Universidade de São Paulo – USP

Instituto de Química de São Carlos – IQSC

Grupo de Química Medicinal & Biológica – NEQUIMED

Pedro Henrique Jatai Batista

**ANÁLISE DO METABOLISMO E ESTABILIDADE DE INIBIDORES DE CISTEÍNO
PROTEASE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR MEIO DE HPLC-UV-MS**

São Carlos – SP

2021

Pedro Henrique Jatai Batista

**ANÁLISE DO METABOLISMO E ESTABILIDADE DE INIBIDORES DE CISTEÍNO
PROTEASE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR MEIO DE HPLC-UV-MS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências.

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos – SP

2021

Pedro Henrique Jatai Batista

**ANÁLISE DO METABOLISMO E ESTABILIDADE DE INIBIDORES DE CISTEÍNO
PROTEASE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR MEIO DE HPLC-UV-MS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências.

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Aprovada em: 12/03/2021

Banca Examinadora

Andrei Leitão

Moacir Rossi Forim

Álvaro José dos Santos Neto

Bárbara Sayuri Bellete

Fernão Castro Braga

São Carlos – SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Batista, Pedro Henrique Jatai

Análise do metabolismo e estabilidade de inibidores de cisteína protease em amostras biológicas por meio de HPLC-UV-MS / Pedro Henrique Jatai Batista.
— São Carlos, 2021.
134 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

1. Metabolismo. 2. Análise de farmacocinética. 3. Permeabilidade. 4. Estabilidade química. 5. Relação estrutura-atividade (SPR). I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8

In memoriam à todas as vítimas de Covid-19

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à essa entidade amiga e protetora que alguns chamam de Deus;

À toda minha família, que sempre deu suporte e apoio nos momentos difíceis e que sempre lutou para que eu pudesse estar onde estou hoje;

A todos os meus amigos que dividiram momentos de alegria e tristeza;

Ao grupo Nequimed pelos anos de companheirismo;

Ao Professor Andrei por ter aceitado o desafio e pela orientação durante o doutorado;

Um agradecimento especial à pesquisadora Patrícia Luísa de Souza Bergo, sem a qual esse trabalho não seria possível;

A todos os professores e funcionários do IQSC, que trabalham arduamente para manter a excelência do instituto;

A todos que diretamente, ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto;

Muitíssimo obrigado.

RESUMO

O estudo de substâncias bioativas é multifacetado e requer que diversos métodos sejam aplicados para identificar um candidato a fármaco. Para doenças negligenciadas como a de Chagas, alvos macromoleculares como a cruzaina são usados para a descoberta de inibidores. Dentre eles, dipeptidil nitrilas inibem a cruzaina e apresentam grande potencial terapêutico. No entanto, os parâmetros farmacocinéticos são de grande relevância e devem ser obtidos para estabelecer relações estrutura-propriedade (SPR) para a permeabilidade, o metabolismo e a estabilidade química. Neste trabalho, a validação do método analítico HPLC-UV de um inibidor sintetizado pelo grupo (Neq0570) é realizada usando o odanacatib como padrão interno, usando a legislação atual da ANVISA. O objetivo é avaliar a estabilidade dos inibidores sintetizados pelo grupo frente às amostras de meio de cultura utilizado em ensaios celulares para duas cepas de *Trypanossoma cruzi* (Y e Tulahuen), além de quantificá-los em amostras reais oriundas dos ensaios celulares. O desenvolvimento do método analítico levou a um gradiente de 15 a 85% de acetonitrila em 14 min, vazão 1,0 mL.min⁻¹, 35 °C, volume de injeção de 5 µL, detecção em 225 nm (Neq0570) e 265 nm (odanacatib). A técnica de preparo de amostras foi a extração líquido-líquido em 3 extrações sequenciais, utilizando o éter metil terc-butilico como solvente extrator na proporção de 1:1. O método apresentou linearidade na faixa de 10-70 ng.mL⁻¹, não apresentou efeito de matriz e nem efeito residual, apresentou também seletividade e acurácia. O método foi capaz de quantificar o composto parental para as duas cepas diferentes, Y e Tulahuen, nos meios extracelular (23% e 22%, respectivamente) e intracelular (43% e 46%, respectivamente). Desta forma, entre 66 a 69% do composto parental estava presente no frasco de cultura após 3 dias de ensaio. Os possíveis metabólitos foram propostos a partir da estrutura química do composto parental. Ao final, avaliou-se a reatividade intrínseca desta substância, e de outros derivados sintetizados pelo grupo. Os resultados alcançados demonstram que a inserção do grupo ciclopropano na Posição P1, de fato aumenta a estabilidade do composto, diminuindo, assim sua reatividade frente a outros alvos dentro da célula. O conjunto de informações reunidas aponta que Neq0570 é um composto matriz (*lead*) adequado para a continuação dos estudos de otimização química de derivados antichagásicos, considerando a gênese planejada de fármacos.

Palavras-Chave: análise da farmacocinética, metabolismo, estabilidade química, permeabilidade, relação estrutura-propriedade (SPR).

ABSTRACT

The study of bioactive substances is a multifaceted subject and requires the application of numerous methods to identify a new candidate. Neglected diseases, as Chagas, are being tackled by the discovery of inhibitors for macromolecular targets, including cruzain. Among these inhibitors, dipeptidyl nitriles promote the cruzain inhibition and present promising therapeutic potential. However, pharmacokinetic parameters must be accessed to determine structure-property relationships (SPR) for permeability, metabolism and chemical stability. Here, the HPLC-UV analytical method of an inhibitor synthesized by the group (Neq0570) is performed using odanacatib as an internal standard, based on the current ANVISA legislation. The objective is to evaluate the stability of the inhibitors synthesized by the group against samples of culture medium used in cell assays for two strains of *Trypanosoma cruzi* (Y and Tulahuen), in addition to quantifying them in real samples from cell assays. The analytical method development led to a gradient from 15 to 85% acetonitrile in 14 min, flow rate 1.0 mL.min⁻¹, 35° C, injection volume of 5 µL and detection at 225 nm and 265 nm for Neq0570 and odanacatib, respectively. The sample preparation technique was liquid-liquid extraction in 3 sequential extractions, using MTBE as a solvent extractor in the proportion of 1: 1. The method showed good linearity in the 10-70 ng.mL⁻¹ range, with no matrix or residual effects, besides showing selectivity and accuracy. The method was able to quantify the parent compound in two different strains, Y and Tulahuen, in extra and intra cellular media. It was also able to identify potential metabolites of the parent compound. Finally, the method allowed the evaluation of intrinsic reactivity for the Neq0570 and the other similar derivatives synthesized by our group. The results achieved demonstrate that the insertion of the cyclopropane group in Position P1, in fact increases the stability of the compound, thus decreasing its reactivity towards other targets within the cell. The set of information gathered points out that Neq0570 is a matrix compound (lead) suitable for the continuation of studies on chemical optimization of antichagasic derivatives, considering the planned genesis of drugs.

Keywords: pharmacokinetic analysis, metabolism, chemical stability, permeability, structure-property relationship (SPR).

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%B	Percentagem de composição da fase móvel
%CV	Coefficiente de Variação Percentual
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise da Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DMSO	Dimetilsulfóxido
d.p.	Desvio padrão
ESI	Eletrospray
FBS	Soro de feto bovino
FMN	Fator de matriz normalizado
g.l.	Graus de liberdade
HPLC-UV-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector UV/Visível e Espectrômetro de Massas
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
LQ	Limite de quantificação
MTBE	Éter metil terc-butílico
m/z	Razão massa-carga
MQ	Média quadrática
p	Probabilidade
PI	Padrão interno
RDC	Resolução da diretoria colegiada
R_s	Resolução
SPE	Extração em fase sólida
SQ	Soma quadrática
t_G	Tempo de gradiente
t_R	Tempo de retenção

Lista de Tabelas

Tabela 1. Potência e seletividade das dipeptidil nitrilas descritas previamente como inibidores da cruzaina e da forma amastigota do <i>T. cruzi</i> (cepa Tulahuen) em relação ao fármaco de referência benzonidazol.	27
Tabela 2. Condições experimentais utilizadas na análise exploratória inicial.	38
Tabela 3. Condições experimentais utilizadas nas análises em modo isocrático.	38
Tabela 4. Novas condições experimentais utilizadas na análise em modo de eluição gradiente.	38
Tabela 5. Condições experimentais utilizadas na avaliação da extração em fase sólida.	39
Tabela 6. Condições experimentais utilizadas na avaliação da extração em fase sólida.	41
Tabela 7. Avaliação do efeito de matriz para o composto Neq0570 (n = 6).	63
Tabela 8. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em meio de cultura RPMI recém-preparado.	64
Tabela 9. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em meio de cultura RPMI incubado a 37°C em atmosfera com 5% de CO ₂ na ausência de células LLCMK2	66
Tabela 10. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK2 contendo amastigotas da cepa Tulahuen	68
Tabela 11. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK2 contendo amastigotas da cepa Y	69
Tabela 12. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em extrato lisado de células LLCMK2 infectadas com amastigotas da cepa Y.	71
Tabela 13. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em extrato lisado de células LLCMK2 infectadas com amastigotas da cepa Tulahuen.	72
Tabela 14. Avaliação da precisão intracorrida para validação do método analítico de quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular.	75
Tabela 15. Avaliação da precisão intercorrida para validação do método analítico de quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular.	76
Tabela 16. Avaliação da exatidão intracorrida para validação do método analítico de quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular.	76
Tabela 17. Avaliação da exatidão intercorrida para validação do método analítico de quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular.	77
Tabela 18. Avaliação da estabilidade da solução primária de NEQ0570 1 μ M após sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento.	78
Tabela 19. Avaliação da estabilidade da solução primária de Odanacatibe (PI) 1 μ mM após sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento.	79
Tabela 20. Análise quantitativa do composto NEQ0570 em meio extracelular.	83
Tabela 21. Contagem de células LLCMK2 viáveis no estudo celular.	84
Tabela 22. Análise quantitativa do composto NEQ0570 em extrato de lisado celular.	88
Tabela 23. Quantificação do número porcentagem de mol do composto NEQ0570 no ensaio celular para a linhagem LLC-MK2 infectada com amastigotas de <i>T. cruzi</i>	89
Tabela 24. Proposta de possíveis metabólitos e/ou produtos de degradação do analito Neq0570.	90
Tabela 25. Tempos de meia-vida para os inibidores sintetizados pelo grupo frente a cisteína.	94

Tabela 26. Tempos de meia-vida para os inibidores sintetizados pelo grupo frente a glutathiona.	95
---	----

Lista de Figuras

Figura 1. Etapas da gênese planejada de fármacos demonstrando os custos e tempo estimado neste processo.....	18
Figura 2. Os processos analíticos e bioanalíticos são aplicados em todas as etapas da gênese planejada de fármacos.	19
Figura 3. Mapa da distribuição da Doença de Chagas pelo mundo.	20
Figura 4. Representação do sítio ativo da enzima, numerção dos subsítios (em preto) e respectiva estrutura genérica de uma dipeptidil nitrila (à direita)	21
Figura 5. Propostas de mecanismos de inibição de peptidil nitrilas frente às cisteíno proteases: (a) mecanismo em duas etapas; (b) mecanismo concertado.	22
Figura 6. Ciclo de vida e transmissão da Doença de Chagas mostrados de forma simplificada, com ênfase nas formas de vida do parasito (T. cruzi).	23
Figura 7. Representação estrutural do inibidor de cisteíno protease que avançou até o final da fase clínica (odanacatib) e de dois fármacos contendo nitrilas em sua estrutura: verapamil (antiarrítmico) e anastrozol (anticâncer de mama).	24
Figura 8. Representação estrutural de derivados de dipeptidil nitrilas (Neq0409 e Neq0570) com atividade antichagásica.	26
Figura 9. Curvas de concentração plasmática média do [14C]odanacatib e radioatividade após aplicação intravenosa de 1 mg/kg em macacos.	28
Figura 10. Demonstração esquemática de processos de permeação celular. Da esquerda para a direita - Transporte transcelular passivo, transporte mediado por receptor, transporte paracelular, efluxo por transporte ativo e transporte com metabolismo na célula.	33
Figura 11. Estruturação esquemática dos trabalhos descritos em relação a análise da estabilidade química e da permeabilidade celular.	36
Figura 12. Cromatogramas referentes à análise exploratória inicial em modo gradiente para o composto Neq0570 (a) e PI (b). Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 5-100% B, 10 min; vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 oC; Detecção: 225 e 265 nm.	47
Figura 13. Cromatogramas referentes à análise exploratória inicial em modo gradiente para o composto Neq0570 com diferentes tG: 20 min (A), 30 min (B)-Neq0570. Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 5-100%	49
Figura 14. Cromatograma referente à nova condição cromatográfica. Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-85% B em 14 min; vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 oC; Detecção: 225 e 265 nm.	50
Figura 15. Representação da fase Strata-X usada para o preparo de amostras por SPE.	51
Figura 16. Cromatogramas referentes à eluição individual de cada etapa realizada na avaliação da SPE. Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-70% B, 11 min; vazão: 0,5 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 oC; Detecção: 200-400 nm.	52
Figura 17. Cromatogramas referentes à condição otimizada para o preparo de amostra por SPE para o composto Neq0570. Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-70% B, 11 min; vazão: 0,5 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 oC; Detecção: 200-400 n.	53
Figura 18. Cromatogramas referentes à otimização do preparo de amostra por LLE para Neq0570, utilizando-se diferentes proporções (v/v) de amostra/solvente extrator: A - 1:1; B - 1:2; C - 1:3 e D - 1:4. Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-70% B.	54
Figura 19. Variação da resposta analítica em função do número de extrações sequenciais realizadas para o analito Neq0570.	55

Figura 20. Comparação das técnicas de preparo de amostra para Neq0570: A - SPE; B - LLE. Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-70% B, 11 min; vazão: 0,5 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35°C; Detecção: 200-400 nm.	56
Figura 21. Resposta analítica em função do comprimento de onda.	57
Figura 22. Avaliação da seletividade do método cromatográfico para o composto Neq0570(A) e Meio de Cultura – RPMI (B). Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-85% B, 14 min; vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 225 nm.	58
Figura 23. Avaliação da seletividade do método cromatográfico para o Padrão Interno (A) e Meio de Cultura – RPMI (B). Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-85% B, 14 min; vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 265 nm.	59
Figura 24. Avaliação do efeito residual para o composto Neq0570. Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-85% B, 11 min; vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 225 nm.	60
Figura 25. Avaliação do efeito residual para o PI. Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-85% B, 11 min; vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 265 nm.	61
Figura 26. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI recém-preparado.	64
Figura 27. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI incubado a 37°C em atmosfera com 5% de CO ₂ na ausência de células LLCMK2.	65
Figura 28. Análise comparativa das curvas de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI recém-preparado e em meio de cultura incubado a 37°C em atmosfera com 5% de CO ₂ na ausência de células LLCMK2.	67
Figura 29. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK2 contendo amastigotas da cepa Tulahuen.	68
Figura 30. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK2 contendo amastigotas da cepa Y.	69
Figura 31. Análise comparativa das curvas de calibração e dos intervalos de confiança para os respectivos coeficientes angulares dos modelos de regressão linear utilizando-se como matrizes meio RPMI recém-preparado, meio RPMI no qual foram incubadas células LLCMK.	70
Figura 32. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em extrato lisado de células LLCMK2 infectadas com amastigotas da cepa Y.	71
Figura 33. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em extrato lisado de células LLCMK2 infectadas com amastigotas da cepa Tulahuem.	72
Figura 34. Análise comparativa das curvas de calibração e dos intervalos de confiança para os respectivos coeficientes angulares dos modelos de regressão linear utilizando-se como matrizes extratos lisados de células LLCMK2 contendo amastigotas das cepas Y e Tula.	74
Figura 35. Cromatogramas obtidos para a análise do meio extracelular no ensaio de metabolismo do composto NEQ0570 em culturas de células LLCMK2 (Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-85% B, 14 min, vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5µL; Temperatura 35°; Detecção: 265 nm.	81

Figura 36. Modelo de regressão linear, gráfico de resíduos e análise de variância da curva de calibração construída a análise quantitativa	82
Figura 37. Cromatogramas obtidos para a análise dos extratos de lisado celular no ensaio de metabolismo do composto NEQ0570 em culturas de células LLCMK2 (Condições cromatográficas: Fase A: H ₂ O; Fase B: ACN; 15-85% B, 14 min, vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ ; Vinjeção: 5μL; Temperatura 35°C; Detecção: 225 e 265 nm).....	86
Figura 38. Modelo de regressão linear, gráfico de resíduos e análise de variância da curva de calibração construída a análise quantitativa	87
Figura 39. Proposta de metabolização do composto parental Neq0570 obtida a partir dos ensaios in vitro.	91
Figura 40. Reações de nitrilas com tióis presentes nas células de mamíferos. a) Reação reversível de uma nitrila com um tiol. b) Reação irreversível de uma nitrila com cisteína.....	93
Figura 41. Decaimento exponencial da área dos inibidores sintetizados pelo grupo frente a cisteína, medido por HPLC-UV.	96
Figura 42. Decaimento exponencial da área dos inibidores sintetizados pelo grupo frente a glutathione, medido por HPLC-UV.	97
Figura 43. Perfil de decaimento exponencial do fármaco nilvadipina com cisteína.	98
Figura 44. Perfil de decaimento exponencial com cisteína para os inibidores K777 e Neq0682.	99
Figura 45. Cromatogramas contendo os brancos das amostras estudadas para cada composto.....	100

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	A gênese planejada de fármacos	17
1.2	Os processos analíticos na gênese de fármacos	18
1.3	A Doença de Chagas	19
1.4	Os inibidores de cisteíno proteases como antichagásicos	20
1.5	Aplicação dos processos analíticos no estudo farmacocinético de inibidores de cisteíno proteases	27
1.6	Relevância dos estudos <i>in vitro</i> e aplicação analítica para estudo de permeabilidade e estabilidade/metabolismo de substâncias químicas	29
2.	Objetivos	34
2.1	Objetivo geral	34
2.2	Objetivos específicos desta etapa do trabalho	34
3.	Materiais e métodos	36
3.1	Estudo quantitativo para o composto Neq0570	36
3.1.1	Solventes e reagentes	36
3.1.2	Procedimentos experimentais	37
3.1.3	Otimização do método analítico	37
3.1.4	Preparo de amostra	38
3.1.5	Validação do método analítico	40
3.1.6	Aplicação do Método em amostras de Meio de Cultura RPMI1640 usado nos Ensaios Celulares para as Cepas Y e Tulahuen	43
4.	Resultados e discussão	47
4.1	Otimização do método analítico	47
4.2	Preparo de amostra	50
4.2.1	Extração em fase sólida (SPE)	51
4.2.2	Extração líquido-líquido (LLE)	53
4.3	Validação do método analítico	57
4.3.1	Seletividade	57
4.3.2	Efeito residual	59
4.3.3	Efeito de matriz	61
4.3.4	Curva de calibração	63
4.3.5	Precisão e Exatidão	75
4.3.6	Estabilidade do analito em matriz biológica	77
		15

4.4	<i>Aplicação do método analítico no estudo do metabolismo do composto NEQ0570 em células LLCMK2 infectadas com amastigotas de T. cruzi.</i>	79
4.4.1	<i>Análise quantitativa do composto NEQ0570 em meio extracelular</i>	79
4.4.2	<i>Análise quantitativa do composto NEQ0570 em extrato de lisado celular</i>	83
4.4.2.1	<i>Determinação do número médio total de células LLCMK2 no estudo celular</i>	84
4.4.2.2	<i>Quantificação do composto NEQ0570 no extrato de lisado por HPLC-UV</i>	84
5.	<i>Conclusão</i>	101
6.	<i>Referências</i>	103
7.	<i>Anexo</i>	109

1. INTRODUÇÃO

1.1 A gênese planejada de fármacos

Novas substâncias químicas bioativas com interesse farmacológico são continuamente descobertas e desenvolvidas em projetos onde é necessário aplicar uma série de conhecimentos e áreas de trabalho de forma integrada, portanto tornando este um fenômeno multi-, inter- e transdisciplinar (HUGHES *et al.*, 2011).

Estimativas recentes apontam que mais de 2 bilhões de dólares e 12 a 15 anos são necessários em média para a pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco (**figura 1**) (BLOGS.SCIENCEMAG.ORG). Tem-se relacionado o aumento dos custos e tempo à maior complexidade das doenças estudadas (como é o caso de tipos de câncer resistentes ou a dificuldade no delineamento de alvos eficazes para doenças neurodegenerativas, por exemplo). A gênese planejada de fármacos, LEITÃO; MONTANARI; MONTANARI, 2011, envolve uma estratégia de análise integrada dos dados físico-químicos e biológicos desde os primórdios da fase de identificação do ligante e obtenção do composto líder (*hit-to-lead*). Os compostos identificados inicialmente apresentam propriedades físico-químicas e biológicas que devem ser otimizadas visando obter novos derivados mais potentes, seletivos e seguros. Desta forma, uma grande gama de ensaios *in vitro* é atualmente empregada, apresentados de forma breve a seguir:

- Uso do alvo macromolecular isolado ou em cocomplexos de proteínas: que podem incorporar estudos de cinética enzimática e termodinâmicos por microcalorimetria, ressonância de superfície de plasma, fluorescência, cristalografia de raios X, criomicroscopia eletrônica, ressonância magnética nuclear, dentre outros. A macromolécula pode estar na forma nativa ou possuindo mutações;
- Análise do alvo macromolecular em ensaio celular: a atividade da macromolécula pode ser estudada diretamente ou a sua via de sinalização celular por meio de uma série de métodos (usualmente) colorimétricos e fluorimétricos;
- Há ainda o estudo onde o alvo macromolecular não é conhecido, sendo então desenvolvidos ensaios celulares e em modelos em animais para o teste de substâncias bioativas e o planejamento baseado na estrutura do ligante (LBDD) é desenvolvido.

Estudos relacionando o tipo de inibição do alvo com a resposta celular também são importantes para fundamentar uma hipótese do mecanismo de ação da substância de interesse, com a descrição desde o seu nível molecular, até o seu contexto mais complexo em uma célula.

Nesta etapa, a química medicinal, LOMBARDINO; LOWE, 2004, se insere na descoberta e otimização da estrutura química, com estudos de relação estrutura-propriedade (SPR) e estrutura-atividade (SAR). As modificações das estruturas químicas são planejadas de acordo com a evolução destas substâncias ao longo de cada etapa, que também envolvem análises computacionais por meio de métodos em quimio- e bioinformática. No Grupo de Química Medicinal & Biológica (NEQUIMED) este estudo está baseado na estruturação de uma hipótese inicial, que irá guiar a síntese dos novos derivados. Estes são então testados em modelos envolvendo as enzimas de interesse, além de seus respectivos modelos celulares. A partir dos resultados alcançados completa-se o ciclo de planejamento-síntese-teste, com avaliação da hipótese inicial e proposição de modificações a este e retomada do ciclo de estudo.

No entanto, a atividade farmacológica, que engloba a farmacodinâmica do processo, constitui somente uma das propriedades de interesse. Ainda há a necessidade de estudar a farmacocinética e a atividade tóxica, que tem sido cada vez mais estudada usando ensaios celulares.

Figura 1. Etapas da gênese planejada de fármacos demonstrando os custos e tempo estimado neste processo.

Fonte: Adaptado de ROSES, 2008.

1.2 Os processos analíticos na gênese de fármacos

Ao longo de todo o processo de estudos *in vitro* e *in vivo*, faz-se necessário aplicar os processos analíticos e bioanalíticos em um amplo escopo de atividades (**figura 2**) (PANDEY *et al.*, 2010)

Figura 2. Os processos analíticos e bioanalíticos são aplicados em todas as etapas da gênese planejada de fármacos.

Fonte: autoria própria.

Os resultados advindos dos estudos analíticos são essenciais para a análise de qualquer novo candidato a fármaco pelas agências regulamentadoras. No país, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe de dispositivos e normas para tal, como a RDC 166/2017 para produtos farmacêuticos (usada também para complementar os parâmetros analíticos das normas anteriores), e RDC 27/2012 para processos bioanalíticos. Estas resoluções estão em conformidade com agências de outros países (*Food and Drug Agency Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*, nos EUA) ou continentes (*European Medicines Agency* 192217/2009, na Europa). Estes guias são usados em todos os estudos que envolvam análise de material biológico para o estudo de novos compostos bioativos.

Neste trabalho, o método analítico é aplicado em compostos bioativos, que são dipeptidil nitrilas inibidoras de cisteíno proteases que apresentaram atividade antichagásica. O estudo é baseado em modelos *in vitro* celulares. Desta forma, uma contextualização geral do tema é apresentada nos próximos tópicos, com subsequente definição da aplicação analítica.

1.3 A Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma doença negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de setenta milhões de pessoas em todo o mundo estão em risco de serem infectadas com o parasito e desenvolverem a doença (**figura 3**).

Figura 3. Mapa da distribuição da Doença de Chagas pelo mundo.

Fonte: Adaptado de DNDIAL.ORG, 2020.

De acordo com o *Drug for Neglected Diseases initiative* (DNDi), a Doença de Chagas é endêmica de 21 países da América Latina, e cerca de seis milhões de pessoas estão infectadas. Estima-se que haja cerca de 14.000 mortes por ano nessa região (**figura 3**).

A doença de Chagas foi descrita inicialmente pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909 e é transmitida pela passagem, através da picada, das fezes ou urina do inseto vetor, popularmente conhecido como barbeiro (*Triatoma infestans*) (AVELAR *et al.*, 2015).

A doença de chagas apresenta dois estágios clínicos distintos: a Fase crônica e a Fase aguda. Durante a fase aguda, a maior parte dos pacientes não apresenta nenhum sintoma. Com o passar do tempo, erupções de pele, nódulos inflamatórios, febre, dor de cabeça, gânglios linfáticos aumentados, náuseas, entre outros sintomas podem durar de dois a quatro meses. Após a fase aguda, o paciente entra em uma fase crônica indeterminada, que pode durar até décadas. O parasito ainda se encontra presente em tecidos e órgãos, ainda que o paciente não apresente qualquer sintoma. Ele ainda pode transmitir a doença. Para cerca de 40% dos infectados, a doença evolui para um quadro clínico onde danos cardíacos (normalmente associados a morte súbita, ou insuficiência cardíaca progressiva) são detectados. Ainda pode ocorrer o alargamento do trato e órgãos gastrointestinais, além de transtornos motores gastrointestinais (DNDIAL.ORG, 2020).

1.4 Os inibidores de cisteíno proteases como antichagásicos

As cisteíno proteases são enzimas responsáveis pela quebra da ligação peptídica. Elas são essenciais durante todo o ciclo de vida de parasitos, como o *Trypanosoma cruzi*. Dentre as cisteíno proteases expressas no *T. cruzi*, a cruzipaina é que apresenta maior relevância, tanto em termos funcionais quanto de quantidade presente (BRANQUINHA *et al.*, 2015).

Vários tipos de inibidores de cisteíno proteases são descritos na literatura. No entanto, tem-se majoritariamente o estudo de inibidores derivados de peptídeos com um grupo reativo que interagem no sítio ativo da enzima e seus respectivos subsítios, conforme demonstrado na **figura 4**.

Figura 4. Representação do sítio ativo da enzima, numeração dos subsítios (em preto) e respectiva estrutura genérica de uma dipeptidil nitrila (à direita)

Fonte: Retirado de AVELAR *et al.*, 2015.

O sítio ativo das cisteíno proteases é composto por uma díade catalítica, onde o tiol da cisteína está presente na sua forma reativa (tiolato) a partir da protonação de uma histidina. O ataque nucleofílico do tiolato ao carbono mais eletrofílico da nitrila constitui o primeiro passo da reação. Em seguida, ocorre a protonação do átomo de nitrogênio pelo resíduo de histidina presente na vizinhança.

Existe também uma segunda rota mecanística que sugere um processo concertado, no qual, ocorre simultaneamente o ataque nucleofílico e a transferência do próton da histidina adjacente (DOS SANTOS *et al.*, 2018) (**figura 5**).

Figura 5. Propostas de mecanismos de inibição de peptidil nitrilas frente às cisteíno proteases: (a) mecanismo em duas etapas; (b) mecanismo concertado.

Fonte: Adaptado de DOS SANTOS *et al.*, 2018

Estas enzimas são importantes em diversos processos patofisiológicos no ser humano e em parasitos. No último caso, a cruzipaína é importante para a remodelação do parasito da forma não infectante e replicativa (epimastigota) para a infectante não replicativa (tripomastigota) no inseto vetor. Além disso, ela controla o processo de invasão da forma tripomastigota nas células hospedeiras do mamífero infectado, para que haja a produção da forma intracelular replicativa (amastigota). Devido ao elevado número de parasitos no interior da célula, a célula hospedeira se rompe e leva aos efeitos observados nos humanos (especialmente problemas cardíacos devido à morte dos cardiomiócitos). Neste processo de ruptura, as amastigotas são novamente transformadas em tripomastigotas para retomar o ciclo, como mostrado na **figura 6**.

Figura 6. Ciclo de vida e transmissão da Doença de Chagas mostrados de forma simplificada, com ênfase nas formas de vida do parasito (*T. cruzi*).

Fonte: Autoria própria.

Tem-se na literatura diversos exemplos de substâncias inibidoras de cruzipaina (ou de sua sequência truncada denominada cruzaina), usadas nos estudos bioquímicos que apresentam potencial atividade antichagásica (SILVA, Daniel G. *et al.*, 2017). Os compostos bioativos que atuam como inibidores destas cisteína proteases usualmente interagem no sítio ativo e competem com o substrato, como é descrito para substâncias que somente formam interações intermoleculares. Outros inibidores formam uma ligação covalente reversível com a cisteína, que é lábil e retorna ao estado inicial, como é o caso das dipeptidil nitrilas mencionadas previamente (Figura 5). Há ainda os inibidores covalentes irreversíveis com o sítio ativo, que não são competitivos, pois inativam a enzima, sendo neste caso, o K11777 um exemplo (SAJID *et al.*, 2011). É observado que inibidores que não formam ligações covalentes normalmente apresentam baixa potência, ao passo que inibidores que formam ligações covalentes irreversíveis apresentam problemas de toxidez devido à inativação de outras substâncias, o que é conhecido como efeito *off-target* (BEAULIEU *et al.*, 2010).

Diante do exposto, o grupo NEQUIMED tem optado por estudar derivados de dipeptidil nitrilas (AVELAR *et al.*, 2015), que apresentam um perfil farmacológico e toxicológico adequados. A nitrila, como mencionado anteriormente, é o *warhead* comumente descrito em moléculas bioativas. Devido à sua reatividade moderada, este grupo funcional está presente em

várias substâncias em uso clínico, sendo computados 19 fármacos no DrugBank (dois exemplos são mostrados na **figura 7**).

Figura 7. Representação estrutural do inibidor de cisteína protease que avançou até o final da fase clínica (odanacatib) e de dois fármacos contendo nitrilas em sua estrutura: verapamil (antiarrítmico) e anastrozol (anticâncer de mama).

Fonte: retirado e modificado das bases de dados ChEMBL e DrugBank.

O odanacatib (ou odanacatibe, Figura 7) foi um candidato a fármaco estudado para o tratamento da osteoporose, com mecanismo de ação baseado na inibição da enzima catepsina K (uma cisteína protease que controla o processo de reabsorção óssea) (DRAKE *et al.*, 2017). Contudo, esse derivado pode se acumular nos lisossomos e provocar uma inesperada atividade frente à catepsinas, como a B, L e F. Beulieu *et al* 2010 também menciona que a inserção de um grupo básico na estrutura do odanacatib melhora a atividade deste e reduz a concentração dos parasitos no sangue.

Outros autores relatam a atividade de derivados de peptídeos que contêm nitrila como sítios reativos (denominados de *warheads*) frente à catepsinas. A inserção de um átomo de cloro na fenilalanina da posição P2 (**figura 4**) em derivados de dipeptidil nitrilas melhora a seletividade destes compostos frente às catepsinas K e L (ASAAD *et al.*, 2009). Já a inserção de um grupo fluorófilo no aminoácido da posição P2 aumenta a seletividade para a catepsina B e K, enquanto que diminui a atividade para as catepsinas L e S, uma vez que essas enzimas preferem grupos volumosos na posição P2 (FUSTERO *et al.*, 2011). A otimização das posições P2 e P3 levou a potência da ordem de nanomolar de um derivado de dipeptidil nitrila frente a catepsina B (GREENSPAN *et al.*, 2001).

A eficácia *in vitro* de inibidores reversíveis frente à cruzipaina, bem como a sua biodisponibilidade oral em estudos *in vivo* foram alvos de vários autores ao longo da última década. Além disso, é descrito que as propriedades farmacocinéticas dessa classe de substâncias são adequadas ao organismo humano (NDAO *et al.*, 2014).

O uso de derivados de dipeptidil nitrilas se estende a outras doenças que também possuem cisteína proteases como alvo macromolecular. Vários compostos dessa classe mostraram seletividade para a falcipaina-2, uma cisteína protease essencial para o parasito da

malária (EHMKE *et al.*, 2011). Uma série de peptídeos contendo nitrilas como *warhead* foi testada contra rodesaína, a principal cisteíno protease do *Trypanosoma brucei*, agente causador da doença do sono, e valores de EC₅₀ na ordem de micromolar foram obtidos após 72 h de incubação (SCHIRMEISTER *et al.*, 2017).

O processo de inibição pode ser tempo-dependente. Mesmo para compostos otimizados com seletividade suficiente em painéis de triagem de cisteíno proteases, o efeito *off-target* pode ser significativo após uma exposição prolongada (CIANNI *et al.*, 2019). A meia-vida ($t_{1/2}$) para a reação de inibidores com glutathione (GSH) ou cisteína, por exemplo, fornece informações sobre sua eletrofilicidade e labilidade (LONSDALE *et al.*, 2017). A comparação dos dados de $t_{1/2}$ em uma variedade de compostos com diferentes *warheads* pode propiciar informações úteis para a modelagem de novos compostos dentro com reatividade e seletividade desejadas (MACFAUL; MORLEY; CRAWFORD, 2009).

Ang *et al.*, 2011 descrevem a ação de compostos com diferentes grupos reativos frente a vários alvos macromoleculares distintos. Entre os grupos testados estavam as nitrilas, os ceto-heterociclos, hidróxi/alcóxi-cetonas, vinilsulfonas entre outros. Essa biblioteca de compostos foi testada contra falciparina-2, falciparina-3, rodesaína, cruzaina e cathepsina B. Inibidores irreversíveis, como as vinilsulfonas se mostraram tempo-dependentes e irreversíveis, enquanto os reversíveis, como as nitrilas, não mostraram dependência do tempo.

Além disso, outros grupos reativos de natureza não-peptídica também são descritos ROCHA *et al.*, 2018, como tiazóis e tiosemicarbazonas, epóxi-ésteres, aminoquinilinas, entre outros.

Hidrazonas, dicetopiperazinas e macrociclos de origem natural (como aquelas presentes em esponjas marinhas), também são citados como inibidores não-peptídicos de cisteíno proteases, como cruzaina e rodesaína (DA SILVA *et al.*, 2016).

Neste trabalho, a dipeptidil nitrila codificada como Neq0570 é estudada (**figura 8**). Esta substância apresenta uma estrutura química simplificada em relação ao odanacatib. Atualmente derivados do odanacatib estão sendo estudados para minimizar os problemas cardíacos identificados após mais de uma década de estudos clínicos em idosos. Este longo tempo de estudo é necessário devido ao uso crônico da substância para a osteoporose. Isto é distinto, para um antiparasitário, que deve ser administrado por um pequeno intervalo de tempo para o tratamento da doença.

Figura 8. Representação estrutural de derivados de dipeptidil nitrilas (Neq0409 e Neq0570) com atividade antichagásica.

Fonte: autoria própria.

Em nosso grupo de estudo, o composto Neq0570 e o próprio odanacatib, dentre vários outros derivados de dipeptidil nitrilas, demonstraram possuir atividade inibitória para a cruzaina e são ativos em ensaios celulares usando cepas do *T. cruzi* (**tabela 1**). No entanto, embora sejam potentes inibidores da cruzaina no ensaio bioquímico, não há correspondência com a morte do parasito nos ensaios celulares. Desta forma, é necessário estudar as propriedades destas substâncias no ambiente do ensaio celular para observar quais fenômenos podem estar relacionados à falta de correlação observada nos ensaios realizados pelo grupo ao longo da série de dipeptidil nitrilas e derivados.

Tabela 1. Potência e seletividade das dipeptidil nitrilas descritas previamente como inibidores da cruzaina e da forma amastigota do *T. cruzi* (cepa Tulahuen) em relação ao fármaco de referência benzonidazol.

Composto	K _i (cruzaina) (μM)	EC ₅₀ (amastigota) (μM)	CC ₅₀ (LLCMK2) (μM)	SI
Neq0409	0,50(0,037)	126	> 250	> 2
Neq0570	0,25(0,019)	126	> 250	> 2
Odanacatib	0,13(0,029)	2,5(0,052)	31(4)	12
Benzonidazol	-	1,9	353(3,70)	186

K_i = constante de inibição na enzima cruzaina. EC₅₀ = concentração do composto necessária para levar a morte de 50% dos parasitos na forma amastigota (intracelular) do *T. cruzi*. CC₅₀ = concentração do composto necessária para levar a morte de 50% das células hospedeiras LLCMK2. SI = índice de seletividade calculado para CC₅₀/EC₅₀. Os valores entre parêntesis são os erros padrão. Dados retirados de (AVELAR *et al.*, 2015) e (BURTOLOSO *et al.*, 2017).

1.5 Aplicação dos processos analíticos no estudo farmacocinético de inibidores de cisteíno proteases

Conforme mencionado, o odanacatib tem sido o derivado de dipeptidil nitrila mais avançado recentemente estudado, alcançando a fase clínica 3, sendo que este será usado para ilustrar uma das aplicações do processo analítico, que é a análise farmacocinética deste. No estudo realizado *in vivo*, o odanacatib foi avaliado usando isótopo de carbono (C¹⁴) para analisar por meio de HPLC-MS a farmacocinética e identificação dos metabólitos em três espécies de animais (**figura 9**) (KASSAHUN *et al.*, 2011).

As reações de oxirredução são as mais comumente identificadas nas reações de metabolismo *in vivo*, com uma grande gama de enzimas do citocromo P450 dentre outras envolvidas no processo (FOTI; DALVIE, 2016). Usualmente as reações de metabolismo são divididas em 2 fases, onde a primeira engloba majoritariamente reações de oxirredução, enquanto a de segunda fase envolve as reações de conjugação como a glicuronidação. Embora esta terminologia leve a percepção de que uma ocorra somente após a outra, isto não é necessariamente correto (JOSEPHY; GUENGERICH; MINERS, 2005).

No caso da permeabilidade, este é um parâmetro *in vitro* aplicado para a compreensão ou extrapolação da absorção *in vivo* (AVDEEF, 2012). Além disto, ela é importante para todos

os processos que envolvem a passagem da substância bioativa do meio extra para o intracelular, influenciando diretamente na concentração da substância no local de ação, dado como o potencial de interação com o alvo (*Target Engagement Potential* – TEP) (DURHAM; BLANCO, 2015).

Figura 9. Curvas de concentração plasmática média do [¹⁴C]odanacatib e radioatividade após aplicação intravenosa de 1 mg/kg em macacos.

Fonte: adaptado de KASSAHUN *et al.*, 2011.

Além dos estudos *in vivo*, cada vez mais têm sido aplicados ensaios *in vitro*, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento de compostos bioativos, que será tópico do próximo item.

Neste trabalho, é realizada a avaliação *in vitro* em matriz celular e nas células hospedeiras infectadas com o parasito, uma vez que a substância Neq0570 é um antiparasitário. Portanto, uma análise similar aos estudos realizados *in vivo* é aplicada para os ensaios *in vitro*. Os ensaios *in vitro* têm ganhado relevância cada vez maior devido à necessidade de substituição dos ensaios *in vivo* para novas substâncias bioativas. Desta forma, o presente estudo irá abordar a análise das concentrações da dipeptidil nitrila (Neq0570) usando esta matriz biológica para sua quantificação no meio extracelular e no meio intracelular. Além disto, outros ensaios foram aplicados ao longo do doutorado para analisar quantitativamente e qualitativamente outras propriedades, como a reatividade e a entrada do composto em células e são abordados neste trabalho.

1.6 Relevância dos estudos *in vitro* e aplicação analítica para estudo de permeabilidade e estabilidade/metabolismo de substâncias químicas

A redução dos estudos usando animais tem levado cada vez mais a busca de alternativas para testes de novas substâncias bioativas. Esta tendência tem sido observada ao longo dos anos, desde o banimento de ensaios para determinar a dose letal em 50% dos animais (LD₅₀), criação dos Comitês no Uso de Animais (CEUA) subordinados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (WWW.MCTIC.GOV.BR) e banimento de uso de animais para estudo de cosméticos. Há também uma extensão à formação educacional, com redução ou completa remoção do uso de animais nos cursos de graduação.

Como uma alternativa, os ensaios celulares têm sido usados para a aplicação de uma série de estudos dos novos compostos químicos, com estudos considerados clássicos como o de permeabilidade usando células de intestino (Caco-2 e MDCK) (VOLPE, 2011), até o desenvolvimento de plataformas de cultura tridimensional e acoplamento de modelos de perfusão usando microfluídica (BHATIA; INGBER, 2014). Comissões específicas para avaliar ensaios celulares como alternativas ao uso de animais foram criadas há décadas nos Estados Unidos (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods - ICCVAM*) (NTP.NIEHS.NIH.GOV) e na Europa (*European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing - EURL ECVAM*) (EC.EUROPA.EU) (BALLS, 1994). Desta forma, os ensaios celulares têm sido usados com a finalidade de levar a uma redução da quantidade de ensaios *in vivo*, com vários trabalhos abordando a questão da extrapolação *in vitro* para *in vivo* (IVIVE) que tem suscitado estudo das agências reguladoras (BELL *et al.*, 2018).

Neste contexto, os métodos analíticos e as técnicas empregadas para avaliar as propriedades farmacocinéticas continuam sendo importantes nos ensaios *in vitro*, sendo HPLC-UV-MS um sistema hifenado com amplo uso para matrizes biológicas. O sistema HPLC-UV foi o escolhido para ser aplicado ao ambiente celular (no caso do meio intracelular), e do meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino neste trabalho. Assim, a legislação da ANVISA (RDC 27/2012) foi adaptada para aplicação dos estudos neste trabalho. Além disto, o mesmo tipo de sistema foi estruturado para ensaios com análise de derivados de dipeptidil nitrilas nos estudos de estabilidade química.

Uma busca na plataforma de dados Scifinder, desenvolvida pelo Chemical Abstract Service (CAS) e acessada pelo acervo da CAPES em novembro de 2019, mostrou que o termo “*bioanalysis*” como termo de busca levou a descrição de 3645 artigos. Refinando-se a busca

para todos os artigos que utilizaram LC-MS nas pesquisas, o número reduziu para 706 artigos. Dentre estes, 243 continham análises de estabilidade e/ou metabolismo de substâncias, sendo 158 descritos somente nos últimos 10 anos.

Pôde-se classificar os trabalhos de acordo com o objetivo principal de cada um. Os artigos que abordavam estudos clínicos figuravam cerca de 25%. Aqui, chamou atenção a quantidade de artigos de revisão (foram incluídos nessa categoria os capítulos de livros que tratavam de bioanálises e que continham o tópico de LC-MS), que representavam cerca de 32%. Os artigos de proteômica somavam 5%, enquanto os que analisaram e caracterizaram interferentes em análises por LC-MS perfaziam 4%. Os artigos que tiveram como objetivo principal relatar o desenvolvimento e validação de um método analítico somaram cerca de 19%. As publicações que tratavam exclusivamente de metabolômica somavam 8%, e os que se dedicavam ao preparo da amostra foram cerca de 7%. Apenas um artigo descrevia um estudo sobre lipidômica [(HINTERWIRTH *et al.*, 2013)].

Também foi possível quantificar os resultados referentes aos Limites de Detecção e Quantificação reportados pelos autores. Cerca de 75% dos trabalhos relataram LOQ e LOD entre 0,01 e 100 ng/mL. Os artigos que relataram valores entre 0,1 e 10 µg/mL somaram cerca de 23%, e apenas 2% relataram valores na ordem de pg/mL.

Com relação ao tipo de equipamento utilizado nos trabalhos, quase a totalidade dos artigos usou HPLC de forma convencional ou UHPLC. No caso de sistema hifenado, os espectrômetros de massa mais utilizados foram os que continham um triplo quadrupolo como analisador (cerca de 63%) e a fonte de ionização por eletrospray (cerca de 72%). Os outros equipamentos descritos foram os que utilizavam analisador de Tempo de Voo (cerca de 20%), orbitrap e ion trap (cerca de 6% cada) e single quadrupolo (4%, aproximadamente). Em relação às fontes de ionização também foram descritas a Turbospray (cerca de 20%). Os outros 8% são divididos entre a Tubo V[®], MALDI, APCI e nano-ESI.

A técnica de LC-MS/MS tem sido uma técnica muito empregada para o uso de detecção e quantificação de fármacos e metabólitos por mais de duas décadas. Apesar disso, o estudo de separação/detecção/quantificação de pequenas substâncias e seus metabólitos é dependente muito do objetivo e da matriz do estudo. Os parâmetros a serem ajustados para a análise variam de acordo com a necessidade de cada trabalho, e envolvem o conhecimento do tipo de amostra (TAN; FANARAS, 2018) em seus estudos de caso.

Além desse aspecto, a própria complexidade da amostra e/ou matriz é outro fator determinante. Além de substâncias aquirais e seus metabólitos, esses sistemas podem conter muitas substâncias quirais. Tudo isso pode dificultar muito o trabalho do pesquisador.

Os produtos de metabolismo e degradação podem ser inclusive, os maiores interferentes e causadores de perda de acurácia nas análises por LC-MS. De acordo com YUAN; JI, 2018 um pico desconhecido, e posteriormente identificado, foi detectado no modo de análises MRM quando um pró-fármaco foi analisado em plasma de ratos e macacos, apenas para citar um exemplo dentre os vários casos do tipo. De acordo com o autor, os interferentes metabólicos podem ser resultado de várias rotas possíveis e constituem um desafio adicional na quantificação de pequenas substâncias. Uma otimização do método, como mudança da fase estacionária ou pH da fase móvel, pode contornar essa situação. A espectrometria de massas de alta resolução, geralmente, consegue identificar interferentes metabólicos que não são bem resolvidos cromatograficamente (YUAN; JI, 2018).

Meiss *et al* 2016 também usou um sistema hifenado de LC-MS para quantificar biomarcadores para diabetes melitus tipo 2 e os metabólitos oriundos das possíveis rotas metabólicas associadas a essa desordem. Um total de 74 compostos pôde ser quantificado com limites variando entre 0,1 e 48 μ M. Além de ajudar na compreensão das rotas metabólicas já descritas na literatura.

O preparo da amostra desempenha um papel importante e crucial nesse tipo de pesquisa. Como em muitos casos, a precipitação de proteínas, a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida são as técnicas mais utilizadas. Como ressaltado, o estudo de preparo de amostra vem crescendo cada vez mais, com técnicas miniaturizadas e/ou automatizadas ganhando espaço. Meng *et al* (2017) utilizaram um sistema robótico (NIMBUS®, Hamilton Company) para preparar amostras de fármacos para a quantificação em plasma humano. Um preparo de amostra adequado associado a um método otimizado, fornece limites de quantificação na ordem de ng/mL na maioria dos casos. E os campos de aplicação são muitos, de análise de fármacos e seus metabólitos ao monitoramento de agrotóxicos.

Os métodos analíticos envolvem o uso do sistema hifenado HPLC-UV que pode ser também aplicado com MS para o estudo das dipeptidil nitrilas descritas anteriormente. Este estudo está baseado na quantificação destas substâncias e identificação de possíveis metabólitos e produtos de degradação usando um modelo *in vitro* no qual o meio de cultura é usado como mimético da matriz biológica *in vivo* (como o plasma), uma vez que este apresenta constituintes presentes no soro, inclusive sendo comumente suplementado com 10% de soro bovino. Assim, uma análise análoga foi realizada em uma primeira etapa, com padronização e validação dos compostos usando o meio de cultura.

A dipeptidil nitrila (Neq0570) apresenta interesse para ser estudada de forma mais aprofundada. A principal característica desse composto é a introdução do ciclopropano na

posição P1 (Figura 4), pois é descrito na literatura que este grupo funcional protege o carbono da nitrila do ataque nucleofílico de outras substâncias. Consequentemente, a hipótese inicialmente estabelecida é que Neq0570 seja menos reativo do que análogos que não possuem o ciclopropano e, em última análise, poderia levar a um menor efeito *off-target* (RUDMANN, 2013). No entanto, não há uma descrição de qualquer outra propriedade deste tipo de composto na literatura a não ser a potência (Tabela 1), o que torna necessário realizar a caracterização destas substâncias em um sistema biológico de interesse. Inicialmente, o sistema usado envolve a análise destes compostos em uma cultura de células *in vitro*, como apresentado na Tabela 1. De acordo com a hipótese previamente formulada, espera-se que Neq0570 tenha um perfil de estabilidade química (ou metabolismo) igual ou melhor do que outras substâncias que não possuem substituinte na posição P1, como é o caso do composto Neq0409 (Figura 4 e Figura 8).

Neste trabalho, a técnica de HPLC-UV-MS foi usada para analisar o composto parental em ensaios de estabilidade química usando a cisteína e a glutatona para observar o seu decaimento com o tempo em um estudo de cinética química. Este tipo de estudo é aplicado para compostos que apresentam grupos reativos para determinar se estes podem avançar ou não para as próximas fases do desenvolvimento de novos compostos bioativos, uma vez que a glutatona é um importante composto usado para o balanço de espécies reativas de oxigênio (ROS) presente em elevada concentração no interior da célula. Além disto, a cisteína é um aminoácido abundante na célula, que é um precursor da glutatona e está presente na composição de várias proteínas, inclusive no sítio ativo das cisteíno proteases (Batista & Bonatto et al, 2020).

No caso específico dos compostos contendo nitrilas, estudos prévios descrevem métodos capazes de predizerem *in vitro* se um novo composto deve proceder ou não às próximas fases devido à sua reatividade. Tem-se como exemplo o trabalho realizado por Macfould et al. 2009, onde o composto de referência usado foi a nilvadipina, que é um fármaco usado para tratamento de hipertensão que possui uma nitrila ligada a um anel heteroaromático. Conforme descrito pelos autores, a reatividade foi analisada de forma comparativa com este fármaco de referência, o que foi considerada uma análise bem conservadora, especialmente por usar um fármaco otimizado como um valor de corte para a reatividade do grupo ciano. Berteotti, et al. 2014 realizaram uma análise relacionando a reatividade (dada pelo $t_{1/2}$ da cinética de reação) e a barreira de energia para atingir o estado de transição predita usando cálculos por DFT.

Nos estudos de permeabilidade com o meio extracelular e a matriz celular, foi usado HPLC-UV para realizar inicialmente uma análise qualitativa para alguns compostos, seguido de uma quantificação para o composto Neq0570.

Deve-se levar em consideração que existem diferentes formas de permeação celular, conforme mostrado na **figura 10**. Dentre estas distintas formas, a permeabilidade passiva é a mais comumente observada para os fármacos, onde o composto bioativo atravessa a membrana a partir do hidrofílico-lipofílico existente na molécula. O transporte paracelular somente ocorre para moléculas com baixa massa molecular. Espera-se que este seja o caso também para os compostos derivados de dipeptidil nitrilas.

Figura 10. Demonstração esquemática de processos de permeação celular. Da esquerda para a direita - Transporte transcelular passivo, transporte mediado por receptor, transporte paracelular, efluxo por transporte ativo e transporte com metabolismo na célula.

Fonte: adaptado de Balimane e Chong, 2005.

Várias técnicas por HPLC em modo reverso (RP-HPLC) podem ser usadas para determinar a permeabilidade celular considerando o modo passivo. Um exemplo aplicado consiste no uso de um componente de membrana como fase estacionária visando ter propriedades biomiméticas à membrana celular, denominada como Membrana Artificial Imobilizada (IAM), para que o $\log K_w$ seja usado como parâmetro para a predição da permeabilidade passiva. Este tipo de estudo tem sido usado por diversos trabalhos na literatura, inclusive em nosso grupo de pesquisa (Gomes et al, 2019; Santoro et al., 2016).

Como há a possibilidade de que os compostos tenham mais de um tipo de transporte e para usar um modelo mais próximo do observado *in vivo*, optou-se por realizar este ensaio usando a linhagem de célula hospedeira de macaco Rhesus LLC-MK2. Esta linhagem é aplicada

nos ensaios de infecção por cepas do *T. cruzi* em colaborações envolvendo o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), sob a coordenação do Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque.

Além do estudo quantitativo, análises qualitativas também podem ser realizadas para identificar compostos que tenham alguma permeabilidade celular. Neste caso, pode-se analisar somente a área sob a curva (AUC) do pico cromatográfico para o composto de interesse, nas condições adequadas de análise.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar a permeabilidade, a estabilidade e a reatividade *in vitro* dos inibidores de cisteíno proteases sintetizados pelo grupo em amostras de meio de cultura RPMI1640 oriundas de ensaios celulares usando as técnicas de HPLC-UV e HPLC-MS visando a proposição de modificações químicas para otimização das propriedades analisadas

2.2 Objetivos específicos desta etapa do trabalho

Os estudos estão divididos em duas partes, uma relacionada à estabilidade química e outro com estudo de permeabilidade celular.

Para os estudos de estabilidade química:

- Estabelecimento de um protocolo para a análise da reatividade química de dipeptidil nitrilas e derivados usando glutatona e cisteína;
- Aplicação do método para determinação da reatividade química por meio do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e velocidade de reação (k);

Para os estudos de permeabilidade, dois estudos distintos foram realizados, sendo um qualitativo e um quantitativo:

- Desenvolvimento de um método qualitativo para análise de dipeptidil nitrilas analisadas em meio intracelular usando linhagem de câncer de pâncreas MIA PaCa-2.
- Desenvolver um método quantitativo para análise de dipeptidil nitrila inibidora de cisteíno proteases (codificada como Neq0570) por meio de HPLC-UV-MS, usando as

mesmas condições de ensaio aplicadas para a triagem de substâncias bioativas para o *Trypanosoma cruzi*;

- Realizar a validação dos métodos para a análise das substâncias a partir de amostras em meio celular;
- Aplicar o método para que o analito seja quantificado nas amostras provenientes dos ensaios *in vitro*.

3. Materiais e métodos

Esta tese está dividida em 2 partes principais voltadas à análise da estabilidade química e da permeabilidade celular, conforme descrito na Figura 11. Os estudos de estabilidade química foram realizados para uma série de dipeptidil nitrilas, assim como os estudos qualitativos sobre a permeabilidade. O composto Neq0570 foi analisado especificamente para o estudo quantitativo da permeabilidade. Os métodos usados em todos os ensaios serão descritos nas próximas sessões.

Figura 11. Estruturação esquemática dos trabalhos descritos em relação a análise da estabilidade química e da permeabilidade celular.

3.1 Estudo quantitativo para o composto Neq0570

3.1.1 Solventes e reagentes

A dipeptidil nitrila denominada Neq0570 foi sintetizada pelo grupo e foi devidamente caracterizada previamente, com grau de pureza acima de 95% (anexo 7.9) (AVELAR *et al.*, 2015). A acetonitrila grau HPLC foi obtida da empresa Honeywell (Muskegon, EUA). O ácido fórmico e o éter metil terc-butílico (MTBE) foram comprados da empresa Sigma-Aldrich (St.

Louis, USA) e a água utilizada foi água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q (Merck Millipore, Alemanha).

O meio de cultura RPMI1640 foi adquirido da empresa Cultilab (Campinas) e foi suplementado com 10% de soro de feto bovino (FBS) e 1% (v/v) de solução penicilina/estreptomicina.

3.1.2 Procedimentos experimentais

Soluções estoque de Neq0570 foram preparadas na concentração de 1,0 mM, às quais foram utilizadas para preparar soluções estoques intermediárias na concentração de 1,0 μ M em DMSO e mantidas a -20 °C até a utilização. Como padrão interno (PI) foi utilizado o odanacatib. A solução estoque do PI foi preparada na concentração de 1,9 μ M em DMSO e mantida a -20 °C até a utilização.

3.1.3 Otimização do método analítico

Para a etapa de otimização do método analítico, foram preparadas soluções de trabalho do analito Neq0570 em água na concentração 50 ng.mL⁻¹, a partir das soluções estoque 1,0 μ M. A concentração do PI foi 40 μ g.mL⁻¹.

O equipamento utilizado foi um Shimadzu Proeminence (Shimadzu Corp. Japan), equipado com um sistema ternário de bombas LC-20AT/AD, com um sistema de degasser DGU-20A5, um arranjo de diodos como detector SPD-20MA, um sistema de injeção automática SIL-20A HT e um forno para coluna CTO-20A. A coluna utilizada foi uma Gemini ® (Phenomenex, 150x4,6 mm – 5 μ m, C18)

Inicialmente fez-se uma análise em gradiente exploratório nas condições descritas na **tabela 2** para cada um dos analitos.

Tabela 2. Condições experimentais utilizadas na análise exploratória inicial.

Parâmetro	Condição experimental
% B _{inicial}	5% ACN
% B _{final}	100% ACN
t _G	10 min
vazão	1,0 mL.min ⁻¹
Temperatura	35 °C
V _{injeção}	5 µL
Detecção	200 - 400 nm

Fonte: próprio autor.

Em seguida, foi avaliada a eluição em modo isocrático nas condições descritas na **tabela 3** utilizando algumas composições para a fase móvel.

Tabela 3. Condições experimentais utilizadas nas análises em modo isocrático.

Parâmetro	Condição experimental
% B	60%
vazão	1,0 mL.min ⁻¹
Temperatura	35 °C
V _{injeção}	5 µL
Detecção	200 - 400 nm

Fonte: próprio autor.

Diante dos resultados obtidos, foram avaliadas mais duas condições de eluição em modo gradiente. (**tabela 4**).

Tabela 4. Novas condições experimentais utilizadas na análise em modo de eluição gradiente.

Parâmetro	Condição experimental 1	Condição experimental 2
% B _{inicial}	5% ACN	5% ACN
% B _{final}	100% ACN	100% ACN
t _G	20 min	30 min
vazão	1,0 mL.min ⁻¹	1,0 mL.min ⁻¹
Temperatura	35°C	35°C
V _{injeção}	5 µL	5 µL
Detecção	200 - 400 nm	200 - 400 nm

Fonte: próprio autor.

3.1.4 Preparo de amostra

Foram avaliadas duas técnicas de preparo de amostras: extração em fase sólida e extração líquido-líquido. Nessa etapa foram utilizadas soluções de trabalho de Neq0507 na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio de cultura RPMI, ambas contendo PI na concentração $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

a) Extração em fase sólida

A extração em fase sólida foi realizada em cartuchos de fase polimérica Strata-X (Phenomenex, Torrance, EUA) com 1 mL de capacidade. Cada cartucho foi condicionado com 1,0 mL de ACN (2 x 500 μL) e equilibrado com 1,0 mL de H_2O (2 x 500 μL). Um volume de 500 μL da solução de trabalho foi diluído em água na proporção de 1:1 e aplicado no cartucho. O cartucho foi seco sob vácuo por 10 min. e, em seguida, lavado com 1,0 mL de H_2O , para a eliminação dos interferentes. As soluções de condicionamento, equilíbrio e lavagem foram descartadas.

Soluções de ACN em água, nas concentrações 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90%, além da ACN pura, foram aplicadas consecutivamente, em volumes de 1,0 mL (2 x 500 μL) para a eluição. Após cada aplicação, o cartucho foi seco sob vácuo por 10 min. Todos os eluídos foram coletados individualmente, tendo o volume ajustado para 1,0 mL com a respectiva solução. Em seguida, cada fração foi analisada por HPLC-UV nas condições descritas na **tabela 5**.

Tabela 5. Condições experimentais utilizadas na avaliação da extração em fase sólida.

Parâmetro	Condição experimental
%B _{inicial}	15% ACN
%B _{final}	70% ACN
t _G	11 min
vazão	0,5 mL.min ⁻¹
Temperatura	35°C
V _{injeção}	5 μL
Detecção	200 - 400 nm

Fonte: próprio autor.

Uma nova amostra de cada solução de trabalho foi submetida à extração em fase sólida. As condições de equilíbrio, condicionamento e aplicação da amostra foram as mesmas descritas anteriormente. Na etapa de lavagem do cartucho foi utilizada uma solução aquosa 10% ACN, que foi descartada. Para a eluição dos analitos e do PI foi utilizada solução aquosa 60% ACN.

b) Extração líquido-líquido

Uma solução de Neq0570 em meio RPMI foi preparada, em triplicata, na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contendo PI na concentração $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e fracionadas em alíquotas de $500 \mu\text{L}$. A cada amostra foram adicionados 500, 1000, 1500 ou 2000 μL de MTBE. As misturas foram agitadas em vórtex por 30 s e mantidas a -20°C . As frações de éter foram recolhidas e secas em temperatura ambiente até a evaporação completa do solvente. Cada resíduo foi ressuspensão em 1,0 mL de ACN 60% e analisado por HPLC-UV nas condições apresentadas anteriormente.

Posteriormente, volumes de $500 \mu\text{L}$ de MTBE foram adicionados a 5 amostras de $500 \mu\text{L}$ das soluções do composto Neq0570 $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio RPMI1640 contendo PI na concentração de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após a agitação por 30 s em vórtex e o congelamento da fase aquosa, as frações de éter foram secas até a total evaporação do solvente. Uma das amostras secas foi reservada para análise. Às outras quatro, uma nova alíquota de éter foi adicionada e homogeneizada. As fases orgânicas foram separadas, depositadas nos mesmos tubos onde havia o resíduo resultante da primeira extração e evaporadas. Uma das amostras secas foi reservada para análise e com as outras 3 fez-se novamente o procedimento por mais uma, duas e três vezes respectivamente. Os cinco resíduos totais secos foram ressuspensos em 1,0 mL de ACN 60% e analisados por HPLC-UV nas condições apresentadas anteriormente. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

3.1.5 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada com base na Guia Oficial da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para métodos bioanalíticos, publicada no Diário Oficial da União na forma da RDC 27 de 17 de maio de 2012.

Nas etapas de validação, a solução estoque $1,0 \mu\text{M}$ do composto Neq0570 em DMSO foi utilizada para preparar as soluções de trabalho em meio RPMI, analisadas em cada em ensaio, às quais continham ainda o PI na concentração $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Todas as soluções de trabalho foram homogeneizadas em vórtex, e submetidas ao pré-tratamento por LLE.

Volumes de $500 \mu\text{L}$ de MTBE foram adicionados aos $500 \mu\text{L}$ das soluções de trabalho, agitados em vórtex por 30 s, congelados e centrifugados. Os sobrenadantes foram retirados e completamente evaporados. Aos resíduos, novas alíquotas de $500 \mu\text{L}$ de solvente foram adicionados, sendo em seguida agitados, congelados centrifugados. A fase orgânica foi

depositada no mesmo tubo que a anterior e ao resíduo, foram adicionados outros 500 µL de solvente, repetindo-se o processo de extração, totalizando 3 extrações sequenciais.

As amostras completamente secas foram ressuspensas em 1,0 mL de ACN 15%, homogeneizadas e analisadas por HPLC-UV nas condições descritas na **tabela 6**.

Tabela 6. Condições experimentais utilizadas na avaliação da extração em fase sólida.

Parâmetro	Condição experimental
%B _{inicial}	15% ACN
%B _{final}	70% ACN
t _G	11 min
vazão	0,5 mL.min ⁻¹
Temperatura	35°C
V _{injeção}	5 µL
Detecção	225 nm (Neq0409 e Neq0570) 265 nm (PI)

Fonte: próprio autor.

a) Seletividade

Para esse ensaio, foram analisadas soluções de trabalho do composto Neq0570 em meio RPMI na concentração de 10 ng.mL⁻¹, contendo PI na concentração 40 µg.mL⁻¹. Também foram analisadas uma amostra de solução ACN 15% (fase móvel inicial) e uma amostra do meio RPMI1640 ao qual não foi adicionado analito ou padrão interno.

Todas as amostras contendo meio RPMI1640 foram pré-tratadas por LLE conforme descrito no início desta seção. As análises por HPLC-UV foram feitas nas condições apresentadas anteriormente.

b) Efeito Residual

Nesse ensaio, foi analisada uma amostra de meio de cultura sem adição de analito ou padrão interno. Também foram analisadas amostras de solução de trabalho para a substância Neq0570 em meio RPMI1640 na concentração de 70 ng.mL⁻¹, contendo PI na concentração 40 µg.mL⁻¹. As análises foram realizadas na seguinte sequência:

- amostra de meio de cultura isento de analito e PI;
- amostra com Neq0570 (70 ng.mL⁻¹), com PI (40 µg.mL⁻¹);
- reinjeção da amostra com Neq0570 (70 ng.mL⁻¹), com PI (40 µg.mL⁻¹);
- reinjeção da amostra de meio de cultura isento de analito e PI;

- reinjeção da amostra de meio de cultura isento de analito e PI.

Todas as amostras foram pré-tratadas por LLE conforme descrito no início desta seção. As análises por HPLC-UV foram feitas nas condições apresentadas anteriormente.

c) Efeito de matriz

Para o ensaio foram utilizadas soluções de NEQ570 nas concentrações de 25 ng.mL⁻¹ e 56 ng.mL⁻¹ (contendo PI na concentração 40 µg.mL⁻¹) em solução ACN 60% de acordo com o estabelecido pela ANVISA RDC 27/2010, onde fica orientado a execução do experimento com os Controles de Qualidade Baixo e Alto (CQB e CQA); amostras de meio de cultura, previamente extraídas por LLE nas condições descritas anteriormente, às quais foram adicionados separadamente NEQ570 nas concentrações de 25 ng.mL⁻¹ e 56 ng.mL⁻¹ (mais PI na concentração 40 µg.mL⁻¹); e amostras de meio de cultura que foram submetidos à LLE após a adição NEQ570 nas concentrações de 25 ng.mL⁻¹ e 56 ng.mL⁻¹ (mais PI na concentração 40 µg.mL⁻¹). Para cada uma foram preparadas 6 replicatas.

O efeito de matriz foi avaliado por meio do coeficiente de variação (%CV) do Fator de Matriz Normalizado (FMN), o qual foi obtido utilizando a equação:

$$FMN = \frac{(\text{Resposta do analito na matriz} / \text{Resposta do PI na matriz})}{(\text{Resposta do analito em solução} / \text{Resposta do PI em solução})}$$

d) Curva de calibração

Nesse estudo foram utilizadas soluções com o composto Neq0570 em meio RPMI1640 nas concentrações de 10, 22, 34, 46, 58 e 70 ng.mL⁻¹. A concentração do PI foi 40 µg.mL⁻¹. Também foram usadas amostras do meio de cultura sem adição de qualquer analito e amostras de meio de cultura contendo apenas o PI na concentração de 40 µg.mL⁻¹.

As amostras foram preparadas em triplicata, pré-tratadas por LLE conforme procedimento descrito no início desta seção e analisadas por HPLC-UV nas condições apresentadas anteriormente.

e) Avaliação da linearidade em diferentes matrizes

Para avaliar a linearidade do método em diferentes matrizes, o analito foi submetido às mesmas condições de preparo da solução estoque em meio RPMI1640 e incubado em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48 horas. Após o período de incubação, a solução em meio de cultura foi diluída nas mesmas concentrações da curva de calibração, adicionadas de PI na mesma concentração da avaliação da linearidade no meio RPMI1640 sem tratamento, extraídas com

éter *Terc*-metil-butil etílico na proporção de 1:1, por três vezes sequenciais, secas em temperatura ambiente e resuspensas em 1,0 mL de Acetonitrila 15%.

Também foi avaliada a linearidade nos meios extra e intracelulares das cepas Y e Tulahuen. Os meios celulares foram preparados conforme descrito no item 3.1.5, e as soluções de trabalho foram preparadas nas mesmas concentrações da avaliação da linearidade em meio de cultura RPMI1640 sem tratamento, adicionadas de PI na mesma concentração da avaliação da linearidade, extraídas com éter *Terc*-metil-butil-etílico na proporção de 1:1, por três vezes sequenciais, secas em temperatura ambiente e ressuspensas em 1,0 mL de Acetonitrila 15%. Para o meio intracelular, teve-se que adicionar uma etapa prévia de rompimento das membranas nas células antes da etapa de diluição nas concentrações de análise.

f) Precisão e Exatidão

Para esse ensaio as soluções de trabalho foram preparadas independentemente durante três dias consecutivos e analisadas em comparação. Todas as amostras foram mantidas congeladas e descongeladas apenas no momento de cada análise, homogeneizadas em vórtex e submetidas à LLE, como descrito anteriormente. As soluções de trabalho foram preparadas nas concentrações de 10, 25, 40, 56 e 1000 ng/mL. Sendo que esta última concentração foi preparada por diluição.

3.1.6 Aplicação do Método em amostras de Meio de Cultura RPMI1640 usado nos Ensaios Celulares para as Cepas Y e Tulahuen

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, as células da linhagem LLCMK₂ foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 células/mL. As formas tripomastigotas da cepa Tulahuen LacZ e Y foram adicionadas na concentração de 5×10^5 parasitos/mL quando as células atingiram 30% de confluência e foram incubadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48 horas. Após o período de incubação foram realizadas sucessivas lavagens com PBS para retirar as formas tripomastigotas que não infectaram a célula hospedeira. O meio de cultura RPMI-1640 foi trocado a cada dois dias, até a cultura começar a liberar as formas tripomastigotas no meio para a infecção de uma nova garrafa. Após o período de incubação, as formas tripomastigotas presentes no sobrenadante foram retiradas com sucessivas lavagens com PBS, permanecendo apenas as formas amastigotas. A substância Neq0570 foi incubada por 24 e 48 horas.

Para quantificar o composto parental no meio intracelular as células foram lisadas usando banho ultrassônico (Fischer Scientific 500) com pulsos de 10% de amplitude durante 3 minutos e com intervalos de 30 segundos.

Para a quantificação do analito nos meios extra e intracelulares, foram preparadas três concentrações de trabalho denominadas de A, B e C. As soluções A, B e C foram preparadas considerando permeação celular do composto parental entre 10% e 90%.

A solução A foi feita com uma alíquota de 60 μL da amostra adicionada de 20 μL de PI, com o volume completado com 420 μL de meio.

A solução B foi obtida com uma alíquota de 20 μL de amostra diluída em 80 μL de meio, onde foram retirados 60 μL dessa solução, com adição de 20 μL de PI e o volume completado com 420 μL de meio.

A solução C foi obtida a partir de uma alíquota de 20 μL de amostra diluída em 160 μL de meio, onde foram retirados 60 μL , com adição de 20 μL de PI e o volume completado com 420 μL de meio.

Para todas as três soluções de análise, foram preparadas soluções do controle negativo (isto é, sem o composto), nas mesmas condições.

Todas as amostras passaram pelo pré-tratamento com LLE e analisadas usando o método desenvolvido e validado, ambos descritos anteriormente.

3.1.7 Estudo de metabolismo e degradação

Para realizar os ensaios de predição e detecção dos possíveis metabólitos e produtos de degradação do composto parental, alíquotas de 5 μL das soluções de trabalho das cepas Y e Tulahuen dos meios extra e intracelular, dopadas com 10 μL do analito Neq0570, foram analisadas no sistema hifenado LC-MS nas seguintes condições:

O cromatógrafo utilizado foi o mesmo de todos os outros ensaios realizados nesse trabalho, como descrito anteriormente.

O espectrômetro de massas utilizado foi um Brucker Amazon utilizando um analisador do tipo Ion Trap (Brucker GmbH, Germany). O equipamento utiliza uma fonte de ionização por *eléctron-spray* (ESI), operando no modo positivo. As condições de análise foram otimizadas para operação de 4500V como voltagem do capilar e temperatura de 300°C. A pressão do gás nebulizador foi de 35 psi e o fluxo do gás de secagem foi de 9,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Foi utilizado um gradiente de 5-100% de ACN em 30 min. e fluxo de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, na coluna Phenomenex Gemini®.

Os softwares utilizados para a predição e detecção dos metabólitos e/ou produtos de degradação foram os MetabolitePredict e o MetaboliteDetect (Brucker GmbH, Bremen, Germany). Os parâmetros de operação dos softwares foram otimizados para todas as vias de metabolismo de células de mamíferos.

3.2 *Análise qualitativa da permeabilidade celular de dipeptidil nitrilas*

3.2.1 *Cultura Celular e Processo de Infecção Parasitária*

Os parasitos foram mantidos em sua morfologia infectante através da infecção de células hospedeiras de rim de macacos (LLC-MK2) em frascos T75 com meio de cultura RPMI1640 (pH 7,2) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino a 37 °C, mantidas em atmosfera de 5% de CO₂ com 90% de umidade. Células de mamíferos não infectadas foram cultivadas nas mesmas condições para todos os experimentos realizados. Após cinco dias de infecção, células na morfologia tripomastigota puderam ser coletadas do sobrenadante do meio de cultura usado na incubação, conforme descrito (Tezuka *et al.*, 2020).

3.3 *Análise da estabilidade dos compostos.*

As dipeptidil nitrilas usadas no estudo foram sintetizadas pelo grupo e tiveram sua pureza determinada por métodos cromatográficos ($\geq 95\%$) e foram diluídas em meio RPMI1640 resultando em soluções de concentração final 10 μ M. As soluções de trabalho foram incubadas por 0 h, 6 h e 24 h a temperatura de 37 °C, e atmosfera de 90% de umidade e 5% de CO₂ para realização do estudo de estabilidade usando as mesmas condições dos estudos *in vitro*. Cada analito foi extraído usando Tert-Metil-Butil Éter (TMBE) na proporção de 1:1, três vezes sequencialmente. As soluções foram secadas a temperatura ambiente e ressuspensas em solução de ACN/H₂O (5:95) e injetadas no mesmo sistema de cromatografia líquida de alta eficiência usado no estudo de desenvolvimento e validação do método analítico.

Foi realizado um gradiente exploratório de 5-100% de Acetonitrila/H₂O em 30 minutos, com 5 μ L de injeção, temperatura do forno de 35 °C e fluxo de 0,5 mL/min de fase móvel.

3.4 *Estudo da Reatividade Intrínseca de dipeptidil nitrilas*

Para a realização do estudo da reatividade intrínseca foram utilizados dois modelos aquosos diferentes. Um utilizando cisteína, e o outro utilizando glutatona. O decaimento da área cromatográfica foi analisado pela AUC obtida por HPLC-UV e os tempos de meia-vida e as constantes de decaimento foram calculadas pelo software GraphPad®.

Os meios aquosos com cisteína e glutatona consistiram em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4), com 1,0 mM de EDTA, 5,0 mM de tiol e 5% de acetonitrila. Inicialmente 80 µL de solução do inibidor em estudo (2,5 mM) foram adicionados no meio tamponado que continha o tiol (cisteína ou glutatona) e uma alíquota de 5 µL foi injetada no HPLC. Depois disso, a solução foi mantida em equilíbrio térmico a 37 °C. Cada alíquota era retirada apenas no momento da injeção.

A cisteína empregada nos ensaios foi comprada da Sigma-Aldrich (código C7352-25G) em sua forma levogira (MM: 121,16 g.mol⁻¹, C₃H₁₇NO₂S), com pureza maior do que 98% oriunda de fontes não-animais. A glutatona também foi comprada da Sigma-Aldrich (código PHR1359-690MG).

As soluções de estoque de tiol foram preparadas com concentração final de 50 mM em tampão fosfato, pH 7,4.

O HPLC e a coluna utilizados foram os mesmos utilizados nos outros ensaios realizados nesse trabalho. O método cromatográfico utilizado é que se segue:

0,0-10,0 min a concentração de solvente B (ACN) cresceu de 5-100%, de 10,1-15 min a concentração de B permaneceu em 100%, de 15,1 -25,0 min a concentração de B voltou a 5%. O solvente A foi H₂O.

Os dados foram processados pelo software GraphPad® com o modelo matemático de uma reação de pseudo-primeira ordem. O modelo é o que segue:

$$Y = (Y_0 - \text{Platô}) * \exp(-K * X) + \text{Platô}$$

4. Resultados e discussão

A seguir, os resultados para cada etapa estabelecida na sessão de materiais e métodos serão apresentados e discutidos nos seus respectivos itens.

4.1 Otimização do método analítico

Inicialmente foram realizadas análises exploratórias em modo gradiente a fim de se identificar os tempos de retenção (t_r) dos analitos de interesse, bem como o do PI (**figura 12**).

Figura 12. Cromatogramas referentes à análise exploratória inicial em modo gradiente para o composto Neq0570 (a) e PI (b). Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 5-100% B, 10 min; vazão: 1,0 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 μ L; Temperatura: 35 °C; Detecção: 225 e 265 nm.

Fonte: próprio autor.

Com base nos resultados, a razão da variação dos t_r em relação ao t_G ($\Delta t_r/t_G$) foi calculada para cada análise, obtendo-se o valor de 0,110 Neq0570. Segundo Snyder (2010), tais valores sugerem a possibilidade de se utilizar o modo de eluição isocrático. Dessa forma, novas tentativas de otimização do método nesse modo de análise foram realizadas, porém com resultados insatisfatórios, apresentando um alargamento das bandas cromatográficas e perda da resolução (R_s) da separação.

O modo de eluição gradiente foi então escolhido para as análises do trabalho. Tendo em mente que o método seria aplicado à quantificação dos analitos na presença de analitos possivelmente mais hidrofílicos (como descrito para o odanacatib) KASSAHUN *et al.*, 2011, outras percentagens de composição e suas variações por intervalo de tempo foram testadas para o gradiente (**figura 13**).

Figura 13. Cromatogramas referentes à análise exploratória inicial em modo gradiente para o composto Neq0570 com diferentes tG: 20 min (A), 30 min (B)-Neq0570. Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 5-100%

Fonte: próprio autor.

Como ambas inclinações ($3,2\%.\text{min}^{-1}$ e $4,75\%.\text{min}^{-1}$) levaram a resultados satisfatórios, para a escolha da condição experimental, ponderou-se sobre o número total e o tempo necessário para a execução de cada uma. Por isso, uma nova condição foi avaliada, com uma inclinação de gradiente e com maior concentração inicial de fase orgânica. Nessas novas condições (15-85% de B em 14 min), os sinais analíticos apresentaram excelentes separações, com boa simetria e o tempo total da análise foi reduzido, o que tornaria especialmente interessante nas etapas de validação do método (**figura 14**).

Figura 14. Cromatograma referente à nova condição cromatográfica. Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-85% B em 14 min; vazão: 1,0 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 oC; Detecção: 225 e 265 nm.

4.2 Preparo de amostra

O objetivo principal do preparo de amostra era eliminar qualquer (ou quaisquer) interferente(s) presentes no meio de cultura que poderia(m) comprometer a análise dos

compostos de interesse no estudo realizado. Para isso foram avaliadas duas técnicas de preparo de amostra bastante utilizadas em análises por HPLC-UV.

4.2.1 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida é uma técnica de preparo de amostras bastante interessante para matrizes complexas por permitir uma remoção eficiente de potenciais interferentes para a análise. A fase escolhida Strata-X é uma fase polimérica que agrega características das fases mais utilizadas para SPE (**figura 15**).

Figura 15. Representação da fase Strata-X usada para o preparo de amostras por SPE.

Fonte: Adaptado de PHENOMENEX, 2018.

Em uma primeira etapa, foi realizada uma otimização das condições de eluição, de forma a maximizar a extração dos analitos e do padrão interno. Para isso, após as etapas de pré-condicionamento, equilíbrio, aplicação da amostra e lavagem para remoção dos interferentes, foram realizadas eluições sequenciais em um mesmo cartucho, nas quais a proporção de solvente orgânico era adicionada em incrementos de 10%. Analogamente à cromatografia em fase reversa, na SPE com fase polimérica, a força do eluente aumenta com a maior concentração de solvente orgânico, pois o mesmo se torna menos hidrofílico.

A otimização da SPE para o Neq0570, o analito começou a ser eluído com 20% de ACN na fase eluente, terminando com 50% ACN. Para o PI, o perfil de eluição iniciou-se com 40% ACN e terminando com 60% de solvente orgânico (**figura 16**). Dessa forma, para o Neq0570, as condições de lavagem dos cartuchos após a passagem da amostra e de eluição dos compostos de interesse também foram definidas como 10% e 60% ACN respectivamente (**figura 17**).

Figura 16. Cromatogramas referentes à eluição individual de cada etapa realizada na avaliação da SPE. Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-70% B, 11 min; vazão: 0,5 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 200-400 nm

Fonte: próprio autor.

Figura 17. Cromatogramas referentes à condição otimizada para o preparo de amostra por SPE para o composto Neq0570. Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-70% B, 11 min; vazão: 0,5 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 200-400 nm

Fonte: próprio autor.

4.2.2 Extração líquido-líquido (LLE)

A LLE é uma técnica clássica amplamente utilizada em preparo de amostras, porém em amostras biológicas, principalmente em ensaios miniaturizados, seu uso é bem mais recente (PENG; BRANCH; KING, 2001). Para a extração de dipeptidil nitrilas (como nesse estudo) a LLE se mostra bastante interessante, sendo aplicada para o odanacatib, por exemplo (KASSAHUN *et al.*, 2011).

Uma vez que a LLE é baseada na partição do analito entre dois solventes imiscíveis entre si, o principal fator que influencia a extração é a saturação da fase orgânica. Quando se objetiva empregar a LLE como preparo de amostras em uma rotina de laboratório, deve-se pensar em uma condição em que se utiliza uma menor quantidade de solvente e um menor número de extrações sequenciais possíveis, minimizando-se a quantidade de resíduos gerados, sem prejudicar na eficiência do método. Nesse sentido, a otimização da LLE para o composto Neq0570 foi realizada em duas etapas. Na primeira, foi otimizada a proporção de solvente extrator e volume da amostra a ser extraída. Foram avaliadas as proporções (v/v) 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4 de amostra/solvente.

Para o composto Neq0570, houve uma variação na resposta analítica à medida que aumentou-se a quantidade de solvente extrator. No entanto, como a variação foi pouco significativa, decidiu-se pela proporção 1:1, minimizando-se a quantidade de resíduo gerado (**figura 18**).

Figura 18. Cromatogramas referentes à otimização do preparo de amostra por LLE para Neq0570, utilizando-se diferentes proporções (v/v) de amostra/solvente extrator: A - 1:1; B - 1:2; C - 1:3 e D - 1:4. Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-70% B

Fonte: próprio autor.

A etapa seguinte foi a avaliação do número de extrações sequenciais necessárias para se obter a máxima quantidade de analito e PI na fase móvel. Quando se aplica essa estratégia, o analito é extraído exaustivamente. Em outras palavras, atinge-se a capacidade máxima de

extração para aquele analito, naquela matriz específica. Os resultados obtidos para os dois analitos de interesse mostraram um pequeno aumento da razão entre a resposta analítica do composto de interesse e a resposta analítica do PI quando se fez 1, 2 ou 3 extrações sequenciais (**figura 19**). A partir da terceira extração, observou-se uma estabilização da razão entre as respostas analíticas. Isso significa que, mesmo que houvesse um aumento na extração do analito de interesse, a extração do PI aumentaria proporcionalmente, o que nas análises quantitativas seria indiferente. Por esta razão, decidiu-se fixar em 3 o número de extrações sequenciais para cada um dos analitos.

Figura 19. Variação da resposta analítica (área do analito/área do PI) em função do número de extrações sequenciais realizadas para o analito Neq0570.

Fonte: próprio autor.

Comparando-se os cromatogramas obtidos nas condições otimizadas para a SPE e LLE, observaram-se resultados bastante semelhantes para o analito (**figura 17** e **figura 18**). A LLE exige uma maior manipulação de amostra, o que, em uma rotina laboratorial poderia comprometer a quantificação, por ter um maior erro associado, mas possui um custo operacional mais baixo. A SPE, embora apresente uma menor manipulação direta das amostras, requer um tempo maior de preparo, devido ao tempo de passagem dos solventes no cartucho em cada etapa da extração, além do custo dos próprios cartuchos, que são importados. Sendo assim, como os resultados obtidos foram muito próximos, optou-se por empregar a técnica de LLE em todas as etapas subsequentes do trabalho. A **figura 20** mostra os resultados obtidos para o método otimizado para as duas técnicas de preparo de amostra.

Figura 20. Comparação das técnicas de preparo de amostra para Neq0570: A - SPE; B - LLE. Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-70% B, 11 min; vazão: 0,5 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35oC; Detecção: 200-400 nm.

Fonte: próprio autor.

Após a definição das condições cromatográficas e de preparo de amostras, e antes de se iniciar os estudos para a validação do método, era necessário definir o comprimento de onda a ser utilizado para a quantificação dos analitos. Analisando-se as curvas de resposta analítica em função do comprimento de onda (**figura 21**), notou-se que os analitos de interesse apresentam um máximo de absorbância em um comprimento de onda no qual o PI apresenta absorbância mínima. O recíproco também é verdadeiro, quando se observa a curva do PI. Por isso, decidiu-se trabalhar simultaneamente com dois comprimentos de onda: 225 nm para o analito Neq0570 e 265 nm para o PI.

Figura 21.Resposta analítica em função do comprimento de onda.

Fonte: próprio autor.

4.3 Validação do método analítico

Validar um método analítico significa assegurar que, nas condições experimentais avaliadas, o método analítico pode ser usado para quantificar o analito de interesse. Toda validação é orientada por um conjunto de diretrizes que estabelece os critérios de aceitação para os resultados experimentais. Essas diretrizes são elaboradas e publicadas por órgãos oficiais, os quais variam conforme a aplicação do método em desenvolvimento. Nesse trabalho, o método está sendo validado conforme as orientações publicadas pela ANVISA na RDC nº. 27 de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012). Como a matriz biológica do ensaio *in vitro* não corresponde exatamente a matriz *in vivo*, algumas adaptações são necessárias.

4.3.1 Seletividade

A seletividade de um método, segundo a ANVISA, determina o quanto o método em avaliação consegue distinguir e quantificar um analito e/ou padrão interno na presença de outros componentes intrínsecos da amostra (BRASIL, 2012 - referência da RDC da ANVISA). Nesse estudo ela foi avaliada comparando-se o cromatograma de uma amostra do meio de cultura sem a adição que analito (branco) ou padrão interno com aquele obtido para uma amostra à qual foram adicionados 10 ng.mL^{-1} de analito, concentração mais baixa empregada na curva de calibração (**figura 22**). No comprimento de onda selecionado para a quantificação dos analitos não foram observadas bandas cromatográficas referentes a compostos presentes na matriz com

tempo de retenção próximos aos analitos de interesse. Para o PI, a análise é semelhante (**figura 23**). Pode-se dizer, portanto, que o método desenvolvido nesse trabalho apresenta seletividade para os analitos de interesse e para o PI.

Figura 22. Avaliação da seletividade do método cromatográfico para o composto Neq0570(A) e Meio de Cultura – RPMI (B). Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-85% B, 14 min; vazão: 1,0 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 225 nm

Fonte: próprio autor.

Figura 23. Avaliação da seletividade do método cromatográfico para o Padrão Interno (A) e Meio de Cultura – RPMI (B).
Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-85% B, 14 min; vazão: 1,0 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 µL;
Temperatura: 35 °C; Detecção: 265 nm

Fonte: próprio autor.

4.3.2 Efeito residual

Quando uma amostra possui um analito em concentrações elevadas, pode acontecer de a fase móvel não apresentar força suficiente para eluir todo o analito em uma única análise. Caso isso aconteça, as análises subsequentes apresentam o sinal analítico para aquele composto, mesmo que ele não esteja presente na amostra que se está analisando, levando a uma interpretação equivocada do resultado obtido. Por isso, é importante avaliar um possível efeito residual do analito, o que também é conhecido como *carryover*. Uma forma de se fazer isso é analisando uma amostra da matriz isenta do analito antes e depois da concentração mais alta utilizada na curva de calibração.

As análises do meio de cultura sem o analito, identificado como branco na **figura 24**, mostram que o composto Neq0570 não apresenta efeito residual, pois não há, nas amostras do meio isento, qualquer banda cromatográfica interferente no mesmo t_r dos analitos de interesse.

O mesmo é válido para o PI, pois não houve o surgimento de qualquer pico cromatográfico no mesmo t_r . A **figura 25** mostra a comparação de todos os cromatogramas.

Figura 24. Avaliação do efeito residual para o composto Neq0570. Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-85% B, 11 min; vazão: 1,0 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 225 nm.

Fonte: próprio autor.

Figura 25. Avaliação do efeito residual para o PI. Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; 5Fase B: ACN; 15-85% B, 11 min; vazão: 1,0 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5 µL; Temperatura: 35 °C; Detecção: 265 nm.

4.3.3 Efeito de matriz

O efeito de matriz ocorre quando interferentes presentes na matriz coeluem com o analito de interesse (ou PI), aumentando a resposta analítica do mesmo, ou ainda qualquer alteração na resposta do analito e/ou padrão interno causada por componentes da matriz biológica. Como a concentração é diretamente proporcional à resposta instrumental, o efeito de matriz superestima o resultado da análise. Com isso, a concentração calculada pelo método torna-se superior à verdadeira e, conseqüentemente, diminui a exatidão do método.

Nesse estudo, o efeito de matriz foi determinado matematicamente (a partir das análises para 6 replicatas) e expresso por meio do Fator de matriz normalizado (FMN). Nas análises para baixas concentrações, conforme pode se observar na **tabela 7**, os valores dos coeficientes de variação (%CV) para o composto Neq0570 mantiveram-se abaixo de 10%. Os valores do coeficiente de variação ficaram muito abaixo do valor limite aceito na guia oficial (15%) – RDC 27/2010, indicando conformidade do método. Pode-se dizer, portanto, que neste método não há efeito de matriz.

Tabela 7. Avaliação do efeito de matriz para o composto Neq0570 (n = 6).

Conc. (ng.mL ⁻¹)	FMN (adição pré- extração)	FMN (adição pós- extração)	Conc. (ng.mL ⁻¹)	FMN (adição pré- extração)	FMN (adição pós- extração)
25	1,064	1,185	56	1,011	1,088
	0,997	1,101		0,992	1,124
	0,943	1,093		1,025	1,121
	1,013	1,124		0,947	1,176
	1,002	1,217		0,998	1,149
	0,924	1,148		0,929	1,211
média	0,991	1,144		0,984	1,145
d.p.	0,051	0,049		0,037	0,043
% CV	5,099	4,252		3,798	3,807

Conc.: concentração. d.p.: desvio padrão. %CV: percentagem do coeficiente de variação.

Fonte: próprio autor.

4.3.4 Curva de calibração

A curva de calibração é o ponto central do método quantitativo, pois é por meio dela que se torna possível determinar a concentração do analito de interesse. Neste estudo foi escolhida a faixa de 10 a 70 ng.mL⁻¹, pois essa é a faixa de concentração mais baixa na qual o composto Neq0570 seria avaliado em estudos celulares.

Seguindo as diretrizes do guia oficial de validação, uma curva de calibração em triplicata foi construída para o composto em meio RPMI recém-preparado (**figura 26**). O modelo de regressão linear baseado em mínimos quadrados apresentou um bom ajuste ao conjunto de dados, com boa homocedasticidade e conseguindo explicar mais de 99% de sua variância. O coeficiente de correlação superior a 0,999 foi bastante superior ao mínimo recomendado pela agência reguladora (0,99) (**tabela 8**).

Figura 26. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI recém-preparado.

Tabela 8. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em meio de cultura RPMI recém-preparado.

equação do modelo linear				coeficiente de correlação	
y = (0,01612±0,00012)x - (0,002485±0,0056)				r = 0,9994	
ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	2,1828	1	2,1828	16776	< 0,0001
Resíduo	0,0025	19	0,0001		
F. ajuste	0,0008	5	0,0002	1,348	0,3553
Erro puro	0,0017	14	0,0001		
Total	2,185	20			
% variação máxima explicada				99,89	
% variação máxima explicável				99,92	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

Todos os padrões de calibração apresentaram desvio-padrão muito abaixo dos 15% para a concentração de 10 ng.mL⁻¹ ou 20% para as demais concentrações, em relação às respectivas concentrações nominais e, por isso, foram utilizados no cálculo da curva de calibração (Anexo 7.1). Como a curva de calibração teve 100% dos padrões aprovados de 7 concentrações distintas, dentre os quais estão o LIQ (10 ng.mL⁻¹) e o LSQ (70 ng.mL⁻¹), a curva de calibração foi aprovada para a quantificação na faixa de interesse.

O método analítico foi desenvolvido e apresentado até este momento está sendo validado neste trabalho para a posterior quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular. Até este momento, todas as análises foram realizadas em meio RPMI recém-preparado. No entanto, durante o experimento celular, esse mesmo meio de cultura também estaria exposto às mesmas condições de temperatura (37°C) concentração de CO₂ atmosférico (5%) às quais as células serão submetidas. Para verificar se tais condições seriam suficientes para degradar o meio de cultura, gerando artefatos e/ou subprodutos que pudessem interferir na quantificação do analito de interesse nos ensaios celulares, uma nova curva de calibração foi construída, substituindo-se o meio RPMI recém-preparado por meio RPMI incubado por 2 dias a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ na ausência de células (**figura 27, tabela 9**). Novamente, o modelo de regressão linear baseado em mínimos quadrados apresentou um bom ajuste ao conjunto de dados, com boa homocedasticidade e conseguindo explicar mais de 99% de sua variância. Todos os padrões de calibração também apresentaram valores para os desvios-padrões dentro dos limites de aceitação da legislação (Anexo 7.2), sendo a curva, portanto, aprovada.

Figura 27. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI incubado a 37oC em atmosfera com 5% de CO2 na ausência de células LLCMK2

A)

B)

Tabela 9. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em meio de cultura RPMI incubado a 37oC em atmosfera com 5% de CO2 na ausência de células LLCMK2

equação do modelo linear				coeficiente de correlação	
y = (0,01629±0,00015)x - (0,0191±0,0066)				r = 0,9992	
ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	2,2291	1	2,2291	12017	< 0,0001
Resíduo	0,0035	19	0,0002		
F. ajuste	0,0014	5	0,0003	1,825	0,1991
Erro puro	0,0021	14	0,0002		
Total	2,233	20			
% variação máxima explicada				99,84	
% variação máxima explicável				99,90	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

Quando se observam comparativamente as curvas geradas pelos modelos de regressão linear, nota-se elevada similaridade entre os dois conjuntos de dados (**figura 28**). A análise dos intervalos de confiança para os coeficientes lineares das equações mostrou uma superposição entre eles, indicando que não há diferença estatística entre eles com pelo menos 95% de confiança. Na prática, isso significa que as condições de temperatura, umidade e quantidade de CO₂ em que o ensaio é realizado não produziram interferentes que comprometessem a quantificação do analito de interesse.

Figura 28. Análise comparativa das curvas de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI recém-preparado e em meio de cultura incubado a 37oC em atmosfera com 5% de CO2 na ausência de células LLCMK2

Intervalo de confiança para o coeficiente angular (95%)		
matriz	Lim. Inferior	Lim. Superior
meio RPMI recém-preparado	0,01586	0,01638
meio RPMI incubado s/ células	0,01598	0,01660

Assim como foi feito para o meio de cultura, também seria importante verificar se metabólitos ou até mesmo fragmentos celulares poderiam coeluir com o analito de interesse,

comprometendo as análises quantitativas. Construíram-se, então, curvas de calibração em triplicata no mesmo intervalo de concentrações utilizando-se, como matriz, amostras de meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK₂ contendo formas amastigotas de parasito da cepa Tulahuem (**figura 29** e **tabela 9**). Todos os padrões de calibração apresentaram valores para os desvios-padrões dentro dos limites de aceitação da legislação (Anexo 7.3), sendo a curva, portanto, aprovada.

Figura 29. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK2 contendo amastigotas da cepa Tulahuen

Tabela 10. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK2 contendo amastigotas da cepa Tulahuen

equação do modelo linear				coeficiente de correlação	
y = (0,01561±0,00021)x + (0,0164±0,0093)				r = 0,9983	
ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	2,0469	1	2,0469	5086	< 0,0001
Resíduo	0,0076	19	0,0004		
F. ajuste	0,0034	5	0,0007	2,245	0,1190
Erro puro	0,0042	14	0,0003		
Total	2,055	20			
% variação máxima explicada				99,63	
% variação máxima explicável				99,79	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

O mesmo procedimento foi realizado com amostras de meio de cultura RPMI nos quais foram incubadas células LLCMK₂ contendo formas amastigotas de parasito da cepa Y (**figura 30 e tabela 11**). Todos os padrões de calibração também apresentaram desvios-padrões em relação aos valores nominais, permitindo a aprovação da curva de calibração (Anexo 7.4).

Figura 30. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK₂ contendo amastigotas da cepa Y.

Tabela 11. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em meio de cultura RPMI no qual foram incubadas células LLCMK₂ contendo amastigotas da cepa Y

equação do modelo linear				coeficiente de correlação	
y = (0,01573±0,00013)x + (0,01167±0,0073)				r = 0,9994	
ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	2,0784	1	2,0784	15200	< 0,0001
Resíduo	0,026	19	0,0001		
F. ajuste	0,005	5	0,0001	0,727	0,6571
Erro puro	0,0021	14	0,0001		

Total	2,081	20	
% variação máxima explicada			99,88
% variação máxima explicável			99,90

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

Assim como aconteceu com o meio de cultura incubado na ausência de células, também foi observada alta similaridade entre as curvas obtidas neste experimento e aquela construída utilizando meio de cultura RPMI recém-preparado (**figura 31**). A análise dos intervalos de confiança para os coeficientes lineares das equações mostrou superposição para todos eles, indicando que ausência de diferença estatística com um mínimo de 95% de confiança. Na prática, isso significa que as condições de temperatura, umidade e quantidade de CO₂ em que o ensaio é realizado com as células LLCMK₂ não produziram interferentes que comprometessem a quantificação do analito de interesse no estudo de metabolismo.

Figura 31. Análise comparativa das curvas de calibração e dos intervalos de confiança para os respectivos coeficientes angulares dos modelos de regressão linear utilizando-se como matrizes meio RPMI recém-preparado, meio RPMI no qual foram incubadas células LLCMK

Comparação das curvas de calibração para os meios de cultura recém-preparado e incubado com células LLCMK₂

Intervalo de confiança para o coeficiente angular (95%)		
matriz	Lim. Inferior	Lim. Superior
meio RPMI recém-preparado	0,01586	0,01638
meio RPMI incubado c/ cepa Y	0,01547	0,01600
meio RPMI incubado c/ cepa Tulahuen	0,01518	0,01605

Os objetos principais do desenvolvimento/validação deste método eram a quantificação tanto do composto NEQ570 que permeou as células contendo formas amastigotas do *T.cruzi*, quanto do composto que permaneceu e/ou foi eliminado em sua forma parental durante o

estudo. Para a quantificação do composto interiorizado é necessário submetê-las previamente a um processo de digestão celular. Esse processo, devido à sua natureza, produz fragmentos de lisado celular que poderiam coeluir com o analito de interesse, comprometendo a quantificação desejada. Por isso, também foram construídas, em triplicatas, curvas de calibração utilizando-se como matrizes, os extratos lisados de células LLCMK₂ infectadas com amastigotas da cepa Y (**figura 32** e **tabela 12**) e amastigotas da cepa Tulahuen (**figura 33** e **tabela 13**). O modelo de regressão linear baseado em mínimos quadrados apresentou um bom ajuste para ambos conjuntos de dados, com boa homocedasticidade e conseguindo explicar mais de 99% de sua variância. Todos os padrões de calibração também apresentaram valores para os desvios-padrões dentro dos limites de aceitação da legislação (Anexos 7.5 e 7.6), sendo a curva, portanto, aprovada.

Figura 32. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em extrato lisado de células LLCMK₂ infectadas com amastigotas da cepa Y.

Tabela 12. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em extrato lisado de células LLCMK₂ infectadas com amastigotas da cepa Y.

equação do modelo linear				coeficiente de correlação	
y = (0,01667±0,00025)x + (0,013±0,011)				r = 0,9978	
ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p

Regressão	2,3343	1	2,3343	4427	<0,0001
Resíduo	0,0100	19	0,0005		
F. ajuste	0,0036	5	0,0007	1,549	0,2793
Erro puro	0,0065	14	0,0005		
Total	2,344	20			
% variação máxima explicada				99,57	
% variação máxima explicável				99,72	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Figura 33. Modelo de regressão linear (A) e distribuição dos resíduos (B) para a curva de calibração do composto Neq0570 em extrato lisado de células LLCMK2 infectadas com amastigotas da cepa Tulahuen.

Tabela 13. Equação e Análise de variância para o modelo linear de regressão da curva de calibração para o composto Neq0570 em extrato lisado de células LLCMK2 infectadas com amastigotas da cepa Tulahuen.

equação do modelo linear	coeficiente de correlação
$y = (0,01699 \pm 0,00043)x + (0,004 \pm 0,019)$	$r = 0,9940$
ANOVA	

fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	2,4249	1	2,4249	1478	< 0,0001
Resíduo	0,0312	19	0,0016		
F. ajuste	0,0118	5	0,0024	1,698	0,2329
Erro puro	0,0194	14	0,0014		
Total	2,456	20			
% variação máxima explicada				98,73	
% variação máxima explicável				99,21	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Assim como aconteceu com as análises comparativas dos meios de cultura RPMI recém-preparado, incubado na ausência ou na presença de células, em relação aos extratos de lisado celular também foi observada alta similaridade entre as curvas de calibração obtidas (**figura 34**). A análise dos intervalos de confiança para os coeficientes lineares das equações mostrou novamente uma boa superposição entre eles, indicando que ausência de diferença estatística com um mínimo de 95% de confiança. Na prática, isso significa que o processo de lise celular não produziu interferentes que comprometessem a quantificação do analito de interesse no estudo de metabolismo.

Figura 34. Análise comparativa das curvas de calibração e dos intervalos de confiança para os respectivos coeficientes angulares dos modelos de regressão linear utilizando-se como matrizes extratos lisados de células LLCMK₂ contendo amastigotas das cepas Y e Tula

Em todos os ensaios de calibração, para a faixa de concentração de interesse (10 a 70 ng.mL⁻¹), o modelo linear de regressão se mostrou adequado para quantificar o composto NEQ0570 nos ensaios celulares com as células LLCMK₂ infectadas com amastigotas de *T. cruzi*. Além disso, os resultados obtidos para as curvas de calibração mostraram não haver diferença estatisticamente significativa entre quaisquer matrizes analisadas (meio RPMI recém-preparado, meio RPMI incubado a 37°C e atmosfera de CO₂ a 5% , meio de cultura extracelular ou extratos de lisado celular).

Sendo assim, decidiu-se pela continuidade dos ensaios de validação e posteriormente pela aplicação do método na quantificação das amostras do ensaio celular utilizando apenas o meio RPMI recém-preparado como matriz analítica. Apenas para ilustrar, a análise comparativa entre as curvas de calibração em diferentes matrizes é também a mesma condição de validade que a ANVISA recomenda quando não se consegue obter a matriz isenta do analito de interesse e se deseja utilizar a curva em solvente para quantificá-lo (ANVISA, RDC 21 de maio de 2012).

4.3.5 Precisão e Exatidão

A precisão é o parâmetro da norma que avalia a dispersão dos dados obtidos para diferentes amostras, nesse caso, as diferentes concentrações estudadas. Segundo a agência regulamentadora esse parâmetro se divide em precisão intracorrida e precisão intercorrida.

Para a precisão intracorrida foram analisadas quantitativamente em um único dia amostras em quintuplicata nas concentrações nominais de 10, 25, 40, 56 e 1000 ng.mL⁻¹, respectivamente Limite Inferior de Quantificação (LIQ), Controle de Qualidade Baixo (CQB), Controle de Qualidade Médio (CQM), Controle de Qualidade Alto (CQA) e Controle de Qualidade de Diluição (CQD). As triplicatas da curva de calibração utilizada no ensaio foram construídas em 5 níveis de concentração na faixa de 10 a 70 ng.mL⁻¹ (anexo 7.7). A precisão foi avaliada por meio do Desvio Padrão Relativo (DPR) e todos os valores estavam dentro dos limites estabelecidos pela guia de validação, que eram de 20% para o LIQ e 15% para os demais (tabela 14) .

Tabela 14. Avaliação da precisão intracorrida para validação do método analítico de quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular.

precisão intracorrida				
padrão	concentração nominal	concentração experimental	n	DPR
LIQ	10 ng.mL ⁻¹	10,8 ± 1,5 ng.mL ⁻¹	5	13,53%
CQB	25 ng.mL ⁻¹	25,00 ± 0,84 ng.mL ⁻¹	5	3,36%
CQM	40 ng.mL ⁻¹	39,89 ± 0,91 ng.mL ⁻¹	5	2,28%
CQA	56 ng.mL ⁻¹	55,0 ± 2,3 ng.mL ⁻¹	5	4,25%
CQD	1000 ng.mL ⁻¹	1143 ± 98 ng.mL ⁻¹	5	7,95%

Para a precisão intercorrida foram analisadas, quantitativamente e em três dias alternados, amostras em quintuplicata nas mesmas concentrações nominais do ensaio anterior. Também foram construídas triplicatas da curva de calibração em 5 níveis de concentração na faixa de 10 a 70 ng.mL⁻¹ (anexo 7.7). Assim como na precisão intracorrida, a avaliação também

foi baseada do DPR. Todos os valores estavam dentro dos limites estabelecidos pela guia de validação, que eram de 20% para o LIQ e 15% para os demais (**tabela 15**).

Tabela 15. Avaliação da precisão intercorrida para validação do método analítico de quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular.

precisão intercorrida				
padrão	concentração nominal	concentração experimental	n	DPR
LIQ	10 ng.mL ⁻¹	11,2 ± 1,5 ng.mL ⁻¹	15	13,04%
CQB	25 ng.mL ⁻¹	23,5 ± 2,4 ng.mL ⁻¹	15	10,27%
CQM	40 ng.mL ⁻¹	41,4 ± 3,4 ng.mL ⁻¹	15	8,13%
CQA	56 ng.mL ⁻¹	56,0 ± 3,8 ng.mL ⁻¹	15	6,87%
CQD	1000 ng.mL ⁻¹	(1,13 ± 0,13).10 ³ ng.mL ⁻¹	15	11,04%

A exatidão é o parâmetro analítico que avalia a concordância entre a concentração nominal de uma amostra e a sua concentração real, a qual é obtida experimentalmente. Assim como a precisão, esse parâmetro também se divide em exatidão intracorrida e exatidão intercorrida. As análises foram realizadas concomitantemente aos ensaios anteriores de precisão, com quintuplicatas de amostras nas mesmas 5 concentrações processadas em um único dia (exatidão intracorrida) e em 3 dias alternados (exatidão intercorrida). Para as quantificações, foram construídas curvas de calibração em triplicatas e em 5 níveis de concentração na faixa de 10 a 70 ng.mL⁻¹ (anexo 7.7). As avaliações das exatidões foram baseadas nos valores dos Erros Padrões Relativos (EPR) (**tabelas 16 e 17**).

Tabela 16. Avaliação da exatidão intracorrida para validação do método analítico de quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular.

exatidão intracorrida				
padrão	concentração nominal	concentração experimental	n	EPR
LIQ	10 ng.mL ⁻¹	10,8 ± 1,5 ng.mL ⁻¹	5	8,45%
CQB	25 ng.mL ⁻¹	25,00 ± 0,84 ng.mL ⁻¹	5	-0,01%
CQM	40 ng.mL ⁻¹	39,89 ± 0,91 ng.mL ⁻¹	5	-0,27%

CQA	56 ng.mL ⁻¹	55,0 ± 2,3 ng.mL ⁻¹	5	-1,88%
CQD	1000 ng.mL ⁻¹	1143 ± 98 ng.mL ⁻¹	5	+14,27%

Tabela 17. Avaliação da exatidão intercorrida para validação do método analítico de quantificação do composto NEQ0570 em ensaio celular.

exatidão intercorrida				
padrão	concentração nominal	concentração experimental	n	EPR
LIQ	10 ng.mL ⁻¹	11,2 ± 1,5 ng.mL ⁻¹	15	11,73%
CQB	25 ng.mL ⁻¹	23,5 ± 2,4 ng.mL ⁻¹	15	-6,21%
CQM	40 ng.mL ⁻¹	41,4 ± 3,4 ng.mL ⁻¹	15	3,53%
CQA	56 ng.mL ⁻¹	56,0 ± 3,8 ng.mL ⁻¹	15	0,04%
CQD	1000 ng.mL ⁻¹	(1,13 ± 0,13).10 ³ ng.mL ⁻¹	15	+13,37%

Em ambos ensaios (exatidão intradia e interdia), todos os valores obtidos para os EPRs estavam dentro dos limites estabelecidos pela guia de validação, que eram de ±20% para o LIQ e ±15% para os demais.

Os resultados apresentados mostraram que ambos parâmetros estão em conformidade com as recomendações estabelecidas no guia oficial de validação. Pode-se dizer, portanto, que o método desenvolvido neste trabalho é preciso e exato para quantificar o composto NEQ0570 no ensaio celular com as células LLCMK₂ infectadas com amastigotas de *T. cruzi*.

4.3.6 Estabilidade do analito em matriz biológica

Todas as soluções de trabalho utilizadas na validação do método foram recém-preparadas. A solução primária do composto NEQ0570 na concentração 1 µM e a solução primária do PI (odanacatibe) na concentração de 1mM foram as únicas soluções submetidas a ciclos de congelamento / descongelamento. Por isso, neste trabalho foi realizada apenas a avaliação da estabilidade do analito e do PI em solução. Para tal, foram analisadas triplicatas da solução de NEQ0570 nas concentrações de 10 ng.mL⁻¹ (LIQ), 40 ng.mL⁻¹ (CQM) e 70 ng.mL⁻¹ (LSQ) e triplicatas da solução do PI na concentração de trabalho (40 µg.mL⁻¹). Foram

utilizadas tanto amostras recém-preparadas (ou seja, pesadas, solubilizadas e diluídas) e amostras cujas diluições foram realizadas após múltiplos ciclos de congelamentos e descongelamentos. A avaliação foi baseada na análise comparativa das respostas instrumentais.

De acordo com os resultados apresentados nas **tabelas 18 e 19**, as respostas analíticas observadas para as soluções primárias do composto NEQ0570 e do PI mostraram um desvio inferior a 10% mesmo após 6 ciclos de congelamento / descongelamento para todas as concentrações testadas. O limite estabelecido pelo guia oficial é de 15%.

Tabela 18. Avaliação da estabilidade da solução primária de NEQ0570 1 □ □ M após sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento.

Concentração:	10 ng.mL⁻¹		
Ciclo	Resposta analítica média	n	Desvio
Recém-preparado	(53,51±0,70).10 ³	3	-
1°	(48,47±0,40).10 ³	3	-9,43%
2°	(53,1±1,5).10 ³	3	-0,75%
3°	(51,2±3,6).10 ³	3	-4,33%
4°	(52,4±3,9).10 ³	3	-2,12%
5°	(50,8±3,9).10 ³	3	-5,12%
6°	(54,9±1,0).10 ³	3	+2,60%
Concentração:	40 ng.mL⁻¹		
Ciclo	Resposta analítica média	n	Desvio
Recém-preparado	(208,6±4,2).10 ³	3	-
1°	(205±26).10 ³	3	-1,51%
2°	(211,1±4,6).10 ³	3	+1,20%
3°	(219±15).10 ³	3	+5,05%
4°	(220±29).10 ³	3	+5,30%
5°	(219±30).10 ³	3	+4,88%
6°	(213±17).10 ³	3	+8,37%
Concentração:	70 ng.mL⁻¹		
Ciclo	Resposta analítica média	n	Desvio
Recém-preparado	(346±12).10 ³	3	-
1°	(344,0±7,3).10 ³	3	-0,47%

2°	$(357 \pm 31) \cdot 10^3$	3	+3,33%
3°	$(374 \pm 28) \cdot 10^3$	3	+8,25%
4°	$(359 \pm 38) \cdot 10^3$	3	+4,00%
5°	$(372 \pm 46) \cdot 10^3$	3	+7,70%
6°	$(364 \pm 48) \cdot 10^3$	3	+5,30%

Tabela 19. Avaliação da estabilidade da solução primária de Odanacatibe (PI) 1 μ M após sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento

Concentração:	40 μ g.mL ⁻¹		
Ciclo	Resposta analítica média	n	Desvio
Recém-preparado	$(324 \pm 11) \cdot 10^3$	3	-
1°	$(318 \pm 24) \cdot 10^3$	3	-1,78%
2°	$(298,6 \pm 8,2) \cdot 10^3$	3	-7,91%
3°	$(320,9 \pm 1,7) \cdot 10^3$	3	-1,04%
4°	$(311 \pm 19) \cdot 10^3$	3	-4,12%
5°	$(312 \pm 16) \cdot 10^3$	3	-3,85%
6°	$(354,5 \pm 5,6) \cdot 10^3$	3	+9,33%

Dessa forma, pode-se dizer que as soluções primárias utilizadas nesse trabalho são estáveis e resistentes a múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento.

4.4 Aplicação do método analítico no estudo do metabolismo do composto NEQ0570 em células LLCMK2 infectadas com amastigotas de *T. cruzi*.

4.4.1 Análise quantitativa do composto NEQ0570 em meio extracelular

O principal objetivo dessa etapa do trabalho foi avaliar a quantidade do composto de interesse que permaneceu sem atuar nas células de interesse, seja permeando a membrana celular ou interagindo com alvos na sua superfície. Para isso, após o período de incubação de 3 dias, amostras do meio extracelular foram coletadas, processadas e analisadas quantitativamente. Nesse estudo foram incluídas amostras de (i) meio extracelular de culturas de células LLCMK₂ infectadas com amastigotas da cepa Tulahuen; (ii) meio extracelular de

culturas de células LLCMK₂ infectadas com amastigotas da cepa Y; e (iii) meio de cultura submetido às mesmas condições de incubação, porém na ausência de células. Os meios extracelulares das culturas de LLCMK₂ foram ainda subdivididos em células que receberam o tratamento com o composto NEQ0570 e aquelas que não o receberam (controle negativo). Os cromatogramas obtidos para as amostras descritas acima são mostrados na **figura 35**.

Figura 35. Cromatogramas obtidos para a análise do meio extracelular no ensaio de metabolismo do composto NEQ0570 em culturas de células LLCMK2 (Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-85% B, 14 min, vazão: 1,0 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5µL; Temperatura 35°; Detecção: 265 nm

Para a análise quantitativa do composto NEQ0570 no meio extracelular, foi construída uma curva de calibração em triplicata e 5 níveis de concentração. Todos os padrões atenderam

aos critérios de aceitação da ANVISA (Anexo 7.8). O modelo linear apresentou um bom ajuste ao conjunto de dados (**figura 36**).

Figura 36. Modelo de regressão linear, gráfico de resíduos e análise de variância da curva de calibração construída a análise quantitativa

equação do modelo linear				coeficiente de correlação	
y = (0,01649±0,00017)x + (0,0160±0,0075)				r = 0,9993	
ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	1,835	1	1,8355	9952	< 0,0001
Resíduo	0,0024	13	0,0002		
F. ajuste	0,0002	3	0,0001	0,336	0,6954
Erro puro	0,0022	10	0,0002		
Total	1,838	14			
% variação máxima explicada				99,87	
% variação máxima explicável				99,88	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

Inicialmente, como a concentração esperada de composto em meio extracelular era desconhecida, foram preparadas amostras considerando-se 3 diferentes cenários: (i) apenas 10% do composto NEQ0570 adicionado no início do experimento estaria em sua forma não-metabolizada (parental) do meio de cultura; (ii) 50% do composto estaria na forma parental; ou (iii) 90% do composto estaria na forma não-metabolizada. Para cada situação, foram preparadas amostras em quintuplicata. Nas análises realizadas, foi observado que as amostras correspondentes à situação (i) apresentaram resposta analítica superior àquela do limite superior de quantificação da curva de calibração e, portanto, não poderiam ser utilizadas para a análise. As amostras correspondentes à situação (iii), por sua vez, apresentaram resposta analítica muito próxima do limite inferior de quantificação e foram também descartadas da análise. Dessa forma, a análise quantitativa foi realizada considerando-se o cenário da situação (ii) e o resultado está apresentado na **tabela 20**.

Tabela 20. Análise quantitativa do composto NEQ0570 em meio extracelular.

Ensaio celular do composto NEQ0570 em linhagem LLCMK ₂ Infectada com amastigotas <i>T. cruzi</i> .		
Cepa da amastigota	Concentração inicial NEQ0570 no meio extracelular	Concentração no meio extracelular após 3 dias de incubação
Tulahuen	10 µM	(2,114±0,050)µM
Y	10 µM	(2,138±0,095)µM

Os resultados obtidos mostraram que, independentemente da cepa infectante das células, aproximadamente 20% da concentração inicial do composto NEQ0570 foi encontrado em sua forma parental no meio extracelular. O que não necessariamente significa que os outros 80% de fato tenham agido na célula ou na amastigota. Um dos grandes desafios do desenvolvimento de fármacos para Doença de chagas é entender completamente a interação e a relevância de cada cepa para o desenvolvimento e manutenção da doença. O fato de termos cerca de 20% de composto recuperado do meio extacelular, independentemente da cepa estudada, pode ser considerado um resultado promissor, uma vez que os fármacos que obtiveram maior sucesso nas fases subsequentes de estudos não apresentaram dependência da cepa analisada (Chatelain, 2014)

4.4.2 Análise quantitativa do composto NEQ0570 em extrato de lisado celular

4.4.2.1 Determinação do número médio total de células LLCMK2 no estudo celular

Após retirar o meio dos frascos de cultura, foi adicionada tripsina para clivar as ligações peptídicas formadas entre proteínas de membrana e a superfície. Dessa forma, as células perdem a aderência e podem ser facilmente removidas do frasco. O soro de feto bovino, adicionado logo em seguida tem a função de interromper a reação da tripsina, evitando assim que essa enzima continue clivando ligações peptídicas na membrana celular, o que levaria ao rompimento das células.

A contagem das células suspensas realizada na câmara de Neubauer apresentou os resultados mostrados na **tabela 21**. Como se pode observar, os resultados para as contagens foram bastante semelhantes, sugerindo que o composto, na concentração de 10 μM , não foi capaz de matar as células. Sabe-se também, a partir de estudos anteriores realizados pelo grupo que na concentração utilizada nesse experimento, o composto NEQ0570 também apresenta inatividade para as amastigotas. A título de comparação, derivados fluorados e com modificações em P3, apresentaram valores de EC_{50} de 0,72 μm e 107 μm para cepas Y e Tulahuen para a forma amastigota de *T. cruzi*, enquanto que o composto de referência (Bezonidazol) apresentou valores de EC_{50} de 5,37 μm e 3,23 μm para cepas Y e Tulahuen, respectivamente (Quilles et al., 2020).

Por isso, nos cálculos subsequentes (ver a próxima seção), decidiu-se por utilizar o número médio de células.

Tabela 21. Contagem de células LLCMK2 viáveis no estudo celular.

Cepa infectante da cultura celular	Concentração de células
Tulahuen (controle negativo)	$3,62.10^5$ células.mL ⁻¹
Tulahuen (tratamento com NEQ0570)	$5,00.10^5$ células.mL ⁻¹
Y (controle negativo)	$2,73.10^5$ células.mL ⁻¹
Y (tratamento com NEQ0570)	$2,50.10^5$ células.mL ⁻¹
Média (n=4)	$(3,5\pm 1,1).10^5$ células.mL ⁻¹

4.4.2.2 Quantificação do composto NEQ0570 no extrato de lisado por HPLC-UV

Já nessa etapa do trabalho, objetivo principal foi avaliar a quantidade do composto de interesse que permeou a membrana celular ou interagiu com alvos na sua superfície, mas que

permaneceu em sua forma parental. Para isso, após o período de incubação de 3 dias e após a retirada do meio extracelular, as células foram tripsinizadas e lisadas. O extrato resultante foi analisado quantitativamente. Foram incluídas amostras de (i) extrato lisado de células LLCMK₂ infectadas com amastigotas da cepa Tulahuen e tratadas com NEQ0570 10 µM; e (ii) extrato lisado de células LLCMK₂ infectadas com amastigotas da cepa Y e tratadas com NEQ0570 10 µM; e (iii) extratos lisados das mesmas linhagens, infectadas com os mesmos parasitos e que foram incubadas somente com meio de cultura RPMI (controles negativos). Os cromatogramas obtidos para as amostras descritas acima são mostrados na **figura 37**.

Figura 37. Cromatogramas obtidos para a análise dos extratos de lisado celular no ensaio de metabolismo do composto NEQ0570 em culturas de células LLCMK2 (Condições cromatográficas: Fase A: H₂O; Fase B: ACN; 15-85% B, 14 min, vazão: 1,0 mL.min⁻¹; Vinjeção: 5μL; Temperatura 35°C; Detecção: 225 e 265 nm)

Para a análise quantitativa do composto NEQ0570 nos extratos, também foi construída uma curva de calibração em triplicata e 5 níveis de concentração. Todos os padrões atenderam

aos critérios de aceitação da ANVISA (Anexo 7.9). O modelo linear apresentou um bom ajuste ao conjunto de dados (**figura 38**).

Figura 38. Modelo de regressão linear, gráfico de resíduos e análise de variância da curva de calibração construída a análise quantitativa

equação do modelo linear				coeficiente de correlação	
y = (0,01598±0,00037)x + (0,001±0,017)				r = 0,9966	
ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	1,724	1	1,7237	1.915	< 0,0001
Resíduo	0,0117	13	0,0009		
F. ajuste	0,0027	3	0,0009	1,007	0,4014
Erro puro	0,0090	10	0,0009		
Total	1,735	14			
% variação máxima explicada				99,33	
% variação máxima explicável				99,48	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

Assim como aconteceu na análise do meio extracelular, também se desconhecia inicialmente a concentração esperada para o composto NEQ0570 no extrato de lisado celular. Por isso, nessa análise foram novamente preparadas quintuplicatas de amostras considerando-se os mesmos 3 cenários descritos anteriormente: (i) apenas 10%, (ii) 50% ou (iii) 90% do composto adicionado no início do experimento teria permeado a célula ou interagido com a membrana, porém sem ser metabolizado. Nessas análises também foi observado que as amostras correspondentes à situação (i) apresentaram resposta analítica muito superior àquela do limite superior de quantificação da curva de calibração e, portanto, não poderiam ser utilizadas para a análise. As amostras correspondentes à situação (iii), por sua vez, apresentaram resposta analítica próxima do limite inferior de quantificação e foram também descartadas da análise. Dessa forma, a análise quantitativa foi realizada considerando-se o cenário da situação (ii) e o resultado está apresentado na **tabela 22**.

Tabela 22. Análise quantitativa do composto NEQ0570 em extrato de lisado celular.

Ensaio celular do composto NEQ0570 em linhagem LLCMK ₂ Infectada com amastigotas <i>T. cruzi</i> .			
Cepa da amastigota	Concentração inicial NEQ0570 no ensaio	Concentração extrato lisado após 3 dias de incubação*	Quantidade de composto por célula**
Tulahuen	10 µM	(4,41±0,27)µM	(12,8±4,2) fmol.cel ⁻¹
Y	10 µM	(4,12±0,38)µM	(11,9±4,1) fmol.cel ⁻¹

* Esta concentração foi obtida a partir do volume do lisado celular (extrato) que foi ressuspense no procedimento de preparação da amostra e não deve ser usado como referência de concentração intracelular. ** Neste cálculo a concentração de células é usada (células/mL) para a obtenção da razão.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 18), tem-se uma quantidade de composto por célula na ordem de fentomol. Os valores provenientes da literatura para quantificação de composto no meio intracelular são usualmente dados como massa (ou mol) em razão do número de células ou por massa de proteína obtida do lisado celular

Desta forma, a quantidade de matéria (número de mol) é o único termo apresentado em todas as amostras (uma vez que o analito é dado como mol/L no meio extracelular, enquanto deve ser dado como mol/célula no intracelular). Ao fazer os cálculos considerando as diluições e volumes das amostras obtidos para os meios extra e intracelular, tem-se cerca de 66-69% de composto parental permaneceu nas amostras extra e intracelulares, sendo que 31-34% foi

metabolizado e/ou degradado durante o ensaio celular (**tabela 23**). Isto demonstra que o composto Neq0570 apresenta uma boa estabilidade. Do total de 66-69% do composto presente no frasco de cultura após 3 dias de ensaio, tem-se 43-46% de Neq0570 no meio intracelular.

Tabela 23. Quantificação do número porcentagem de mol do composto NEQ0570 no ensaio celular para a linhagem LLC-MK2 infectada com amastigotas de *T. cruzi*.

Cepa da amastigota	Quantidade inicial (nmol)	Quantidade final de analito (nmol; % mol)		Total (%mol)
		Extracelular	Intracelular	
Tulahuen	200	44,3; 22,2	92,6; 46,3	68,5
Y	200	44,9; 22,5	86,5; 43,3	65,7

4.5. *Estudo de metabolismo e degradação*

A predição de metabólitos é uma técnica rápida, simples e promissora de desreplicação direcionada a compostos que possuem semelhanças estruturais. Baseado no conhecimento que se tem a respeito do polimorfismo estrutural e rotas biossintéticas de um composto, ou classe de compostos, pode-se prever uma série de compostos analogamente estruturais. Um banco de dados contendo as estruturas parentais e seus análogos deve ser construído. Em seguida informações sobre as vias de fragmentação obtidas em relação aos compostos parentais são usadas para identificar compostos observados com mesma razão massa/carga do banco de dados construído (STAVRIANIDI, 2020).

Para esse estudo o banco de dados foi construído usando o inibidor Neq0570 como referência e todas as vias de metabolismo de células de mamíferos como vias de fragmentação e metabolismo.

Após as análises dos meio extra e intra celulares das cepas Y e Tulahuen foi possível perceber que não houve diferenças significativas entre as respectivas cepas, mas houve entre os respectivos meios, ou seja, os cromatogramas para o meio extracelular das cepas Y e Tulahuen são virtualmente iguais, assim como os cromatogramas para ambas as cepas no meio intracelular. Porém, houve uma diferença significativa entre os meios intra e extra celulares.

Pelos resultados obtidos, percebe-se que dois dos possíveis metabólitos são mais hidrofóbicos do que o analito.

A **tabela 24** resume os produtos de metabolismo preditos e identificados pelos programas, sendo que as possíveis estruturas químicas estão identificadas na **figura 39**. Embora as estruturas dos metabólitos sejam indicadas a partir do conhecimento de reações de oxidação preferenciais em *para* ao anel aromático, não foi realizada uma caracterização estrutural para que estas estruturas fossem comprovadas, sendo ilustradas somente as propostas de metabólitos em possíveis posições no composto parental.

Tabela 24. Proposta de possíveis metabólitos e/ou produtos de degradação do analito Neq0570.

Massa molar	Fórmula Química	Reação Proposta	Aduto Identificado
Meio Extracelular			
429,1	$C_{20}H_{19}N_3O_6S$	Oxidação + Sulfonação	H^+
525,1	$C_{26}H_{27}N_3O_9$	Oxidação + Glicuronidação	H^+
Meio Intracelular			
349,1	$C_{20}H_{19}N_3O_3$	Oxidação	H^+
285,1	$C_{16}H_{15}NO_4$	Oxidação + Hidrólise	H^+

Fonte: próprio autor.

É importante destacar que existe um possível metabólito e/ou produto de degradação que foi identificado pelo MetaboliteDetect, mas não foi previsto pelo MetabolitePredict. Este, possui massa de 922,4.

Outro fato que merece atenção é que o pico que possui massa 285, 1, do meio intracelular pode ser o produto de degradação de um produto de metabolismo prévio. A sugestão é de uma oxidação no composto parental seguida da perda de sua porção amida para gerar um ácido carboxílico. Esse fato chama atenção, pois o grupo já trabalha com a modificação das carbonilas das amidas para grupos CF_3 com o intuito de melhorar a estabilidade química e biológica dessas unidades da molécula.

Figura 39. Proposta de metabolização do composto parental Neq0570 obtida a partir dos ensaios in vitro.

Fonte: próprio autor.

Vale salientar que a estabilidade química e biológica é sempre buscada no processo de desenvolvimento de um fármaco, uma vez que os produtos gerados pelo metabolismo ou degradação podem afetar a eficiência do candidato a fármaco - LI; GONZALEZ; MA, 2012, ainda que a metabolização de xenobióticos seja um processo usual e não impeça o desenvolvimento de fármacos. No entanto, os fármacos possuem pontos passíveis de metabolização para auxiliar na sua inativação e consequente eliminação do organismo, constituindo-se como *soft drugs* (Bodor & Buchwald, 2000)

Comumente, reações de oxidação e redução ocorrem no citocromo P450 por meio de oxiredutases (Quilles Jr. *et al.*, 2019) que levam ao metabolismo de fase I. Usualmente, as reações de oxidação ocorrem em posições menos impedidas, sendo as posições *para* nos anéis aromáticos as mais favoráveis para tal (Figura 41). Esta também foi uma das posições preferenciais para oxidação identificadas nos programas on-line XenoSite e BioTransformer (Djombou-Feunang *et al.*, 2019; Zaretski *et al.*, 2013). A partir destes possíveis metabólitos

oxidados, as reações de fase II pontuadas podem ocorrer, como a sulfonilação (por meio de sulfonil transferase) de glicuronidação (glicuronil transferase), Figura 41. Além destas, a hidrólise da ligação peptídica pode ser realizada por meio de proteases, uma vez que o composto é um peptideomimético, com a clivagem da cadeia principal em sua estrutura (Figura 41).

A maior hidrofilia dos produtos pode facilitar sua excreção do meio celular. Além disso, é importante frisar que, para identificar inequivocamente os produtos observados, seria necessário isolar e caracterizar cada um deles.

4.6. Estudo da Reatividade Intrínseca

Como dito anteriormente, o processo de inibição pode ser tempo-dependente, e o efeito *off-target* (a reação do grupo de interesse, nesse caso, as dipeptidil nitrilas, com outros alvos dentro das células) modulado por esse processo. Por causa disso, resolveu-se avaliar a reatividade intrínseca dos inibidores planejados e sintetizados pelo grupo frente a duas das principais moléculas contendo tióis no nosso organismo – cisteína e glutatona, tendo como base, o inibidor codificado como Neq0570.

A reação de nitrilas com tióis, como a cisteína e glutatona, pode ocorrer de maneira reversível, formando um intermediário tiomidato. Contudo, a reação pode tomar um caminho irreversível quando o tiol é a cisteína. Se há uma amina livre, o tiomidato rearranja rapidamente para formar uma tiazolina (**figura 40**) (BERTEOTTI *et al.*, 2014).

Figura 40. Reações de nitrilas com tióis presentes nas células de mamíferos. a) Reação reversível de uma nitrila com um tiol. b) Reação irreversível de uma nitrila com cisteína.

Fonte: adaptado de BERTEOTTI *et al.*, 2014

A reação apresentada no item a) da figura 40 é considerada uma reação de segunda ordem, pois depende tanto da concentração de nitrila quanto da concentração de tiol.

$$v = k_1 \times [tiol] \times [nitrila]$$

Entretanto, se mantivermos a concentração de nitrila muito inferior a concentração de tiol ($[tiol] \gg [nitrila]$), a concentração de tiol permanecerá praticamente inalterada durante toda a reação, o que nos permitirá tratar a reação como uma reação de pseudo-primeira ordem.

$$v = k_{obs} \times [nitrila]$$

Como k_{obs} é uma função da constante de velocidade e da concentração constante de tiol, temos que:

$$v = k_1 \times [tiol]$$

Por tanto, podemos encontrar o valor de k_1 dividindo o valor de k_{obs} pelo valor da concentração de tiol.

Essa aproximação facilita o trabalho, pois reduz o número de variáveis experimentais, permitindo tratar a reação, matematicamente, como uma reação de primeira ordem. Estratégia essa, que já foi utilizada anteriormente em estudos similares a esse (MACFAUL; MORLEY; CRAWFORD, 2009).

Como dito anteriormente, já é relatado na literatura que a inserção do grupo ciclopropano na posição P1 na estrutura de dipeptidil nitrilas protege o carbono da nitrila do ataque nucleofílico de outras substâncias, o que os tornaria menos reativos, e poderia levar a um menor efeito *off-target*. Com isso, nossa hipótese inicial é a de que o inibidor codificado como Neq0570 teria um perfil reativo mais adequado aos fins do grupo de pesquisa.

Um plantel de inibidores (os compostos denominados como Neq0570, Neq0409, Neq0690, Neq0656, Neq0682, Nivaldipina e K777) foi testado a fim de comparar suas reatividades e verificar se a hipótese inicial poderia ser validada. Outros *warheads* também foram testados para nos fornecer informações sobre a reatividade das nitrilas frente a estes, como mostram as **tabelas 25 e 26**.

Tabela 25. Tempos de meia-vida para os inibidores sintetizados pelo grupo frente a cisteína.

Inibidor	Warhead	$t_{1/2}$	k ($L.mol^{-1}.min^{-1}$)
Neq0570	Nitrila-ciclopropano	159,0 min	$4,36 \times 10^{-3}$
Neq0409	Nitrila-metileno	74,3 min	$9,33 \times 10^{-3}$
Neq0690	Azanitrila	21,9 min	$3,15 \times 10^{-2}$
Neq0656	Aldeído	22,1 min	$3,12 \times 10^{-2}$
Nilvadipina*		48,9min	$1,41 \times 10^{-2}$

* A Nilvadipina pode ser usada como um controle, uma vez que ela já foi usada como fármaco de referência em outros estudos (MACFAUL; MORLEY; CRAWFORD, 2009).

Fonte: próprio autor.

Tabela 26. Tempos de meia-vida para os inibidores sintetizados pelo grupo frente a glutatona.

Inibidor	Warhead	$t_{1/2}$	k (L.mol ⁻¹ .min ⁻¹)
Neq0570	Nitrila-ciclopropano	85,6 min	$8,09 \times 10^{-3}$
Neq0409	Nitrila-metileno	48,9 min	$1,47 \times 10^{-3}$
Neq0690	Azanitrila	68,4 min	$1,01 \times 10^{-2}$
Neq0656	Aldeído	39,9 min	$1,73 \times 10^{-2}$
Nilvadipina*		>5000 min	-

Fonte: próprio autor.

Como visto nas **tabelas 25 e 26**, a inserção do ciclopropano no inibidor Neq0570, de fato, diminui a reatividade deste frente aos dois tióis analisados, em comparação ao inibidor Neq0409. Este último, análogo ao Neq0570, com a única diferença de não possuir o ciclopropano na posição P1 (Figura 8).

Também é interessante notar como a nitrila como *warhead* modula a atividade inibitória dos candidatos a fármaco. O inibidor Neq0690 é uma azanitrila e o Neq0656, um aldeído, como mostram as **figuras 41 e 42**.

A azanitrila e o aldeído são mais reativos do que o inibidor Neq0570 em ambos os modelos estudados, como esperado. Entretanto, o aldeído e azanitrila têm suas taxas de reatividade virtualmente iguais frente à cisteína.

Estes resultados estão de acordo com os testes citotóxicos realizados previamente pelo grupo, e eles sugerem que o aldeído como *warhead* possui uma reatividade balanceada e que pode levar a um aumento na atividade tripanocida com índice de seletividade desejado, uma vez que não há pouca diferença entre os tempos de meia-vida nos dois modelos estudados, apesar dele ser mais reativo que a nitrila.

Figura 41. Decaimento exponencial da área dos inibidores sintetizados pelo grupo frente a cisteína, medido por HPLC-UV.

Fonte: próprio autor.

Figura 42. Decaimento exponencial da área dos inibidores sintetizados pelo grupo frente a glutatona, medido por HPLC-UV.

Fonte: próprio autor.

A **figura 43** mostra o perfil de decaimento exponencial para o fármaco de referência utilizado nesses ensaios, a Nilvadipina. Como mostram as **tabelas 25** e **26**, só foi possível determinar o tempo de meia-vida para ela no ensaio com cisteína, uma vez que a reação com glutathiona apresentou cinética extremamente lenta.

Figura 43. Perfil de decaimento exponencial do fármaco nilvadipina com cisteína.

Fonte: próprio autor.

A diferença de reatividade entre os tióis-alvos (cisteína e glutathiona) e os inibidores pode ser atribuída à diferença de pKa dos tióis (9,3 para a glutathiona e 8,3 para a cisteína).

O inibidor K777 é um conhecido inibidor irreversível de cruzaina e que chegou ao final da fase pré-clínica de desenvolvimento. Este inibidor possui uma vinil-sulfona como *warhead*. Por esse motivo, avaliamos o perfil reativo deste inibidor no modelo aquoso com cisteína, frente a um análogo sintetizado pelo grupo e que substitui a vinil-sulfona por uma nitrila, como mostra a **figura 44**.

Como esperado, o análogo sintetizado pelo grupo possui maior tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do que o K777. Com $t_{1/2}$ de 12,02 minutos e 79,10 minutos para o K777 e o inibidor (Neq0682), respectivamente, o composto denominado Neq0682 possui taxa reacional aproximadamente 6,5 vezes menor do que o K777, indicando que a nitrila de fato, possui um perfil reacional e de estabilidade mais desejado.

Figura 44. Perfil de decaimento exponencial com cisteína para os inibidores K777 e Neq0682.

Fonte: próprio autor.

Por fim, sob o risco de o decaimento observado ser causado pela degradação dos inibidores em solução e não por causa da reação destes com os tióis estudados, realizou-se um branco dos inibidores em solução. A mesma solução de análise foi preparada, com exceção de não conter nenhum dos tióis em questão. Alíquotas de 5 μL foram injetadas no HPLC nas mesmas condições de análise e mesmos intervalos de tempo das amostras de estudo, como mostra a **figura 45**.

Figure 1 displays six 3D chromatograms, each representing a different neuropeptide: Neq0570, Neq0409, Neq0656, Neq0690, Neq0682, and Neq0777. Each chromatogram shows the signal intensity (uV) on the vertical axis, the retention time (min) on the horizontal axis, and the fraction number (1 to 10) on the depth axis. The peaks are labeled with their retention times, and the legend indicates the corresponding fraction for each peak.

Neq0570

Peaks (min): 8.136, 8.144, 8.151, 8.159, 8.169, 8.138, 8.125, 8.151, 8.143, 8.141.

Fractions: 1 570 Branco.lcd - Ch1, 2 570 Branco001.lcd - Ch1, 3 570 Branco002.lcd - Ch1, 4 570 Branco003.lcd - Ch1, 5 570 Branco004.lcd - Ch1, 6 570 Branco005.lcd - Ch1, 7 570 Branco006.lcd - Ch1, 8 570 Branco007.lcd - Ch1, 9 570 Branco008.lcd - Ch1, 10 570 Branco009.lcd - Ch1.

Neq0409

Peaks (min): 7.608, 7.612, 7.604, 7.674, 7.669, 7.660, 7.665, 7.648, 7.671, 7.662.

Fractions: 1 409 Branco.lcd - Ch1, 2 409 Branco001.lcd - Ch1, 3 409 Branco002.lcd - Ch1, 4 409 Branco003.lcd - Ch1, 5 409 Branco004.lcd - Ch1, 6 409 Branco005.lcd - Ch1, 7 409 Branco006.lcd - Ch1, 8 409 Branco007.lcd - Ch1, 9 409 Branco008.lcd - Ch1, 10 409 Branco009.lcd - Ch1.

Neq0656

Peaks (min): 8.221, 8.225, 8.229, 8.233, 8.237, 8.241, 8.245, 8.249, 8.253, 8.257.

Fractions: 1 656 Branco.lcd - Ch1, 2 656 Branco001.lcd - Ch1, 3 656 Branco002.lcd - Ch1, 4 656 Branco003.lcd - Ch1, 5 656 Branco004.lcd - Ch1, 6 656 Branco005.lcd - Ch1, 7 656 Branco006.lcd - Ch1, 8 656 Branco007.lcd - Ch1, 9 656 Branco008.lcd - Ch1, 10 656 Branco009.lcd - Ch1.

Neq0690

Peaks (min): 9.362, 9.364, 9.357, 9.371, 9.372, 9.355, 9.362, 9.373, 9.328, 9.353.

Fractions: 1 690 Branco.lcd - Ch1, 2 690 Branco001.lcd - Ch1, 3 690 Branco002.lcd - Ch1, 4 690 Branco003.lcd - Ch1, 5 690 Branco004.lcd - Ch1, 6 690 Branco005.lcd - Ch1, 7 690 Branco006.lcd - Ch1, 8 690 Branco007.lcd - Ch1, 9 690 Branco008.lcd - Ch1, 10 690 Branco009.lcd - Ch1.

Neq0682

Peaks (min): 10.556, 10.560, 10.564, 10.568, 10.572, 10.576, 10.580, 10.584, 10.588, 10.592.

Fractions: 1 682 Branco.lcd - Ch1, 2 682 Branco001.lcd - Ch1, 3 682 Branco002.lcd - Ch1, 4 682 Branco003.lcd - Ch1, 5 682 Branco004.lcd - Ch1, 6 682 Branco005.lcd - Ch1, 7 682 Branco006.lcd - Ch1, 8 682 Branco007.lcd - Ch1, 9 682 Branco008.lcd - Ch1, 10 682 Branco009.lcd - Ch1.

Neq0777

Peaks (min): 8.214, 8.114, 8.188, 8.182, 8.193, 8.197, 8.180, 8.195, 8.180, 8.184.

Fractions: 1 K_777 Branco.lcd - Ch1, 2 K_777 Branco001.lcd - Ch1, 3 K_777 Branco002.lcd - Ch1, 4 K_777 Branco003.lcd - Ch1, 5 K_777 Branco004.lcd - Ch1, 6 K_777 Branco005.lcd - Ch1, 7 K_777 Branco006.lcd - Ch1, 8 K_777 Branco007.lcd - Ch1, 9 K_777 Branco008.lcd - Ch1, 10 K_777 Branco009.lcd - Ch1.

100

Como observado acima, os inibidores são estáveis em solução, pelo menos dentro da faixa de tempo que os experimentos foram realizados. Confirmando que o decaimento da área cromatográfica apresentado, e consequentemente, a taxa reativa calculada, se deve à reação dos inibidores com os tióis estudados.

5. Conclusão

O método cromatográfico desenvolvido e validado se mostrou adequado às análises da dipeptidil nitrila sintetizada pelo grupo, codificada como Neq0570. O método apresentou seletividade, nenhum efeito de matriz foi observado, ou efeito residual nas análises. Além disso, a linearidade na faixa de 10-70 ng.mL⁻¹ foi verificada e o método apresentou acurácia. Todos os valores dos coeficientes de variação e erro padrão estão dentro da faixa estabelecida pela norma vigente da agência reguladora, ANVISA.

A sua aplicação para os ensaios celulares demonstrou que foi factível quantificar o composto parental nos meios intra e extracelular usando duas cepas de *T. cruzi* infectando a célula hospedeira LLCMK₂. Após os três dias de incubação, 22-23% do composto ainda estava presente no meio extracelular, quando comparado com a quantidade adicionada inicialmente no ensaio. No meio intracelular, a porcentagem foi praticamente o dobro (43-46%) o que demonstra a permeabilidade do composto. Entre 66 a 69% do composto parental ainda estava presente no frasco de cultura após 3 dias de ensaio, o que indica a estabilidade da substância. Os possíveis metabólitos foram propostos baseados na estrutura do composto parental, sendo também avaliada a reatividade intrínseca desta substância e de outros derivados sintetizados pelo grupo.

Estes resultados, juntamente com os dados obtidos em relação à estabilidade química e biológica, os estudos *in silico* e o estudo da reatividade intrínseca, levam a proposição de modificações químicas nas substâncias para a modulação do perfil farmacocinético, dando segmento ao ciclo de “planejamento-síntese-teste-planejamento” que o grupo de pesquisa utiliza para nortear os trabalhos desenvolvidos. A substituição da cabonila por um grupo CF₃, para aumentar a estabilidade biológica frente a metabolização celular, como indicado pela identificação e proposição dos metabólitos gerados é um dos exemplos de dados encontrados que nos ajudam a completar o ciclo mencionado. Outro dado importante é a diminuição da reatividade intrínseca, medida por meio do tempo de meia-vida, nos dois modelos aquosos

compostos por glutathione e cisteína. Nota-se que a inserção do grupo ciclopropano é de fato, importante para modular a reatividade dos inibidores sintetizados pelo grupo. Assim, este estudo contribuiu para a gênese planejada de fármacos a partir do estabelecimento do composto Neq0570 como um bom composto matriz (*lead*) para futuras modificações estruturais na fase de desenvolvimento.

6. Referências

- ANG, K. K. H.; RATNAM, J.; GUT, J.; LEGAC, J.; HANSELL, E.; MACKEY, Z. B.; SKRZYPCZYNSKA, K. M.; DEBNATH, A.; ENGEL, J. C.; ROSENTHAL, P. J.; McKERROW, J. H.; ARKIN, M. R.; RENSLO, A. R. Mining a cathepsin inhibitor library for new antiparasitic drug leads. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. 1–13, 2011. DOI 10.1371/journal.pntd.0001023.
- ASAAD, N.; BETHEL, P. A.; COULSON, M. D.; DAWSON, J. E.; FORD, S. J.; GERHARDT, S.; GRIST, M.; HAMLIN, G. A.; JAMES, M. J.; JONES, E. V.; KAROUTCHI, G.; KENNY, P. W.; MORLEY, A. D.; OLDHAM, K.; RANKINE, N.; RYAN, D.; RYAN, D.; WELLS, S. T.; WOOD, L.; AUGUSTIN, M.; KRAPP, S.; SIMADER, H.; STEINBACHER, S. Dipeptidyl nitrile inhibitors of Cathepsin L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 19, n. 15, p. 4280-4283 2009. DOI 10.1016/j.bmcl.2009.05.071.
- AVELAR, L. A. A.; CAMILO, C. D.; ALBUQUERQUE, S.; FERNANDES, W. W.; GONÇALEZ, C.; KENNY, P.; LEITÃO, A.; McKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A.; OROZCO, E. V. M.; RIBEIRO, J. F. R.; ROCHA, J. R.; ROSINI, F.; SAIDEL, M. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. e0003916, 2015. DOI 10.1371/journal.pntd.0003916.
- BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. **Laboratory Animals**, London, v. 28, n. 3, p. 193–211, 1994. DOI 10.1258/002367794780681714.
- BATISTA, P. H. J.; BONATTO, V.; CIANNI, L.; DE VITA, D.; SILVA, G.; CEDRON, R.; TEZUKA, D. Y.; ALBUQUERQUE, S.; MORAES, C. B.; FRANCO, C. H.; LAMEIRA, J.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A. On the intrinsic reactivity of highly potent trypanocidal cruzain inhibitors. **RSC Medicinal Chemistry**, Cambridge, v. 11, p. 1275-1284, 2020. DOI 10.1039/d0md00097c.
- BEAULIEU, C.; ISABEL, E.; FORTIER, A.; MASSÉ, F.; MELLON, C.; MÉTHOT, N.; NDAO, M.; NICOLL-GRIFFITH, D.; LEE, D.; PARK, H. BLACK, W.C. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 20, n. 24, p. 7444-7449, 2010. DOI 10.1016/j.bmcl.2010.10.015.
- BELL, S. M.; CHANG, X.; WAMBAUGH, J. F.; ALLEN, D. G.; BARTELS, M.; BROUWER, K. L. R.; CASEY, W. M.; CHOKSI, N.; FERGUSON, S. S.; FRACZKIEWICZ, G.; JARABEK, A. M.; KE, A.; LUMEN, A.; LYNN, S. G.; PAINI, A.; PRCE, P. S.; RING, C.; SIMON, T. W.; SIPES, N. S.; SPRANKLE, C. S.; STRICKLAND, J.; TROUTMAN, J.; WETMORE, B. A.; KLEINSTREUR, N. In vitro to in vivo extrapolation for high throughput prioritization and decision making. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 47, p. 213–227, 2018. DOI 10.1016/j.tiv.2017.11.016.

BERTEOTTI, A.; VACONDIO, F.; LODOLA, A.; BASSI, M.; SILVA, C.; MOR, M.; CAVALLI, A. Predicting the reactivity of nitrile-carrying compounds with cysteine: a combined computational and experimental study. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, Washington, v. 5, n. 5, p. 501–505, 2014. DOI 10.1021/ml400489b.

BHATIA, S. N.; INGBER, D. E. Microfluidic organs-on-chips. **Nature Biotechnology**, New York, v. 32, n. 8, p. 760–772, 2014. DOI 10.1038/nbt.2989.

BODOR, N.; BUCHWALD, P. Soft drug designed: general principles and recent applications. **Medicinal Research Reviews**, Hoboken, v. 20, n. 1, p. 58-101, 2000.

BURTOLOSO, A. C. B.; ALBUQUERQUE, S.; FURBER, M.; GOMES, J. C.; GONÇALEZ, C.; KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A.; QUILLES JUNIOR, J. C.; RIBEIRO, J. F. R.; ROCHA, J. R. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine, e protease inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2017. DOI 10.1371/journal.pntd.0005343.

BUSSY, U.; LI, K.; LI, W. Application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantitative bioanalyses of organic molecules in aquatic environment and organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 23, n. 10, p. 9459–9479, 2016. DOI 10.1007/s11356-016-6433-7.

CHETALAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of Biomolecular Screening**, Thousand Oaks, p. 1-14, 2014. DOI: 10.1177/1087057114550585.

CIANNI, L.; FELDMANN, C. W.; GILBER, E.; GUTSCHOW, M.; JULIANO, L.; LEITÃO, A.; BAJORATH, J.; MONTANARI, C. A. Can cysteine protease cross-class inhibitors achieve selectivity? **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 62, p. 10497–10525, 2019. DOI 10.1021/acs.jmedchem.9b00683.

DA SILVA, E. B.; DO NASCIMENTO PEREIRA, G. A.; FERREIRA, R. S. Trypanosomal cysteine peptidases: target validation and drug design strategies. In: MÜLLER, S.; CERDAN, R.; RADULESCU, O. **A comprehensive analysis of parasite biology: from metabolism to drug discovery**. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. p. 121–145, 2016. DOI 10.1002/9783527694082.ch5.

DJOMBOU-FEUNANG, Y.; FIAMONCINI, J.; GIL-DE-LA-FUENTE, A.; GREINER, MANACH, WISHART, D. Biotransformer: a comprehensive computational tools for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. **Journal of Cheminformatics**, London, v, 11, n. 2, p. 1-25, 2019.

DOS SANTOS, A. M.; CIANNI, L.; DE VITA, D.; ROSINI, F.; LEITÃO, A.; LAUGHTON, C.A.; LAMEIRA, J.; MONTANARI, C.A. Experimental study and computational modelling of cruzain cysteine protease inhibition by dipeptidyl nitriles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 20, n. 37, p. 24317–24328, 2018. DOI 10.1039/C8CP03320J.

DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; OURSLER, M.J.; KHOSLA, S. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: biology, potential clinical utility, and lessons learned. **Endocrine Reviews**, Washington, v. 38, n. 4, p. 325–350, 2017. DOI 10.1210/er.2015-1114.

DURHAM, T. B.; BLANCO, M. J. Target engagement in lead generation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 25, n. 5, 2015. DOI 10.1016/j.bmcl.2014.12.076.

EHMKE, V.; KILCHMAN, F.; HEINDL, C.; CUI, K.; SCHIRMEISTER, T.; DIEDERICH, F. Peptidomimetic nitriles as selective inhibitors for the malarial cysteine protease falcipain-2. **MedChemComm**, Cambridge, v. 2, n. 8, p. 800–804, 2011. DOI 10.1039/c1md00115a.

FOTI, R. S.; DALVIE, D. K. Cytochrome P450 and non-cytochrome P450 oxidative metabolism: contributions to the pharmacokinetics, safety, and efficacy of xenobiotics. **Drug Metabolism and Disposition**, Rockville, v. 44, n. 8, p. 1229–1245, 2016. DOI 10.1124/dmd.116.071753.

FUSTERO, S.; RODRIGO, V.; SANCHEZ-ROSELLO, M.; DEL POZO, C.; TIMONEDA, J.; FRIZLER, M.; SISAY, M. T.; BAJORATH, J.; CALLE, L. P.; CANADA, F. J.; JIMENEZ-BARBERO, J.; GUTSCHOW, M. New cathepsin inhibitors to explore the fluorophilic properties of the S2 pocket of cathepsin B: design, synthesis, and biological evaluation. **Chemistry: a european journal**, Weinheim, v. 17, n. 19, p. 5256–5260, 2011. DOI 10.1002/chem.201100113.

GOMES, J. C.; CIANNI, L.; RIBEIRO, J.; ROCHO, F. R.; SILVA, S. C. M.; BATISTA, P. H. J.; MORAES, C. B.; FRNACO, C. H.; FRITAS-JUNIOR, L. H. G.; KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; BURTOLOSO, A. C.; DE VITA, D.; MONTANARI, C. A. Synthesis and structure-activity relationship of nitrilbased cruzain inhibitors incorporating a trifluoroethylamine-based P2 amide replacement. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 27, p. 115083e, 2019. DOI 10.1016/j.bmc.2019.115083.

GREENSPAN, P. D.; CLARK, K. L.; TOMMASI, R. A.; COWEN, S. D.; McQUIRE, L. W.; FARLEY, D. L.; VAN DUZER, J. H.; GOLDBERG, R. L.; ZHOU, H.; DU, Z.; FITT, J. J.; COPPA, D. E.; FANG, Z.; MACCHIA, W.; ZHU, L.; CAPPARELLI, M. P.; GOLDSTEIN, R.; WIGG, A. M.; DOUGHTY, J. R.; BOHACEK, R. S.; KNAP, A. K. Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 44, n. 26, p. 4524–4534, 2001. DOI 10.1021/jm010206q.

HINTERWIRTH, H.; STUBIGER, G.; LINDNER, W.; LAMMERHOFER, M. Gold nanoparticle-conjugated anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies for targeted lipidomics of oxidative stress biomarkers. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 85, n. 17, p. 8376–8384, 2013. DOI 10.1021/ac401778f.

HUGHES, J. P.; REES, S.; KALINDJIAN, S. B.; PHILPOTT, K. L. Principles of early drug discovery. **British Journal Pharmacology**, Oxford, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011. DOI 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.

JOSEPHY, P. D.; GUENGERICH, F. P.; MINERS, J. O. “Phase I” and “Phase II” drug metabolism: terminology that we should phase out? **Drug Metabolism Reviews**, Philadelphia, v. 37, n. 4, p. 575–580, 2005. DOI 10.1080/03602530500251220.

KASSAHUN, K.; BLACK, W. C.; NICOLL-GRIFFITH, McINTOSH, I.; CHAURET, N.; DAY, S.; ROSENBERG, E.; KOEPLINGER, K. Pharmacokinetics and metabolism in rats , dogs , and monkeys of the cathepsin k inhibitor odanacatib : demethylation of a methylsulfonyl moiety as a major metabolic pathway. **Drug Metabolism and Disposition**, Rockville, v. 39, n. 6, 2011. DOI 10.1124/dmd.110.037184.

LI, F.; GONZALEZ, F. J.; MA, X. LC–MS-based metabolomics in profiling of drug metabolism and bioactivation. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Beijing, v. 2, n. 2, p. 118–125, 2012. DOI 10.1016/j.apsb.2012.02.010.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now. **Nature Reviews. Drug.Discovery**, London, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004. DOI 10.1038/nrd1523.

LONSDALE, R.; BURGESS, J.; COLCLOUG, N.; DAVIES, N. L.; LENZ, E. M.; ORTON, A. L.; WARD, R. A. Expanding the armory: predicting and tuning covalent warhead reactivity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 57, n. 12, p. 3124–3137, 2017. DOI 10.1021/acs.jcim.7b00553.

MACFAUL, P. A.; MORLEY, A. D.; CRAWFORD, J. J. A simple in vitro assay for assessing the reactivity of nitrile containing compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 1136–1138, 2009. DOI 10.1016/j.bmcl.2008.12.105.

MEISS, E.; WERNER, P.; JOHN, C.; SCHEJA, L.; HERBACH, N.; HEEREN, J.; FISCHER, M. Metabolite targeting: development of a comprehensive targeted metabolomics platform for the assessment of diabetes and its complications. **Metabolomics**, New York, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2016. DOI 10.1007/s11306-016-0958-0.

MENG, M.; ZHAO, N.; PEDERSON, C. C.; HARRISON, E.; GREEN, C.; GORMAN, S. H.; RESCHEL, S. Simultaneous quantification of loxapine , loxapine N -oxide , amoxapine , 8-hydroxyloxapine and 7-hydroxyloxapine in human plasma using LC – MS / MS. **Journal of Chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 1046, p. 87–97, 2017. DOI 10.1016/j.jchromb.2017.01.007.

NDAO, M.; BEAULLEU, C.; BLACK, W. C.; ISABEL, E.; VASQUEZ-CAMARGO, F.; NATH-CHOWDHURY, M.; MASSE, F.; MELLON, C.; METHOT, N.; NICOLL-GRIFFITH, D. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 2, p. 1167–1178, 2014. DOI 10.1128/AAC.01855-13.

PENG, S. X.; BRANCH, T. M.; KING, S. L. Fully automated 96-well liquid-liquid extraction for analysis of biological samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 73, n. 3, p. 708–714, 2001. DOI 10.1021/ac001036c.

QUILLES JUNIOR, J. C.; BERNARDI, M. D. L.; BATISTA, P. H. J.; SILVA, S. C. M.; ROCHA, C. M. R. R.; MONTANARI, C. A.; LEITÃO, A. Biological activity and physicochemical properties of dipeptidyl nitrile derivatives against pancreatic ductal adenocarcinoma cells. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 19, n. 1, p. 112–120, 2019. DOI <http://dx.doi.org/10.2174/1871520618666181029141649>.

QUILLES JUNIOR, J.C.; SHAMIM, A.; TEZUKA, D. Y.; BATISTA, P. H. J.; LOPES, C. D.; ALBUQUERQUE, S.; MONTANARI, C. A.; LEITÃO, A. Dipeptidyl nitrile derivatives suppress the *Trypanosoma cruzi* *in vitro* infection. **Experimental Parasitology**, Maryland Heights, v. 219, p. 108032, 2020. DOI: 10.1016/j.exppara.2020.108032.

ROCHA, D. A.; SILVA, E. B.; FORTES, I. S.; LOPES, M. S.; FERREIRA, R. S.; ANDRADE, S. F. Synthesis and structure-activity relationship studies of cruzain and rhodesain inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 157, p. 1426-1459, 2018. DOI 10.1016/j.ejmech.2018.08.079.

ROSES, A. D. Pharmacogenetics in drug discovery and development: A translational perspective. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 7, n. 10, p. 807–817, 2008. DOI 10.1038/nrd2593.

RUDMANN, D. G. On-target and off-target-based toxicologic effects. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 41, n. 2, p. 310–314, 2013. DOI 10.1177/0192623312464311.

SAJID, M.; ROBERTSON, S. A.; BRINEN, L. S.; McKERROW, J. H. Cruzain: the path from target validation to the clinic. *In*: ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. **Cysteine proteases of pathogenic organisms**. New York: Springer Science, 2011. p. 100-115. (Advances in experimental medicine and biology, 712).

SANTORO, A. L.; CARRILHO, E.; LANÇAS, F. M.; MONTANARI, C. A. Quantitative structure-retention relationships of flavonoids unraveled by immobilized artificial membrane chromatography. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 88, p. 147-157, 2016. DOI 10.1016/j.ejps.2015.12.009.

SCHIRMEISTER, T.; SCHMITZ, J.; JUNG, S.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; GUTSCHOW, M. Evaluation of dipeptide nitriles as inhibitors of rhodesain, a major cysteine protease of *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, London, v. 27, n. 1, p. 45-50, 2017. DOI 10.1016/j.bmcl.2016.11.036.

SILVA, D. G.; SCHMITZ, J.; JUNG, S.; SCHMENDER, T.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; GUTSCHOW, M. A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, London, v. 27, n. 22, p. 5031-5035, 2017. DOI 10.1016/j.bmcl.2017.10.002.

STAVRIANIDI, A. A classification of liquid chromatography mass spectrometry techniques for evaluation of chemical composition and quality control of traditional medicines. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1609, p. 1-25, 2020. DOI 10.1016/j.chroma.2019.460501.

TAN, A.; FANARAS, J. C. How much separation for LC–MS/MS quantitative bioanalysis of drugs and metabolites? **Journal of Chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Amsterdam, v. 1084, p. 23–35, 2018. DOI 10.1016/j.jchromb.2018.03.019.

TEZUKA, D. Y.; ALBUQUERQUE, S.; MONTANARI, C. A.; LEITÃO, A. Discovery of 2-aminopyridine derivatives with antichagasic and antileishmanial activity using phenotypic assays. **Letters in Drug Design & Discovery**, Sharjah, v. 17, p. 867-872, 2020. DOI:10.2174/1570180816666191204105232.

TOYO'OKA, T. Derivatization-based high-throughput bioanalysis by LC-MS. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 33, n. 5, p. 555–564, 2017. DOI 10.2116/analsci.33.555.

VOLPE, D. A. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. **Future Medicinal Chemistry**, London, v. 3, n. 16, p. 2063–2077, 2011. DOI 10.4155/fmc.11.149.

YUAN, L.; JI, Q. C. Discovery, identification and mitigation of isobaric sulfate metabolite interference to a phosphate prodrug in LC–MS/MS bioanalysis: critical role of method development in ensuring assay quality. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 155, p. 141–147, 2018. DOI 10.1016/j.jpba.2018.03.064.

ZARETSKI, J.; MATLOCK, M.; SWAMIDASS, J. Xenosite: accurately predicting CYP-mediated sites of metabolism with neural network. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 53, n. 12, p. 3373-3383, 2013.

ZHENG, J. J.; SHIELDS, E. E.; SNOW, K. J.; NELSON, D. M.; OLAH, T. V.; REILY, M. D.; ROBERTSON, D. G.; SHIPKOVA, P. A.; STRYKER, S. A.; XIN, B.; DREXLER, D. M. The utility of stable isotope labeled (SIL) analogues in the bioanalysis of endogenous compounds by LC-MS applied to the study of bile acids in a metabolomics assay. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 503, p. 71-78, 2016. DOI 10.1016/j.ab.2016.03.011.

7. Anexo

7.1 Avaliação dos padrões de calibração em meio RPMI recém-preparado quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,01612 \pm 0,00012)x - (0,002485 \pm 0,0056)$			$r = 0,9994$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	10,90	8,98	20	aprovado
	9,64	-3,64		aprovado
	10,24	2,41		aprovado
20	19,66	-1,68	15	aprovado
	20,73	3,64		aprovado
	20,28	1,40		aprovado
30	29,03	-3,25	15	aprovado
	29,60	-1,33		aprovado
	30,18	0,59		aprovado
40	40,72	1,80	15	aprovado
	40,00	0,01		aprovado
	39,66	-0,84		aprovado
50	48,69	-2,61	15	aprovado
	49,45	-1,09		aprovado
	50,12	0,23		aprovado
60	60,63	1,04	15	aprovado

	58,91	-1,81		aprovado
	59,92	-0,14		aprovado
70	70,72	1,03	15	aprovado
	69,75	-0,36		aprovado
	71,36	1,94		aprovado

7.2 Avaliação dos padrões de calibração em meio RPMI incubado a 37oC em atmosfera com 5% de CO₂ na ausência de células LLCMK₂ quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,01629 \pm 0,00015)x - (0,0191 \pm 0,0066)$			$r = 0,9992$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	10,62	6,21	20	aprovado
	10,77	7,69		aprovado
	10,65	6,54		aprovado
20	19,72	-0,280	15	aprovado
	19,27	-0,734		aprovado
	19,00	-1,002		aprovado
30	29,78	-0,216	15	aprovado
	29,30	-0,696		aprovado
	30,62	0,617		aprovado
40	39,46	-1,36	15	aprovado
	41,73	4,32		aprovado
	39,42	-1,45		aprovado
50	49,37	-1,25	15	aprovado

	50,10	0,20		aprovado
	49,92	-0,17		aprovado
60	59,34	-1,10	15	aprovado
	60,67	1,12		aprovado
	58,28	-2,87		aprovado
70	70,86	1,23	15	aprovado
	70,82	1,17		aprovado
	70,25	0,36		aprovado

7.3 Avaliação dos padrões de calibração em meio RPMI no qual foram incubadas células LLCMK₂ contendo amastigotas da cepa Tulahuen quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,01561 \pm 0,00021)x + (0,0164 \pm 0,0093)$			$r = 0,9983$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	9,10	-8,97	20	aprovado
	8,25	-17,46		aprovado
	9,47	-5,31		aprovado
20	20,74	3,71	15	aprovado
	21,23	6,15		aprovado
	21,13	5,67		aprovado
30	31,02	3,39	15	aprovado
	31,41	4,72		aprovado

	29,73	-0,89		aprovado
40	39,16	-2,09	15	aprovado
	38,40	-4,00		aprovado
	40,30	0,75		aprovado
50	48,97	-2,06	15	aprovado
	51,59	3,17		aprovado
	49,86	-0,28		aprovado
60	62,68	4,47	15	aprovado
	59,88	-0,20		aprovado
	58,21	-2,98		aprovado
70	69,60	-0,58	15	aprovado
	69,49	-0,73		aprovado
	69,93	-0,10		aprovado

7.4 Avaliação dos padrões de calibração em meio RPMI no qual foram incubadas células LLCMK₂ contendo amastigotas da cepa Y quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,01573 \pm 0,00013)x + (0,01167 \pm 0,0073)$			$r = 0,9994$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	9,87	-1,29	20	aprovado
	10,08	0,77		aprovado
	10,37	3,66		aprovado
20	20,24	1,21	15	aprovado

	19,60	-2,00		aprovado
	19,76	-1,19		aprovado
30	30,02	0,08	15	aprovado
	29,85	-0,51		aprovado
	30,01	0,04		aprovado
40	40,56	1,41	15	aprovado
	39,39	-1,53		aprovado
	40,33	0,82		aprovado
50	51,69	3,39	15	aprovado
	49,28	-1,43		aprovado
	51,20	2,40		aprovado
60	59,39	-1,02	15	aprovado
	59,25	-1,25		aprovado
	61,12	1,86		aprovado
70	70,45	0,64	15	aprovado
	69,80	-0,28		aprovado
	68,59	-2,02		aprovado

7.5 Avaliação dos padrões de calibração em extrato lisado de células LLCMK₂ infectadas com amastigotas da cepa Y quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

Equação do modelo linear	Coefficiente de correlação
---------------------------------	-----------------------------------

$y = (0,01667 \pm 0,00025)x + (0,013 \pm 0,011)$			$r = 0,9978$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	10,93	9,30	20	aprovado
	9,28	-7,19		aprovado
	11,72	17,16		aprovado
20	20,63	3,14	15	aprovado
	18,17	-9,17		aprovado
	20,99	4,97		aprovado
30	30,34	1,14	15	aprovado
	28,81	-3,96		aprovado
	29,54	-1,54		aprovado
40	40,44	1,10	15	aprovado
	36,78	-8,05		aprovado
	40,04	0,09		aprovado
50	49,21	-1,57	15	aprovado
	49,51	-0,99		aprovado
	50,46	0,91		aprovado
60	61,62	2,70	15	aprovado
	61,29	2,14		aprovado
	61,84	3,07		aprovado
70	70,54	0,78	15	aprovado

	67,64	-3,37		aprovado
	70,30	0,42		aprovado

7.6 Avaliação dos padrões de calibração em meio RPMI no qual foram incubadas células LLCMK₂ contendo amastigotas da cepa Tulahuen quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,01699 \pm 0,00043)x + (0,004 \pm 0,019)$			$r = 0,9940$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	9,85	-1,48	20	aprovado
	10,04	0,44		aprovado
	9,71	-2,92		aprovado
20	21,02	5,08	15	aprovado
	21,44	7,22		aprovado
	19,48	-2,62		aprovado
30	28,75	-4,18	15	aprovado
	27,79	-7,36		aprovado
	29,24	-2,55		aprovado
40	40,41	1,04	15	aprovado
	41,56	3,89		aprovado
	39,77	-0,58		aprovado
50	49,03	-1,94	15	aprovado

	48,42	-3,15		aprovado
	48,14	-3,73		aprovado
60	62,50	4,16	15	aprovado
	63,47	5,78		aprovado
	61,37	2,29		aprovado
70	74,66	6,66	15	aprovado
	65,47	-6,48		aprovado
	64,96	-7,21		aprovado

7.7 Curvas de calibração utilizadas nos ensaios de precisão e exatidão

7.7.1 Dia 1

7.7.7.1 Avaliação dos padrões de calibração quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,03254 \pm 0,00063)x - (0,010 \pm 0,029)$			$r = 0,9975$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	10,36	3,56	20	aprovado
	11,40	13,97		aprovado
	11,15	11,53		aprovado
25	25,16	0,65	15	aprovado
	25,03	0,10		aprovado

	24,43	-2,27		aprovado
40	38,57	-3,56	15	aprovado
	38,95	-2,62		aprovado
	38,63	-3,42		aprovado
55	56,59	2,88	15	aprovado
	52,33	-4,86		aprovado
	53,23	-3,21		aprovado
70	72,03	2,90	15	aprovado
	69,40	-0,85		aprovado
	72,69	3,85		aprovado

7.7.1.2 Modelo de regressão linear, gráfico de resíduos e análise de variância da curva de calibração construída para o dia 1 do ensaio de precisão e exatidão

equação do modelo linear	coeficiente de correlação
$y = (0,03254 \pm 0,00063)x - (0,010 \pm 0,029)$	$r = 0,9975$

ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	7,1472	1	7,1472	2639	< 0,0001
Resíduo	0,0352	13	0,0027		
F. ajuste	0,0171	3	0,0057	3,154	0,0521
Erro puro	0,0181	10	0,0018		
Total	7,182	14			
% variação máxima explicada				99,51	
% variação máxima explicável				99,75	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

7.7.1 Dia 2

7.7.1.1 Avaliação dos padrões de calibração quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,03183 \pm 0,00067)x + (0,012 \pm 0,029)$			$r = 0,9974$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	11,43	14,27	20	aprovado
	11,22	12,24		aprovado
	10,96	9,61		aprovado
25	23,68	-5,29	15	aprovado
	24,89	-0,42		aprovado

	24,29	-2,85		aprovado
40	38,75	-3,14	15	aprovado
	39,13	-2,17		aprovado
	38,80	-2,99		aprovado
55	57,16	3,92	15	aprovado
	53,73	-2,31		aprovado
	52,81	-3,99		aprovado
70	72,95	4,21	15	aprovado
	70,26	0,38		aprovado
	73,63	5,18		aprovado

7.7.1.2 Modelo de regressão linear, gráfico de resíduos e análise de variância da curva de calibração construída para o dia 2 do ensaio de precisão e exatidão

equação do modelo linear	coeficiente de correlação
$y = (0,03183 \pm 0,00067)x + (0,012 \pm 0,029)$	$r = 0,9974$

ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	5,8618	1	5,8618	2290	< 0,0001
Resíduo	0,0307	12	0,0026		
F. ajuste	0,0155	3	0,0052	3,043	0,0585
Erro puro	0,0152	9	0,0017		
Total	5,893	13			
% variação máxima explicada				99,48	
% variação máxima explicável				99,74	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

7.7.2 Dia 2

7.7.2.1 Avaliação dos padrões de calibração quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,03183 \pm 0,00067)x + (0,012 \pm 0,029)$			$r = 0,9974$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	11,43	14,27	20	aprovado
	11,22	12,24		aprovado
	10,96	9,61		aprovado
25	23,68	-5,29	15	aprovado
	24,89	-0,42		aprovado
	24,29	-2,85		aprovado

40	38,75	-3,14	15	aprovado
	39,13	-2,17		aprovado
	38,80	-2,99		aprovado
55	57,16	3,92	15	aprovado
	53,73	-2,31		aprovado
	52,81	-3,99		aprovado
70	72,95	4,21	15	aprovado
	70,26	0,38		aprovado
	73,63	5,18		aprovado

7.7.2.2 Modelo de regressão linear, gráfico de resíduos e análise de variância da curva de calibração construída para o dia 2 do ensaio de precisão e exatidão

equação do modelo linear	coeficiente de correlação
$y = (0,03183 \pm 0,00067)x + (0,012 \pm 0,029)$	$r = 0,9974$
ANOVA	

fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p
Regressão	5,8618	1	5,8618	2290	< 0,0001
Resíduo	0,0307	12	0,0026		
F. ajuste	0,0155	3	0,0052	3,043	0,0585
Erro puro	0,0152	9	0,0017		
Total	5,893	13			
% variação máxima explicada				99,48	
% variação máxima explicável				99,74	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

7.7.3 Dia 3

7.7.3.1 Avaliação dos padrões de calibração quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,03094 \pm 0,00012)x + (0,244 \pm 0,055)$			$r = 0,9905$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	9,25	-7,55	20	aprovado
	9,88	-1,16		aprovado
	11,34	13,45		aprovado
25	22,39	-10,45	15	aprovado
	24,38	-2,47		aprovado
	27,55	10,19		aprovado
40	39,67	-0,82	15	aprovado

	38,70	-3,24		aprovado
	37,05	-7,38		aprovado
55	60,06	9,20	15	aprovado
	62,48	13,61		aprovado
	59,32	7,86		aprovado
70	74,04	5,77	15	aprovado
	64,92	-7,26		aprovado
	66,51	-4,98		aprovado

7.7.3.2 Modelo de regressão linear, gráfico de resíduos e análise de variância da curva de calibração construída para o dia 3 do ensaio de precisão e exatidão

equação do modelo linear				coeficiente de correlação	
y = (0,03183±0,00067)x + (0,012±0,029)				r = 0,9974	
ANOVA					
fonte de variação	SQ	g.l.	MQ	F	p

Regressão	6,2309	1	6,2309	624	< 0,0001
Resíduo	0,1198	12	0,0100		
F. ajuste	0,0556	3	0,0185	2,595	0,0856
Erro puro	0,0642	9	0,0071		
Total	6,351	13			
% variação máxima explicada				98,11	
% variação máxima explicável				98,99	

F: Teste F. g.l.: graus de liberdade. MQ: média quadrática. SQ: soma quadrática. p: probabilidade.

Fonte: próprio autor.

7.8 Avaliação dos padrões de calibração utilizados na construção das curvas de calibração para a quantificação do composto NEQ0570 no ensaio celular quanto aos critérios estabelecidos na RDC 27 de 17 de maio de 2012:

7.8.1 Análises quantitativas em meio extracelular

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,01649 \pm 0,00017)x + (0,0160 \pm 0,0075)$			$r = 0,9993$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	9,67	-3,27	20	aprovado
	10,05	0,55		aprovado
	9,99	-0,08		aprovado
20	25,53	2,12	15	aprovado
	25,01	0,05		aprovado
	24,28	-2,88		aprovado
30	40,43	1,08	15	aprovado

	40,69	1,73		aprovado
	40,16	0,40		aprovado
40	55,95	1,73	15	aprovado
	53,89	-2,02		aprovado
	54,35	-1,18		aprovado
50	71,68	2,40	15	aprovado
	69,71	-0,41		aprovado
	68,67	-1,89		aprovado
60	9,67	-3,27	15	aprovado
	10,05	0,55		aprovado
	9,99	-0,08		aprovado
70	25,53	2,12	15	aprovado
	25,01	0,05		aprovado
	24,28	-2,88		aprovado

7.8.2 Análises quantitativas em extrato de lisado celular

Equação do modelo linear			Coeficiente de correlação	
$y = (0,01598 \pm 0,00037)x + (0,001 \pm 0,017)$			$r = 0,9966$	
Concentração nominal do padrão de calibração	Concentração experimental do padrão de calibração	Desvio em relação à concentração nominal (%)	Valor máximo aceito para o desvio (%)	Situação
10	9,17	-8,27	20	aprovado
	9,66	-3,45		aprovado
	9,29	-7,07		aprovado
20	23,72	-5,12	15	aprovado
	27,02	8,08		aprovado

	26,64	6,56		aprovado
30	38,98	-2,55	15	aprovado
	41,05	2,62		aprovado
	38,27	-4,33		aprovado
40	56,02	1,85	15	aprovado
	58,10	5,64		aprovado
	54,52	-0,87		aprovado
50	67,85	-3,08	15	aprovado
	72,57	3,68		aprovado
	67,03	-4,24		aprovado
60	9,17	-8,27	15	aprovado
	9,66	-3,45		aprovado
	9,29	-7,07		aprovado
70	23,72	-5,12	15	aprovado
	27,02	8,08		aprovado
	26,64	6,56		aprovado

7.9 Caracterização química dos inibidores sintetizados pelo grupo.

(2*S*)-*N*-(1-cianociclopropil)-3-fenil-2-(fenilformamido)propanamida (Neq0570)

O composto codificado como Neq0570 foi obtido como um sólido branco de ponto de Fusão entre 189–190°C. $[\alpha]^{24}_D = -35,05^\circ$ (Metanol, *c.* 2,5 mg.mL⁻¹) e HRMS (ESI (+)) de 334,1550 [M+H⁺, calc.334,1550 (C₂₀H₂₀N₃O₂)] (Figura S5). O espectro de RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) (Figura S6) mostrou os picos em δ 9,02 (s, 1H), 8,64 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,82 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,52 (t, *J* = 7,3 Hz, 1H), 7,44 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,30 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,25 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,17 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,60 (ddd, *J* = 9,6; 8,2; 5,4 Hz, 1H), 3,03

(ddd, $J = 23,4; 13,6; 7,6$ Hz, 2H), 1,46 (d, $J = 2,7$ Hz, 2H), 1,04 (d, $J = 9,7$ Hz, 2H). O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) (Figura S7) δ 172,73; 166,26; 137,84; 133,80; 131,36; 129,16; 128,16; 128,09; 127,47; 126,35; 120,73; 54,59; 36,93; 19,74; 15,70; 15,67. A análise da pureza enantiomérica foi realizada por HPLC, e revelou apenas uma única banda com tempo de retenção em 13,5 minutos (Coluna de Celulose, Diacel – Chiralpak IC, 250 x 4,6 mm, partícula de 5 μm . Vazão de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN} - 45\%$ como fase móvel e monitorando o comprimento de onda de 240 nm), como mostra a Figura S8.

Figura S1. Espectro de HRMS do Neq0570 em metanol (m/z 334,1550 $[M+H^+]$).

Figura S2. Espectro de RMN 1H (500 MHz, DMSO d_6) do Neq0570.

Figura S3. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO d-6) do Neq0570.

Figura S4. Análise por HPLC do Neq0570. Coluna Chiralpalk (250 x 4,6, 5 μ m).
H₂O/ACN - 45%, 0,5 mL.min⁻¹. UV – 240 nm.

RESEARCH ARTICLE

Biological Activity and Physicochemical Properties of Dipeptidyl Nitrile Derivatives Against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells

José C. Quilès Jr.^a, Murillo D.L. Bernardi^{ab}, Pedro H.J. Batista^a, Samelyn C.M. Silva^a, Camila M.R. Rocha^{ab}, Carlos A. Montanari^a and Andrei Leitão^{ab*}

^aMedicinal Chemistry Group (NEQ/UMED), São Carlos Institute of Chemistry (IQSC), University of São Paulo (USP) - Av. Trabalhador São-carlense, 400, São Carlos, SP, Brazil; ^bPrograma de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia (PPGiB), University of São Paulo (USP) - Av. Trabalhador São-carlense, 400, São Carlos, SP, Brazil

Abstract: *Background:* Pancreatic cancer is one of the most aggressive types with high mortality in patients. Therefore, studies to discover new drugs based on cellular targets have been developed to treat this disease. Due to the importance of Cysteine Protease (CP) to several cellular processes in cancer cells, CP inhibitors have been studied as novel alternative approaches for pancreatic cancer therapy.

Objective: The cytostatic potential of new CP inhibitors derived from dipeptidyl nitriles is analyzed *in vitro* using pancreatic cancer (MIA PaCa-2) cells.

Methods: The cytotoxic and cytostatic activities were studied using MTT colorimetric assay in 2D and 3D cultures. Colony formation, migration in Boyden chamber and cell cycle analysis were applied to further study the cytostatic activity. The inhibition of cysteine proteases was evaluated with Z-FR-MCA selective substrate, and ROS evaluation was performed with DCFH-DA fluorophore. Permeability was investigated using HPLC-MS to obtain log k_p . Combination therapy was also evaluated using the best compound with gemcitabine.

Results: The inhibition of intracellular CP activity by the compounds was confirmed, and the cytostatic effect was established with cell cycle retention in the G1 phase. CP inhibitors were able to reduce cell proliferation by 50% in the clonogenic assay, and the same result was achieved for the migration assay, without any cytotoxic effect. The Neq0554 inhibitor was also efficient to increase the gemcitabine potency in the combination therapy. Physicochemical properties using an artificial membrane model quantified $1.14 \pm \log K_p \approx 0.73$ for all inhibitors (also confirmed using HPLC-MS analysis) along with the identification of intra and extracellular metabolites. Finally, these dipeptidyl nitrile derivatives did not trigger the formation of reactive oxygen species, which is linked to genotoxicity.

Conclusion: Altogether, these results provide a clear and favorable picture to develop CP inhibitors in pre-clinical assays.

Keywords: Cytostatic activity, dipeptidyl nitrile derivatives, cell-based assays, pancreatic cancer cell, selectivity, combined therapy, inhibition of cell migration.

1. INTRODUCTION

The rapid metastatic potential of pancreatic cancer makes it one of the most aggressive types of this disease [1]. After the diagnosis, usually, the only chance of cure is the surgical resection [2]. Gemcitabine is one of the chemotherapeutics most used among the patients after the surgical procedure [3]. Nevertheless, the success of gemcitabine therapy is limited due to the cellular resistance acquired by the tumor [4]. This life-threatening perspective is evidencing the necessity of efficient and safe treatment for pancreatic cancer, which could be accomplished by the drug alone or in combined therapy.

Monitoring the compound bioactivity is required to determine its efficiency based on tumor response and treatment. This response may be obtained using drugs with distinct mechanisms of action to trigger the expected cellular response [5]. For example, cytostatic compounds can inhibit or suppress tumor growth without promoting toxic effects [6]. Several substances with these characteristics have been widely used to treat different types of tumors

based on the modulation of molecular targets such as thymidine kinase [7], phosphatidylcholine [8], CD26 trans-membrane glycoprotein [9] and Na/K-ATPase protein [10]. The tumor presents numerous alterations from the biochemical point of view, including the activity of cysteine cathepsins [11]. Cysteine cathepsins have protease activity based on nucleophilic attack of the thiolate at the peptide bond of the substrate. The substrate selectivity is achieved by the intermolecular interactions with the cathepsin subsites [12]. Hence, cathepsin inhibitors (named here as cysteine protease inhibitors – CPI) are carefully designed to achieve the highest potency and selectivity as antineoplastic compounds. One class, in particular, derivatives of dipeptidyl nitriles, is the subject for evaluation here, once previous studies point to promising therapeutic outcome in various diseases, including cancer [13].

In this work, dipeptidyl nitrile derivatives were assayed against MIA PaCa-2 cells using two (2D) and three dimensional (3D) *in vitro* models to determine the cytostatic activity in this pancreatic carcinoma lineage. In a search for a novel alternative therapy approach, CPIs are evaluated alone or in combination [14] with the reference drug gemcitabine. It is reported in the literature that the combination of gemcitabine and different drugs shows compelling results [15]. The cytostatic profiling and cell cycle arrest are also established here for the set of CPI, including the inhibition of metastasis in cell colony formation and wound healing experiments. Physicochemical properties that are linked to cell permeation and

*Address correspondence to this author at the Medicinal Chemistry Group (NEQ/UMED), São Carlos Institute of Chemistry (IQSC), University of São Paulo (USP) - Av. Trabalhador São-carlense, 400, São Carlos-SP, Brazil; Tel: +55(16)3373-9943; Fax: +55(16)3373-9983; E-mail: andrei@iqsc.usp.br

Synthesis and structure-activity relationship of nitrile-based cruzain inhibitors incorporating a trifluoroethylamine-based P2 amide replacement

Julliana C. Gomes^a, Lorenzo Cianni^b, Jean Ribeiro^b, Fernanda dos Reis Rocho^b, Samelyn da Costa Martins Silva^b, Pedro Henrique Jatal Batista^b, Carolina Borsol Moraes^c, Calo Haddad Franco^c, Lucio H.G. Freltas-Junior^c, Peter W. Kenny^b, Andrei Lettão^b, Antonio C.B. Burtoloso^b, Daniela de Vita^{b,*}, Carlos A. Montanari^{b,*}

^a Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil

^b Grupo de Química Medicinal do IQSC/USP, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil

^c Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Covalent inhibitor
Cruzain
Cysteine protease
Group efficiency
Lipophilic efficiency
Nonadditivity
Structure-activity relationship

ABSTRACT

The structure-activity relationship for nitrile-based cruzain inhibitors incorporating a P2 amide replacement based on trifluoroethylamine was explored by deconstruction of a published series of inhibitors. It was demonstrated that the P3 biphenyl substituent present in the published inhibitor structures could be truncated to phenyl with only a small loss of affinity. The effects of inverting the configuration of the P2 amide replacement and linking a benzyl substituent at P1 were observed to be strongly nonadditive. We show that plotting affinity against molecular size provides a means to visualize both the molecular size efficiency of structural transformations and the nonadditivity in the structure-activity relationship. We also show how the relationship between affinity and lipophilicity, measured by high-performance liquid chromatography with an immobilized artificial membrane stationary phase, may be used to normalize affinity with respect to lipophilicity.

1. Introduction

Chagas disease,^{1–3} also known as American trypanosomiasis, is caused by *T. cruzi* parasite infection and is a significant public health problem both in Latin America and internationally.⁴ Cruzipain, the major *T. cruzi* cysteine protease, is expressed in all stages of the life-cycle of the parasite and is considered to be an attractive target for therapeutic intervention in the treatment of Chagas disease.^{5–7} Enzyme inhibition studies typically make use of recombinant cruzain (Cz) which consists of the catalytic domain of cruzipain. Cruzain inhibitors have shown antichagasic activity in murine disease models.^{7,8}

A commonly employed tactic in design of cysteine protease inhibitors is to incorporate an electrophilic entity, commonly referred to as a “warhead”, in the inhibitor structure.^{9,10} This enables a covalent bond to be formed between an electrophilic atom of the inhibitor and the thiol of the catalytic cysteine. Michael acceptors such as the vinylsulfone K777⁷ are typically irreversible inhibitors of cysteine proteases. A nitrile group in an inhibitor structure can form a covalent thioimide adduct with the catalytic cysteine thiol and addition is

typically reversible.^{11,12} Nitrile-based cruzain inhibitors have been reported^{13–25} and *in vivo* activity in a murine disease model has been published⁸ for inhibitors based on this warhead. Anti-trypanosomal activity has also been observed for nitrile-based cysteine protease inhibitors in cell-based assays at concentrations below their cruzain K_i values, suggesting that inhibition of cysteine proteases other than cruzipain may be responsible for these effects.¹⁶

A published¹³ series of nitrile-based cruzain inhibitors that are structurally related to the cathepsin K inhibitor odanacatib¹⁷ provided the starting point for this study. The compounds in this series typically feature a substituted biphenyl group at P3. The principal objective of our study was to establish a structure-activity relationship (SAR) for cruzain inhibition by deconstruction of the published inhibitor structures. Secondary objectives were to explore the utility of chromatographically measured $\log K_{ow}$ for normalization of cruzain inhibition with respect to lipophilicity and to assess the anti-trypanosomal activity of the compounds against an intracellular form of the *T. cruzi* Y strain.

* Corresponding authors at: Department of Chemistry and Molecular Physics, Institute of Chemistry of São Carlos University of São Paulo, Av. Trabalhador Sarcariense, 400, 13566-590 São Carlos/SP, Brazil.

E-mail address: Carlos.Montanari@usp.br (C.A. Montanari).

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115083>

Received 23 June 2019; Received in revised form 22 August 2019; Accepted 26 August 2019
Available online 28 August 2019

0968-0896/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Assessment of the Cruzain Cysteine Protease Reversible and Irreversible Covalent Inhibition Mechanism

José Rogério A. Silva, Lorenzo Cianni, Deborah Araujo, Pedro Henrique Jataí Batista, Daniela de Vita, Fabiana Rosini, Andrei Leitão, Jerônimo Lameira,* and Carlos A. Montanari*

Cite This: *J. Chem. Inf. Model.* 2020, 60, 1666–1677

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Reversible and irreversible covalent ligands are advanced cysteine protease inhibitors in the drug development pipeline. K777 is an irreversible inhibitor of cruzain, a necessary enzyme for the survival of the *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) parasite, the causative agent of Chagas disease. Despite their importance, irreversible covalent inhibitors are still often avoided due to the risk of adverse effects. Herein, we replaced the K777 vinyl sulfone group with a nitrile moiety to obtain a reversible covalent inhibitor (Neq0682) of cysteine protease. Then, we used advanced experimental and computational techniques to explore details of the inhibition mechanism of cruzain by reversible and irreversible inhibitors. The isothermal titration calorimetry (ITC) analysis shows that inhibition of cruzain by an irreversible inhibitor is thermodynamically more favorable than by a reversible one. The hybrid Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) and Molecular Dynamics (MD) simulations were used to explore the mechanism of the reaction inhibition of cruzain by K777 and Neq0682. The calculated free energy profiles show that the Cys25 nucleophilic attack and His162 proton transfer occur in a single step for a reversible inhibitor and two steps for an irreversible covalent inhibitor. The hybrid QM/MM calculated free energies for the inhibition reaction correspond to -26.7 and -5.9 kcal mol $^{-1}$ for K777 and Neq0682 at the MP2/MM level, respectively. These results indicate that the ΔG of the reaction is very negative for the process involving K777; consequently, the covalent adduct cannot revert to a noncovalent protein–ligand complex, and its binding tends to be irreversible. Overall, the present study provides insights into a covalent inhibition mechanism of cysteine proteases.

INTRODUCTION

Chagas disease, named after Carlos Chagas, who first described the disease in 1909, is caused by *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted to humans primarily by blood-sucking triatomine bugs.¹ Chagas disease remains a serious public health problem in Latin America, where 6 to 7 million people are estimated to be infected with *T. cruzi*.² This parasite can travel with population movements from endemic to nonendemic countries. It has been estimated that there are now more than 300 000 individuals infected with *T. cruzi* in the United States, and over 5500 in Canada, 80 000 in Europe and in western Pacific region, 3000 in Japan, and 1500 in Australia.² The two prescribed medications for the treatment of Chagas disease, benznidazole and nifurtimox, are not very effective for the treatment of this disease and may present shocking undesirable side effects.^{3,4} In this context, considerable effort has been devoted to establishing new targets for the treatment of Chagas disease. One attractive target for therapeutic intervention in the treatment of Chagas disease is cruzain (Cx), the recombinant form of the enzyme cruzipain (EC 3.4.22.51), the most abundant cysteine protease present in the parasite *T. cruzi*.^{5–8}

The most successful cruzain inhibitor developed so far is K777 (Scheme 1), also known as K11777 (*N*-methyl-

Scheme 1. 2D Structure of the Cruzain Inhibitors: K777 and Neq0682

piperazine-phenylalanyl-homophenylalanyl-vinylsulfone phenyl), which has demonstrated efficacy in models of acute and chronic Chagas disease in both mice and dogs in preclinical

Received: December 9, 2019

Published: March 3, 2020

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis and matched molecular pair analysis of covalent reversible inhibitors of the cysteine protease CPB

Thiago Kelvin Brito Matos^{a,d}, Pedro Henrique Jatal Batista^{a,d}, Fernanda dos Reis Rocho^a, Daniela de Vita^a, Nicholas Pearce^b, Barrie Kellam^c, Carlos Alberto Montanari^a, Andrei Leitão^{a,*}

^a Medicinal & Biological Chemistry Group (NEQUIMED), São Carlos Institute of Chemistry-University of São Paulo (IQSC-USP), São Carlos, SP, Brazil

^b School of Chemistry, University of Nottingham, Nottingham, UK

^c School of Pharmacy, University of Nottingham, Nottingham, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Dipeptidyl nitrile derivatives
Enzymic inhibitors
Additive effect
SAR
Crystallographic structure

ABSTRACT

Cysteine protease B (CPB) can be targeted by reversible covalent inhibitors that could serve as antileishmanial compounds. Here, sixteen dipeptidyl nitrile derivatives were synthesized, tested against CPB, and analyzed using matched molecular pairs to determine the effects of stereochemistry and *p*-phenyl substitution on enzyme inhibition. The compound (S)-2-((S)-1-(4-bromophenyl)-2,2,2-trifluoroethylamino)-N-(1-cyanocyclopropyl)-3-phenylpropanamide (5) was the most potent CPB inhibitor ($pK_i = 6.82$), which was also selective for human cathepsin B ($pK_i < 5$). The inversion of the stereochemistry from *S* to *R* was more detrimental to potency when placed at the P2 position than at P3. The *p*-Br derivatives were more potent than the *p*-CH₃ and *p*-OCH₃ derivatives, probably due to intermolecular interactions with the S3 subsite.

Leishmaniasis is a neglected disease endemic in many countries, including Brazil. It is considered an emergent and uncontrolled disease, caused by more than 20 species of *Leishmania*.¹ Leishmaniasis can be classified into three forms, the two most common being tegumentary and visceral. The most frequent types in Brazil are cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*²; however, the visceral form is the deadliest. According to the World Health Organization (WHO), visceral leishmaniasis affected 500,000 people in 88 countries worldwide in 2017; 556 million people live in endemic areas. Six countries, including Brazil, account for 94% of cases.³

The disease is transmitted to humans by the bite of infected female sandflies. These parasites are present inside the vector gut as extracellular promastigotes; then, they transform into intracellular amastigotes in mammalian host cells.⁴ Currently, leishmaniasis treatment includes pentavalent antimonials, amphotericin B and miltefosine. Pentavalent antimonials are the first-line treatment; however, these are associated with side effects such as hepatotoxicity and cardiotoxicity.⁵ Amphotericin B, another common antileishmanial drug, causes renal toxicity.⁶ For these reasons, it is crucial to develop new drugs, and cysteine proteases are attractive targets; these are associated with physio-pathological processes such as cancer (for cathepsins),⁷ Chagas

disease that is caused by *Trypanosoma cruzi* (where cruzipain is expressed throughout the whole life cycle), and leishmaniasis, caused by *Leishmania* spp. (for the enzymes CPA, CPB, and CPC).⁸ These enzymes irreversibly hydrolyze peptide bonds by putative mechanism involving nucleophilic attack provided by the thiolate, resulting in formation of a tetrahedral intermediate that is followed by formation of a thioester intermediate and its hydrolysis. The active site of the cysteine proteases from the papain family recognizes the protein sequence to be cleaved (or the biomimetic inhibitor) in which the substituents in the α -carbon of the amino acids (or the inhibitors) bind to the subsites.⁹

Many research groups been working with derivatives of dipeptidyl nitrile that bind reversibly with cysteine proteases.^{10,11} The covalent bond is formed between the carbon from the nitrile warhead and the thiolate of the catalytic cysteine forming the thioimide; nevertheless, this is unstable and degrades to return the system to the initial state. Therefore, these compounds are classified as covalent reversible inhibitors.¹²

There are many reports in the literature of various cysteine proteases inhibitors, especially reversible and irreversible covalent inhibitors.^{13,14} Moreover, inhibitors that do not form a covalent bond with the active site usually show lower potency. By contrast, those that form irreversible covalent bonds may have toxicity due to off-target

* Corresponding author at: Medicinal & Biological Chemistry Group (NEQUIMED), São Carlos Institute of Chemistry-University of São Paulo (IQSC-USP), Av. Trabalhador São-carlense, 400 São Carlos, SP 13566-590, Brazil.

E-mail address: andleitao@iqsc.usp.br (A. Leitão).

^d Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127439>

Received 1 June 2020; Received in revised form 20 July 2020; Accepted 21 July 2020
Available online 25 July 2020

0960-894X/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cite this: DOI: 10.1039/
d0md00097cOn the intrinsic reactivity of highly potent
trypanocidal cruzain inhibitors†Vinicius Bonatto,^{†a} Pedro Henrique Jatai Batista,^{†a} Lorenzo Ciarni,^a
Daniela De Vita,^a Daniel G. Silva,^a Rodrigo Cedron,^a Daiane Y. Tezuka,^{ab}
Sérgio de Albuquerque,^b Carolina Borsoi Moraes,^c Caio Haddad Franco,^{b,c}
Jerônimo Lameira,^{b,ad} Andrei Leitão^{b,ea} and Carlos A. Montanari^{b,ea}

The cysteine protease cruzain is considered to be a validated target for therapeutic intervention in the treatment of Chagas disease. Hence, peptidomimetic cruzain inhibitors having a reactive group (known as warhead) are subject to continuous studies to discover novel antichagasic compounds. Here, we evaluated how different warheads for a set of structurally similar related compounds could inhibit the activity of cruzain and, ultimately, their trypanocidal effect. We first investigated *in silico* the intrinsic reactivity of these compounds by applying the Fukui index to correlate it with the enzymatic affinity. Then, we evaluated their potency against *T. cruzi* (Y and Tulahuén strains), which revealed the reversible cruzain inhibitor Neq0656 as a better trypanocidal agent (EC_{50}^{trypan} = 0.1 μ M; SI = 58.4) than the current drug benznidazole (EC_{50}^{trypan} = 5.1 μ M; SI > 19.6). We also measured the half-life time by HPLC analysis of three lead compounds in the presence of glutathione and cysteine to experimentally assess their intrinsic reactivity. Results clearly illustrated the reactivity trend for the warheads (azanitrile > aldehyde > nitrile), where the aldehyde displayed an intermediate intrinsic reactivity. Therefore, the aldehyde bearing peptidomimetic compounds should be subject for in-depth evaluation in the drug discovery process.

Received 28th March 2020,
Accepted 3rd August 2020

DOI: 10.1039/d0md00097c

rsc.li/medchem

1. Introduction

Chagas disease, whose etiological agent is the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is a serious health and social problem for people living in Latin America and areas previously considered non-endemic such as Japan, East Europe and North America.¹ More than 300 000 new cases are reported every year in 21 countries around the world, with an average of one million people currently infected with *T. cruzi*.^{2–4} The only two existing drugs available for the treatment of this unmet medical need, benznidazole and nifurtimox, show many side effects and high inefficiency in the chronic stage of the disease.⁵ Despite this, benznidazole

has recently been approved for therapeutic use in children under 12 in the USA. Nonetheless and beyond doubt, new drugs that are safe and efficacious are therefore critically needed. One approach consists in the discovery and development of cruzain (Cz) inhibitors, which is the major *T. cruzi* cysteine protease responsible for the survival and propagation of the protozoan parasite.⁶ Recently, we have reported different covalent reversible inhibitors of cruzain as potent trypanocidal agents.^{7–10} Moreover, we explored the effects on the affinity of cruzain inhibition by replacing a nitrile group using alternative warheads.¹¹

The active site of cruzain is V-shaped containing a Cys25, His162, and Asn182 catalytic triad. In general, the catalytic cysteine is deprotonated by the histidine, which is stabilized by the Asn175 and a Trp184 residue shielding the thiolate-imidazolium ion-pair from the solvent. The stabilized negative charge renders the active site cysteine capable of attacking the warhead of certain types of covalent inhibitors.¹² The same mechanism is present for different mammalian and protozoan cysteine proteases. In general, 19 different types of warheads have been applied for cysteine protease inhibition. However, just a few of them inhibit cruzain.^{13,12} K777, the leader of the first generation of irreversible Cz inhibitors, was withdrawn from the preclinical phase due to substantial side effects caused by its irreversible

^a Medicinal Chemistry Group, Institute of Chemistry of São Carlos, University of São Paulo, Avenue Trabalhador Sincronizada, 400, 21365-500, São Carlos/SP, Brazil. E-mail: andrelleitao@iqc.usp.br, carlos.montanari@usp.br^b Ribeirão Preto School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil^c Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil^d Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Cordeiro 01, CP 66078-110, Belém-PA, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0md00097c

‡ These authors contributed equally to the work.