UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos
Programa de Pós-Graduação

Estudos da lipofilia e estabilidade química de inibidores de cisteíno proteases

Samelyn da Costa Martins Silva

São Carlos
06/2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos
Programa de Pós-Graduação

Estudos da lipofilia e estabilidade química de inibidores de cisteíno proteases

Samelyn da Costa Martins Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

Química Orgânica e Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Andrei Leitão

São Carlos
06/2018

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento sempre será a Deus, por me fazer acreditar no direito da vida eterna.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Andrei Leitão (oficial), Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari (fundador do NEQUIMED), Dra. Bianca Rebelo Lopez Simões (Bibi) e Dr. Peter W. Kenny pelas instruções acadêmicas, intelectuais e pessoais. À banca examinadora pela disponibilidade e participação da minha defesa de mestrado.

Aos professores e examinadores da minha defesa: Prof. Dr. Ernani Pinto, Profa. Dra. Regina Oliveira e Dra. Juliana C. Barreiro, obrigada pelas contribuições, atenção e tempo dispendido para sugestões e correção deste texto.

À Dra. Patrícia Bergo pelos treinamentos e discussões sobre preparo de amostra para análise por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS).

Aos órgãos de fomento pela bolsa concedida e financiamento da pesquisa em São Paulo (FAPESP) e no Brasil (CNPq e CAPES).

À Profa Dra. Quézia pela participação da banca de qualificação; discussões de cromatografia em que eu me dirigia a ela durante disciplina em busca de “socorro” que resultaram em uma evolução incrível no desenvolvimento e compreensão do meu projeto de mestrado. Também agradeço à Dra. Juliana C. Barreiro pela contribuição como examinadora na minha qualificação cujas sugestões foram de grande aproveitamento.

Às alunas da profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza que me auxiliaram no uso temporário da speedVac do Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (DQ-UFSCar). Ao grupo Croma pelas disposições da balança analítica, reagentes e solventes químicos (eventualmente). Ao Prof Dr. Daniel R. Cardoso pela disponibilidade da speedVac e à Silmara França Buchviser pelos cuidados e instruções no uso do equipamento. Aos demais funcionários do IQSC que em sua rotina fazem que tenhamos bons desempenhos de trabalho.

Aos meus colegas do grupo Separare – DQ - UFSCar que sempre motivaram à paixão pela carreira cromatografista: Marina Denadai (Marry), Kênia, Neila; além do suporte técnico durante o mestrado no IQSC - USP.

Ao grupo NEQUIMED especialmente pelo desenvolvimento pessoal e científico com pessoas magníficas: Ariel, Camila, Murillo, Daiane, Thalita, Junior, Fabiana Rossini, Pedro, Thiago, Fernanda, Lorenzo, com destaque para Dra. Daniela de Vitta

pelas longas noites de discussão no NEQUIMED (desde aulas de inglês, português, italiano, cromatografia até química orgânica avançada! Acompanhadas de pastel ou esfiha) – com certeza uma das pessoas mais honestas e admiráveis que já conheci! Obrigada Dani. Ao pessoal do LabEcel (Laboratório de Ensaio Celulares) pelas tardes de descontração e meio de cultura fornecido para o meu projeto.

À prof Dra. Ana Cláudia Kassebohemer pela prazerosa disciplina de práticas científicas e acadêmicas abrindo meus olhos para o espírito científico.

Agradeço aos meus amados pais Ivanilda e Samuel pois são exemplos pra mim principalmente nos momentos em que preciso ser forte e resistente, levando a principal característica deles: o amor e resiliência...Minha querida mãe que me ensina a sensibilidade pelas suas habilidades na música e organização com seu olhar crítico. Meu querido pai que me ensina a observar e prudência para falar. Os amo tanto!

Ao meu noivo, Jonathan, que me ensina a sorrir em meio aos inúmeros desafios que a vida proporciona pois são através deles que mudamos, crescemos e aumentamos nosso valor como seres humanos.

Aos meus irmãos Ellen Tammy, Evelyn e Lucas, por me aguentarem nos momentos de estresse e me trazerem de volta ao foco: *Não ter medo!*

Aos meus queridos amigos Ivani e Manoel que sempre me acolhem em São Carlos (seja para um café, almoço e até hospedagem acompanhados de uma boa conversa que edifica). Deus os abençoe sempre!

Aos meus amigos de graduação Paulo e Tati, por muitos momentos de descontração (via Whatsapp, Skype e pessoalmente). À amizade e conversas de corredor e bandeirão com Mariana Buk (mesma turma de graduação) e Diandra (apaixonada por gatos).

*“Há um tempo em que é preciso
abandonar as roupas usadas
Que já tem a forma do nosso corpo
E esquecer os nossos caminhos
que nos levam sempre aos mesmos lugares
É o tempo da travessia
E se não ousarmos fazê-la
Teremos ficado para sempre
A margem de nós mesmos”*

Tempo de Travessia – Fernando Pessoa

RESUMO

O estudo das propriedades físico-químicas é essencial na fase de otimização e desenvolvimento de substâncias bioativas. A lipofilia e a estabilidade química de candidatos a fármacos são extremamente importantes e devem ser determinadas no estágio de descoberta de novos fármacos. A determinação da lipofilia dos compostos bioativos foi feita utilizando Membrana Artificial Imobilizada (IAM) para obtenção do $\log K_w$. A bioanálise qualitativa da estabilidade química de algumas substâncias em meio de cultura foi estudada utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) com fonte de ionização eletrospray e analisador do tipo ion trap. A série de dipeptidil nitrilas foi sintetizada pelo Grupo de Estudos em Química Medicinal (NEQUIMED) tendo como alvo a inibição de cisteíno proteases a fim de combater a Doença de Chagas e alguns tipos de carcinomas. O trabalho aqui apresentado foi realizado a fim de expandir as análises para uma série de derivados do Neq0409, composto cuja estrutura química norteia às modificações subsequentes de forma que se estabeleceu um mapa de dipeptidil nitrilas com ascendentes características lipofílicas. Desta maneira foi possível obter uma relação estrutura-propriedade, além da análise do perfil de degradação e/ou estabilidade de algumas das substâncias de interesse.

ABSTRACT

The study of physico-chemical properties is essential in the optimization and development phase of new bioactive substances. Lipophilicity and chemical stability of new drug candidates are extremely important and should be determined in drug discovery programs. Therefore, the determination of the lipophilicity of bioactive compounds was done using immobilized artificial membrane (IAM) to obtain logK_w. Moreover, the qualitative bioanalysis of the chemical stability of some substances in culture medium was studied using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) with electrospray ionization and ion trap mass analyzer. Chemical structures of dipeptidyl nitriles were synthesized by our research group aimed to inhibit cysteine proteases in order to fight against Chaga's disease and some types of carcinomas. The work was carried out in order to expand the analyzes for a series of derivatives of Neq0409, so that a map of dipeptidyl nitriles with ascending lipophilic characteristics was established. In this way, it was possible to obtain a structure-property relationship, besides the analysis of the degradation and/or stability profile of some of the substances of interest.

Sumário

Lista de Abreviações	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xi
Introdução	1
1.1 <i>Química Medicinal</i>	1
1.2 <i>Cisteíno Proteases e Inibidores</i>	3
1.3 <i>Odanacatib: Inibidor de Catepsina K</i>	4
1.4 <i>Fármaco Anti-Chagásico de Referência</i>	5
1.5 <i>Estudos Farmacocinéticos: Estabilidade Química e Permeabilidade Celular de Substâncias Candidatas a Fármaco</i>	6
CAPÍTULO 2	7
ESTUDO DA LIPOFILIA	8
2.1 <i>Objetivo</i>	11
2.2 <i>Materiais e Métodos</i>	12
2.3.1 <i>Equipamentos</i>	12
2.3.2 <i>Determinação do $\log K_w$ pelo modelo IAM.PC.DD</i>	12
2.3 <i>Resultados e Discussão</i>	13
2.4 <i>Conclusão</i>	22
CAPÍTULO 3	23
ESTABILIDADE QUÍMICA DE DIPEPTIDIL NITRILAS	24
3.1 <i>Objetivo</i>	25
3.2 <i>Materiais e Métodos</i>	25
3.2.1 <i>Generalidades</i>	25
3.2.2 <i>Preparo de amostra para estudo de estabilidade química em meio de cultura</i>	27
3.2.3 <i>Tratamento dos espectros pelo software MetaboliteDetect version 2.0</i>	29
3.3 <i>Resultados e Discussão</i>	29
3.4 <i>Conclusão</i>	42
CAPÍTULO 4	43
Considerações Finais	44
ANEXO A	45
ANEXO B	52

Lista de Abreviações

ACN	Acetonitrila
ACN:H ₂ O	Fase móvel: Acetonitrila e água
BNZ	Benzonidazol
Caco-2	Células de Adenocarcinoma de Colo humano
Cys25	Cisteína-25
C18	Octadecil quimicamente ligado à sílica
DAD	Detector de Arranjo Diodo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, meio sintético complexo</i>
EIC	Cromatograma de Íon Extraído
ESI	Ionização por Eletrospray
E64	<i>trans</i> -Epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butano
E64D	(2S,3S)- <i>trans</i> -Epoxysuccinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester
FBS	Soro de Feto Bovino
GPCR	Receptores Acoplados à Proteína G
His159	Histidina-159
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HTS	<i>High-Throughput Screenings</i> – Triagem de Alta Produtividade
IAM	Membrana Artificial Imobilizada
IAM.PC.DD	Membrana Artificial Imobilizada com Fosfatidilcolina
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
k	Fator de retenção
k _w	Fator de retenção em água
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
logKp	Coeficiente de permeabilidade da pele
LSS	modelo Linear de Força do Solvente
MeOH	Metanol
MeOH:H ₂ O	Fase móvel: Metanol:Água
Mia-Paca2	Células de Câncer de Pâncreas
MS	Espectrômetro de Massas
MS ⁿ	Espectrometria de Massas sequencial
NEQUIMED	Grupo de Estudos em Química Medicinal
P	Coeficiente de Partição
PC	Fosfatidilcolina
pEC ₅₀	log da concentração de fármaco na metade do efeito máximo
pKa	log da constante de acidez
pKi	log da constante de inibição enzimática
RNA	Ácido ribonucleico
RP-HPLC	Cromatografia líquida operando em modo reverso de eluição
SPR	Relação Estrutura Atividade
TLC	Cromatografia em Camada Delgada
vHTS	<i>High-Throughput virtual screening</i> – Triagem de Alta Produtividade em ensaio virtual
φ	Porcentagem de Modificador Orgânico

Lista de Figuras

Figura 1. Representação gráfica do espaço químico.....	2
Figura 2. Etapas do planejamento de um novo fármaco.	2
Figura 3. Representação geral das estruturas de dipeptidil nitrilas.....	4
Figura 4. Representação da estrutura química do Odanacatib.....	5
Figura 5. Representação da estrutura química do Benzonidazol	5
Figura 6. Membrana artificial imobilizada (IAM) de fosfatidilcolina (PC) covalentemente ligada à sílica	9
Figura 7. Representação de interações intermoleculares entre uma dipeptidil nitrila e a fosfatidilcolina.	13
Figura 8. Log k vs proporção de metanol na fase móvel	15
Figura 9. Representação das estruturas do odanacatib e benzonidazol com os valores de $\log k_w$	17
Figura 10. Representação das modificações nas estruturas químicas de dipeptidil nitrilas estudadas neste trabalho e valores de $\log k_w$	18
Figura 11. Representação das estruturas das substâncias da série B.	21
Figura 12. Representação esquemática das etapas experimentais. (1) Meio de cultura DMEM ou água (a-c); (2) Extração Líquido-Líquido; (3) Equilíbrio do sistema bifásico à -80°C; (4) Transferência da fase orgânica; (5) Evaporação do acetato de etila em (6) Ressuspensão da amostra	28
Figura 13. Software MetaboliteDetect empregado na subtração dos espectros <i>full MS scan</i> das amostras de meio fortificado com Neq0409 pelo meio branco.	31
Figura 14. Cromatogramas obtidos para as amostras de Neq0409 nos tempos de incubação: t_0 (azul), $t_1 = 24h$ (laranja), $t_2 = 48h$ (verde), $t_3 = 72h$ (preto)	31
Figura 15. Cromatograma de íon extraído das amostras de Neq0409 nos tempos de incubação e análise de 0h (vermelho), 24h (azul), 48h (preto) e 72h (verde).....	31
Figura 16. Cromatogramas de duplicatas de amostras branco nos tempos 0h e 72h.	32
Figura 17. Cromatogramas obtidos para as amostras de Neq0570 nos tempos de incubação: t_0 (vermelho), $t_1 = 24h$ (verde), $t_2 = 48h$ (azul), $t_3 = 72h$ (preto).....	37
Figura 18. Cromatograma de íon extraído das amostras de Neq0409 nos tempos de incubação e análise de 0h (azul), 24h (rosa), 48h (verde) e 72h (preto)	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Proporção de metanol na fase móvel e $\log k_w$ das substâncias estudadas ..	14
Tabela 2 Série A de substâncias empregadas neste estudo	16
Tabela 3. Segunda série de substâncias empregadas neste estudo (série B)	20
Tabela 4. Parâmetros e condições otimizadas no espectrômetro de massas	27
Tabela 5. Representação estrutural, dados dos ensaios enzimático e celulares das substâncias Neq0409 e Neq0570	30
Tabela 6. Cromatogramas de Íons Totais e seus respectivos espectros das bandas - Neq0409 – até 8.5 min.....	33
Tabela 7. Cromatogramas de Íons Totais e seus respectivos espectros das bandas - Neq0409 – entre 10.0 e 11.4 min.....	34
Tabela 8. Cromatogramas de Íons Totais e espectros de regiões para comparação entre o branco e meio fortificado com Neq0409 até 8.5 min	35
Tabela 9. Cromatogramas de íons totais e espectros de regiões para comparação entre o branco e meio fortificado com Neq0409 - entre 10.0 e 11.4 min	36
Tabela 10. Cromatogramas de Íons Totais e seus respectivos espectros das bandas - Neq0570 – até 9.2 min.....	38
Tabela 11. Cromatogramas de Íons Totais e seus respectivos espectros das bandas - Neq0570 – entre 9.2-11.1 min	39
Tabela 12. Cromatogramas de Íons Totais e espectros de regiões para comparação entre o branco e meio fortificado com Neq0570 até 9.2 min	40
Tabela 13. Cromatogramas de Íons Totais e espectros de regiões para comparação entre o branco e meio fortificado com Neq0570 entre 9.2-11.1 min	41

Introdução

1.1 Química Medicinal

A química medicinal está inserida no universo da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Neste universo, podemos construir o espaço químico, análogo ao universo cosmológico. Ou seja, numa vastidão de possíveis estruturas químicas, nem todas são sinteticamente viáveis. Para navegar na diversidade do espaço químico, adotamos o conceito de “quimiografia” que é semelhante a um sistema de posicionamento global e que permite o mapeamento de descritores (ou parâmetros) para diversas propriedades físico-químicas ou topológicas. Os limites do espaço químico biologicamente relevante são definidos por interações intermoleculares entre macromolécula e substância presentes em padrões de reconhecimento molecular em moléculas biológicas como proteínas, RNA e DNA. Assim, como no universo, os compostos bioativos encontram-se em galáxias de propriedades físico-químicas semelhantes. Porém, é difícil localizar tais galáxias, pois frequentemente o universo químico é “vazio”, já que não contém substâncias de interesse. A **Figura 1** apresenta a região do espaço químico que compreende substâncias químicas agrupadas de acordo com o tipo de atividade farmacológica e farmacocinética. Observa-se a relação entre a continuidade do espaço químico e as suas áreas discretas ocupadas por compostos com afinidade específica para moléculas bioativas. Os espaços restritos são exemplos de tais moléculas (mostradas em marrom), com famílias de alvos macromoleculares codificadas por cores como proteases (roxas), receptores acoplados à proteína G (GPCR) lipofílicos (azul) e quinases (vermelho).

Figura 1. Representação gráfica do espaço químico.¹

ADME: absorção, distribuição, metabolismo, excreção. Fonte: Figura retirada da referência 2.

O planejamento de pequenas moléculas é uma estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos, devido à compatibilidade com a produção de fármacos administrados por via oral. As etapas deste processo estão descritas na **Figura 2**.

Figura 2. Etapas do planejamento de um novo fármaco.

HTS: *High-Throughput Screening*.

Fonte: Figura retirada da referência 2.

O "modelo padrão" de descoberta de fármacos é apresentado de forma linear na **Figura 2** para facilitar a compreensão, embora esteja longe de ocorrer desta forma. Novos alvos (geralmente proteínas) são identificados através do conhecimento de uma determinada doença. Bibliotecas químicas possuem diversos compostos semelhantes a fármacos que podem ser testados em *High-Throughput Screening* (HTS – Triagem de Alta Produtividade) por sua capacidade de interagir ou modular o alvo de interesse, embora não seja a única forma de iniciar o estudo. Pode-se realizar um estudo dirigido, onde substâncias conhecidas são planejadas e sintetizadas quando já se tem informações sobre o alvo macromolecular e compostos moduladores deste. Outra estratégia engloba os ensaios virtuais em massa (vHTS) realizados *in silico* para a seleção de substâncias de interesse para ensaio *in vitro*. De qualquer forma, as substâncias são testadas para analisar suas propriedades farmacológicas em diversos

¹ LIPINSKI, C., HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature*, 2004;432,855-861. (b) AVDEEF, A. Absorption and drug development solubility, permeability, and charge state. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2003, 287p. (c) BEALE, J., BLOCK, J., Willson & Givold's Textbook of Organic Medicinal & Pharmaceutical Chemistry. 12 ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011, 1010p.

ensaios *in vitro*, tais como cinética enzimática, termodinâmica do sistema macromolécula-ligante, ensaios celulares para identificar uma série de respostas biológicas, dentre outros. Em paralelo, estudos de farmacocinética também são aplicados para compreender propriedades físico-químicas e analisar permeabilidade na célula, estabilidade, degradação, metabolismo, possíveis efeitos tóxicos, *etc.* Caso as substâncias de interesse continuem progredindo, os ensaios *in vivo* são realizados, posteriormente prosseguindo até os ensaios clínicos em humanos ²

Segundo Valkó³, apesar deste presente estudo ter como foco a lipofilia pode-se a compará-la com a permeabilidade de substâncias bioativas frente a barreira biológica.

1.2 Cisteíno Proteases e Inibidores

Enzimas classificadas como proteases são responsáveis pela catálise de reações de hidrólise de ligação peptídica e desempenham um papel importante em vários processos patológicos, como artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, infecções parasitárias, bacterianas e virais, câncer e doença de Alzheimer.⁴

Neste contexto, as cisteíno proteases são investigadas como alvos macromoleculares na descoberta de fármacos para a doença de Chagas. Estudos de biologia molecular e celular, química computacional, dentre outros foram conduzidos para revelar as funções dessas enzimas e validá-las para esta finalidade.⁵ A cruzaina, uma peptidase do tipo catepsina L que pertence à família papaína, é a principal cisteíno protease do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Estudos de cristalografia realizados em nosso grupo de pesquisa demonstram que a cruzaina apresenta dois domínios, um composto predominantemente de α hélices e o outro de folhas β antiparalelas. O sítio ativo, localizado na interface entre os dois domínios, encerra a tríade catalítica formada por Cys25, His159 e Asn175.⁶ A cruzaina tem função vinculada à invasão das células hospedeiras, pois foi demonstrado que o inibidor endógeno de cruzaina do parasita bloqueia a invasão de células musculares

² LIPINSKI, C., HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature*, 2004;432,855-861. (b) AVDEEF, A. Absorption and drug development solubility, permeability, and charge state. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2003, 287p. (c) BEALE, J., BLOCK, J., Willson & Givold's Textbook of Organic Medicinal & Pharmaceutical Chemistry. 12 ed, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011, 1010p.

³ KLARA VALKO,¹ CHAU MY DU,² CHRISTOPHER D. BEVAN,¹ DEREK P. REYNOLDS,¹ MICHAEL H. ABRAHAM. Rapid-Gradient HPLC Method for Measuring Drug Interactions with Immobilized Artificial Membrane: Comparison with Other Lipophilicity Measures. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000,89(8), 1985-1096.

⁴ BACHOVCHIN, D. A., & CRAVATT, B. F., The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. *Nature reviews. Drug discovery*, 2012;11(1),52.

⁵ Siklos M, BenAissa M, Thatcher GRJ. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(6):506–19.

⁶ AVELAR, L. A. A.; *et al.* "Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors" *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9,e0003916.

por *T. cruzi*. Além disso, parasitas atenuados com baixa atividade de cruzaina são menos eficazes em infectar animais de laboratório.⁷

Sucessões de derivados de dipeptidil nitrilas têm sido planejadas e testadas a fim de aumentar a afinidade e seletividade pelo sítio ativo de cisteíno proteases usando uma combinação de métodos experimentais e computacionais.⁸ O arcabouço químico⁹ é mostrado na **Figura 3** e tem sido usado para a identificação e otimização de substituintes nas posições indicadas. O grupo nitrila demonstrou funcionar como um centro reativo eletrofílico que sofre uma reação de adição reversível com o resíduo Cys nucleófilo da cisteíno protease, produzindo um tioimidato. Desta maneira, por meio das alterações estruturais, é possível obter informações sobre as relações estrutura-atividade e seletividade.

Figura 3. Representação geral das estruturas de dipeptidil nitrilas
Fonte: autoria própria.

1.3 Odanacatib: Inibidor de Catepsina K

O Odanacatib (**Figura 4**) é um potente inibidor de catepsina K que alcançou o estágio III de desenvolvimento como terapia para a osteoporose, por meio do bloqueio de degradação das proteínas da matriz óssea¹⁰ sendo que estrutura química e mecanismo de ação são semelhantes aos compostos sintetizados por pesquisadores membros do NEQUIMED (codificados como Neq0XXX).

⁷ FERREIRA, L.G., ANDRICOPULO, A.D., Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery *Pharmacology & Therapeutics* 2017;180,49–61.

⁸ BURTOLOSO, A. C. B., DE ALBUQUERQUE S, FURBER M, GOMES JC, GONÇALEZ C, KENNY, P.W., LEITÃO A., MONTANARI C.A., QUILLES JR. J.C., RIBEIRO J.F.R, ROCHA J.R. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2017;11(2): e0005343.

⁹ SCHIRMEISTER, T., SCHMITZ, J., JUNG, S., SCHMENGGER, T., KRAUTH-SIEGEL, R.L., GÜTSCHOW, M., Evaluation of dipeptide nitriles as inhibitors of rhodesain, a major cysteine protease of *Trypanosoma brucei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2017;27,45–50.

¹⁰ DUONG, L. T. Therapeutic inhibition of cathepsin K — reducing bone resorption while maintaining bone formation *Nature*, 2012,67,1-8.

Figura 4. Representação da estrutura química do Olanacatib

Fonte: Figura retirada da referência 9.

1.4 Fármaco Anti-Chagásico de Referência

É conhecido que o benzonidazol¹¹ (BNZ) ainda é o fármaco mais comum para a abordagem terapêutica da Doença de Chagas, porém, seus efeitos adversos são incômodos e atingem à maioria dos pacientes em tratamento. Sendo assim, este fármaco é comumente usado como controle nos estudos de novos antiparasitários, a fim de comparar os resultados obtidos para os compostos sintetizados no NEQUIMED.

O benzonidazol (**Figura 5**) é absorvido rapidamente e metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 nos hepatócitos. Há formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos que são gerados quando o grupo nitro é reduzido a um grupo amino pela ação de nitroredutases. Esta etapa é importante para o mecanismo de ação hipotético da atividade tripanocida do BNZ causada por ligação covalente dos seus metabólitos reduzidos a macromoléculas. No entanto, também é relatado que BNZ induz estresse oxidativo dentro do protozoário. As espécies reativas de oxigênio e metabólitos eletrofílicos podem reagir com ácidos nucleicos e levar às lesões do DNA. Para reverter ou até mesmo evitar danos genômicos consequentes, os organismos vivos desenvolveram vias bioquímicas que promovem a reparação de diferentes danos no DNA¹².

Figura 5. Representação da estrutura química do Benznidazol

Fonte: Figura retirada da referência 10.

¹¹ MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUZA, J. Caracterização Físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. *Quim. Nova*, 2010,33(8)1714–1719.

¹² RAJÃO, M.A., FURTADO, C., TEIXEIRA, S.M.R., MACHADO, C.R., Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2014;321,309–321.

1.5 Estudos Farmacocinéticos: Estabilidade Química e Permeabilidade Celular de Substâncias Candidatas a Fármaco

As seções anteriores (1.1-1.4) tiveram como enfoque a química medicinal que envolve a descoberta e desenvolvimento de candidatos a fármacos, especialmente com o delineamento do alvo (cruzaína) e de substâncias bioativas estudadas (dipeptidil nitrilas) e de referência (benzonidazol e odanacatib). Estes dados são importantes para estabelecer o vínculo com o trabalho aqui apresentado, que envolve a análise de propriedades físico-químicas das dipeptidil nitrilas relacionadas à farmacocinética que são a estabilidade química e a permeabilidade em membrana celular. Como mencionado anteriormente, estas propriedades são essenciais para o planejamento de novas substâncias pois compostos com baixa estabilidade química e/ou impermeáveis à membrana são eliminados dos estudos, modificados estruturalmente para sanar o problema ou até formulações podem ser usadas para mitigar o problema. Desta forma, os novos derivados de dipeptidil nitrilas analisados são comparados com o fármaco benzonidazol e o odanacatib, uma vez que essas substâncias atravessam a membrana celular e apresentam uma estabilidade química adequada. Mais especificamente a difusão passiva é o tipo de permeabilidade analisada, uma vez que odanacatib e outros inibidores de cisteína proteases apresentam tal perfil.

Nas seções subsequentes, estes estudos são descritos de forma detalhada, com informações sobre os tipos de sistemas usados e métodos aplicados neste trabalho.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA LIPOFILIA

Lipophilicity represents the affinity of a molecule or a moiety for a lipophilic environment. It is commonly measured by its distribution behavior in a biphasic system, either liquid-liquid (e.g., partition coefficient in 1-octanol/water) or solid-liquid (retention on reversed-phase high-performance liquid chromatography (*RP-HPLC*) or thin-layer chromatography (*TLC*) system).

A citação acima traz a definição de lipofilia segundo a IUPAC¹³, que pode ser expressa quantitativamente como coeficiente de partição (P) de um determinado composto entre as fases lipofílica e hidrofílica. Comumente, a partição é expressa na sua forma logarítmica (log P) a qual facilita a compreensão de seus valores, onde valores negativos englobam amostras mais hidrofílicas, enquanto amostras mais lipofílicas apresentam valores positivos. A lipofilia é importante para a análise da relação entre a atividade biológica e a estrutura molecular de um determinado fármaco, que apresentam interações como: (i) interações lipofílicas, (ii) transporte e distribuição através de barreiras do sistema biológico, (iii) metabolismo e excreção. Além disso, a lipofilia apresenta importante influência nas interações enzima-substrato, antígeno-anticorpo, com hormônios e neurotransmissores, sendo de grande interesse no estudo e planejamento de fármacos.¹⁴

Existem diversos modelos para determinar o coeficiente de partição de substâncias bioativas e assim prever a permeabilidade através da membrana celular: métodos físico-químicos como a partição octanol/água; retenção hidrofóbica utilizando coluna cromatográfica de fase reversa sílica (ex: octadecil - C18) ou coluna de membrana artificial imobilizada (IAM);¹⁵ ensaios celulares utilizando células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2),¹⁶ endotelial do cérebro e outras células; ensaios em tecidos como intestino (*gut sac*)¹⁷.

No entanto, métodos físico-químicos são mais fáceis de serem realizados principalmente para prever o transporte passivo através das membranas celulares, uma das rotas transcelulares da penetração de fármacos através dos tecidos. As rotas transcelulares de permeabilidade de substâncias bioativas incluem não apenas

¹³ Definição de Lipofilia, 2017. Disponível em <<https://goldbook.iupac.org/html/L/LT06965.html>> acesso em 15.Dez.2017.

¹⁴ NOGUEIRA, L.J., MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L., Histórico da Evolução da Química Medicinal e a Importância da Lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as Contribuições de Overton e de Hansch. *Rev. Virtual Quim.*, 2009,1(3),227-240. (b) LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001,46,3-26.

¹⁵ BARBATO F, DI MARTINO G, GRUMETTO L, LA ROTONDA MI. Prediction of drug-membrane interactions by IAM-HPLC: effects of different phospholipid stationary phases on the partition of bases. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004, 22, 261-269.

¹⁶ VAN BREEMEN RB, LI Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2005 1, 175-185.

¹⁷ BARTHE L, WOODLEY JF, KENWORTHY S, HOUIN G., An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1998, 23, 313-323.

mecanismos passivos, mas também ativos e facilitados. Atualmente, os métodos físico-químicos ainda são os mais aplicados para mimetizar o transporte passivo na descoberta de fármacos por três motivos: (1) são experimentalmente mais simples; (2) o transporte passivo é total ou parcialmente responsável pela absorção de fármacos na maioria das células; (3) a maior parte dos fármacos permeia pela membrana celular por meio de difusão passiva.¹⁸ Inicialmente, várias vias de transporte através da membrana da célula podem ser consideradas para que os ensaios estabeleçam qual destes fenômenos é observado (difusão passiva, transporte facilitado, transporte ativo, endocitose). Contudo, não há um consenso sobre quais métodos são os mais adequados para cada tipo de caso.

A permeabilidade de uma substância bioativa está relacionada à atividade farmacológica e sua eficácia quando o alvo macromolecular se encontra no interior da célula. Desta forma, a permeabilidade controla indiretamente a atividade biológica e, é uma informação crítica para o estudo de fármacos. Por esta razão, estudos¹⁹ têm demonstrado que as colunas IAM são uma estratégia adequada para a identificação de candidatos a fármacos, uma vez que constituem um modelo conveniente de transporte passivo para as células.

Colunas IAM foram introduzidas como fase estacionária de colunas de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) por Pidgeon e Venkataram. Vários tipos de lipídeos podem ser imobilizados, sendo as monocamadas com moléculas de fosfatidilcolina covalentemente ligadas à superfície de partículas de sílica uma das mais usadas, conforme representado na **Figura 6**. IAMs e lipossomas exibem propriedades interfaciais semelhantes e possuem uma grande gama de aplicações em farmacocinética e estabelecimento de relação estrutura atividade (SPR).²⁰

Figura 6. Membrana artificial imobilizada (IAM) de fosfatidilcolina (PC) covalentemente ligada à sílica²¹

¹⁸ PECK T., HILL S., WILLIAMS, M. Chapter 1: Drug passage across the cell membrane. In. *Pharmacology for Anaesthesia and Intensive Care*, 4th Edition, Cambridge University Press

¹⁹ LEITÃO, A., MONTANARI, M. L., MONTANARI, C.A. Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos. 7 Propriedades Físico Químicas de Substâncias Químicas Bioativas. EDUSP p 167 – 170, 2012.

²⁰ YANG, C.Y., CAI, S.J., LIU, H., PIDGEON, C., Immobilized Artificial Membranes - screens for drug membrane interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996,23,229-256.

²¹ REGIS, T. The Regis IAM.PC.DD 2 Drug-Discovery HPLC Column. [s.d.] disponível em < <http://www.registech.com/upload/ProductMatrixPDF/IAMDD2%20Care%20and%20Use%20Guide.pdf>> acesso em 18.12.2017.

Segundo Lázaro, Pidgeon e colaboradores foi observada uma correlação considerada razoável entre o logaritmo do fator de retenção de IAM ($\log k_{IAM}$) e a absorção intestinal do rato ($R^2 = 0,791$), ou com a permeabilidade usando o modelo celular Caco-2 ($R^2 = 0,762$) para fármacos estruturalmente diferentes. A correlação aumentou a partir do uso da massa molecular como fator de correção na equação ($R^2 = 0,858$ e $0,854$, respectivamente, para intestino de rato e Caco-2). Já Nasal e colaboradores encontraram uma correlação elevada ($R^2 = 0,942$) entre $\log k_{IAM}$ e coeficientes de permeabilidade da pele ($\log K_p$) para um conjunto de 10 esteroides.²²

Os estudos realizados com uma coluna IAM no sistema RP-HPLC usualmente necessitam de um co-solvente, que atua como modificador orgânico na fase aquosa (que é a fase móvel). Em cromatografia líquida, o fator de retenção (k) é alterado conforme a proporção de modificador orgânico (ϕ) na fase móvel. Ou seja, no modo reverso, quanto maior a porcentagem de solvente orgânico menor a retenção de analitos de baixa polaridade devido ao incremento da força do solvente. Por exemplo, na condição $0,2 < \phi < 0,8$ há um comportamento linear proposto por Snyder para o metanol. Assim, é possível calcular o $\log k_w$ quando a proporção de fase móvel é 100% aquosa por meio de extrapolação obtida a partir da equação de reta estabelecida no modelo. Os valores de k_w podem ser calculados por meio do modelo Linear de Força do Solvente (LSS) de Snyder (Equação 1).²³

$$\log k = -S\phi + \log k_w \quad (1)$$

O $\log P$ é então obtido por meio da Equação 2. Nesta equação, quando a e b são iguais a um e zero, respectivamente, é garantido que o coeficiente de retenção seja linear e homoenergeticamente relacionado ao coeficiente de partição.²⁴

$$\log P = a \log k_w + b \quad (2)$$

Se a lipofilia for o fator mais importante na ação da substância de interesse, deve-se analisá-la de acordo com o contexto que envolve o mecanismo de ação da substância. Por exemplo, acredita-se que os anestésicos gerais atuem por dissolução nas membranas celulares, o que requer uma maior lipofilia. Conforme esperado, os coeficientes de partição octanol/água dos compostos éter dietílico, clorofórmio e halotano são 0,98, 1,97 e 2,3, respectivamente, o que indica que o halotano seria o mais solúvel destes em membranas lipídicas. Isso corresponde às suas atividades

²² LÁZARO, E.; RÂFOLS, C.; ABRAHAM, M.H.; ROSÉS, M., Chromatographic Estimation of Drug Disposition Properties by Means of Immobilized Artificial Membranes (IAM) and C18 Columns *J. Med. Chem.* 2006,49,4861-4870

²³ SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2º ed. New York: Jhon Wiley & Sons Inc. p. 882. 1979. (b) SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 2º ed. New York: Jhon Wiley & Sons Inc. p. 882. 1979.

²⁴ VALKÓ, K.; SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L. Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition. *Journal of Chromatography A*, v. 656, n. 1-2, p. 501-520, 1993.

relativas, sendo o halotano o mais potente. Consequentemente, a lipofilia de um composto em termos do seu coeficiente de partição é um dos fatores considerados no planejamento de novos fármacos.²⁵

Sendo assim, podemos citar o estudo desenvolvido por Lázaro e colaboradores²¹ que observou a similaridade dos resultados obtidos para coluna IAM com coluna C18 comum em comparação com os sistemas biológicos. O modelo de estudo da lipofilia empregando a coluna IAM mostrou uma estreita semelhança com a partição da pele humana e os processos de permeabilidade sangue-cérebro, mostrando que pode ser útil como modelo para esses processos biológicos. Em contrapartida, é mostrado que a permeabilidade da pele humana é mais parecida com a partição C18 do que com a partição IAM.

Outro emprego da coluna IAM envolve o trabalho desenvolvido por Santoro e colaboradores (2016) realizado no grupo de pesquisa NEQUIMED.²⁶ A propriedade lipofílica de flavonoides utilizando colunas IAM e imobilizada com colesterol foi comparada com a determinação de $\log P_{\text{oct/w}}$ e *in silico* obtido por meio do software VolSurf. Essa metodologia foi escolhida para o trabalho em questão por consequência destes resultados obtidos e verificados pelo grupo.

2.1. Objetivo

Determinar o valor de $\log k_w$ para uma série de dipeptidil nitrilas por meio da técnica de RP-HPLC com emprego de coluna de Membrana Artificial Imobilizada (IAM).

²⁵ THOMAS, G. Medicinal Chemistry - An Introduction. 2º ed. Chichester: Jhon Wiley & Sons Inc. p. 38-70. 2007. (b) SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; GANT, J. R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 165, n. 1, p. 3-30, 1979.

²⁶ SANTORO A.L., CARRILHO E., LANÇAS F.M., MONTANARI C.A. Quantitative Structure- Retention Relationships of Flavonoids Unraveled by Immobilized Artificial Membrane Chromatography. *Eur. J. Pharm. Sci.* v.88, 147-157, 2016.

2.2 Materiais e Métodos

2.3.1 Equipamentos

Utilizou-se o equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Prominence, Shimadzu, Japão) que possui as bombas SHIMADZU LC 20AT e LC 20AD, desgaseificador DGU-20A₅ com detector de arranjo de diodos (DAD) SHIMADZU SPD-M20A e autoinjeter SHIMADZU SIL-20A HT. A aquisição de dados foi feita utilizando o software LCsolution *version* 1.26 SP5.

Água deionizada MILLI-Q® (Meck-Millipore) foi empregada no preparo da fase móvel e no preparo de amostras. As amostras foram homogeneizadas em Vórtex® QL-901 e as substâncias pesadas em balança analítica Sartorius Ag gc803s. As micropipetas utilizadas no preparo das amostras foram EPPENDORF®. Para as medidas de pH utilizou-se pHmetro Qualxtron modelo 8010 com precisão $\pm 0,06$.

2.3.2 Determinação do $\log K_w$ pelo modelo IAM.PC.DD

- *Amostras*

As substâncias testadas neste trabalho foram sintetizadas por membros do grupo NEQUIMED, sendo que 34 compostos foram testados. Dois compostos padrões foram utilizados como referência no estudo: benzonidazol da empresa Sigma Aldrich (Lote: 419656) e odanacatib da empresa ChemShuttle (Lote: MK6L3727).

Os compostos foram pesados, solubilizados em metanol (MeOH) cuja concentração final foi de aproximadamente $3,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ e, à partir destas soluções, prepararam-se soluções de trabalho na concentração de 1 mg.mL^{-1} diluídas em MeOH:H₂O (30:70 v/v). Todas as amostras foram injetadas em triplicatas em um volume de injeção de $3 \mu\text{L}$, sendo que o tempo morto da coluna (t_0) foi determinado utilizando-se acetona. Foram avaliadas e empregadas seis fases móveis diferentes, com proporções de modificador orgânico de 0 a 60% de metanol em modo de eluição isocrático. A coluna cromatográfica IAM.PC.DD (100mmx4.6mm I. D., $5 \mu\text{m}$, $300 \text{ \AA}$ - Regis Technologies®, Morton Grove, IL, EUA) empregada neste estudo foi adquirida a partir da empresa Regis Technologies Inc. A vazão utilizada foi de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$, enquanto que as demais condições foram: temperatura ambiente, detector DAD com monitoramento no comprimento de onda de 206 nm.

Os dados experimentais coletados foram tratados no programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, Inc.) com o $\log k_w$ calculado a partir de regressão linear pelo mesmo programa estatístico.

2.3 Resultados e Discussão

Foi utilizado um detector de arranjo de diodo cuja varredura de comprimento de onda variou de 200 a 400 nm. Verificou-se que a maior absorvidade molar de dipeptidil nitrilas é em 206 nm, sendo este comprimento de onda adotado nas análises.

Snyder e colaboradores²⁷ sugeriram que a inclinação obtida para a curva de $\log k$ versus %MeOH (proporção de metanol da fase móvel), S , é uma medida de lipofilicidade. As regressões lineares para as substâncias são quase paralelas entre si e indicam o mesmo mecanismo de retenção e a possibilidade de S ser responsável pelas interações químicas como a ligação de hidrogênio. A **Figura 7** representa exemplos de possíveis interações das regiões da fosfatidilcolina com as dipeptidilnitrilas sendo que apresentam diferente densidade eletrônica.

Figura 7. Representação de interações intermoleculares entre uma dipeptidil nitrila e a fosfatidilcolina.

A **Tabela 1** apresenta as proporções de modificador orgânico adotadas para cada substância. As faixas de porcentagem utilizadas correspondem à lipofilia da substância. Ou seja, quanto maior as características lipofílicas maior a proporção de modificador orgânico na fase móvel para eluição.

²⁷ SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W.; GANT, J. R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 165, n. 1, p. 3–30, 1979

Tabela 1. Proporção de metanol na fase móvel e log_w das substâncias estudadas

Código Neq	%Metanol														log _w
	5	7,5	10	15	20	22,5	25	30	35	40	45	50	55	60	
Neq0409		X	X	X	X		X	X							0,66
Neq0414							X	X	X			X	X	X	1,3
Neq0415							X	X	X			X	X	X	1,8
Neq0551					X	X	X	X	X	X	X	X			0,75
Neq0554					X	X	X	X	X	X	X	X			1,0
Neq0568					X	X	X	X	X	X	X	X			1,0
Neq0569					X	X	X	X	X	X	X	X			1,1
Neq0570	X		X	X	X		X	X							0,76
Neq0573					X	X	X	X	X	X	X	X			0,76
Neq0594								X	X		X	X	X	X	1,4
Neq0595							X	X	X			X	X	X	1,5
Neq0629					X	X			X	X	X	X			2,9
Neq0630								X	X	X	X	X	X	X	2,7
Neq0631	X	X	X	X	X		X								1,0
Neq0633					X	X	X	X	X		X	X			2,6
Neq0636	X	X	X	X	X		X	X	X	X					1,7
Neq0641					X	X	X	X	X	X	X	X			2,8
Neq0642					X	X	X	X	X	X	X	X			2,6
Neq0643					X	X	X	X	X	X	X	X			2,3
Neq0655	X	X	X	X	X		X								1,0
Neq0658					X	X	X	X	X	X	X	X			3,1
Neq0659					X	X			X		X	X			3,2
Neq0662							X		X	X	X	X	X	X	3,8
Neq0663							X		X	X			X	X	3,6
Neq0664	X		X	X	X		X	X	X	X					1,6
Neq0665					X	X	X	X	X	X	X	X			2,8
Neq0668					X	X	X	X	X	X	X	X			1,4
Neq0669	X		X	X	X		X	X	X	X					1,7
Neq0670					X	X	X	X	X	X	X	X			2,2
Neq0671					X	X	X	X	X	X	X	X			2,7
Neq0672					X	X	X	X	X	X	X	X			1,0
Benzonidazol	X		X	X	X	X	X	X							0,22
Odanacatib	X		X	X	X	X	X	X							2,0

Foi adotado o Modelo Linear de Força de Solvente (Equação (1)) para a regressão linear e obtenção do $\log k_w$, parâmetro quantitativo da lipofilia segundo o modelo cromatográfico (Figura 8).

$$\log k = -S\phi + \log k_w \quad (1)$$

Figura 8. Log k vs proporção de metanol na fase móvel

Os valores de $\log k_w$ foram obtidos a partir das equações de regressão linear e estão apresentados na **Tabela 2**, onde há a extrapolação de seu valor para a fase móvel sem modificador orgânico (onde $Y = 0$). Desta forma, o $\log k_w$ é o termo constante apresentado em negrito na equação.

Tabela 2 Série A de substâncias empregadas neste estudo

Compostos	Regressão Linear	R ²	Sy.x
Neq0409	$Y = -0,024\phi + \mathbf{0,66}$	0,9932	0,028
Neq0414	$Y = -0,037\phi + \mathbf{1,3}$	0,9969	0,026
Neq0415	$Y = -0,042\phi + \mathbf{1,8}$	0,9986	0,020
Neq0570	$Y = -0,026\phi + \mathbf{0,76}$	0,9932	0,029
Neq0594	$Y = -0,037\phi + \mathbf{1,4}$	0,995	0,026
Neq0595	$Y = -0,038\phi + \mathbf{1,5}$	0,9976	0,023
Neq0629	$Y = -0,056\phi + \mathbf{2,9}$	0,9984	0,021
Neq0630	$Y = -0,054\phi + \mathbf{2,7}$	0,9982	0,023
Neq0631	$Y = -0,021\phi + \mathbf{1,0}$	0,9959	0,012
Neq0633	$Y = -0,049\phi + \mathbf{2,6}$	0,9978	0,026
Neq0636	$Y = -0,032\phi + \mathbf{1,7}$	0,9892	0,040
Neq0641	$Y = -0,051\phi + \mathbf{2,8}$	0,9993	0,013
Neq0642	$Y = -0,049\phi + \mathbf{2,6}$	0,9988	0,018
Neq0643	$Y = -0,044\phi + \mathbf{2,3}$	0,9976	0,023
Neq0655	$Y = -0,024\phi + \mathbf{1,0}$	0,9948	0,015
Neq0658	$Y = -0,053\phi + \mathbf{3,1}$	0,9177	0,14
Neq0659	$Y = -0,055\phi + \mathbf{3,2}$	0,9446	0,11
Neq0662	$Y = -0,070\phi + \mathbf{3,8}$	0,9977	0,031
Neq0663	$Y = -0,068\phi + \mathbf{3,6}$	0,9979	0,030
Neq0664	$Y = -0,030\phi + \mathbf{1,6}$	0,9902	0,036
Neq0665	$Y = -0,052\phi + \mathbf{2,8}$	0,9984	0,022
Neq0668	$Y = -0,035\phi + \mathbf{1,4}$	0,9965	0,022
Neq0669	$Y = -0,032\phi + \mathbf{1,7}$	0,9872	0,044
Neq0670	$Y = -0,045\phi + \mathbf{2,2}$	0,9979	0,022
Neq0671	$Y = -0,052\phi + \mathbf{2,7}$	0,999	0,018
Neq0672	$Y = -0,030\phi + \mathbf{1,0}$	0,9931	0,026
Benzonidazol	$Y = -0,017\phi + \mathbf{0,22}$	0,9944	0,015
Odanacatib	$Y = -0,046\phi + \mathbf{2,0}$	0,998	0,022

Como descrito anteriormente, a lipofilia é proporcional ao valor de $\log k_w$ obtido. Desta maneira, pode-se construir um mapa (**Figura 10**) que caracteriza o aumento de $\log k_w$ conforme a alteração de substituintes na estrutura matriz de dipeptidil nitrila. As substâncias de referência utilizadas nesta parte do estudo foram: benzonidazol (antichagásico) e odanacatib (derivado de dipeptidil nitrila inibidor da catepsina K). A **Figura 9** representa as estruturas químicas do odanacatib²⁸ ($\log k_w = 2,0$) e benzonidazol²⁹ ($\log k_w = 0,22$) empregadas neste estudo, cuja atividade intracelular é conhecida devido à permeabilidade pela membrana por difusão passiva. Os valores de $\log k_w$ (**Tabela 2**) obtidos que estão na faixa $0,22 < \log k_w < 2,0$ remetem à possibilidade de também se difundirem por transporte passivo através da barreira biológica. Por outro lado, segundo Lipinski e colaboradores,³⁰ a difusão passiva é possível para substâncias que apresentam valores acima de 2,0 mas a partir de 5,0 se encontram as substâncias fortemente lipofílicas.

Este dado confirma estudos realizados por membros do grupo onde a análise da permeabilidade utilizando uma série de inibidores de cisteína proteases com potente atividade celular foi usada para estabelecimento de um modelo de inteligência artificial que apontou os derivados descritos na **Figura 10** com atividade de inibição enzimática e permeabilidade celular.^{31,34}

Figura 9. Representação das estruturas do odanacatib e benzonidazol com os valores de $\log k_w$

²⁸ KASSAHUN, K. et al. 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* 39, 6, 1079-1087, 2011

²⁹ MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUZA, J. Caracterização Físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. *Quim. Nova*, 33, 8, 1714–1719, 2010.

³⁰ LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46, 3–26, 2001

³¹ SILVA, D.G., ROCHA, J.R., SARTORI, G.R., MONTANARI, C.A., Highly predictive hologram QSAR models of nitrile-containing cruzain inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35, 15, 3232–3249, 2017. (b) SILVA, D.G., RIBEIRO, J.F.R., DE VITA, D., CIANNI, L., FRANCO C.H., FREITAS-JUNIOR, L.H., MORAES, C.B., ROCHA, J.R., BURTOLOSO A.C.B., KENNY, P.W., LEITÃO, A., MONTANARI, C.A., A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 27, 5031–5035, 2017. (c) KENNY, P.W., MONTANARI, C.A., PROKOPCZYK, I.M., RIBEIRO, J.F.R., SARTORI, G.R., Hydrogen Bond Basicity Prediction for Medicinal Chemistry Design. *J. Med. Chem.* 59, 4278–4288, 2016.

Figura 10. Representação das modificações nas estruturas químicas de dipeptidil nitrilas estudadas neste trabalho e valores de $\log k_w$

Nota-se que a modificação dos substituintes resultou em diversas interações com o fosfolípídeo presente na coluna cromatográfica e, conseqüentemente, tempos de retenção diferentes. Sendo assim, a modificação na carbonila por trifluormetil (CF_3) em Neq0570 (0,76) que produziu Neq0594 (1,4) e Neq0631 (1,0), comprovou o aumento da interação e retenção pela coluna. Além disso, a estratégia da síntese utilizando CF_3 se deve à potencialização ou conservação do efeito de inibição da cruzaina³², a fim de aumentar a estabilidade química dos novos derivados frente aos nucleófilos que poderiam desencadear reações indesejáveis nos possíveis eletrófilos: nitrila e carbonila.

É conhecido da literatura³³ que os substituintes CF_3 e carbonila apresentam configuração eletrônica e efeito estérico similares, o que justifica a escolha de tais substituintes como equivalentes, sendo conhecidos como bioisósteros. A adição de metoxila em posição *para* no anel aromático em R2 no Neq0631 (1,0) formou Neq0668 (1,4) que gerou pequeno aumento na interação com a coluna IAM (embora isto não necessariamente esteja relacionado com o aumento na lipofilia), ao passo que a troca da fenila em Neq0594 (1,4) e Neq0633 (2,6) pela isopropila para obter Neq0672 (1,1) causou uma pequena redução na interação com a fase estacionária.

Nota-se que as substâncias são diastereoisoméricas como Neq0641 (2,8) com Neq0642 (2,6) e Neq0664 (1,6) com Neq0669 (1,7) apresentaram valores de $\log k_w$ distintos. Observa-se na **Figura 7** a presença de um centro quiral na estrutura da fosfatidilcolina imobilizada à sílica. Propõe-se que a diferença nos valores de $\log k_w$ para os isômeros se deve ao fato de interagirem de maneira particular com este centro estereogênico refletindo em resultados distintos de tempo de retenção. No entanto, devido à falta de homogeneidade nos resultados observados para os pares de diastereoisômeros, torna-se inviável estabelecer um padrão adequado para a descrição da lipofilia.

Os resultados de $\log k_w$ (**Tabela 2**) servem para guiar a estratégia de síntese de novas substâncias pertinentes à classe de inibidores de cisteína proteases, cujos valores de pK_i foram previamente determinados no grupo. A tendência lipofílica mensurada está relacionada com o caminho percorrido pelo fármaco até chegar ao alvo dentro do organismo para enfim exercer a ação farmacodinâmica.³⁴ Sendo assim, combinando respostas de inibição enzimática e o estudo da lipofilia é possível

³² BURTOLOSO, A. C., DE ALBUQUERQUE, S., FURBER, M., GOMES, J. C., GONÇALEZ, C., KENNY, P. W.,...& ROCHA, J. R. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. *PLoS neglected tropical diseases*, 2017, 11(2), e0005343.

³³ BEALE Jr., J. M., BLOCK, J. H., Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer. 12 ed. Filadelfia. pp.20-22. 2011

³⁴ LEITÃO, A., MONTANARI, M. L., MONTANARI, C.A. Química Medicinal: Métodos e Fundamentos em Planejamento de Fármacos. 7 Propriedades Físico Químicas de Substâncias Químicas Bioativas. EDUSP p 167 – 170, 2012

predeterminar quais substituintes da estrutura química terão maior êxito nos ensaios celulares, uma vez que diversos inibidores enzimáticos podem ser inativos em modelos celulares por causa da inadequação de suas propriedades físico-químicas.

O estudo de determinação de $\log k_w$ se estendeu para uma segunda série de substâncias de interesse para o NEQUIMED, cujos valores encontrados estão apresentados na **Tabela 3**. As substâncias de referência E64 e E64D correspondem aos inibidores de cisteína proteases que são permeáveis (E64D) ou impermeáveis (E64) a membrana celular.

Tabela 3. Segunda série de substâncias empregadas neste estudo (série B)

Compostos	Regressão Linear	R ²	Sy.x
Neq0551	$Y = -0,028\phi + 0,75$	0,9940	0,023
Neq0554	$Y = -0,030\phi + 1,0$	0,9941	0,024
Neq0568	$Y = -0,034\phi + 1,0$	0,9906	0,035
Neq0569	$Y = -0,035\phi + 1,1$	0,9946	0,027
Neq0573	$Y = -0,029\phi + 0,76$	0,9920	0,028
E-64	$Y = -0,013\phi - 0,77$	0,9870	0,020
E-64D	$Y = -0,028\phi + 0,57$	0,9834	0,039

Dentre os resultados de $\log k_w$ obtidos observa-se que a substância E-64 apresenta um valor negativo (-0,77), o que justifica a sua reconhecida impermeabilidade à membrana celular por causa da elevada hidrofília deste zwitterion (**Figura 11**)³⁵. No caso do seu análogo com atividade celular (E-64D) foi obtido um valor positivo, onde grupos lipofílicos compostos por hidrocarbonetos estão presentes.

As substâncias desta série B apresentam $\log k_w$ no intervalo de 0,75 a 1,0, dentro do esperado para inibidores de proteases e com atividade antiparasitária em estudos celulares (de acordo com os valores obtidos para odanacatib, E-64D e benzonidazol). Estudo *in vitro* em células de câncer de pâncreas (Mia-Paca2) empregando esta segunda série mostrou atividade antineoplásica.

Deve-se observar que a diferença entre Neq0568 e Neq0569 é a inserção de uma ciclopropila, o que torna Neq0569 mais lipofílico do que a substância de partida e uma maior retenção, como descrito anteriormente. É relevante notar que a *t*-butila em Neq0573 (0,76) apresentou o mesmo valor de Neq0570 (0,76 - **Figura 1010**), que

³⁵ LAMPI, K.J., KADOYA, K., AZUMA, M., DAVID, L.L., SHEARER, T.R., Comparison of cell-permeable calpain inhibitors and E64 in reduction of cataract in cultured rat lenses. *Toxicology and applied pharmacology*, 117,53-57, 1992.

possui o grupo fenil em R2. Além disso, a comparação entre Neq0409 (0,66 - **Figura 10**) e Neq0551 (0,74 - **Figura 11**) mostra que a hidroxila em posição *para* interage por ligação de hidrogênio com a fase estacionária, incrementando a retenção.

Figura 11. Representação das estruturas das substâncias da série B.

Os resultados desta segunda série de compostos são complementares àqueles previamente apresentados juntamente à descrição da relação estrutura-propriedade (SPR) apresentada nesta capítulo para tais substâncias tendo em consideração a mimetização da difusão passiva através da membrana celular.

2.4 Conclusão

Os resultados de $\log k_w$ obtidos por meio da técnica de cromatografia líquida com emprego da coluna IAM.PC.DD levaram a proposições de SPR por meio da análise das modificações estruturais dos derivados. Foi observado que na maioria dos casos apresentados, houve uma boa correlação entre a lipofilia e a retenção. Além disso, a análise comparativa com as substâncias de referência com reconhecida atividade celular e que apresentam permeabilidade por difusão passiva, demonstrou que as novas substâncias possuem uma excelente probabilidade de também apresentarem atividade celular com o mesmo mecanismo de permeação.

Por fim, este estudo mostrou-se relevante na estratégia de novos fármacos já que é uma das interfaces entre o planejamento computacional, síntese, ensaio enzimático e ensaios *in vitro*, pois esclarece e justifica hipóteses inicialmente concebidas, apresenta possíveis interações lipofílicas e, principalmente, relaciona a estrutura química e a propriedade físico-química.

CAPÍTULO 3

ESTABILIDADE QUÍMICA DE DIPEPTIDIL NITRILAS

A estabilidade química de substâncias bioativas pode ser estudada em diferentes contextos. No desenvolvimento de novos fármacos, por exemplo, está relacionada a fatores biológicos (meio de cultura celular, membrana celular, citoplasma, organelas em ensaios celulares, por exemplo) e químicos (pH, concentração, solubilidade, lipofilia). Estes fatores podem desencadear reações nas quais a substância bioativa pode ter o tempo de meia-vida alterado e participar de outras rotas enzimáticas. Isto é, seus produtos de degradação podem ter um perfil biológico completamente distinto daquela substância. Desta forma, torna-se essencial compreender como estes fatores biológicos e químicos podem afetar o perfil de atividade biológica da substância de interesse a partir da análise da sua estabilidade quando exposta às condições experimentais de interesse.³⁶

Existem várias etapas para que a substância bioativa atinja o alvo, sendo que pode ocorrer biotransformação³⁷, degradação³⁸ ou metabolismo³⁹. O foco deste trabalho é o estudo da estabilidade de derivados de dipeptidil nitrilas em meio de cultura usado nos ensaios celulares executados pelo grupo NEQUIMED.

O meio de cultura é uma solução rica em nutrientes para as células envolvidas em ensaios *in vitro*. Sendo assim, esta mistura de aminoácidos, sais minerais, vitaminas e glicose é fundamental para a nutrição da célula e torna-se um possível meio de degradação da substância bioativa antes mesmo desta atingir o alvo. Além disto, ele é suplementado com soro de feto bovino (FBS) inativado por calor, que contém proteínas, hormônios e outros constituintes de origem animal. Em estudos prévios utilizando as substâncias Neq0409 e Neq0570 observaram-se resultados divergentes ao esperado. Os ensaios enzimáticos mostraram inibição da enzima cruzaina enquanto que ensaios *in vitro* para células parasitárias não levaram a resposta biológica esperada.⁴⁰ Desta maneira, propõem-se o estudo da estabilidade de tais compostos em meio de cultura, com emprego da técnica analítica de LC-MS/MS para analisar a estabilidade da substância bioativa em presença do meio de

³⁶ HOLLERAN, J. L. et al. Use of high-performance liquid chromatography to characterize the rapid decomposition of wortmannin in tissue culture media. *Analytical Biochemistry*, 2003,323(1),19–25. (b) MADDIPATI, K. R.; ZHOU, S. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 2011,94,59–72. (c) POMPON, A. et al. Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyl- oxymethyl) esters of azidothymidine 51-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium: an application of the “on-line ISRP-cleaning” HPLC technique. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. 1994,5(2),91–98.

³⁷ FLESCHHUT, J.; KULLING, S. E.; ANTHO-, S. B. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 2006,45,7–18.

³⁸ WANG, Y.-J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1997,15,1867–1876.

³⁹ MUKHERJEE, K.; CHATTOPADHYAY, N. Pharmacological Inhibition of Cathepsin K: a Promising Novel Approach for Postmenopausal Osteoporosis Therapy. *Biochemical Pharmacology*, 2016,117,10-19.

⁴⁰ AVELAR, L. A. A. et al. Molecular Design , Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. *Plos Negl Trop Dis*, 2015,1–24.

cultura DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) suplementado com FBS e antibióticos estreptomicina e ampicilina.⁴¹

3.1 Objetivo

Estudar qualitativamente a estabilidade química de dipeptidil nitrilas em meio de cultura (DMEM) por meio da técnica RP-LC-MS/MS.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Generalidades

Água ultra pura foi obtida de sistema Milli-Q® (Millipore, São Paulo, Brasil) e empregada nos preparos da fase móvel e de amostras. As amostras foram homogeneizadas em Vórtex® QL-901 e as substâncias pesadas em balança analítica Sartorius Ag Germany gc803s. As micropipetas utilizadas foram Eppendorf®. Para as medidas de pH utilizou-se pHmetro Qualxtron modelo 8010 com precisão $\pm 0,06$. Os solventes com grau de pureza HPLC foram adquiridos junto a JT Baker, Sigma-Aldrich e Merck para as análises. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente. Os compostos químicos testados foram provenientes de planejamento e síntese por membros do grupo NEQUIMED: Neq0409 e Neq0570. O meio de cultura DMEM suplementado com soro de feto bovino (FBS) e pH = 7,2 foi obtido da Cultilab Materiais de Cultura Celular (Campinas-SP) e armazenado a 4°C.

Equipamento LC-MS

O sistema LC-MS utilizado neste trabalho consistiu em um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Prominence, Shimadzu, Japão) que possui as bombas SHIMADZU LC 20AT e LC 20AD, desgazeificador DGU-20A₅ e autoinjeter SHIMADZU SIL-20A HT. Este sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas (MS) AmazonSL Bruker (Bruker Daltonics, Germany), com fonte de ionização eletrospray (ESI) operando em modos positivo e negativo com analisador do tipo *ion trap* (IT). Os dados adquiridos foram analisados utilizando o software Bruker Daltonics Data Analysis software (*version 4.2.383.1*).

⁴¹ HOLLERAN, J. L., EGORIN, M.J., ZUHOWSKI, E.G., PARISE, R.A., MUSSER, S.M., PAN, S. Use of high-performance liquid chromatography to characterize the rapid decomposition of wortmannin in tissue culture media. *Analytical Biochemistry*, 2003, 323(1) 19–25. (b) RAMISETTIA, N. R., KUNTAMUKKALAA, R., LAKSHETTIB, S., SRIPADI P., Identification and characterization of stress degradants of lacosamide by LC–MS and ESI-Q-TOF-MS/MS: Development and validation of a stability indicating RP-HPLC method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014, 95, 256–264.

Condições de Análise por LC-MS

Os estudos de estabilidade química foram feitos individualmente para cada um dos analitos Neq0409 e Neq0570, utilizando-se uma coluna Córtecs C18 Waters (100x2,1mm d.i. e 2,7µm d.p.). O método analítico consistiu em uma fase móvel composta de acetonitrila e água (ACN:H₂O) ambas contendo 0,1% de ácido fórmico, usando modo de eluição gradiente. Resumidamente, de 0-2,5 min: 5% ACN; 2,5-6,5 min: 35% ACN e de 6,5-10 min: de 35 a 90% de ACN; 10-15 min: 90% ACN para limpeza da coluna e de 15-20min: 5% ACN para recondicionamento da coluna com a condição inicial. A vazão empregada foi de 350 µL.min⁻¹, volume de injeção de 2 µL.

Este método foi otimizado a partir de três gradientes exploratórios de 60, 20 e 10 minutos, sendo de 20 minutos adotado para o presente estudo.

A otimização das condições de ionização foram feitas para cada uma das substâncias estudadas no modo *full MS scan*, com varredura de massa *m/z* 100-800 Da. Para isso, foram preparadas soluções individuais dos padrões numa concentração de 5,0 µg.mL⁻¹ em diluente: ACN:H₂O (1:1) e 0,1% ácido fórmico. Estes padrões foram analisados no espectrômetro de massas através de experimentos de infusão direta com o auxílio de uma bomba seringa a uma vazão de 3,0 µL.min⁻¹. Os íons precursores monitorados foram *m/z* = 308,1 para Neq0409 e *m/z* = 334,1 para Neq0570. Os parâmetros estabelecidos para a análise de ambos compostos estão apresentados na **Tabela 4** a seguir. A otimização da energia do capilar na fonte ionização foi realizada adotando-se as energias de 4,5; 4,0 e 3,5 kV a fim de minimizar a fragmentação do analito na fonte. Por fim, foi necessária a adequação do parâmetro *compound stability* para 20% para diminuir a fragmentação de analito na fonte.

Tabela 4. Parâmetros e condições otimizadas no espectrômetro de massas

Tune Source		Tune Smart Parameter Setting		
Capillary exit	140.0 V	Target Mass	308.1 ^a <i>m/z</i>	306.1 ^b <i>m/z</i>
Dry temperature	300 °C		334.1 ^c <i>m/z</i>	332.1 ^d <i>m/z</i>
Nebulizer	40.00 psi	Compound Stability	20%	
Dry gas	7.00 l/min	Trap Drive Level	100%	
HV Capillary	-4.500 V	Optimize	Normal	
HV End Plate Offset	-500 V	Smart Parameter Setting	Active	

^aíon Neq0409 no modo positivo; ^bíon Neq0409 no modo negativo; ^cíon Neq0570 no modo positivo; ^díon Neq0570 no modo negativo

3.2.2 Preparo de amostra para estudo de estabilidade química em meio de cultura

- *Preparo das soluções estoque*

As soluções estoque na concentração 100 mM de Neq0409 (15 mg.mL⁻¹) e Neq0570 (17 mg.mL⁻¹) foram preparadas em dimetilsulfóxido e armazenadas a 4°C.

- *Preparo de amostra*

Aliquotou-se 5 µL de solução estoque em diferentes meios ((a) a (d) descritos abaixo) a fim de obter a concentração e volume finais de 100 µM e 500 µL, respectivamente. Este volume refere-se a alíquota coletada para o estudo nos diferentes intervalos de tempo: 0, 24, 48 e 72h.

- Água fortificada com a solução estoque
- Meio de cultura fortificado com solução estoque antes da extração líquido-líquido
- Meio de cultura fortificado com a solução estoque depois da extração líquido-líquido
- Branco: Meio de cultura sem o analito

As etapas da parte experimental empregadas neste estudo estão representadas na **Figura 12**.

Figura 12. Representação esquemática das etapas experimentais. (1) Meio de cultura DMEM ou água (a-c); (2) Extração Líquido-Líquido; (3) Equilíbrio do sistema bifásico à -80°C ; (4) Transferência da fase orgânica; (5) Evaporação do acetato de etila em (6) Ressuspensão da amostra

- (1) **Meio fortificado:** O meio fortificado com solução padrão estoque foi mantido à temperatura de 37°C , atmosfera a $5\% \text{CO}_2$ e 90% de umidade. Coletou-se $500 \mu\text{L}$ de amostra em microtubos cuja concentração final de analito manteve-se $100\mu\text{M}$. As coletas foram feitas em triplicata.
- (2) **Extração Líquido-Líquido:** Para a extração líquido-líquido foram adicionados $500 \mu\text{L}$ de acetato de etila. Em seguida, agitou-se a solução bifásica durante 10 s em vórtex.
- (3) **Equilíbrio do sistema bifásico à -80°C :** A solução bifásica foi armazenada em congelador à -80°C durante 20 min para equilíbrio das fases imiscíveis.

- (4) **Transferência da fase orgânica:** A fase orgânica foi transferida para novo microtubo limpo.
- (5) **Evaporação do acetato de etila:** A evaporação completa do acetato de etila foi feita em concentrador de amostra SpeedVac Thermo Fisher SPD111V-115 durante 20 minutos à temperatura de 45 °C.
- (6) **Ressuspensão em ACN:Água:** Após evaporação total de acetato de etila as amostras foram ressuspensas em 100 µL de ACN/H₂O 30:70 (v/v) e 0,1% de ácido fórmico, em seguida submetidas à centrifugação a 25.000 x g (10.000 rpm) por cinco minutos.

- *Extração líquido-líquido*

Foram investigados procedimentos de preparo de amostra com emprego de extração líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos: hexano, éter e acetato de etila. Os resultados obtidos quando do uso de acetato de etila foram satisfatórios em relação aos outros solventes avaliados e, portanto, esse foi selecionado. Os resultados estão apresentados a seguir na parte de Resultados e Discussão.

3.2.3 Tratamento dos espectros pelo software MetaboliteDetect version 2.0

Os espectros de massas obtidos para os quatro tempos de incubação analisados para os dois compostos foram tratados pelo software Bruker Daltonics Metabolite Tools 2.0 SR4 MetaboliteDetect version 2.0. Inicialmente, os sinais de íons correspondentes ao branco foram subtraídos dos espectros das amostras fortificadas com analito com o objetivo de minimizar os interferentes na análise dos resultados obtidos.

3.3 Resultados e Discussão

As substâncias usadas neste trabalho, Neq0409 e Neq0570, são antiparasitárias e representam o esqueleto químico no qual outros compostos foram planejados e sintetizados. A **Tabela 5** contém as suas representações químicas, os valores de pK_i obtidos a partir de ensaio de inibição de cruzaina (importante enzima presente no *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas), além da atividade celular antichagásica (pEC₅₀ obtido para a forma amastigota de *T. cruzi*) realizada por outros membros do grupo.⁴² A partir destes resultados, é possível correlacioná-los entre si. A única modificação química existente entre as duas

⁴² AVELAR, L. A. A. et al. Molecular Design , Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. *Plos Negl Trop Dis*, 2015,1–24.

substâncias consiste na presença de um ciclopropano em Neq570 (**Tabela 5**) que é usado para inibir reações com outras substâncias que possam reagir com a nitrila.

Tabela 5. Representação estrutural, dados dos ensaios enzimático e celulares das substâncias Neq0409 e Neq0570

Códigos	Estruturas químicas	Massa Molar (g.mol ⁻¹)	pKa ^a	pK _i ^b	pEC ₅₀ ^c
Neq0409		307,1	1. 12 2. 15	6,3	3,9
Neq0570		333,1	1. 11 2. 3,4	6,6	3,9

^a pKa (log da constante de acidez) calculado pelo software MarvinSketch 17.3.13.0. ^b pK_i (log da constante de inibição enzimática). ^c pEC₅₀ (log da concentração de fármaco que atinge metade do seu efeito máximo) obtido da fonte 7.

A adição da ciclopropila não afetou a potência do Neq0570 em relação ao Neq409 (**Tabela 5**). No entanto, não se sabe se este substituinte realmente atua reduzindo as possíveis reações secundárias com a nitrila. Desta forma, como justificativa, a técnica de LC-MS/MS foi aplicada para delinear o perfil de degradação das substâncias Neq0409 e Neq0570 em meio de cultura, que é constituído por uma complexa mistura de nutrientes para as células.

A **Figura 13** apresenta um exemplo de subtração dos espectros de meio fortificado com Neq0409 subtraído pelo branco em t₀ através do software *Bruker Daltonics Metabolite Tools 2.0*® conforme procedimento descrito em 3.3 Métodos que foi adotado para todos os espectros das análises de degradação de Neq0409 e Neq0570. A **Figura 14** representa os cromatogramas de íons totais obtidos para o Neq0409 em meio de cultura DMEM nos diferentes intervalos de tempo de incubação. Em seguida, na **Figura 15** estão os cromatogramas de íons extraídos (EIC) para o Neq0409.

Figura 13. Software MetaboliteDetect empregado na subtração dos espectros *full MS scan* das amostras de meio fortificado com Neq0409 pelo meio branco.

Figura 14. Cromatogramas obtidos para as amostras de Neq0409 nos tempos de incubação: t₀ (azul), t₁ = 24h (laranja), t₂ = 48h (verde), t₃ = 72h (preto)

Figura 15. Cromatograma de íon extraído das amostras de Neq0409 nos tempos de incubação e análise de 0h (vermelho), 24h (azul), 48h (preto) e 72h (verde)

A degradação do Neq0409 durante 72h não foi comprovada pelos cromatogramas representados nas **Figuras 14 e 15**, uma vez que apresentaram perfis semelhantes, ou seja, mesmas quantidades de bandas cromatográficas e tempos de retenção similares. Porém, nota-se que a intensidade nos cromatogramas varia de

maneira randômica, impossibilitando compará-la com a possível variação de concentração do analito. Sendo assim, avaliaram-se todos os espectros de *full MS scan* para verificar a presença ou não de possíveis íons que pudessem ser relacionados com produtos de degradação através da relação m/z . No entanto, as análises foram feitas na seguinte ordem: coleta de amostra e análise, a cada dia de estudo. Devido à sensibilidade do analisador do MS, as diferentes intensidades das bandas podem ser relacionadas às variações diárias da rede de alimentação elétrica, que influenciam na ionização da amostra.

Entretanto, a **Figura 16** que representa os cromatogramas em duplicatas do meio branco em 0h e 72h. Notou-se que as amostras apresentaram perfis diferentes com o decorrer do tempo. Propõe-se que houve degradação no meio de cultura sem o analito. O que pode ser observado devido ao fato de duas bandas cromatográficas não aparecerem nos cromatogramas de 72h.

Figura 16. Cromatogramas de duplicatas de amostras branco nos tempos 0h e 72h

Os espectros *full MS scan* do Neq0409 (**Tabelas 6 e 7**) mostram que o íon m/z 308,1, correspondente ao analito, está predominantemente presente no meio de cultura no intervalo de tempo máximo de incubação (72h), possibilitando sugerir que a substância seja estável em meio de cultura.

Adicionalmente, uma análise mais detalhada foi realizada para cada um dos compostos em estudo. Ou seja, foi feita a obtenção dos espectros *full MS scan* das bandas dos cromatogramas de íons totais dos tempos de incubação 0h e 72h, conforme as **Tabelas 6 e 7** enquanto que as **Tabelas 8 e 9** mostra os cromatogramas e espectros referentes a amostra branco sem a subtração pelo software a fim de comparar o que acontece com o meio no decorrer das 72h de estudo na ausência do analito nos mesmos tempos analisados para o Neq0409.

Notou-se que os sinais que aparecem no tempo inicial da incubação se mantêm os mesmos para os tempos analisados. Embora não seja possível comprovar a estabilidade do analito Neq0409 em meio de cultura, pode-se observar uma consistência no resultado.

Os espectros e cromatogramas das análises dos tempos 24 e 48h para o Neq0570 encontram-se no **Anexo B**.

Tabela 6. Cromatogramas de Íons Totais e seus respectivos espectros das bandas - Neq0409 – até 8.5 min

Tabela 7. Cromatogramas de Íons Totais e seus respectivos espectros das bandas - Neq0409 – entre 10.0 e 11.4 min

Análise do tempo 0h

Análise após 72h

Tabela 8. Cromatogramas de Íons Totais e espectros de regiões para comparação entre o branco e meio fortificado com Neq0409 até 8.5 min

Tabela 9. Cromatogramas de íons totais e espectros para comparação entre o branco e meio fortificado com Neq0409 - entre 10.0 e 11.4 min

Os cromatogramas de íons totais obtidos para as análises da substância Neq0570 nos tempos 0, 24, 48 e 72 h estão representados a seguir, na **Figura 17**.

Figura 17. Cromatogramas obtidos para as amostras de Neq0570 nos tempos de incubação: t_0 (vermelho), $t_1 = 24h$ (verde), $t_2 = 48h$ (azul), $t_3 = 72h$ (preto)

Figura 18. Cromatograma de íon extraído das amostras de Neq0409 nos tempos de incubação e análise de 0h (azul), 24h (rosa), 48h (verde) e 72h (preto)

Comparando-se os cromatogramas referentes ao Neq0570 (**Figura 17 e 18**) não é possível afirmar algo sobre a estabilidade em meio de cultura no intervalo de tempo de incubação proposto (72h). Assim, como descrito anteriormente para o Neq0409, a comparação entre os espectros de *full MS scan* complementa os argumentos acerca da estabilidade do Neq0570 em meio de cultura, via observação dos íons presentes nas amostras branco e amostras fortificadas.

Nesse caso, também é sugerida a estabilidade da substância Neq0570 nas condições experimentais adotadas já que, por meio da comparação dos espectros de íons totais nas **Tabelas 10 e 11**, observa-se que os sinais de íons presentes na amostra se mantêm os mesmos. Por outro lado, as **Tabelas 12 e 13** apresenta os cromatogramas e espectros referentes a amostra branco sem a subtração pelo software a fim de comparar o que acontece com o meio no decorrer das 72h de estudo na ausência do analito nos mesmos tempos analisados para o Neq0570.

Os espectros e cromatogramas das análises dos tempos 24 e 48h para o Neq0570 encontram-se no **Anexo B**.

Tabela 10. Cromatogramas de Íons Totais e seus respectivos espectros das bandas - Neq0570 – até 9.2 min

Tabela 11. Cromatogramas de Íons Totais e seus respectivos espectros das bandas - Neq0570 – entre 9.2-11.1 min

	Análise do tempo 0h	Análise após 72h
Cromatogramas		
Intervalo de 9.2-9.5min		
Intervalo de 10.4-11.2min		
Intervalo de 10.6-11.1min		

Tabela 12. Cromatogramas de Íons Totais e espectros para comparação entre o branco e meio fortificado com Neq0570 até 9.2 min

Análise do tempo 0h

Análise após 72h

Tabela 13. Cromatogramas de Íons Totais e espectros de regiões para comparação entre o branco e meio fortificado com Neq0570 entre 9.2-11.1 min

Os resultados obtidos para o Neq0409 e Neq0570 revelam a importância do estudo da estabilidade com o mínimo de possíveis fontes de variações que possam interferir o estudo. Como as análises foram feitas no espectrômetro de massas em diferentes dias, é difícil comparar com certeza as áreas das bandas no cromatograma. Além disso, é importante o estudo de degelo a fim de garantir que as aliquotas sejam estáveis não só durante análise por espectrometria de massas mas também durante a manipulação e preparo da amostra. Então, o congelamento e descongelamento das amostras devem ser estudados a fim de eliminar possíveis fontes de variações durante este estudo.

3.4 Conclusão

Este estudo teve a finalidade de analisar qualitativamente a estabilidade de dipeptidil nitrilas em condições de ensaio *in vitro* na ausência de células, ou seja, em meio de cultura, temperatura de 37°C, atmosfera com 5% de CO₂ e umidade de 90% num intervalo máximo de 72h.

Os resultados obtidos mostraram estabilidade química mediante procedimento experimental empregado. Porém, o emprego de estratégia diferente pode mostrar outro perfil. A intensão aqui é observar o comportamento dos compostos em meio de cultura. A investigação de possíveis produtos de degradação requer a validação parcial de um método por LC-MS que quantifique a concentração do analito em questão e a partir de então investigar a possível degradação nas etapas biológicas do planejamento de novos fármacos.

CAPÍTULO 4

Considerações Finais

O estudo da lipofilia de substâncias bioativas fornece possíveis rotas sintéticas a fim de aumentar ou diminuir a interação hidrofóbica de substâncias bioativas, seja para ultrapassar barreiras biológicas ou prever interações entre a substância e o sítio ativo de enzimas, por exemplo.

A coluna cromatográfica IAM é um modelo de determinação da propriedade lipofílica e está em crescente utilização nos últimos anos⁴³. Sendo assim, a estratégia de obter o $\log k_w$ é relevante na etapa de planejamento de fármacos. A monocamada de fosfatidilcolina imobilizada à sílica mimetiza a interação do fluído biológico com os lipídios presentes na membrana celular.

Em outra vertente, o estudo da estabilidade química de substâncias bioativas em meios de cultura que fazem parte de etapas de ensaios biológicos é relevante já que pretende-se monitorar o comportamento da estrutura química do composto e assim compreender qual o seu mecanismo de ação.

⁴³ ERMONTI, G.; VALLARO, M.; CARON, G.; Learning how to use IAM chromatography for predicting permeability *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2018** 114: 385–390.

ANEXO A

A-1. Cromatogramas de íons totais obtidos para as amostras de Neq0409 (azul) e branco do meio de cultura DMEM (rosa) no $t_1 = 24h$

A-2. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_1 = 24h$ – tempo de análise: 6,0-6,1 min

A-3. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24h$ - tempo de análise: 6,0-6,1 min

A-4. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_1 = 24h$ - tempo de análise: 6,6-6,8 min

A-5. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24\text{h}$ – tempo de análise: 6,6-6,8 min

A-6. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_1 = 24\text{h}$ – tempo de análise: 8,2-8,4 min

A-7. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24\text{h}$ - tempo de análise: 8,2-8,4 min

A-8. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_1 = 24\text{h}$ - tempo de análise: 9,9-10,2 min

A-9. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24h$ - tempo de análise: 9,9-10,2 min

A-10. Cromatogramas de íons totais obtidos para as amostras de Neq0409 (azul) e branco do meio de cultura DMEM (rosa) no $t_2 = 48h$

A-12. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 6,0-6,1 min

A-13. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 6,0-6,1 min

A-14. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 6,6-6,8 min

A-15. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 6,6-6,8 min

A-16. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 8,2-8,4 min

A-17. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 8,2-8,4 min

A-18. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 9,9-10,2 min

A-19. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 9,9-10,2 min

A-20. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0409. $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 10,7-10,8 min

A-21. Espectro de *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 10,7-10,8 min

ANEXO B

B-1. Cromatogramas *full MS scan* obtidos para as amostras de Neq0570 (vermelho) e branco do meio de cultura DMEM (rosa) no $t_1 = 24h$

B-2. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_1 = 24h$ - tempo de análise: 0,0-20,0 min

B-3. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_1 = 24h$ - tempo de análise: 6,2-6,9 min

B-4. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24h$ - tempo de análise: 6,2-6,9 min

B-5. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_1 = 24h$ - tempo de análise: 8,5-8,7 min

B-6. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24h$ - tempo de análise: 6,2-6,9 min

B-7. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_1 = 24\text{h}$ - tempo de análise: 8,9-9,2 min

B-8. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24\text{h}$ - tempo de análise: 8,9-9,2 min

B-9. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_1 = 24\text{h}$ - tempo de análise: 9,2-9,4min

B-10. Espectro de massas *full scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24\text{h}$ - tempo de análise: 9,2-9,4 min

B-11. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_1 = 24\text{h}$ - tempo de análise: 10,4-11,1 min

B-12. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_1 = 24\text{h}$ - tempo de análise: 10,4-11,1 min

B-13. Cromatogramas *full MS scan* obtidos para as amostras de Neq0570 (vermelho) e branco do meio de cultura DMEM (rosa) no $t_2 = 48\text{h}$

B-14. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 0,0-20,0 min

B-15. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 6,3-6,4 min

B-16. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 6,3-6,4 min

B-17. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_2 = 48\text{h}$ - tempo de análise: 8,5-8,7 min

B-18. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48\text{h}$ - tempo de análise: 8,5-8,7 min

B-19. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_2 = 48\text{h}$ - tempo de análise: 8,9-9,1 min

B-20. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 8,9-9,1 min

B-21. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 10,4-11,1 min

B-22. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). $t_2 = 48h$ - tempo de análise: 10,4-11,1 min

B-23. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM fortificado com Neq0570. t_2 = 48h - tempo de análise: 10,7-11,2 min

B-24. Espectro de massas *full MS scan* de amostra de DMEM (branco). t_2 = 48h - tempo de análise: 10,7-11,2 min