UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Permeabilidade *in vitro* e *in silico* de análogos à nifuroxazida com
atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus*
aureus

Mariane Ballerini Fernandes

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Sílvia Storpirtis

Co-orientador:
Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares

São Paulo
2012

Mariane Ballerini Fernandes

Permeabilidade *in vitro* e *in silico* de análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Sílvia Storpirtis

Co-orientador:
Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares

São Paulo
2012

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.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fernandes, Mariane Ballerini
F363p Permeabilidade *in vitro* e *in silico* de análogos à nifuroxazida com
atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus*
aureus / Mariane Ballerini Fernandes. -- São Paulo, 2012.
234p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Storpirtis, Sílvia

Co-orientador : Tavares, Leoberto Costa

1. Biofarmacotécnica 2. Quimioterapia : Farmacologia 3. Relações
quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (QSAR) :
Química farmacêutica I. T. II. Storpirtis, Sílvia, orientador. III.
Tavares, Leoberto Costa, co-orientador.

615.4b CDD

Mariane Ballerini Fernandes

Permeabilidade *in vitro* e *in silico* de análogos à nifuroxazida com
atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus*
aureus

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Sílvia Storpirtis
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

**Aos meus avós,
Thereza (*in memoriam*), Aimar, Annita e José Francisco,
por serem os responsáveis pelas mais belas
lembranças e lições da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Especial agradecimento à Profa. Sílvia Storpirtis e ao Prof. Leoberto Costa Tavares pela orientação, esforço, ética, profissionalismo e, sobretudo, pelos formidáveis ensinamentos não restritos apenas aos temas envolvidos neste trabalho, mas também nas várias facetas da vida, o que os tornam exemplos de educadores e orientadores.

Aos amigos José Eduardo Gonçalves e Marcus Tullius Scotti pela amizade e companheirismo durante todos estes anos, pelos preciosos ensinamentos, pela paciência e pela imensa colaboração oferecida desde a elaboração até a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Aitemar e Josiane, que, além de proporcionarem uma ótima infância e vida acadêmica, formaram os fundamentos do meu caráter e estão sempre presentes em minha vida de forma indispensável.

A minha irmã e eterna bonequinha, Tatiane, por ter sido sempre meu incentivo para crescer.

Ao meu noivo, Jorge Luís, pela paciência, companheirismo e força.

Aos meus padrinhos, tios e primos pela constante torcida e apoio.

Aos amigos Adriana, Alex, Cláudio, Douglas, Guilherme, Fanny, Fran, João, Leandro, Marina, Marc, Matheus, Michelle, Rafael Paraíso, Rafael Melo, Rodrigo e Salomão, pela agradável companhia no decorrer dessa caminhada e por aliviar minhas horas difíceis, me alimentando de certezas, força e alegria.

Aos amigos de perto e de longe, pelo amor e preocupação demonstrados por meio de ligações, visitas, e-mails e orações.

À Dra. Kerly Mesquita Pasqualoto, pelos valiosos ensinamentos e simpatia.

À Profa. Tânia Marcourakis e ao mestre Raphael Caio Tamborelli, pela grande colaboração na realização nos estudos de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Stephano, pelo fornecimento de linhagens de células Caco-2.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacotécnica, Claudinéia, Dora e Edgar, e aos funcionários da pós-graduação da FCF- USP, Alexandre, Bete, David, Elaine, Jorge e Kelma, pelo excelente trabalho que realizam sempre com atenção e carisma.

A todos os meus professores, que semearam em mim a curiosidade e a vontade de aprender.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

À FAPESP, pela concessão dos recursos para o projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente tornaram possível a conclusão deste trabalho.

*Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho
e sobre ele lança toda a força de sua alma,
todo o universo conspira a seu favor.*

Johann Wolfgang von Goethe

RESUMO

FERNANDES, M. B. **Permeabilidade *in vitro* e *in silico* de análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.** 2012. 234 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) é um dos principais responsáveis por infecções nosocomiais, sendo identificado também em infecções associadas à comunidade. Embora potentes fármacos anti-estafilocócicos estejam disponíveis, as infecções causadas por este patógeno continuam a apresentar significativa morbidade e mortalidade devido ao aparecimento de cepas com resistência a múltiplos fármacos, incluindo vancomicina e teicoplanina. Compostos 5-nitro-heterocíclicos com estrutura análoga à nifuroxazida, antimicrobiano utilizado em infecções gastrintestinais, têm apresentado satisfatória atividade *in vitro* frente a estas cepas multirresistentes, sendo importante e necessária a avaliação de sua biodisponibilidade oral como próximo estágio no desenvolvimento de um novo fármaco, visando à seleção eficiente e ao aprimoramento da estrutura molecular. Neste contexto, o presente estudo tem por objetivo empregar ensaios *in vitro*, utilizando células Caco-2, e métodos *in silico*, utilizando descritores moleculares VolSurf, a fim de analisar a permeabilidade de análogos à nifuroxazida com atividade antimicrobiana apresentando, principalmente, atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *S. aureus*. Empregou-se o método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) para a avaliação da citotoxicidade. Nos estudos de permeabilidade *in vitro* foram utilizadas membranas de células Caco-2 cultivadas em placas Transwel® por 21 dias. A quantificação das frações permeadas foi realizada por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV), com métodos validados de acordo com a Resolução 899/03. Os estudos *in silico* foram realizados por meio de análise exploratória, pelo método de consenso de análise de componentes principais (CPCA, *Consensus Principal Component Analysis*), e análise de regressão, por quadrados mínimos parciais (PLS, *Partial Least Squares*). As células Caco-2 apresentaram viabilidade adequada para a realização dos estudos de permeabilidade frente a todos os derivados da nifuroxazida, exceto o derivado MeTIO (5-nitro-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida). Os valores de permeabilidade aparente (*Papp*) obtidos para os análogos à nifuroxazida indicam que estes possuem alta permeabilidade. Os modelos obtidos por CPCA e PLS foram capazes de separar as moléculas em grupos de compostos de baixa, média e alta permeabilidade, sendo os análogos à nifuroxazida classificados como compostos de alta permeabilidade. Para os compostos em estudo, as propriedades determinantes da permeabilidade através de células Caco-2, de acordo com os modelos, seriam de natureza topológica e estérica, sendo possível a previsão externa qualitativa e quantitativa da permeabilidade através de células Caco-2.

Palavras-chave: nifuroxazida, MRSA, células Caco-2, permeabilidade *in vitro*, permeabilidade *in silico*, VolSurf.

ABSTRACT

FERNANDES, M. B. ***In vitro* and *in silico* permeability of nifuroxazide derivatives with potential activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus***. 2012. 234 f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the main pathogens responsible for nosocomial infections, also identified in community-associated infections. Although potent anti-staphylococcal drugs are available, infections caused by this bacteria continues to show significant morbidity and mortality due to the emergence of strains with resistance to multiple drugs, including vancomycin and teicoplanin. The 5-nitro-heterocyclic derivatives of nifuroxazide, which is an antimicrobial used to treat gastrointestinal infections, have shown satisfactory *in vitro* activity against multidrug-resistant strains of *S. aureus*. As a next step in the development of a new drug, it is important and necessary the evaluation of the oral bioavailability to achieve an efficient selection and refinement of the molecular structure. In this context, this study aims to develop *in vitro* assays through Caco-2 cells, and *in silico* approaches, using VolSurf molecular descriptors, in order to analyze the permeability of 5-nitro-heterocyclic compounds analogues to nifuroxazide with antimicrobial activity, especially showing promising activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. The MTT (bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) method was employed to perform the cytotoxicity evaluation. Caco-2 cell monolayers cultivated for 21 days in Transwel® plates were used for the *in vitro* permeability assays. The quantification of the permeated fractions was done by High Performance Liquid Chromatography with UV detection (HPLC-UV), with validated methods according to the Resolution 899/03. *In silico* studies were performed through exploratory analysis by consensus principal component analysis (CPCA) and regression analysis by partial least squares (PLS). Caco-2 cells showed suitable cell viability for the permeability studies against all nifuroxazide analogues except the MeTIO (5-nitro-2-thiophilydene 4-methylbenzidrazide). The nifuroxazide derivatives apparent permeability values (*P_{app}*) obtained indicate these are high permeable compounds. The models obtained by CPCA and PLS were able to separate the molecules into groups of low, medium and high permeabilities, and the nifuroxazide analogues were classified as high permeable substances. The identified properties for the permeability through Caco-2 cells to the studied compounds were topologic and sterical, and it is possible to perform qualitative and quantitative external predictions with these models for the permeability through Caco-2 cells.

Keywords: nifuroxazide, MRSA, Caco-2 cells, *in vitro* permeability, *in silico* permeability, VolSurf.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2. 1. Os 4 principais mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2010).....	32
Figura 2. 2. Incidência de infecções causadas por MRSA em hospitais nos Estados Unidos, no período de 2000 a 2005. Adaptado de ZILBERBERG, SHORR, KOLLEF, 2008.	36
Figura 2. 3. Estruturas químicas de alguns nitrocompostos de maior relevância na terapêutica.	40
Figura 2. 4. Estrutura química de alguns compostos 5-nitro-heterocíclicos utilizados na terapêutica.	41
Figura 2. 5. Subestrutura fundamental dos compostos 5-nitrofurânicos.	42
Figura 2. 6. Grupo farmacofórico de compostos nitrofurânicos com atividade antibacteriana.	43
Figura 2. 7. Possíveis rotas para a bioativação de compostos nitrofurânicos (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009).....	44
Figura 2. 8. Estrutura de análogos da nifuroxazida desenvolvidos ao longo dos anos. A. Derivados furfurilidênicos e tiofilidênicos. B. Derivados benzofuroxânicos (MASUNARI <i>et al.</i> , 2003; TAVARES <i>et al.</i> , 1999a; JORGE <i>et al.</i> , 2009).....	47
Figura 2. 9. Os caminhos tradicional (esquerda), de transição (centro) e racional (direita) para o desenvolvimento de um novo fármaco. Adaptado de NORINDER, BERGSTRÖM, 2006.	48
Figura 2. 10. Aplicação de métodos <i>in silico</i> , <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> nos vários estágios da descoberta de um fármaco. Adaptado de GOODWIN, CLARKE, 2005.....	51
Figura 2. 11. Representação esquemática do transporte de fármacos a partir de uma forma farmacêutica sólida (FFS) para a circulação sistêmica. A dissolução e a permeação através da membrana intestinal influenciam a absorção do fármaco. Adaptado de AMIDON, 2008.....	52
Figura 2. 12. Mecanismos de transporte através da membrana intestinal: a) permeabilidade passiva transcelular; b) transporte mediado por carregadores de membrana; c) permeabilidade passiva paracelular; d) transporte vesicular. Nas letras (e) e (f) estão representados dois mecanismos que impedem a absorção intestinal, sendo: e) transporte mediado por carregadores de excreção e em f) enzimas metabolizadoras (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).	54
Figura 3. 1. A. Estrutura molecular da nitrofurantoína (id 14). B. Estrutura molecular da nifuroxazida (id 13).	80
Figura 3. 2. Viabilidade das células Caco-2 incubadas por 4 horas com: A. nifuroxazida e nitrofurantoína, B. derivados furânicos e C. derivados tiofênicos, todos avaliados pela técnica do MTT. A linha vermelha separa os valores de viabilidade celular acima e abaixo de 70%. ▲ T-test foi usado para comparar os	

resultados entre a nitrofurantoína e nifuroxazida. *Teste ANOVA foi aplicado para comparações múltiplas entre os nitrocompostos e o controle DMSO. Em ambas as análises, as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$86

Figura 3. 3. **A.** Superfície de densidade eletrônica do BrTIO (acima) e BrFUR (abaixo). **B.** Superfície de potencial eletrostático do BrTIO (acima) and BrFUR (abaixo).....90

Figura 4. 1. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de amoxicilina 250 ng/mL em tampão Hanks.....111

Figura 4. 2. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de metoprolol 250 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.111

Figura 4. 3. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de nifuroxazida 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.112

Figura 4. 4. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de nitrofurantoína 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.112

Figura 4. 5. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de HFUR 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.113

Figura 4. 6. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de MeFUR 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.113

Figura 4. 7. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de EtoFUR 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.114

Figura 4. 8. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de AminoFUR 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.114

Figura 4. 9. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de BrFUR 30 ng/mL em solução tampão Hanks pH 7,4.115

Figura 4. 10. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de HTIO 30 ng/mL em solução tampão Hanks pH 7,4.115

Figura 4. 11. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de EtoTIO 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.116

Figura 4. 12. A - Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de AminoTIO 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.116

Figura 4. 13. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação da amoxicilina em tampão Hanks empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.	117
Figura 4. 14. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do metoprolol em tampão Hanks empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.	117
Figura 4. 15. Curva analítica e parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação da nifuroxazida em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.	118
Figura 4. 16. Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da nitrofurantoína em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.....	118
Figura 4. 17. Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do HFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.	119
Figura 4. 18. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do MeFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.....	119
Figura 4. 19. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do EtoFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.....	120
Figura 4. 20. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do AminoFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.	120
Figura 4. 21. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do BrFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.....	121
Figura 4. 22. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do HTIO em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.....	121
Figura 4. 23. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do EtoTIO em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.....	122
Figura 4. 24. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do AminoTIO em solução proveniente de	

estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.122

Figura 5. 1. Esquema do suporte de cultivo de células Caco-2 *in vitro* empregado nos estudos de permeabilidade (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).145

Figura 5. 2. Valores de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 aos 10,15 e 21 dias de cultivo em meio com pH 7,4. Média de seis determinações.155

Figura 5. 3. Valores de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 nas condições dos experimentos de permeabilidade do derivado EtoTIO no tempo inicial (T_0) e final (180 minutos). Média de seis determinações.156

Figura 5. 4. Quantidade permeada de amoxicilina (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.158

Figura 5. 5. Quantidade permeada de metoprolol (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.158

Figura 5. 6. Quantidade permeada de nitrofurantoína (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.159

Figura 5. 7. Quantidade permeada de nifuroxazida (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.159

Figura 5. 8. Quantidade permeada de HFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.160

Figura 5. 9. Quantidade permeada de MeFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.160

Figura 5. 10. Quantidade permeada de EtoFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.161

Figura 5. 11. Quantidade permeada de AminoFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.161

Figura 5. 12. Quantidade permeada de BrFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.162

Figura 5. 13. Quantidade permeada de HTIO (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.162

Figura 5. 14. Quantidade permeada de AminoTIO (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.163

Figura 6. 1. Fluxograma representando as etapas de cálculo dos MIF, geração de tabela de descritores e organização dos dados na matriz X (FERNANDES <i>et al.</i> , 2011).....	176
Figura 6. 2. Gráficos dos escores (A) e pesos (B) da análise exploratória para as duas primeiras PCs [PC1 ou fator 1 (66,52%), PC2 ou fator 2 (23,95%)], que explicam 90,47% da variância do sistema.....	186
Figura 6. 3. Projeção dos análogos EtoTIO, MeTIO e BrTIO sobre o gráfico de escores obtido no modelo de CPCA.	187
Figura 6. 4. Gráficos dos escores (A) e pesos (B) do modelo de regressão para as duas primeiras LVs [LV1 (49,23%); LV2 (10,23%)], que explicam 59,46% da variância do sistema. A. A área em vermelho representa a região dos compostos com permeabilidade mais baixa; a área em azul, os compostos com permeabilidade mais alta.	189
Figura 6. 5. Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos de $-\log P_{app}$ pelo modelo de regressão selecionado.....	190
Figura 6. 6. Projeção dos análogos EtoTIO, MeTIO e BrTIO sobre o gráfico de escores obtido no modelo de PLS.....	191

LISTA DE TABELAS

Tabela 4. 1. Condições relativas aos métodos de partida encontrados na literatura para o desenvolvimento e validação dos métodos de quantificação por CLAE da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão Hanks.....	102
Tabela 4. 2. Valores de concentrações (ng/mL) das soluções-padrão utilizadas na construção da curva analítica e linearidade para quantificação da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão Hanks.	103
Tabela 4. 3. Valores de concentrações (ng/mL) das amostras de controle de qualidade utilizadas na quantificação da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão de Hanks.	103
Tabela 4. 4. Condições relativas aos métodos de quantificação por CLAE desenvolvidos e validados para os compostos 5-nitro-heterocíclicos em estudo.	109
Tabela 4. 5. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a amoxicilina utilizando CLAE-UV.	123
Tabela 4. 6. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o metoprolol utilizando CLAE-UV.	123
Tabela 4. 7. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a nifuroxazida utilizando CLAE-UV.....	124
Tabela 4. 8. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a nitrofurantoína utilizando CLAE-UV.....	124
Tabela 4. 9. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o HFUR utilizando CLAE-UV.....	124
Tabela 4. 10. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o MeFUR utilizando CLAE-UV.	125
Tabela 4. 11. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o EtoFUR utilizando CLAE-UV.	125
Tabela 4. 12. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o AminoFUR utilizando CLAE-UV.	125
Tabela 4. 13. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o BrFUR utilizando CLAE-UV.....	126

Tabela 4. 14. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o HTIO utilizando CLAE-UV.	126
Tabela 4. 15. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o EtoTIO utilizando CLAE-UV.	126
Tabela 4. 16. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o derivado tiofênico substituído cm o grupo amino (AminoTIO) utilizando CLAE-UV.	127
Tabela 4. 17. LD e LIQ obtidos na validação dos métodos para quantificação de amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos empregando-se CLAE-UV.	127
Tabela 4. 18. Estabilidade da amoxicilina em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	128
Tabela 4. 19. Estabilidade do metoprolol em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	128
Tabela 4. 20. Estabilidade da nifuroxazida em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	129
Tabela 4. 21. Estabilidade da nitrofurantoína em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	129
Tabela 4. 22. Estabilidade do HFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	129
Tabela 4. 23. Estabilidade do MeFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	130
Tabela 4. 24. Estabilidade do EtoFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	130
Tabela 4. 25. Estabilidade do AminoFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	130
Tabela 4. 26. Estabilidade do BrFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	131
Tabela 4. 27. Estabilidade do HTIO em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	131

Tabela 4. 28. Estabilidade do EtoTIO em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	131
Tabela 4. 29. Estabilidade do AminoTIO em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.	132
Tabela 4. 30. Estabilidade da amoxicilina em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.....	132
Tabela 4. 31. Estabilidade do metoprolol em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.	133
Tabela 4. 32. Estabilidade da nifuroxazida em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.....	133
Tabela 4. 33. Estabilidade da nitrofurantoína em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.....	133
Tabela 4. 34. Estabilidade do HFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.	134
Tabela 4. 35. Estabilidade do MeFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.	134
Tabela 4. 36. Estabilidade do EtoFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.	134
Tabela 4. 37. Estabilidade do AminoFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.....	135
Tabela 4. 38. Estabilidade do BrFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.	135
Tabela 4. 39. Estabilidade do HTIO em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.	135
Tabela 4. 40. Estabilidade do EtoTIO em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.	136
Tabela 4. 41. Estabilidade do AminoTIO em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.	136

Tabela 5. 1. Valores de concentrações iniciais e tempos de coleta para cada composto em estudo nos experimentos de permeabilidade através de monocamadas de células Caco-2.	154
Tabela 5. 2. Valores de <i>P_{app}</i> da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos determinados a partir da quantidade permeada destes através de monocamadas de células Caco-2.	157
Tabela 6. 1. Estruturas dos compostos empregados nos estudos de análise exploratória e regressão e seus valores de <i>P_{app}</i> , bem como suas classificações como compostos de baixa, média ou alta permeabilidade.....	180
Tabela 6. 2. Descritores moleculares ou variáveis independentes calculados para o conjunto de compostos investigado e respectivas sondas de origem..	183
Tabela 6. 3. Variância (%) e variância acumulada (%) para as quatro LVs calculadas. Os valores dos pesos para cada fator também estão listados.	188
Tabela 6. 4. Valores experimentais e previstos de $-\log P_{app}$ pelo modelo de regressão selecionado.	190

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME = Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

AminoFUR = 5-nitro-2-furfurilideno 4-aminobenzidrazida

AminoTIO = 5-nitro-2-tiofilideno 4-aminobenzidrazida

ANOVA = Análise de variância

BCRP = *Breast Cancer Resistance Protein* (Proteína associada à resistência ao câncer)

BrFUR = 5-nitro-2-furfurilideno 4-bromobenzidrazida

BrTIO = 5-nitro-2-tiofilideno 4-bromobenzidrazida

CA-MRSA = *Community-Acquired Methicilin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina adquirido na comunidade)

CIM = Concentração inibitória mínima

CLAE = Cromatografia a líquido de alta eficiência

Conc. Det. = Concentração determinada

CPCA = *Consensus Principal Component Analysis* (Consenso de análise de componentes principais)

CQA = Controle de qualidade alto

CQB = Controle de qualidade baixo

CQM = Controle de qualidade médio

CV = Coeficiente de variação

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO = Dimetilssulfóxido

DP = Desvio-padrão

Eto/FUR = 5-nitro-2-furfurilideno 4-etoxibenzidrazida

EtoTIO = 5-nitro-2-tiofilideno 4-etoxibenzidrazida

h = horas

HA-MRSA = *Hospital-Acquired Methicilin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina adquirido em hospital)

HFUR = 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazida

HTIO = 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida

LV = Latent variable (Variável latente)

MeFUR = 5-nitro-2-furfurilideno 4-metilbenzidrazida

MeTIO = 5-nitro-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida

mg = miligramas

µg = microgramas

mL = mililitros

mM = milimolar

µL = microlitros

MRSA = *Methicilin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilicina)

MSSA = *Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* sensível à metilicina)

MTT = brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

NCE = *New Chemical Entities* (Novas entidades químicas)

p = Intervalo de confiança

PBP = *Penicillin Protein Binding* (Proteína de ligação à penicilina)

PC = *Principal Component* (Componente principal)

PCA = *Principal Component Analysis* (Análise de componentes principais)

P-gp = Glicoproteína-P

PLS = *Partial Least Squares* (Quadrados Mínimos Parciais)

QSAR = *Quantitative Structure-Activity Relationships* (Relações Quantitativas Estrutura-Atividade)

RPM = Rotações por minuto

RMF = Resistência a múltiplos fármacos

RMN = Ressonância magnética nuclear

TGI = Trato gastrointestinal

UTI = Unidade de terapia intensiva

UV = Ultravioleta

VISA = *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* com sensibilidade intermediária à vancomicina)

VRE = *Vancomycin Resistant Enterococcus* (*Enterococcus* resistente à vancomicina)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	24
1.1 INTRODUÇÃO	25
1.2 OBJETIVOS.....	28
1.2.1 <i>Objetivos gerais</i>	28
1.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	28
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
 CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	 31
2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA	32
2.2 INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> MULTIRRESISTENTE: EPIDEMIOLOGIA E TRATAMENTO.....	33
2.3 COMPOSTOS 5-NITRO-HETEROCÍCLICOS.....	40
2.3.1 <i>Mecanismo de ação dos compostos 5-nitro-heterocíclicos</i>	42
2.3.2 <i>Compostos 5-nitro-heterocíclicos análogos à nifuroxazida</i>	45
2.4 O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E A FARMACOCINÉTICA	48
2.5 PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS	51
2.5.1 <i>Técnicas in vitro para a avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos</i>	58
2.5.2 <i>Técnicas in silico para a avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos</i>	62
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
 CAPÍTULO 3 - ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	 75
3.1 INTRODUÇÃO	76
3.1.1 <i>Ensaio de citotoxicidade visando aos estudos de permeabilidade in vitro com membranas de células Caco-2</i>	76
3.1.2 <i>Toxicidade dos nitrocompostos</i>	77
3.2 OBJETIVOS.....	78
3.2.1 <i>Objetivos gerais</i>	78
3.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	78
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3.3.1 <i>Material</i>	79
3.3.1.1 <i>Série de compostos</i>	79
3.3.1.2 <i>Substâncias Químicas de Referência</i>	80
3.3.1.3 <i>Equipamentos</i>	81
3.3.1.4 <i>Reagentes e materiais empregados no cultivo celular, citotoxicidade e experimentos de permeabilidade</i>	82
3.3.1.5 <i>Infra-estrutura</i>	83
3.3.2 <i>Métodos</i>	83
3.3.2.1 <i>Cultivo das células Caco-2</i>	83

3.3.2.2 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> para determinação da viabilidade das células Caco-2 em presença dos nitrocompostos.....	84
3.3.2.3 Análise estatística.....	85
3.3 RESULTADOS.....	85
3.4 DISCUSSÃO.....	87
3.5 CONCLUSÕES.....	91
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

CAPÍTULO 4 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICO 94

4.1 INTRODUÇÃO.....	95
4.1.1 Quantificação da quantidade permeada em estudos <i>in vitro</i> e desenvolvimento e validação de método bioanalítico.....	95
4.1.2 Métodos para a quantificação da nifuroxazida e nitrofurantoína.....	96
4.2 OBJETIVOS.....	97
4.2.1 Objetivos gerais.....	97
4.2.2 Objetivos específicos.....	97
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	98
4.3.1 Material.....	98
4.3.1.1 Série de compostos.....	98
4.3.1.2 Substâncias Químicas de Referência.....	98
4.3.1.3 Equipamentos.....	99
4.3.1.4 Solventes, reagentes e materiais empregados.....	100
4.3.1.5 Infra-estrutura.....	101
4.3.2 Métodos.....	101
4.3.2.1 Desenvolvimento do método bioanalítico de quantificação de amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e compostos 5-nitro-heterocíclicos.....	101
4.3.2.2 Preparo de soluções-padrão da curva analítica.....	102
4.3.2.3 Preparo de amostras de padrão de controle de qualidade.....	103
4.3.2.5 Parâmetros de validação do método para quantificação de amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em solução tampão de Hanks.....	104
4.4 RESULTADOS.....	108
4.4.1 Desenvolvimento e validação do método de quantificação da amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e compostos 5-nitro-heterocíclicos.....	108
4.4.1.1 Especificidade.....	110
4.4.1.2 Linearidade.....	117
4.4.1.3 Precisão e exatidão.....	123
4.4.1.4 Limite de detecção (LD) e limite inferior de quantificação (LIQ).....	127
4.4.1.5 Estabilidade.....	128
4.5 DISCUSSÃO.....	136
4.6 CONCLUSÕES.....	139
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PERMEABILIDADE EMPREGANDO CÉLULAS CACO-2..... 143

5.1 INTRODUÇÃO	144
5.1.1 <i>Emprego das células Caco-2 em ensaios de permeabilidade</i>	144
5.1.2 <i>Permeabilidade intestinal dos fármacos nifuroxazida e nitrofurantoína</i>	148
5.2 OBJETIVOS.....	150
5.2.1 <i>Objetivos gerais</i>	150
5.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	150
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	151
5.3.1 <i>Material</i>	151
5.3.1.1 <i>Série de compostos</i>	151
5.3.1.2 <i>Substâncias Químicas de Referência</i>	151
5.3.1.3 <i>Equipamentos</i>	151
5.3.1.4 <i>Solventes, reagentes e materiais empregados</i>	152
5.3.1.5 <i>Infra-estrutura</i>	152
5.3.2 <i>Métodos</i>	152
5.3.2.1 <i>Cultivo de células Caco-2</i>	152
5.3.2.2 <i>Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2</i>	152
5.3.2.3 <i>Realização dos experimentos de permeabilidade</i>	153
5.4 RESULTADOS.....	155
5.4.1 <i>Avaliação da integridade de membranas de células Caco-2 por meio da resistência elétrica transepitelial (RET)</i>	155
5.4.2 <i>Permeabilidade da amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e compostos 5-nitro-heterocíclicos</i>	156
5.5 DISCUSSÃO	163
5.6 CONCLUSÕES	169
5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	170

CAPÍTULO 6 - AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA PERMEABILIDADE EMPREGANDO O PROGRAMA VOLSURF..... 173

6.1 INTRODUÇÃO	174
6.1.1 <i>O programa VolSurf</i>	174
6.2 OBJETIVOS.....	178
6.2.1 <i>Objetivos gerais</i>	178
6.2.2 <i>Objetivos específicos</i>	178
6.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	179
6.3.1 <i>Série de compostos</i>	179
6.3.2 <i>Modelagem Molecular</i>	182
6.3.3 <i>Cálculo dos descritores moleculares</i>	183
6.3.4 <i>Análise exploratória pelo método CPCA</i>	185
6.3.4 <i>Modelo de regressão pelo método PLS</i>	185
6.4 RESULTADOS.....	186
6.4.1 <i>Análise exploratória pelo método CPCA</i>	186

6.4.2 Modelo de regressão pelo método PLS.....	187
6.5 DISCUSSÃO	191
6.6 CONCLUSÕES	200
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	201
 CAPÍTULO 7 - CONCLUSÕES.....	 204
 ANEXO A - ESPECTROS DE RMN ¹H	 207
 ANEXO B - ESPECTROS DE RMN ¹³C	 218

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tornou-se um problema mundial, tanto em ambientes hospitalares quanto em infecções associadas à comunidade. As opções de tratamento para estas infecções são geralmente limitadas, especialmente em pacientes debilitados e imunocomprometidos (CHIERAKUL, 2004). A doença infecciosa causada por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, ou MRSA (do inglês *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), é atualmente um problema grave, devido à sua facilidade de transmissão e, conseqüentemente, vasta disseminação (NAKAO, SENDA, 2006). Embora potentes fármacos anti-estafilocócicos recentemente desenvolvidos estejam disponíveis, como a vancomicina e a teicoplanina (glicopeptídeos), a daptomicina (lipopeptídeo cíclico), a linezolida (oxazolidinona) e a tigeciclina (glicilciclina), as infecções causadas por este patógeno continuam a apresentar significativa morbidade e mortalidade devido ao aparecimento de cepas também resistentes a estes antimicrobianos (JONES, 2008; FINCH, HUNTER, 2006).

O elevado nível de resistência que cepas de *Staphylococcus aureus* têm apresentado aos antimicrobianos atualmente disponíveis, decorrente muitas vezes da utilização abusiva e indiscriminada desses fármacos, resulta na necessidade de busca e identificação de compostos mais eficazes para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes (WALSH, AMYES, 2004). O aperfeiçoamento de fármacos já disponíveis na terapêutica é alternativa financeiramente acessível e capaz de contribuir com promissores antimicrobianos, uma vez que o desenvolvimento de fármacos com estrutura totalmente nova é mais dispendioso e envolve mais anos de pesquisa (CHARLES, GRAYSON, 2004).

Na busca por novos fármacos com potencial atividade antimicrobiana, os compostos 5-nitro-heterocíclicos com estrutura análoga à nifuroxazida têm apresentado atividade frente a cepas multirresistentes de *S. aureus* (JORGE, 2007; MASUNARI, 2005). Os nitrocompostos surgiram como agentes terapêuticos na década de 1940 e têm sido empregados, até a atualidade, em diversas classes terapêuticas. Em seu amplo espectro de atividade, destacam-se as aplicações como antibacterianos, antiparasitários, vasodilatadores, anti-hipertensivos, sedativos,

antipiréticos, analgésicos, anti-inflamatórios e antineoplásicos. Como requisito indispensável para o desencadeamento da atividade biológica desses compostos, identifica-se a biorredução do grupo nitro, que pode ocorrer tanto por via anaeróbia, originando compostos que causam danos ao DNA celular, como por via aeróbia, resultando na formação de derivados que causam a desestruturação das membranas biológicas (VIODÉ *et al.*, 1999; TOCHER, 1997; MURRAY *et al.*, 1996).

A nifuroxazida, um 5-nitrofurano sintético utilizado como segunda ou terceira escolha no tratamento da infecção entérica, apresenta excelentes características, tais como amplo espectro de atividade, baixa capacidade de promover significativa resistência bacteriana e estrutura química favorável a modificações. Dessa forma, este fármaco é vislumbrado como molécula capaz de levar ao desenvolvimento de novos análogos, e, possivelmente, a compostos líderes (JORGE *et al.*, 2009; MASUNARI, TAVARES, 2007). Derivados deste fármaco tem se mostrado promissores em relação ao planejamento de novas substâncias potencialmente eficazes no tratamento da doença de Chagas (PAULA, 2007) e no tratamento de infecções causadas por micro-organismos com amplo grau de resistência aos quimioterápicos de uso corrente (MASUNARI, 2005; JORGE, 2007). Uma série de compostos derivados da nifuroxazida foi planejada, sintetizada, caracterizada e avaliada frente a cepas MRSA. Muitos destes compostos apresentaram atividades promissoras frente a estas bactérias (MASUNARI, 2005; JORGE, 2007). O próximo passo no desenvolvimento de um candidato a fármaco seria a análise dos processos envolvidos em seu perfil farmacocinético e toxicidade, ou ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), visando, principalmente, possível administração por via oral.

A via oral é a rota preferencial para a administração de medicamentos devido à conveniência, ao baixo custo e à alta adesão quando comparada com outras vias de administração. Então, estimar a biodisponibilidade de novos candidatos por via oral em humanos nos primeiros estágios do processo de desenvolvimento de um novo fármaco é importante e necessário para se obter eficiente seleção e otimização (KELDENICH, 2009). A triagem relativa à capacidade de absorção é importante para estimar a biodisponibilidade e atrai esforços da indústria e do meio científico. Há crescente necessidade de boas ferramentas para previsão da absorção intestinal que englobem dois propósitos-chave: (1) o estágio de planejamento de novos

compostos e quimiotecas para reduzir o risco de falha em um estágio mais avançado; (2) o aperfeiçoamento da triagem e dos testes apenas para os compostos que se mostrarem mais promissores. Dessa forma, métodos *in vitro* empregando tecido animal, culturas celulares ou membranas artificiais têm sido utilizados no processo de avaliação de candidatos a fármacos, selecionando aqueles que apresentam elevado potencial para a absorção intestinal (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

Dentre os muitos modelos de absorção de compostos em cultura celular *in vitro*, os mais usados são os que empregam as células Caco-2, que são células derivadas de carcinoma humano colo-retal, as quais mantêm a maioria das propriedades morfológicas e funcionais das células do epitélio intestinal humano. Estas propriedades fazem dessa monocamada de células um importante modelo *in vitro* para a triagem da absorção. Foi revelado em muitos estudos que a absorção oral humana de compostos relaciona-se com sua permeabilidade através de células Caco-2. Portanto, a permeabilidade através destas células é um valioso índice para estimar a absorção de fármacos pela administração por via oral (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009). Todavia, apesar de significativos avanços técnicos, estes experimentos ainda possuem alto custo, elevado consumo de tempo e requerem síntese de compostos. Faz-se necessário, portanto, o desenvolvimento de métodos capazes de prever a permeabilidade através das células Caco-2, servindo de base para a seleção de compostos para posterior síntese e avaliação experimental (CRUCIANI, PASTOR, GUBA, 2000).

Os dados de permeabilidade *in vitro* têm sido empregados em estudos *in silico* de relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR, do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationships*), tornando mais eficiente a seleção de compostos logo nos estágios iniciais de desenvolvimento de um novo fármaco (ARTURSSON, BORCHARD, 1997; EKINSA *et al.*, 2000). QSAR é um método que emprega descritores baseados em estruturas moleculares e utiliza métodos de regressão para relacionar os descritores obtidos com o valor de atividade biológica, ou, em um paradigma mais moderno, com o valor de propriedade farmacocinética (QSAR-ADME) (KUBINIY, 1993; GLEESON *et al.*, 2011). O programa VolSurf é capaz de gerar descritores moleculares simples de serem interpretados, tornando a análise de

QSAR rápida e produtiva. Devido à natureza multivariada dos dados, ferramentas quimiométricas como a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e os quadrados mínimos parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) devem ser empregadas para a derivação dos modelos. Dessa forma, a geração de modelos computacionais construídos a partir de dados de alta qualidade faz com que a triagem da permeabilidade intestinal passe a ser realizada com maior antecedência, com maior rapidez e de forma mais eficiente, a fim de que falhas no processo de desenvolvimento de um novo fármaco sejam evitadas, ou que sejam detectadas o quanto antes (UNGELL, 2004).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a permeabilidade de uma série de compostos 5-nitro-heterocíclicos análogos à nifuroxazida com atividade antimicrobiana, apresentando principalmente atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, por meio do emprego de ensaios *in vitro* com células Caco-2 e estudos *in silico* relacionando valores de permeabilidade através destas células e descritores VolSurf.

1.2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, pretendeu-se realizar:

- Avaliação da citotoxicidade da série de compostos frente às células Caco-2;
- Desenvolvimento e validação de método para quantificação dos compostos metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), nitrofurantoína, nifuroxazida e análogos por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE);

- Avaliação *in vitro* da permeabilidade dos compostos metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), nitrofurantoína, nifuroxazida e análogos por meio de ensaios com células Caco-2;
- Estudo *in silico* empregando métodos de reconhecimento de padrão e métodos de calibração relacionando os valores de permeabilidade através de células Caco-2 dos compostos análogos à nifuroxazida (variável dependente) com descritores calculados pelo programa VolSurf (variável independente), a fim de obter modelos capazes de prever o comportamento destes e outros derivados em ensaios *in vitro* com células Caco-2.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTURSSON, P.; BORCHARD, R.T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm. Res.*, v. 14, n. 12, p. 1655-1658, 1997.
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, p. 301-312, 2000.
- CHARLES, P.G.P.; GRAYSON, M.L. The dearth of new antibiotic development: why we should be worried and what we can do about it. *Med J Aust*, v. 181, n. 10, p. 549-553, 2004.
- CHIERAKUL, W.; RAJANUWONG, A.; WUTHIEKANUN, V.; TEERAWATTANASOOK, N.; GASIPRONG, M.; SIMPSON, A.; CHAOWAGUL, W.; WHITE, N. The changing pattern of bloodstream infections associated with the rise in HIV prevalence in northeastern Thailand. *J. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hig*, v. 98, n. 11, p. 678-686, 2004.
- CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.11, suppl. 2, p. 29-39, 2000.
- EKINSA, S.; WALLER, C.L.; SWAAN, P. W.; CRUCIANI, G.; WRIGHTON, S.A.; WIKEL, J.H. Progress in predicting human ADME parameters *in silico*. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 44, p. 251-272, 2000.
- FINCH, R.; HUNTER, P.A.J. Antibiotic resistance-action to promote new technologies: report of an EU intergovernmental conference held in Birmingham. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 58, suppl. 1, p. 159-167, 2006.
- GLEESON, M. P.; HERSEY, A.; MONTANARI, D.; OVERINGTON, J. Probing the links between *in vitro* potency, ADMET and physicochemical parameters. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.10, n.3, p. 197-208, 2011.
- GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS *et al.* **Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1ª ed, 2009, cap. 19, pag 204-211.
- JONES, R.N. Key considerations in the treatment of complicated staphylococcal infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 14, suppl. 2, p. 3-9, 2008.
- JORGE, S.D. Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e de derivados 5(6)-benzofuroxânicos frente a cepas padrão e multirresistentes de

- Staphylococcus aureus*. 2007. 137f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas –USP/SP, 2007.
- JORGE, S.D.; MASUNARI, A.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PASQUALOTO, K.F.M.; TAVARES, L.C. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n. 17, p. 3028–3036, 2009.
- KELDENICH, J. Measurement and Prediction of Oral Absorption. *Chemistry & Biodiversity*, v. 6, p.2000-2013, 2009.
- KUBINYI, H. **QSAR: Hansch analysis and related approaches**. New York: VCR, 1993, 240p.
- MASUNARI, A. Planejamentos, desenvolvimento e estudos de QSAR-2D e QSAR-3D de derivados 5-nitro-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente (CEB – Clone Endêmico Brasileiro. 2005. 231f. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas–USP/SP, 2005.
- MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. A new class of nifuroxazide analogues: Synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n. 15, p. 4229–4236, 2007.
- MURRAY, R.J.; LIM, T.T.; PEARSON, J.C.; GRUBB, W.B.; LUM, G.D. Community-onset methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia in Northern Australia. *Int. J. Infect. Dis.*, v. 8, n. 5, p. 275-283, 1996.
- NAKAO, M.; SENDA, Y. An Epidemiological Investigation of Hospital Infections Caused by MRSA and Their Prevention. *Kaw. J. Med. Welfare*, v. 12, n. 1, p.1-11, 2006.
- PAULA, F.R. QSPR/SAR em derivados 5-nitro-heterocíclicos com atividades antichagásica. Estudo das relações entre o potencial de redução do grupo nitro e propriedades físico-químicas. 2007. 138f. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas–USP/SP, 2007.
- TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *Gen. Pharmacol.*, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.
- UNGELL, A.L.B. Caco-2 replace or refine? *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 4, p. 423-430, 2004.
- VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTHSIEGEL, R.L.; CHAVIÉRE, G.; BALAKARA, N.; PÉRIE, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochem. Pharmacol.*, v. 57, n. 5, p. 549-557, 1999.
- WALSH, F.M.; AMYES, S.G.B. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, p. 439–444, 2004.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Observou-se, neste início de século, número crescente de pacientes imunodeprimidos, com doenças malignas, com estadias prolongadas em unidades de terapia intensiva (UTI) ou necessitando de cuidados médicos a longo prazo. Muitos destes pacientes desenvolveram infecções por patógenos que apresentam características de resistência variável e, não raras vezes, o tratamento destas infecções é realizado com antimicrobianos de amplo espectro, o que aumenta a seleção de resistência a múltiplos fármacos (RMF) (NORDMANN *et al.*, 2007). O desenvolvimento dessas cepas resistentes construiu-se progressivamente ao longo dos últimos 20 anos, agravando-se nos últimos cinco, com a presença de surtos mais frequentes e mais persistentes (WALSH, AMYES, 2004).

As bactérias podem se tornar resistentes a agentes antimicrobianos por mecanismos que consistem, basicamente, na inativação enzimática do fármaco, na prevenção de sua penetração no micro-organismo, impedindo a interação com o sítio ativo, na alteração dos sítios-alvo dos fármacos ou no rápido efluxo do antimicrobiano, conforme esquematizado na Figura 2.1 (TORTORA, FUNKE, CASE, 2010).

Figura 2. 1. Os 4 principais mecanismos de resistência bacteriana a antimicrobianos (TORTORA, FUNKE, CASE, 2010).

A resistência causada por características inerentes às células é conhecida como resistência intrínseca, sendo compartilhada por todos os indivíduos da espécie e é, em geral, determinada geneticamente. A resistência adquirida é resultado de fenômenos de mutação cromossômica e transferência de plasmídeos ou transposons entre cepas, espécies ou gêneros bacterianos distintos e da disseminação de clones destas bactérias em ambientes diversos (LECLERCQ, 2009; BARBOSA, TORRES, 1999; TRABULSI *et al.*, 1999; TENOVER, SCHABERG, 1998).

Alguns patógenos hospitalares, como *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE, do inglês *Vancomycin Resistant Enterococcus*), *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistentes e MRSA, estão se tornando resistentes a todos os antimicrobianos atualmente disponíveis.

A presença do gênero *Staphylococcus* é considerado, desde a década de 1980, grave problema em ambiente hospitalar em função de sua facilidade de transmissão, seja entre pacientes, pela equipe hospitalar ou por visitantes, propiciando sua rápida disseminação (WALSH, AMYES, 2004). Atualmente, representa um padrão de resistência instalado em muitos hospitais em todo o mundo, incluindo os EUA, Canadá, América do Sul, Europa e Ásia, constatando-se, também, seu isolamento em pacientes sem contato prévio com hospitais ou fatores de risco aparentes, como por exemplo, cirurgias, uso de cateteres, dispositivos médicos percutâneos ou diálise, trazendo à tona a necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos eficazes contra estas bactérias (LODE, 2009; LECLERCQ, 2009).

2.2 INFECÇÕES CAUSADAS POR *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTE: EPIDEMIOLOGIA E TRATAMENTO

No final da década de 1950, pelo menos 85% das cepas de *S. aureus* se mostravam resistentes à penicilina nos EUA e França. Com a introdução, em 1959, da meticilina e oxacilina, penicilinas semi-sintéticas não inativadas pelas beta-

lactamases, era esperado término do problema com a resistência. No entanto, os primeiros casos de MRSA foram relatados no Reino Unido em 1961 (MICHEL, GUTMANN, 1997). Essa resistência à meticilina por *S. aureus* é definida como um valor limítrofe de concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina ≥ 4 µg/mL, sendo as cepas resistentes à meticilina ou oxacilina também resistentes a todos os agentes betalactâmicos, incluindo cefalosporinas (com exceção do ceftobiprol) (ENRIGHT *et al.*, 2002).

Os principais alvos dos antibióticos betalactâmicos em *S. aureus* são as chamadas proteínas de ligação à penicilina (PBP, do inglês *Penicillin binding protein*), que têm um papel funcional na biossíntese da parede celular bacteriana, por meio de atividades transpeptidase e carboxipeptidase. Todas as cepas de *S. aureus* altamente resistentes à meticilina produzem uma proteína adicional de baixa afinidade de ligação à penicilina, a PBPa (ou PBP2'), codificada pelo gene *mecA*, cuja origem ainda é desconhecida. A produção da PBP adicional confere resistência intrínseca à meticilina, oxacilina e a todos os betalactâmicos. Embora a aquisição do gene *mecA* por *S. aureus* seja essencial para a expressão de alto nível de resistência à meticilina, pelo menos três outros mecanismos que explicam o baixo nível de resistência a este fármaco (CIM 4-8 mg/L) foram encontrados em alguns isolados clínicos de *S. aureus* sem o *mecA*, como a superexpressão de betalactamase (penicilinase) em alguns *S. aureus*, também chamados *S. aureus* de fronteira (BORSA, do inglês *Boderline Staphylococcus aureus*), a superprodução de PBP4, uma PBP com baixa afinidade para betalactâmicos, ou mutações da PBP2 que poderiam reduzir sua afinidade a betalactâmicos, conhecidos como MODSA (do inglês *Modifiyed Staphylococcus aureus*) (MICHEL, GUTMANN, 1997).

A disseminação da resistência de MRSA ocorreu, principalmente, por transferência horizontal do gene *mecA* e seqüências regulatórias afins (ARCHER *et al.*, 1994). Um único clone provavelmente foi o responsável pela maioria das cepas MRSA isoladas na década de 1960; até 2002, cinco clones principais MRSA emergiram em todo o mundo (ENRIGHT *et al.*, 2002). Desde a década de 1960, a prevalência de MRSA tem aumentado tanto como patógeno nosocomial (HA-MRSA, do inglês *Hospital Acquired MRSA*) como patógeno associado à comunidade (CA-MRSA, do inglês *Community Acquired MRSA*). A observação de que cepas CA-MRSA e HA-MRSA eram, inicialmente, geneticamente distintas sugere que as

primeiras não se originaram da disseminação de cepas nosocomiais para a comunidade (BUCKINGHAM, 2004). No entanto, HA-MRSA parece estar relacionada com alguns clones de comunidade de *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA, do inglês *Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus*) (NORDMANN *et al.*, 2007). O aumento na prevalência de MRSA em hospitais e na comunidade tem sido atribuído a múltiplos fatores, como o uso indiscriminado de antimicrobianos (ENRIGHT *et al.*, 2002), infecção por HIV (MATHEWS *et al.*, 2005), hemodiálise (MMWR, 2007a) e pacientes submetidos a cuidados médicos a longo prazo (SPINDLE, STRAUSBAUGH, JACOBSON, 1995).

A vasta prevalência de MRSA em quase todo tipo de infecção hospitalar está provavelmente relacionada, em parte, à capacidade deste micro-organismo em formar biofilmes em equipamentos hospitalares tais como tubos endotraqueais e catéteres urinários e endovasculares (SHORR, 2007). O biofilme facilita a sobrevivência e multiplicação do MRSA sobre estas superfícies, promovendo a oportunidade potencial de transferência de genes de resistência entre eles (FRIDKIN *et al.*, 2005). No Reino Unido, a proporção de infecções em hospitais por este agente aumentou de forma alarmante, em cerca de 20 vezes, do início até o final da década de 1990 (WALSH, AMYES, 2004). Nos EUA, as cepas MRSA representam cerca de 60% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados (HIDRON *et al.*, 2005). Apresenta-se, na Figura 2.2, a incidência de infecções por MRSA por 100.000 habitantes nos EUA no período de 2000 a 2005, notando-se seu progressivo aumento. Em um estudo realizado em 1990 no Brasil, constatou-se que cepas MRSA representavam entre 38 e 78% do total de cepas de *Staphylococcus aureus* nos hospitais, comprovando sua gravidade no país (PANNUTI, GRINBAUM, 1995). Mundialmente, a prevalência de HA-MRSA varia consideravelmente, de menos de 1% na Escandinávia a 40% no Japão, Israel e no resto da Europa (SADER *et al.*, 2006).

Figura 2. 2. Incidência de infecções causadas por MRSA em hospitais nos Estados Unidos, no período de 2000 a 2005. Adaptado de ZILBERBERG, SHORR, KOLLEF, 2008.

Fatores de risco para infecção por HA-MRSA incluem a colonização por este patógeno ou histórico de infecção, o uso de antimicrobiano, a hospitalização prolongada (superior a 14 dias), cirurgia ou infecção de sítio cirúrgico, internação em UTI ou unidade de queimados, hemodiálise, proximidade a indivíduos com colonização ou infecção por MRSA, presença de dispositivos invasivos, histórico de cirurgia, permanência em centros de cuidados a longo prazo, uso de tubo endotraqueal, nasogástrico ou traqueostomia, nutrição parenteral e alimentação enteral (DAVIS *et al.*, 2004).

Pacientes com infecção por MRSA têm maior mortalidade e permanência hospitalar, o que causa maiores custos de saúde em comparação a pacientes com infecção por MSSA (COSGROVE, 2005). Entre 30 e 60% dos pacientes internados que são colonizados por MRSA desenvolvem infecção (BOYCE, 1989), estando este patógeno associado à doença invasiva grave, como infecções de pele e tecidos moles, incluindo infecções de ferida, bacteremia e pneumonia (DIEKEMA *et al.*, 2001). A proporção de infecções por *S. aureus* na corrente sanguínea causada por MRSA aumentou de 27%, no início da década de 1990, para 54% durante o início do século 21 (KLEVENS, EDWARDS, GAYNES, 2008).

No início da década de 1980 foram descritas as primeiras infecções por CA-MRSA isoladas de usuários de drogas injetáveis (SARAVOLATZ, 1982) e, desde então, tornaram-se a causa mais frequente de infecções de pele e tecidos moles nos departamentos de emergência e ambulatorios dos EUA (HERSH, 2008), com uma variante estabelecendo-se também na América Latina (REYES, 2009). Dados do Sistema de Informação de Saúde Pediátrica nos EUA, que inclui mais de 40 hospitais autônomos infantis, indicam que, entre os anos de 2002 e 2007, cepas MRSA representavam 51% das internações por *S. aureus* em crianças e a incidência de infecção por este patógeno aumentou de 6,7 para 21,1 casos por mil internações no mesmo período, enquanto a incidência de MSSA permaneceu estável (14,1-14,7 casos por 1000 pacientes) (GERBER, 2009).

Observações levaram à identificação de alguns fatores de risco, com relativo valor preditivo, para o CA-MRSA, como traumatismo na pele (por exemplo, lacerações, abrasões, tatuagens, uso de drogas injetáveis), cosméticos para depilação, encarceramento e contato físico com outras pessoas que tenham colonização ou infecção por MRSA (CAMPBELL, 2004; CDC, 2003). No entanto, muitos pacientes com CA-MRSA não apresentam qualquer um destes fatores de risco (MILLER, 2007). Os animais podem carregar este patógeno, sendo também fonte de transmissão (SING, TUSCHAK, HORMANSDORFER, 2008).

Pele e tecidos moles permanecem os locais predominantes de infecção por CA-MRSA, embora também possa causar doença grave e invasiva (STANKOVIC, MAHAJAN, ASMAR, 2007). A doença invasiva pode ocorrer como complicação das infecções de pele ou espontaneamente em pacientes sem infecções anteriores (MMWR, 2007b). As seguintes manifestações de CA-MRSA foram observadas: infecção da pele e tecidos moles, incluindo fascíte necrosante, infecções de ferida, otite média e otite externa, osteomielite, infecção urinária, endocardite, sepse e pneumonia necrosante, ocorrendo frequentemente em adultos previamente saudáveis, jovens e crianças (MMWR, 2007b; WANG *et al.*, 2008; LECLERCQ, 2009; NORDMANN *et al.*, 2007). A osteomielite aguda hematogênica é a mais comum das doenças invasivas causadas por CA-MRSA em crianças (ARNOLD *et al.*, 2006).

Isolados de CA-MRSA não apresentavam inicialmente resistência múltipla a antimicrobianos. No entanto, eles podem ser classificados como organismos RMF, por possuírem resistência aos betalactâmicos, que incluem os principais agentes anti-estafilocócicos, e a alguns outros antimicrobianos, como as tetraciclinas e o ácido fusídico, em alguns isolados na Europa. Além disso, novas variantes de clones CA-MRSA resistentes à clindamicina e quinolonas surgiram recentemente (LECLERCQ, 2009). É provável que as cepas CA-MRSA continuem a se espalhar na comunidade mundial, uma vez que os fatores que influenciam sua propagação são desconhecidos e sua detecção por meio de cultura ainda não é amplamente realizada (NORDMANN *et al.*, 2007). Infecções por CA-MRSA têm sido identificadas em pacientes hospitalizados com frequência cada vez maior, já que os pacientes que adquirem estas cepas na comunidade podem necessitar de hospitalização e, dessa forma, transmiti-las a outros pacientes hospitalizados (OTTER, FRENCH, 2006). Da mesma maneira, infecções por HA-MRSA com incidência na comunidade tem sido observadas com grande frequência. Tais infecções são descritas como infecções não nosocomiais associadas a hospitais, mas o termo "MRSA associado aos hospitais com incidência na comunidade" é preferido (HUANG, PLATT, 2003).

O tratamento de infecções por MRSA é por vezes limitado à administração de vancomicina ou teicoplanina. No entanto, embora a vancomicina ainda seja considerada o melhor agente antimicrobiano para o tratamento de infecções causadas por MRSA, sua moderada difusão extravascular e seu efeito bactericida relativamente lento podem diminuir parcialmente sua eficácia *in vivo*. Tentativas de associação entre vancomicina e rifampicina, ácido fusídico, ou fosfomicina foram realizadas, mas a vantagem de tais combinações sobre a vancomicina isoladamente não foi efetivamente demonstrada (MICHEL, GUTMANN, 1997).

Estudos experimentais demonstraram que a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, um inibidor de penicilinase, é tão eficaz quanto a vancomicina no tratamento de endocardite por MRSA em ratos. Todavia, a necessidade de doses elevadas de ácido clavulânico pode tornar este tratamento inviável na prática clínica. Novas moléculas, como a tigeciclina, a daptomicina e o ceftobiprol são ativas contra MRSA, bem como os lipoglicopeptídeos dalbavancina e telavancina (MICHEL, GUTMANN, 1997).

Em meados da década de 1990, Hiramatsu identificou cepas de MRSA isoladas no Japão com sensibilidade intermediária à vancomicina, com CIM de 8 mg/L. Infecções causadas por essas cepas, conhecidas como VISA (do inglês *Vancomycin Intermediate Staphylococcus aureus*), ainda podem ser tratadas com a administração daquele fármaco. A maior ameaça em *S. aureus*, todavia, é a disseminação de isolados de MRSA resistentes à vancomicina (NORDMANN *et al.*, 2007). Em 2002 foi isolada a primeira cepa MRSA em um paciente em Michigan abrigando um operon *vanA* de VRE, ou seja, um conjunto de genes relacionados à resistência à vancomicina, contíguos e controlados coordenadamente, sendo todos expressos em apenas um RNA mensageiro. Seguiram-se relatos de uma cepa na Pensilvânia e, mais tarde, em Nova York (WALSH, AMYES, 2004). No Brasil, Oliveira e colaboradores (2001) relataram o isolamento de cinco cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA, do inglês *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*) na ala de queimados e uma cepa na ala de ortopedia em alguns pacientes em um hospital no Estado de São Paulo. Estas cepas apresentaram linhagens muito semelhantes, sugerindo possível contaminação de paciente para paciente.

As opções terapêuticas para o tratamento de infecções por MRSA resistente à vancomicina são restritas. As oxazolidinonas, como a linezolida, representam a primeira alternativa aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina). A quinupristina-dalfopristina, a primeira estreptogramina injetável semi-sintética, representa a segunda alternativa promissora contra o MRSA resistente à vancomicina, sendo composta pelas moléculas estruturalmente independentes quinupristina (uma estreptogramina B) e dalfopristina (uma estreptogramina A), que atuam sinergicamente para inibir a síntese proteica (MICHEL, GUTMANN, 1997).

Acredita-se que os isolados de MRSA resistentes à vancomicina continuarão a ser relatados nos próximos anos, uma vez que um reservatório comum e importante para o MRSA e para o VRE existe em muitos países do mundo, como em países asiáticos, nos EUA, na Grécia, na Itália, em Portugal, e no Reino Unido (MICHEL, GUTMANN, 1997). Devido às restritas opções terapêuticas e à rápida disseminação do MRSA tanto nos hospitais como na comunidade, bem como ao aumento de sua virulência e de sua resistência aos antimicrobianos atualmente

disponíveis, faz-se mister o desenvolvimento de novos fármacos ativos contra estas cepas multirresistentes.

2.3 COMPOSTOS 5-NITRO-HETEROCÍCLICOS

Os nitrocompostos estão presentes em diversas classes terapêuticas, sendo usados como anti-hipertensivos (nifedipina), antianginosos (nitroglicerina), sedativos (nitrazepam), analgésicos (óxido nitroso), anti-inflamatórios (nimesulida), anti-histamínicos (ranitidina), antineoplásicos (nitacrina), antiparasitários (metronidazol, nifurtimox) e antibacterianos (cloranfenicol, nifuroxazida) (KOROLKOVAS, FRANÇA, 2007). Apresentam-se, na Figura 2.3, as estruturas químicas de alguns nitrocompostos de maior relevância na terapêutica.

Figura 2. 3. Estruturas químicas de alguns nitrocompostos de maior relevância na terapêutica.

Os primeiros fármacos 5-nitro-heterocíclicos introduzidos na quimioterapia foram os compostos nitrofurânicos, utilizados desde a década de 1940 para o tratamento de infecções do trato urinário (VENUTI, 1995). Número considerável de compostos nitrofurânicos com atividade antibacteriana são aplicados em medicina veterinária e humana, uma vez que apresentam baixa capacidade de indução de resistência bacteriana (PETRI JR, 2001; DAYAN, DEGUINGAND, TRUZMAN, 1985;

VOZYAKOVA, OLEINIK, NOVITSKII, 1978). Observa-se, no entanto, que apenas alguns desses derivados são utilizados na prática médica, uma vez que a maioria desses compostos apresenta amplo espectro de ação (PETRI JR, 2001, PISCOPO *et al.*, 1989, HIRANO *et al.*, 1967), além de alta toxicidade (FOYE, LEMKE, WILLIAMS, 1995; KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1982). A furilfuramida, por exemplo, que se apresenta mutagênica em testes *in vitro* e carcinogênica *in vivo*, foi banida como aditivo alimentar no Japão na década de 1970 (BRYAN, 1978). Outros fármacos desta classe, porém, como a nitrofurantoína e a nifuroxazida, ainda são utilizados como agentes antibacterianos em medicina humana e veterinária por apresentarem toxicidade tolerável. Apresentam-se, na Figura 2.4, alguns derivados 5-nitrofurânicos utilizados na terapêutica.

Figura 2. 4. Estrutura química de alguns compostos 5-nitro-heterocíclicos utilizados na terapêutica.

O nitrofur, costuma ser empregado no tratamento de infecções bacterianas dermatológicas, em queimaduras e úlceras de pele. A nitrofurantoína e o nifuratel são utilizados em infecções do trato genito-urinário causadas principalmente por bactérias Gram-negativas ou protozoários, enquanto a furazolidona e a nifuroxazida são empregadas no combate a infecções do trato gastrointestinal causadas por bactérias Gram-positivas ou protozoários (PETRI JR, 2001, KOROLKOVAS,

FRANÇA, 2007, FOYE, LEMKE, WILLIAMS, 1995; KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1982).

Os compostos 5-nitrofurânicos são sintéticos e caracterizam-se estruturalmente pela presença de um anel furânico substituído na posição 5 pelo grupo nitro, conforme apresentado na Figura 2.5. A ação antibacteriana conferida a estas substâncias está relacionada principalmente aos derivados 2-substituídos.

Figura 2. 5. Subestrutura fundamental dos compostos 5-nitrofurânicos.

Testes realizados com o furoato de 2-metila comprovaram que a substituição do grupo nitro na posição 5 do anel furânico por outros substituintes, como Cl, Br, CH₃, CHO, CH₂Cl e CH₂OH, conferia inatividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus* e *E. coli* (WARD, DODD, 1948; DODD, CRAMER, WARD, 1950).

2.3.1 Mecanismo de ação dos compostos 5-nitro-heterocíclicos

Ao estudar os nitrocompostos, observa-se que seu mecanismo de ação, em nível molecular, ainda não está totalmente estabelecido, uma vez que pode variar de acordo com diferenças estruturais dos compostos. O efeito biológico, em alguns casos, resulta essencialmente da interação dessas substâncias com receptores específicos da biofase. Sabe-se, no entanto, que a maioria dos nitrocompostos com ação antiparasitária e antimicrobiana apresenta, como provável mecanismo de ação, o processo de biorredução enzimática do grupo nitro, que resulta na formação de radicais livres com toxicidade preferencial para células bacterianas e parasitárias (TOCHER, 1997; VIODÉ *et al.*, 1999; MAYA *et al.*, 2007). O grupo nitro é facilmente

reduzido devido ao seu caráter fortemente aceptor de elétrons, e ao efeito de ressonância entre o nitrogênio e os dois átomos de oxigênio de sua estrutura. A passagem transmembrana dos nitrocompostos ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que os radicais livres, provenientes do processo de biorredução, desestabilizam a membrana celular. Assim, devido ao aumento da concentração intracelular daqueles, maior quantidade de radicais livres é gerada e, conseqüentemente, maior é o dano causado pelo estresse oxidativo (TOCHER, 1997).

Além da redução *in vivo* do grupo nitro, a maioria dos nitrocompostos utilizados como antibacterianos apresenta em comum o grupo azometínico (-CH=N-N<) ligado ao carbono 2 do anel 5-nitrofurânico, que atua, provavelmente, em sinergismo farmacológico com o primeiro (FOYE, LEMKE, WILLIAMS, 1995). Apresenta-se, na Figura 2.6, o grupo farmacofórico de compostos nitrofurânicos com atividade antibacteriana.

Figura 2. 6. Grupo farmacofórico de compostos nitrofurânicos com atividade antibacteriana.

Herlich e Schweiger (1976) atribuíram o efeito antibacteriano dos derivados 5-nitro-furânicos à capacidade de causar lesão no DNA bacteriano, bem como à inibição do sistema enzimático de reparo dessas lesões. Posteriormente, acreditou-se que a ação farmacológica destes derivados era resultado de sua interferência com a degradação de carboidratos via ácido pirúvico, que ocorreria provavelmente pelo bloqueio da acetilação da coenzima A, impedindo a produção de energia. Dessa forma, a atividade antimicrobiana destes compostos estaria envolvida com a inibição dos sistemas piruvato desidrogenase, piruvato descarboxilase, citrato

sintetase, malato desidrogenase e glutatona redutase (FOYE, LEMKE, WILLIAMS, 1995; KOROLKOVAS, BURCKHALTER, 1982).

Atualmente, considera-se como mecanismo de ação mais provável de compostos nitrofurânicos aquele proposto para o nifurtimox por VIODÉ e colaboradores (1999). Apresentam-se, na Figura 2.7, duas possíveis rotas propostas para a elucidação da bioativação de compostos nitrofurânicos, a rota anaeróbica e a aeróbica.

Figura 2. 7. Possíveis rotas para a bioativação de compostos nitrofurânicos (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009).

Na rota anaeróbica, observa-se que o processo de biorredução do grupo nitro ocasiona o acúmulo do radical nitroânion, que é, em seguida, transformado no derivado nitroso correspondente. A etapa final deste processo ocorre por meio da formação do derivado amino. O radical $\text{Ar-NO}_2^{\cdot-}$ e o derivado hidroxilamina (Ar-NHOH) podem interagir com o DNA celular, resultando nos efeitos biológicos observados (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009). Todavia, acredita-se que outros

intermediários também apresentem atividade biológica, entre eles, a toxicidade ao DNA supostamente causada pelo radical $\text{Ar-NO}_2\text{H}^\cdot$ e a inativação enzimática desempenhada pelo derivado nitroso (Ar-NO), agindo como aceitor de grupos tióis de enzimas detoxificantes. Já na rota aeróbica, o radical nitroânion formado interage com o oxigênio presente no meio resultando em ânions superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), que sofrem ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SREIDER, GRINBLAT, STOPPANI, 1990). O acúmulo deste último pode desestruturar membranas biológicas, além de proporcionar a formação, por sua reação com enzimas ferredoxinas, de radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) que, ao reagirem com macromoléculas celulares, resultam em danos biológicos como lesão da membrana, inativação enzimática e mutagênese (VIOUÉ *et al.*, 1999; TOCHER, 1997).

2.3.2 Compostos 5-nitro-heterocíclicos análogos à nifuroxazida

O surgimento de sucedâneos mais ativos e menos tóxicos na década de 1960 provocou declínio na utilização da nifuroxazida, ou *5-nitro-2-furfurilideno-4-hidroxibenzidrazida*, em medicina humana. No Brasil, entretanto, a nifuroxazida ainda é encontrada em apresentação para uso humano, comercializada com o nome Passifuril® (DEF, 2010). Estudos relacionados ao efeito genético *in vitro* da nifuroxazida mostraram que esse composto desempenhou atividade mutagênica em algumas cepas de *Salmonella typhimurium*, mas não em células de mamíferos (DAYAN, DEGUINGAND, TRUZMAN, 1985). Afastada a suspeita de atividade mutagênica da nifuroxazida sobre células humanas, aliada ao fato desse fármaco apresentar amplo espectro de atividade, novo interesse tem sido despertado em relação à utilização desse agente antimicrobiano. Além disso, devido à crescente incidência de fenômenos relacionados à resistência microbiana frequentemente detectados em ambientes hospitalares do mundo todo, e atualmente na comunidade (WALSH, AMYES, 2004; DESAI *et al.*, 2003; MCDONALD *et al.*, 2003), considera-se como alternativa extremamente viável a tentativa de aprimoramento do perfil antimicrobiano da nifuroxazida, uma vez que este fármaco possui baixa capacidade de indução à resistência bacteriana (DAYAN, DEGUINGAND, TRUZMAN, 1985) e apresenta estrutura química que favorece modificações moleculares por meio do

planejamento racional de fármacos. Dessa forma, a nifuroxazida torna-se um composto-líder para o desenvolvimento de novos análogos.

Estudos direcionados para a otimização da atividade biológica, ou mais especificamente, atividade antibacteriana da nifuroxazida, vem sendo desenvolvidos buscando encontrar, de maneira adequada, alternativas viáveis para o tratamento de infecções com caráter de multirresistência. El-Obeid e colaboradores (1985) determinaram o CIM de quatro derivados 5-nitrofurânicos com estrutura análoga à nifuroxazida frente a diferentes enterobactérias, observando amplo espectro de atividade destes compostos e valor de CIM relativamente baixo.

Alguns pesquisadores (VÉGH, KOVÁČ, DANDÁROVA, 1980; THEUS, 1968a; THEUS, 1968b) passaram a explorar possíveis potencialidades de derivados nitrotiofênicos, particularmente os 5-nitrotiofenos, estando algumas delas relacionadas às atividades bacteriostática e fungistática desses compostos. Theus (1968b) observou que alguns derivados tiofênicos apresentaram atividades bacteriostática e fungistática com graus de eficácia variando entre bom e ótimo. A grande descoberta desse estudo, porém, consistiu na contraposição aos dados até então encontrados em literatura, os quais revelavam que os derivados nitrotiofênicos eram muito menos ativos que os nitrofurânicos. Theus, todavia, constatou que a maioria dos derivados nitrotiofênicos analisados apresentou atividade antimicrobiana superior em relação aos nitrofurânicos correspondentes. Tavares e colaboradores (TAVARES *et al.*, 1999a,b; TAVARES, AMARAL, 1991) mostraram em estudos envolvendo modificações estruturais planejadas na molécula da nifuroxazida, que substituições da hidroxila fenólica por grupos retiradores de elétrons e do anel furânico por tiofênico favoreceram significativamente a atividade antimicrobiana. Foi verificado, ainda, que a substituição do anel furânico por tiofênico favoreceu significativamente a referida atividade para os compostos *p*-acetil substituídos, cujo valor de CIM para o derivado tiofênico mostrou-se cerca de quatro vezes menor que o determinado para o derivado furânico. Além disso, foi constatada para aquele uma potência seis vezes maior que a da nifuroxazida, indicando, portanto, o caráter promissor desta série de compostos para aplicação de estudos mais aprofundados (MASUNARI *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 1999a). Masunari e Tavares (2007) sintetizaram, identificaram e testaram 14 derivados tiofênicos contra cepas padrão e cepas multirresistentes de *S. aureus*, conforme Figura 2.8A. Os resultados sugerem

que estes micro-organismos não desenvolveram mecanismos de resistência a esta classe de compostos, revelando o potencial de análogos da nifuroxazida como alternativas para o desenvolvimento de novos fármacos visando ao tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes deste patógeno.

Jorge e colaboradores (2009), nesse mesmo grupo, sintetizaram, identificaram e testaram 14 derivados benzofuroxânicos, os quais possuíam o sistema nitrofurânico substituído por um benzofuroxano (benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol-N-óxido), contra cepas padrão e cepas multirresistentes de *S. aureus*, incluindo cepas VISA. A estrutura destes compostos pode ser visualizada na Figura 2.8B. Os resultados indicaram que a atividade antimicrobiana dos compostos em estudo é influenciada pela posição 4 no anel benzênico, havendo relação direta entre atividade antibacteriana e hidrofobicidade.

Figura 2. 8. Estrutura de análogos da nifuroxazida desenvolvidos ao longo dos anos. **A.** Derivados furfurilidênicos e tiofilidênicos. **B.** Derivados benzofuroxânicos (MASUNARI *et al.*, 2003; TAVARES *et al.*, 1999a; JORGE *et al.*, 2009).

Com a comprovação das atividades bacteriostática dos análogos 5-nitrofurânicos, 5-nitrotiofênicos e outros ao longo de três décadas, aliada a estudos mais aprofundados para maior entendimento do mecanismo de ação desses análogos, acredita-se que o desenvolvimento de novos fármacos baseados em estudos de modificação molecular planejada daqueles, constitui-se, atualmente, em alternativa extremamente viável para a seleção de candidatos que sejam ativos contra bactérias multirresistentes. Com a conclusão do planejamento, síntese, caracterização e avaliação da atividade de determinadas séries de compostos 5-

nitro-heterocíclicos frente a cepas MRSA, faz-se necessária, como etapa primordial e subsequente no processo de desenvolvimento de um fármaco para o tratamento destas infecções, a análise dos processos que governam sua farmacocinética, objetivando-se, principalmente, à possível administração por via oral.

2.4 O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E A FARMACOCINÉTICA

Inicialmente, a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos seguia o processo tradicional (Figura 2.9), que consistia em testes de atividade (P) sendo realizados por meio de inúmeros ensaios biológicos de triagem *in vivo*, utilizando-se compostos sintetizados em processos que envolviam muitas etapas e enorme dispêndio de tempo. Os compostos promissores eram selecionados, sendo suas propriedades farmacocinéticas, metabolismo e potencial citotóxico investigados posteriormente à sua atividade (NORINDER, BERGSTRÖM, 2006).

Figura 2. 9. Os caminhos tradicional (esquerda), de transição (centro) e racional (direita) para o desenvolvimento de um novo fármaco. Adaptado de NORINDER, BERGSTRÖM, 2006.

No início da década de 1980, houve rápida evolução nos campos da química combinatória e da robótica, o que tornou possível a síntese de quimiotecas de compostos a partir de uma mesma reação química, e da triagem utilizando ensaios *in vitro* miniaturizados em larga escala (HTS, do inglês *High-throughput screening*), que permitiram a investigação da atividade destas substâncias por meio de ensaios baseados em interações ligante-biomacromolécula alvo. Estas tecnologias criaram ambiente propício para acelerar o processo de descoberta de novos fármacos, permitindo a síntese e a triagem de grandes conjuntos de compostos em curtos períodos de tempo. Tais esforços, no entanto, não foram suficientes para aumentar o número de novos fármacos introduzidos no mercado e muitos dos novos compostos identificados sequer chegam aos testes pré-clínicos. Entre as falhas avaliadas, 40 a 60% são atribuídas a deficiências na farmacocinética e problemas com toxicidade (SONG, LIMAND, TONG, 2009), uma vez que um composto pode, por exemplo, ser viável com base em testes de atividade, mas devido à agregação, solubilidade ou absorção limitada, não é útil como fármaco (JÓNSDÓTTIR, JØRGENSEN, BRUNAK, 2005).

Progressivamente, as indústrias farmacêuticas passaram a avaliar a potência dos compostos juntamente com as suas propriedades farmacocinéticas (ADME) e de toxicidade (T), traçando um perfil completo para a seleção de um candidato a fármaco, auxiliando a reduzir fracassos e a acelerar o desenvolvimento bem sucedido de novas moléculas no chamado caminho de transição (Figura 2.9) (SONG, LIMAND, TONG, 2009). A avaliação ADMET de um grande número de compostos nas etapas iniciais do processo de descoberta de um novo fármaco tornou-se possível pelo desenvolvimento de ensaios *in vitro* HTS de solubilidade, por exemplo, os turbidométricos, pelos ensaios de permeabilidade com células Caco-2, células MDCK (do inglês *Martin-Darby Canine Kidney*), ou PAMPA (do inglês *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), por exemplo, e pelos ensaios de metabolismo com hepatócitos, frações S9 e enzimas recombinantes.

Atualmente, o processo de descoberta e desenvolvimento de novas entidades químicas (NCEs, do inglês *New Chemical Entities*) consome investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) da ordem de milhões de dólares (US\$) e envolve décadas de trabalho de equipes multidisciplinares. Estima-se gasto entre US\$ 500 milhões e 1 bilhão e cerca de 15 anos, desde a concepção do projeto até a

última fase de pesquisa clínica, podendo alcançar, em alguns casos, valores superiores a US\$ 1 bilhão (WERMUTH, 2003; FEE, 2007, LOMBARDINO, LOWE III, 2004). Para alcançar as exigências de produtividade impostas pelos elevados níveis de investimentos em P&D de fármacos, as maiores indústrias farmacêuticas do mundo têm adotado como uma de suas principais estratégias o investimento em novas tecnologias e inovação para a descoberta de NCEs, com o objetivo de realizar testes de triagem o quanto antes e de forma mais racional, minimizando custos e tempo. No caminho racional (Figura 2.9), quimiotecas virtuais são avaliadas por meio de diferentes modelos computacionais (*in silico*) para propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e de toxicidade, sendo uma delas ou mais selecionadas para síntese e testes experimentais *in vitro* e posteriormente *in vivo*, aumentando as chances de identificação de NCEs com propriedades adequadas (YAMASHITA, HASHIDA, 2004).

É importante salientar que as previsões *in silico* não substituem nem desqualificam os testes experimentais. Ao contrário, conforme ilustrado na Figura 2.10, o objetivo daquelas é trabalhar em parceria com estes. O ponto forte dos métodos *in silico* é servir como ferramenta de decisão, juntamente com outras evidências científicas relevantes (VALERIO, 2009). Portanto, ensaios de farmacocinética experimentais, *in vitro* e *in vivo*, são e serão sempre indispensáveis para a avaliação de um novo candidato a fármaco (WESTERHUIS *et al.*, 1998; CRUCIANI, 2006), sendo requeridos para validar o modelo *in silico* proposto (ROBERTS, 2001).

Figura 2. 10. Aplicação de métodos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* nos vários estágios da descoberta de um fármaco. Adaptado de GOODWIN, CLARKE, 2005.

2.5 PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS

Apesar das grandes inovações nas últimas décadas nas formas de liberação de fármacos, a via oral é a rota de administração mais empregada para a maioria dos novos compostos desenvolvidos. A via oral é preferida devido à conveniência, ao baixo custo e à alta adesão quando comparada com outras vias de administração (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000).

Para que um fármaco seja eficaz após sua administração oral, parte significativa da dose administrada inalterada deve atingir a circulação sistêmica. A biodisponibilidade oral, muitas vezes considerada sinônimo de absorção oral, é definida como a porcentagem da dose inalterada que alcança a circulação sistêmica

após administração oral, e é resultado de um processo complexo que envolve várias etapas e diferentes mecanismos, conforme ilustrado na Figura 2.11.

Figura 2. 11. Representação esquemática do transporte de fármacos a partir de uma forma farmacêutica sólida (FFS) para a circulação sistêmica. A dissolução e a permeação através da membrana intestinal influenciam a absorção do fármaco. Adaptado de AMIDON, 2008.

Nos últimos anos foram realizados progressos na compreensão deste processo, especialmente por meio da identificação de parâmetros físico-químicos essenciais e das principais proteínas de transporte, que levaram a melhores previsões sobre a magnitude em que um composto é absorvido e quais os fatores determinantes de sua absorção (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; NORINDER, BERGSTRÖM, 2006). Especificamente para os fármacos, podem ser destacados como principais fatores impactantes na absorção as características de solubilidade, que podem ser afetadas pela composição dos líquidos fisiológicos do trato gastrointestinal, como suco gástrico, sais biliares e líquidos intestinais; a precipitação no local de absorção; a adsorção do fármaco aos compostos presentes no lúmen; a degradação química ou bacteriana; a degradação na própria parede do trato gastrointestinal (TGI) e os múltiplos mecanismos de transportes que determinam as rotas de absorção através do epitélio intestinal (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

A solubilidade e a permeabilidade de um fármaco são consideradas as propriedades mais importantes para sua absorção e a influência de ambas na biodisponibilidade tem recebido considerável atenção. Primeiro, um fármaco deve dissolver-se no meio aquoso no local de absorção, e então, em uma segunda etapa, ele deve ser translocado através da barreira intestinal para o sangue (KELDENICH, 2009). Enquanto a solubilidade de um fármaco pode ser geralmente modificada com o uso de formulação adequada, as possibilidades para melhorar a permeabilidade através da membrana intestinal são mais limitadas. É, portanto, crucial desenvolver um composto cuja estrutura garanta uma permeabilidade suficientemente elevada, ou que, pelo menos as substâncias com permeabilidade reduzida sejam eficientemente identificadas nas etapas iniciais do desenvolvimento de um fármaco.

Após a dissolução, um fármaco encontra várias barreiras sequenciais durante o transporte do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, como a camada de muco, a camada de água imperturbável e a camada de células epiteliais. Assume-se que a permeação através da barreira de células epiteliais seja a etapa limitante deste processo (ARTURSSON, KARLSSON, 1991). Essa barreira consiste na camada de enterócitos que se ligam uns aos outros por interações proteína-proteína formando junções oclusivas (do inglês *tight junctions*), separando a luz intestinal da corrente sanguínea. Os principais parâmetros fisiológicos desta barreira são a sua capacidade de oclusão, a espessura da camada de muco protegendo a camada de células a partir do conteúdo do lúmen, e a expressão de enzimas metabolizadoras e transportadores no enterócito (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009; KELDENICH, 2009).

Há muitos mecanismos conhecidos de transporte pela barreira intestinal, dentre eles, o transporte passivo paracelular, o transporte passivo transcelular, o transporte mediado por carregadores no sentido absorptivo ou secretório e o transporte por vesículas, conforme exposto na Figura 2.10 (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

O principal mecanismo de absorção através do epitélio intestinal é a difusão passiva, que é regida pelo gradiente de concentração. A difusão passiva pode ocorrer entre as junções celulares (transporte paracelular) ou através do citoplasma (transporte transcelular) (LI, 2001). O transporte paracelular geralmente ocorre com

fármacos catiônicos (KARLSSON *et al.*, 1999). Fármacos hidrofílicos e de pequeno a moderado tamanho, como atenolol e furosemida, podem permear o epitélio intestinal por esta via em quantidade significativa, principalmente na porção superior do intestino delgado, onde o transporte via paracelular é mais intenso do que nas porções inferiores do intestino e cólon (ARTURSSON, UNGELL, LOFROTH, 1993). Fármacos que utilizam exclusivamente a via paracelular para sua permeação podem ser considerados como de absorção incompleta, uma vez que os poros intercelulares representam apenas 0,01 a 0,1% da área absorptiva total do intestino. Além desse fator, as regiões apicais e basolaterais dos espaços intercelulares são separadas pelas junções oclusivas, que constituem barreira contra a passagem de substâncias indesejadas pelos poros entre as células justapostas (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

Figura 2. 12. Mecanismos de transporte através da membrana intestinal: a) permeabilidade passiva transcelular; b) transporte mediado por carregadores de membrana; c) permeabilidade passiva paracelular; d) transporte vesicular. Nas letras (e) e (f) estão representados dois mecanismos que impedem a absorção intestinal, sendo: e) transporte mediado por carregadores de excreção e em f) enzimas metabolizadoras (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

O transporte transcelular passivo é caracterizado pela passagem do fármaco através da membrana celular sem que ocorra gasto energético, ocorrendo a penetração do fármaco pela membrana apical, seguida pela sua difusão através do citoplasma, e subsequente permeação pela membrana basolateral. Muitos estudos sugerem que a maioria dos fármacos completamente absorvidos é transportada pela via transcelular. A difusão de moléculas pequenas pelo citoplasma é um processo

normalmente rápido, sendo a passagem pela membrana o fator limitante para este transporte. Para que a difusão na membrana seja eficiente, o fármaco deve ser suficientemente lipofílico e com moderado peso molecular (STENBERG *et al.*, 2000).

Em adição à difusão passiva, alguns fármacos são ativamente transportados por carregadores específicos, processo que requer gasto de energia. O transporte mediado por carregadores é saturável, podendo resultar em farmacocinética não linear para fármacos permeados exclusivamente por um único tipo de transportador. Dentre os transportadores atualmente conhecidos, pode ser destacado o transportador de oligopeptídeos acoplados ao canal de hidrogênio (PepT1, do inglês *Peptide Transporter 1*), que é abundantemente encontrado no intestino delgado e participa da absorção de antibióticos betalactâmicos, inibidores de renina e inibidores da enzima conversora da angiotensina (TSUJI, TAMAI, 1996). Outros transportadores de interesse na absorção de fármacos são os transportadores de cátions orgânicos (OCTN2, do inglês *Carnitine/organic cation transporter*), responsáveis pela absorção de cátions como tetrametilamônio e dos fármacos valproato e verapamil (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009), e os membros da família de transportadores de ácidos orgânicos e peptídeos (OATP, do inglês *Organic anion-transporting polypeptide*).

Uma importante característica do epitélio intestinal é o efluxo de algumas substâncias que entram no citoplasma das células da mucosa. A absorção oral de uma variedade de fármacos pode ser limitada pela expressão de transportadores pertencentes à família ABC (do inglês *ATP Binding Cassete*), presentes na superfície das células epiteliais. Alguns destes transportadores, como a proteína de resistência a múltiplos fármacos, MDR1 (do inglês *Multidrug Resistance Protein 1*) ou glicoproteína-P (ABCB1), a proteína associada à resistência de múltiplos fármacos, MRP2 (do inglês *Multidrug Resistance-Associated Protein 2*) (ABCC2) e a proteína associada à resistência ao câncer de mama, BCRP (do inglês *Breast Cancer Resistance Protein*) (ABCG2) são capazes de causar efluxo de fármacos para o lúmen intestinal (CHAN, LOWES, HIRST, 2004; SCHINKEL, JONKER, 2003). Os substratos da glicoproteína-P (P-gp), como a vimblastina, entram nas células da mucosa intestinal via difusão passiva, sendo uma porção destes transportada para fora da célula e para dentro do lúmen intestinal. A inibição da P-gp com verapamil, aumentaria, portanto, a absorção intestinal dos substratos deste transportador (LI,

2001). Elevados níveis de P-gp podem limitar diretamente a absorção oral, além de ocasionar variabilidade e não linearidade dos parâmetros farmacocinéticos. Uma grande variedade de fármacos é, em maior ou menor grau, substrato para a P-gp, como a vincristina, a vimblastina, a lamivudina, a zidovudina, o paclitaxel, entre outros (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009). A BCRP foi recentemente descoberta e tem sido estudada como importante transportador de efluxo no epitélio intestinal. Sendo expressa no intestino e fígado, assim como a P-gp, atua como uma barreira à absorção e limita a biodisponibilidade oral de agentes quimioterápicos, derivados do estrogênio, ânions orgânicos, entre outros, podendo também atuar na excreção hepatobiliar destes compostos (JONKER *et al.*, 2000; MAO, UNADKAT, 2005).

O transporte vesicular ou endocitose é o processo pelo qual as células vivas absorvem ativamente materiais através das membranas celulares, por meio de formação de vesículas. Existem três formas principais de endocitose: a fagocitose, que consiste na ingestão de partículas grandes ou células através de expansões citoplasmáticas chamadas pseudópodos; a pinocitose, que é um processo contínuo de ingestão de fluidos e moléculas por meio da formação de pequenas vesículas na membrana celular; e a endocitose mediada por receptor, que consiste na ligação de uma molécula extracelular a um receptor na membrana celular, sendo geralmente relevante para permeação de macromoléculas pela mucosa (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

Devido à baixa absorção e/ou biodisponibilidade da NCE avaliada, a etapa de estudos clínicos no desenvolvimento de novos fármacos, a mais onerosa de todo o processo, é, muitas vezes, interrompida. Dessa forma, há grande necessidade de se desenvolver métodos experimentais e teóricos para prever as propriedades biofarmacêuticas com antecedência, em especial a permeabilidade através do epitélio intestinal, identificando e descartando candidatos não promissores o mais rápido possível e, também, desenvolvendo novos análogos (VENKATESH, LIPPER, 2000).

Desde a década de 1950, diversas técnicas de determinação da permeabilidade vem sendo aprimoradas com o objetivo de se obter resultados mais correlacionáveis ao que ocorre no complexo processo de absorção *in vivo*. O método

mais preciso para a determinação da absorção intestinal de fármacos é aquele em que se determina o seu desaparecimento a partir do trato gastrointestinal e, posteriormente, o seu aparecimento no sangue do sistema hepático-portal. Estes métodos oferecem informações sobre a fração do fármaco absorvida através da parede intestinal e, eventualmente, sobre a quantidade dessa fração que é metabolizada no decurso do processo de absorção (AMIDON, SINKO, FLEISHER, 1998, STEWART *et al.*, 1995).

As técnicas atualmente empregadas para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos englobam métodos *in vivo*, que durante a fase de desenvolvimento pré-clínico empregam com maior frequência estudos realizados em camundongos, ratos e cães, sendo possível a obtenção da influência de parâmetros tais como esvaziamento gástrico, presença de alimentos e motilidade intestinal sobre a absorção; métodos *in situ*, que envolvem a perfusão da substância de interesse geralmente por segmentos intestinais de ratos ou coelhos, para estudar, por exemplo, a permeabilidade e a cinética de absorção; métodos *in vitro*, baseados em tecido animal, como intestino invertido, segmentos intestinais ou vesículas isoladas de membranas, baseados em células, como Caco-2, MDCK, entre outras e baseadas em membranas artificiais, como PAMPA; e métodos *in silico*, que são métodos computacionais que empregam dados de lipofilicidade, peso molecular, solubilidade, capacidade de formar ligações de hidrogênio, tamanho molecular, e outras propriedades em estudos de QSAR, redes neurais artificiais (ANN, do inglês *Artificial Neural Networks*) ou outras formas de análise de dados, como máquinas de vetor de suporte (SVM, do inglês *Support Vector Machines*) (LOGAN, 2003; KELDENICH, 2009; STENBERG, LUTHMAN, ARTURSSON, 2000).

Todos os métodos descritos anteriormente podem ser usados isoladamente ou em conjunto, sendo a determinação das características de permeabilidade, por meio de métodos que permitam rápidas e eficientes triagens nos estágios iniciais do desenvolvimento de um fármaco, um fator imprescindível para a diminuição de falhas, tempo e recursos investidos, tornando-se uma abordagem bastante promissora e intensamente utilizada por diversas indústrias farmacêuticas e grupos de pesquisa.

2.5.1 Técnicas *in vitro* para a avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos

Apesar dos experimentos *in vivo* serem capazes de fornecer resultados em relação à absorção de modo mais abrangente, têm alto custo e podem ser potencialmente danosos aos voluntários. Dessa forma, a permeabilidade só pode ser determinada para um limitado número de fármacos bem caracterizados. Nas etapas iniciais de desenvolvimento de um fármaco, todavia, há inúmeros compostos pouco caracterizados a serem analisados. Os estudos podem ser realizados em animais ao invés de humanos, porém, os custos destes experimentos ainda são altos e seu rendimento baixo, restringindo severamente sua capacidade. Algumas técnicas mais simples *in situ* também são extensivamente empregadas e tornaram-se importante ferramenta para a previsão da absorção intestinal de candidatos a novos fármacos (MAKHEY *et al.*, 1998; MARIAPPAN, SINGH, 2004). Todavia, por razões éticas relacionadas à exposição de animais e humanos nestes estudos, assim como ocorre com os estudos *in vivo*, e pela alta complexidade na sua condução, esse tipo de abordagem é utilizado com menor frequência (GUANGLI, YIYU, 2006).

Como alternativa aos estudos *in vivo* e *in situ*, numerosos métodos *in vitro*, que possuem capacidade de previsão muito maior que os métodos *in vivo* e *in situ*, têm sido usados no processo de avaliação de grandes quimiotecas, determinando as características dos compostos e mecanismos de permeabilidade epitelial, e selecionando aqueles que apresentam elevado potencial para a absorção intestinal (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000). As técnicas *in vitro* empregadas para os estudos de permeabilidade têm menor custo e envolvem menos recursos quando comparadas aos estudos em animais e seres humanos nas primeiras etapas do desenvolvimento de um novo fármaco. Além disso, estes métodos permitem um entendimento fundamental das diversas etapas do processo de absorção (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; GUANGLI, YIYU, 2006). Uma questão universal em relação aos sistemas *in vitro*, todavia, é a impossibilidade de se incorporar o efeito de fatores fisiológicos como a velocidade de esvaziamento gástrico, a velocidade de trânsito gastrintestinal e o pH gastrintestinal na interpretação dos dados (HIDALGO, 2001; GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

Cada método *in vitro* possui vantagens e desvantagens. Baseando-se nos objetivos específicos dos estudos, um destes métodos ou mais podem ser usados como ferramenta de triagem para selecionar compostos durante o processo de desenvolvimento de um fármaco (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000). A técnica *in vitro* de escolha deve ser suficientemente simples na execução, com resultados de fácil interpretação, apresentando limites bem estabelecidos e deve representar o mais fielmente possível as condições encontradas *in vivo*, sendo fundamental mimetizar as potenciais barreiras para a absorção relacionadas às condições fisiológicas, tais como o gradiente de pH e ligação às proteínas, entre outros. Adicionalmente, em sua execução, os métodos devem requerer quantidades reduzidas do composto a ser avaliado, uma vez que nos estágios iniciais de desenvolvimento, esses são obtidos em pequenas quantidades. Além disso, os métodos devem ser reprodutíveis, de rápida execução e de baixo custo (HIDALGO, 2001).

A seguir serão abordados alguns modelos *in vitro* utilizados para determinação da absorção de fármacos administrados por via oral.

(1) Métodos baseados em membranas artificiais: Como muitos fármacos são absorvidos por difusão passiva, informações relevantes a respeito da permeabilidade através do epitélio do TGI podem ser obtidas a partir de experimentos realizados sem o emprego de materiais vivos. Estes métodos baseiam-se nos parâmetros físicos-químicos de um fármaco, como sua solubilidade, peso molecular, carga e polaridade de superfície e flexibilidade conformacional, assim como os coeficientes de partição (log P) ou o coeficiente de distribuição (log D), que se referem à partição da substância a partir de uma fase aquosa para a fase lipídica (BURTON *et al.*, 1996, WILS *et al.*, 1994, PALM *et al.*, 1997, CAMENISCH *et al.*, 1998, AVDEEF, 2001). A membrana artificial mais conhecida e utilizada nos experimentos dessa natureza é a PAMPA, que foi inicialmente introduzida por KANSY e colaboradores (1998). Esta técnica é baseada na formação de uma bicamada de fosfolipídeos em solução de dodecano impregnada entre duas membranas semipermeáveis com espessura e dimensões de poros bem estabelecidas, formando, desta forma, dois compartimentos: o doador, onde se adiciona o fármaco em solução e o receptor, onde se quantifica a fração do fármaco que foi capaz de atravessar a bicamada lipídica formada. Este método é muito utilizado para avaliar a permeabilidade

transcelular passiva, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento de NCEs (AVDEEF, 2001).

(2) **Métodos biológicos *in vitro*:** Com estes métodos, é possível manter condições mais próximas possíveis do que ocorre *in vivo*, possibilitando a avaliação dos diferentes mecanismos de absorção (difusão passiva transcelular e paracelular e transporte ativo).

O método biológico *in vitro* mais simples é aquele que emprega frações sub-celulares, como, por exemplo, vesículas de membranas de tecido intestinal, que são obtidas por isolamento dos constituintes teciduais do epitélio intestinal. Esta técnica é utilizada em estudos mecanísticos da interação de enzimas ou acoplamento a elementos durante o processo de transporte (UNGELL, 1997).

Outras técnicas biológicas *in vitro* amplamente empregadas nos estudos de permeabilidade são aquelas que empregam a extração de fragmentos de tecidos intestinais de animais, como os anéis intestinais, a perfusão em segmentos intestinais e os sacos intestinais invertidos (SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007). Estes métodos *in vitro* que empregam tecidos, todavia, apresentam como desvantagens a falta de sangue e nervos, causando a reduzida viabilidade dos tecidos, além da dificuldade de preparação, que pode ocasionar danos morfológicos (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; COOK, SHENOY, 2003, SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

Vários modelos baseados em culturas celulares para determinação da permeabilidade intestinal *in vitro* tem sido desenvolvidos e atualmente adquiriram grande popularidade. Dentre eles, destacam-se aqueles que empregam as células Caco-2 e as células MDCK, as quais têm sido amplamente utilizadas como ferramentas de triagem nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos (ARTURSSON, KARLSSON, 1991; BALIMANE, CHONG, 2005; IRVINE *et al.*, 1999; LENTZ *et al.*, 2000).

As células Caco-2 têm sido as mais extensivamente caracterizadas e utilizadas como modelo celular no campo da permeabilidade e absorção de fármacos (BALIMANE, CHONG, 2005). São oriundas de um adenocarcinoma de colón humano e foram primeiramente isoladas e cultivadas *in vitro* em 1977 por Fogh

e colaboradores, sendo inicialmente utilizadas na investigação dos mecanismos tumorais das células cancerígenas e nos estudos sobre a terapia antineoplásica (PINTO *et al.*, 1983).

Nos últimos anos houve o crescente emprego de células Caco-2 nos ensaios de permeabilidade e absorção de fármacos, tendo muitos estudos sido realizados com o objetivo de avaliar a conformidade entre os dados obtidos *in vitro* e aqueles obtidos com ensaios *in situ* e *in vivo*. Os sistemas de células Caco-2 podem ser usados para avaliar o transporte de fármacos através do citoplasma (transporte transcelular), entre as células (transporte paracelular) e transporte ativo mediado por carregador (LI, 2001). Todavia, este tipo de estudo é mais eficientemente empregado na caracterização da permeabilidade de compostos absorvidos passivamente pela via transcelular, uma vez que as células Caco-2 apresentam variações bastante discutidas quanto à expressão de carregadores de transporte de membranas (BALIMANE, CHONG, 2005). Sabe-se, entretanto, que as células Caco-2 expressam os três principais transportadores de efluxo da família ABC (MDR1 ou P-gp, MRP2 e BCRP), sendo capazes de transportar substratos destas para fora das células, como ocorre *in vivo* (ENGLUND *et al.*, 2006; SEITHEL *et al.*, 2006).

Os modelos *in vitro* de culturas celulares empregando células Caco-2, portanto, auxiliam na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos previamente aos estudos pré-clínicos. Além de serem úteis na obtenção de informações sobre os mecanismos de absorção dos compostos em estudo, podem ser empregados como eficiente ferramenta para identificar compostos com problemas potenciais de solubilidade e permeabilidade, selecionando aqueles com características ótimas de absorção (ARTURSSON, PALM, LUTHMAN, 2001; QUARONI, HOCHMAN, 1996; RUBAS, JEZYK, GRASS, 1993; ARTURSSON, BORCHARD, 1997; LENTZ *et al.*, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2001; NEUHOFF *et al.*, 2005).

2.5.2 Técnicas *in silico* para a avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos

Os modelos *in vitro* são extremamente úteis na previsão da absorção intestinal de candidatos a novos fármacos. No entanto, um completo entendimento das propriedades moleculares que governam a permeabilidade intestinal é essencial para o desenho de novas quimiotecas. Este entendimento pode ser alcançado pela aplicação de métodos computacionais adequados para estabelecer relações de estrutura-permeabilidade. Além disso, as determinações computacionais não requerem síntese de compostos e podem ser aplicadas em qualquer estágio do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, mesmo para aquelas moléculas não suficientemente solúveis ou estáveis para triagem biológica. Diversos métodos *in silico* com diferentes níveis de complexidade estão disponíveis, cada um sendo mais adequado para cada etapa do processo de descoberta de NCEs (UNGELL, 2004; STENBERG, 2001).

A primeira etapa do desenvolvimento de um modelo para a previsão da permeabilidade através da barreira intestinal é a construção da descrição das moléculas em estudo. Para tanto, são gerados descritores moleculares, ou seja, valores que indicam características moleculares de um dado composto, derivados de um procedimento matemático que transforma informação química em números. As principais classes de descritores são os descritores 1D, que contém alguma informação estrutural ainda que de forma fragmentária, como número de ligações, de átomos e presença de funcionalidades; os descritores 2D, que levam em consideração a conectividade entre os diversos átomos das moléculas, como distância entre átomos, conectividade e número de ligações rotáveis; os descritores 3D, que associam a conectividade à informação referente às coordenadas tridimensionais de cada átomo na molécula, como volume molecular e raio de Van der Waals; e os descritores 4D, que incorporam a variedade espacial das moléculas ao representar cada composto em diferentes conformações, orientações, tautômeros, estereoisômeros ou estados de protonação, como volume do sítio ativo e número de interações intermoleculares (TODESCHINI, CONSONNI, 2009).

A capacidade de um composto em permear através das membranas biológicas é determinada por uma combinação de várias propriedades, incluindo o

volume molecular, sua solubilidade em água, grau de ionização (pKa), número de ligações de hidrogênio, lipofilicidade (log P), área de superfície polar (PSA, do inglês *Polar Surface Area*), que é a medida ou estimativa da interação de um composto com o ambiente ou meio polar, e propriedades quânticas, como o orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*), que descreve a densidade eletrônica deste orbital de fronteira em cada átomo (SONG, LIMAND, TONG, 2009). Em geral, moléculas pequenas, hidrofílicas e/ou carregadas, que não podem permear a membrana celular lipofílica, difundem através de poros aquosos. Todavia, é amplamente aceito que as moléculas possam atravessar membranas na sua forma ionizada, além de sua forma neutra, como se presume pela teoria de partição do pH (WATERBEEMD, 2009). Moléculas maiores, com grande número de doadores e aceitadores de ligação de hidrogênio, por vezes em combinação com elevada lipofilicidade, podem utilizar os processos ativos e proteínas de transporte para atravessar as células. No entanto, estas últimas propriedades também aumentam o risco de que o composto seja transportado por proteínas de efluxo, resultando na secreção do composto de volta para o lúmen intestinal, o que resulta em menor concentração de fármaco que alcança o sítio de ação (NORINDER, BERGSTRÖM, 2006). Como os modelos de permeabilidade são geralmente descritos como modelos de transporte passivo transcelular, os descritores de lipofilicidade, hidrofílicidade e tamanho têm extrema importância. Adicionalmente, a PSA mostrou-se boa preditora para conjuntos de dados menos complexos (KRARUP *et al.*, 1998; PALM *et al.*, 1997; PICKETT, MCLAY, CLARK, 2000).

A lipofilicidade é o elemento-chave em muitos processos ADMET envolvendo o transporte de membrana (absorção e distribuição), mas também influencia a interação com enzimas metabolizadoras e transportadores. O conceito de lipofilicidade é baseado em uma correlação simples da concentração do soluto em fase orgânica e em fase aquosa. O coeficiente de partição calculado, Clog P (GHOSE, VISWANADHAN, WENDOLOSKI, 1998), na faixa de pH ideal (pH estomacal entre 1 e 2 e pH intestinal igual ou próximo a 6,5) pode levar a melhores simulações de absorção no trato gastrointestinal. Relata-se que a PSA correlaciona-se inversamente com a capacidade de penetração lipídica (SONG, LIMAND, TONG, 2009). A PSA foi originalmente proposta para estimar a penetração pela barreira

hematoencefálica (BHE), mas também se apresenta como propriedade adequada para a previsão da absorção oral e permeabilidade de membranas em geral. Como simples estimador para a capacidade de ligação de hidrogênio de uma molécula, a PSA se tornou um dos indicadores mais utilizados no desenho de novos medicamentos (WATERBEEMD, 2009). Entretanto, a complexidade do mecanismo de absorção de fármacos e a introdução de bancos de dados com grande diversidade estrutural nos modelos ressaltou a necessidade de empregar vários descritores e análises multivariadas para se obter modelos mais adequados.

A partir do cálculo dos descritores moleculares, inicia-se o desenvolvimento do modelo de previsão da permeabilidade intestinal, que pode ser dividido em métodos de reconhecimento de padrões (ou de classificação) e métodos de calibração (ou regressão). Estes dois tipos de modelo são construídos com diferentes abordagens, permitindo diferentes tipos de previsão.

Os métodos de reconhecimento de padrões ou de classificação são desenvolvidos pela análise de grupos de compostos, identificando semelhanças e diferenças estruturais (STENBERG, 2001). Quando se sabe *a priori* quais amostras são semelhantes e quais são diferentes para encontrar os critérios de classificação, os métodos empregados são denominados supervisionados, como a modelagem independente flexível por analogia de classe (SIMCA, do inglês *Soft Independent Modeling of Class Analogy*). Quando não se faz uso de informação a respeito das classes existentes entre as amostras, os métodos são chamados de não supervisionados, como a PCA (NETO, MOITA, 1998).

O modelo computacional mais amplamente utilizado para a estimativa qualitativa da absorção intestinal é a "Regra dos Cinco" de Lipinski e colaboradores (1997). Este modelo foi desenvolvido por meio da análise de uma série de compostos na fase II de ensaios clínicos e a identificação de 4 descritores e seus respectivos limites para a maioria dos compostos avaliados. De acordo com o modelo, que considera apenas o transporte passivo transcelular intestinal, para um composto ser absorvido quando administrado pela via oral, ele deve apresentar: (1) No máximo 5 ligações doadoras de hidrogênio (átomos de nitrogênio ou oxigênio com um ou mais átomos de hidrogênio); (2) $\text{ClogP} \leq 5$; (3) Massa molecular ≤ 500 g/mol; (4) No máximo 10 ligações aceptoras de hidrogênio (átomos de nitrogênio ou

oxigênio). Caso dois ou mais destes limites sejam excedidos, o composto em questão será considerado não promissor como fármaco. A Regra dos Cinco possui grande relevância e evidencia a importância da lipofilicidade na atividade farmacológica e no planejamento racional de fármacos, sendo muitas vezes usada como primeiro filtro para a avaliação ADMET *in silico*. Cabe ressaltar, contudo, que esta não é uma regra absoluta, pois para algumas classes de fármacos esses preceitos não são válidos, sendo necessário desenvolver modelos mais elaborados (TETKO, OPREA, 2008).

Os métodos de calibração ou regressão estão entre os mais relevantes na avaliação do perfil farmacocinético de quimiotecas (LEACH, 2001). Estes métodos são aplicados para modelar a correlação entre dados medidos ou calculados independentemente (matriz **X**) e alguma propriedade (vetor **y**, variável dependente) do conjunto de amostras sob investigação, que pode ser, por exemplo, a permeabilidade intestinal. Eles têm sido desenvolvidos relacionando a permeabilidade experimental *in vivo*, *in situ* ou *in vitro* a um ou mais descritores moleculares. Estas relações podem ser derivadas pelo emprego de diversos métodos, como procedimentos baseados em algoritmos genéticos (GA, do inglês *Genetic Algorithms*), redes neurais artificiais (ANNs, do inglês *Artificial Neural Networks*), máquinas de vetor de suporte (SVM, do inglês *Support Vector Machines*) e modelos estatísticos de regressão. Estes métodos de derivação têm sido amplamente utilizados para prever a solubilidade aquosa e a absorção intestinal humana, assim como para prever a permeabilidade através de células Caco-2 (EGAN, MERZ, BALDWIN, 2000; FUJIWARA, YAMASHITA, HASHIDA, 2002; NORINDER, OSTERBERG, ARTURSSON, 1999; WESSEL *et al.*, 1998).

Uma das abordagens mais utilizadas nas últimas décadas na área de desenvolvimento de novos fármacos são os estudos de relação quantitativa estrutura-atividade tridimensional (3D-QSAR, do inglês *3D Quantitative Structure-Activity Relationships*), nos quais os descritores moleculares possuem natureza tridimensional, sendo a forma, o tamanho e as propriedades eletrônicas, as características mais importantes na determinação da atividade de compostos bioativos. Estes estudos passaram a apresentar maior impacto e aplicabilidade a partir da introdução do programa computacional CoMFA (do inglês *Comparative Molecular Field Analysis*) por Cramer e colaboradores no final da década de 80

(CRAMER, DE PRIEST, PATTERSON, 1993; CRAMER, PATTERSON, BUNCE, 1988). Muitos métodos de QSAR-3D, entretanto, baseiam o cálculo de propriedades moleculares no alinhamento dos compostos no espaço, fazendo com que este parâmetro exerça papel fundamental na obtenção de dados válidos, tornando-se, em muitos casos, fator limitante para o desenvolvimento do estudo (MARTIN, 1998; KUBINYI, 1997a, b). Além disso, o uso destas abordagens é muitas vezes limitado pela dificuldade de interpretação dos resultados devido ao elevado número de descritores gerados.

O programa VolSurf (CRUCIANI *et al.*, 2000; CRUCIANI, PASTOR, GUBA, 2000), todavia, gera modelos que são menos influenciados pela conformação espacial dos compostos que outros métodos QSAR-3D e não requer o alinhamento das moléculas em estudo. É um método computacional que produz e explora as propriedades físico-químicas espaciais de uma molécula ou de um conjunto delas a partir de mapas tridimensionais de energia de interação gerados entre moléculas e sondas (do inglês *probes*). O conceito básico deste programa é converter a informação presente em mapas tridimensionais gerados pelo programa GRID (BOBBYER, GOODFORD, MCWHINNIE, 1989; GOODFORD, 1985) em número reduzido de descritores de fácil interpretação. Assim, tamanho, forma, ligações de hidrogênio e hidrofobicidade podem ser quantitativamente diferenciados em uma série de moléculas (CRUCIANI *et al.*, 2000).

Em estudo visando comparar a abordagem do programa VolSurf a uma abordagem mais complexa para a previsão da permeabilidade através de células Caco-2 para uma série de 6 fármacos e 5 pró-fármacos, Cruciani e colaboradores (2000) concluíram que ambas as abordagens geraram modelos estatisticamente muito semelhantes. A primeira, todavia, realizada por Krarup e colaboradores (1998), apresentou dispêndio de tempo e recursos computacionais mais elevados, uma vez que empregou dinâmica molecular (DM) para obter 1000 conformações para cada um dos compostos investigados. O cálculo de descritores VolSurf, realizado a partir de conformações únicas para cada composto, mostrou-se mais adequado para ser aplicado nas etapas iniciais de desenvolvimento de um fármaco, onde uma grande quantidade de compostos necessita ser triada.

Portanto, os modelos *in silico* derivados do programa VolSurf são computacionalmente eficientes e adequados para estudos rápidos de QSAR, contribuindo para um maior entendimento das propriedades moleculares responsáveis pela permeabilidade intestinal *in vivo*, *in situ* e *in vitro*, auxiliando a seleção racional de compostos promissores e o desenho de novos candidatos a fármaco (CRUCIANI *et al.*, 2000; CRUCIANI, PASTOR, GUBA, 2000).

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIDON, G.. Biopharmaceutical Classification System (BCS). In: Workshop Dissolution *in vitro* and *ex-vivo*: implications for BE standards trends. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2008.
- AMIDON, G.L.; SINKO, P.J.; FLEISHER, D. Estimating human oral fraction dose absorbed: A correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm. Res.*, v.5, p. 651-654, 1998.
- ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M.; THANASSI, J.A.; PUCCI, M.J. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 38, n. 3, p. 447-454, 1994.
- ARNOLD, S.R.; ELIAS, D.; BUCKINGHAM, S.C.; THOMAS, E.D.; NOVAIS, E.; ARKADER, A.; HOWARD, C. Changing patterns of acute hematogenous osteomyelitis and septic arthritis: emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pediatr. Orthop.*, v. 26, p. 703-708, 2006.
- ARTURSSON, P.; BORCHARD, R.T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm. Res.*, v. 14, n. 12, p. 1655-1658, 1997.
- ARTURSSON, P., KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 175, p.880-885, 1991.
- ARTURSSON, P.; UNGELL, A.; LOFROTH, J. E. Selective paracellular permeability in two models of intestinal absorption: cultured monolayer of human intestinal epithelial cells and rat intestinal segments. *Pharm. Res.* v. 10, p. 10-18, 1993.
- ARTURSSON, P., PALM, K., LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, p. 27-43, 2001.
- AVDEEF, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state. *Curr. Topics Med. Chem.* v.1, p. 277-351, 2001.
- BALIMANE P. V.; CHONG S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005.
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharm. Toxicol. Methods*, v. 44, p. 301-312, 2000.
- BARBOSA, H.R.; TORRES, B.B. **Microbiologia Básica**. São Paulo: Atheneu, 1999, p. 196.
- BOOBYER, D.N.A.; GOODFORD, P.J.; MCWHINNIE, P.M. New hydrogen-bond potential for use in determining energetically favourable binding sites of molecules of known structure. *J. Med. Chem.*, Columbus, v. 32, n. 5, p. 1083-1094, 1989.
- BOYCE, J.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Detection, epidemiology, and control measures. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, v. 3, p. 901-903, 1989.

- BRYAN, G.T. In: BRYAN, G.T. **Carcinogenesis: A Comprehensive Survey**. New York: Raven Press, 1978. p.1-11.
- BUCKINGHAM, C. Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a Memphis, Tennessee Children's Hospital. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v. 23, p. 619-624, 2004
- BURTON, P.S.; CONRADI, R.A.; GI, N.F.H.; HILGERS, A.R.; BORCHARD, R.T. How structural features influence the biomembrane permeability of peptides. *J. Pharm. Sci.* v.85, p. 1336-1340, 1996.
- CAMENISCH G.; ALSENZ, J.; VAN DE WATERBEEMD, H.; FOLKERS, G. Estimation of permeability by diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur. J. Pharm. Sci.* v.6, p. 313-319, 1998.
- CAMPBELL, K.M.; VAUGHN, A.F.; RUSSELL, K.L.; CAMPBELL, K.M.; VAUGHN, A.F.; RUSSELL, K.L.; SMITH, B.; JIMENEZ, D.L.; BARROZO, C.P. Risk factors for community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in an outbreak of disease among military trainees in San Diego, California, in 2002. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 4050-4053, 2004.
- CHAN, L.M.S., LOWES, S., HIRST, B.H., 2004. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 25–51.
- CDC: CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (EUA). Public health dispatch: outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections-- Los Angeles County, California, 2002-2003. *JAMA*, v. 289, p. 1377, 2003.
- COOK, T.J.; SHENOY, S.S. Intestinal permeability of chlorthalidone using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicol.*, v.184, p.125-133, 2003.
- COSGROVE, S.E.; QI, Y.; KAYE, K.S.; et al. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, v. 26, p. 166, 2005.
- CRAMER, R.D.; DE PRIEST, S.A.; PATTERSON, D.E. The developing practice of comparative molecular field analysis. In: KUBINYI, H. (Ed.) *3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications*. Leiden: ESCOM, 1993. p. 443-485.
- CRAMER, R.D.; PATTERSON, D.E.; BUNCE, J.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, Columbus, v. 110, n. 18, p. 5959-5967, 1988.
- CRUCIANI G. **Molecular Interaction Fields**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, v. 27, 2006, p. 303.
- CRUCIANI, G.; CRIVORI, P.; CARRUPT, P.A.; TESTA, B. Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the VolSurf approach. *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, Amsterdam, v. 503, n. 1-2, p. 17-30, 2000.
- CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Paris, v. 11, n. 2, p. S29-S39, 2000.
- DAVIS, K.A.; STEWART, J.J.; CROUCH, H.K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nares colonization at hospital admission and its effect on subsequent MRSA infection. *Clin. Infect. Dis.*, v. 39, p. 776-782, 2004.
- DAYAN, J.; DEGUINGAND, C.; TRUZMAN, C. Study of the mutagenic activity of 6 hepatotoxic pharmaceutical drugs in the *Salmonella typhimurium* microsome test, and the HGPRT Na⁺/K⁺ ATPase system in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, v. 157, n. 1, p.1-12, 1985.
- DEF: Dicionário de especialidades farmacêuticas (DEF 2010/2011), *J. Bras. Med.* Rio de Janeiro: Publicações Médicas, 2010.
- DESAI, D.; DESAI, N.; NIGHTINGALE, P.; ELLIOT, T.; NEUBERGER, J. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with an increased risk of infection after liver transplantation. *Liver Transpl.*, v. 9, n. 7, p. 754-759, 2003.
- DIEKEMA, D.J. ; PFALLER, M.A. ; SCHMITZ, F.J., SMAYEVSKY, J.; BELL, J.; JONES, R.N.; BEACH, M. et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America,

- Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*, v. 32, suppl 2, p. 114, 2001.
- DODD, M.C.; CRAMER, D.L.; WARD, W.C. The relationship of structure and antibacterial activity in the nitrofurans. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, v. 39, n. 6, p. 313-318, 1950.
- EGAN, W.J.; MERZ, K.M.; BALDWIN, J.J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 3867-3877, 2000.
- EL-OBEID, HA.; ELNIMA, EI.; AL-BADR, AA. Synthesis and antimicrobial activity of new furan derivatives. *Pharm. Res.*, v. 1, p. 42-43, 1985.
- ENGLUND, G., RORSMAN, F., RONNBLOM, A., KARLBOM, U., LAZOROVA, L., GRASJO, J., KINDMARK, A., ARTURSSON, P., 2006. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29, 269-277.
- ENRIGHT, M.C.; ROBINSON, D.A.; RANDLE, G. *et al.* The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 99, n. 11, p. 7687-7692, 2002.
- FEE, R. The cost of clinical trials. *Drug Discovery & Development*, v. 10, n. 3, p. 32, 2007.
- FOGH, J.; FOGH, J.M.; ORFEO, T. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl Cancer Inst.*, v.91, p.221-226, 1977.
- FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. **Principles of medicinal chemistry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 4.ed., 1995, p.995.
- FRIDKIN, S.K.; HAGEMAN, J.C.; MORRISON, M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *N. Engl. J. Med.*, v. 352, p. 1436, 2005.
- FUJIWARA, S.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Prediction of Caco-2 cell permeability using a combination of MO-calculation and neural network. *Int. J. Pharm*, 26, 237, 95-105, 2002.
- GERBER, JS, COFFIN, SE, SMATHERS, SA, ZAOUTIS, TE. Trends in the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in children's hospitals in the United States. *Clin Infect Dis* 2009; 49:65.
- GOODWIN, J.T.; CLARK, D.E. *In Silico* Predictions of Blood-Brain Barrier Penetration: Considerations to "Keep in Mind". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 315, n. 2, p. 477-483, 2005.
- GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS *et al.* **Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1ª ed, 2009, cap. 19, pag 204-211.
- GOODFORD, P.J. Computational procedure for determining energetically favourable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.*, Columbus, v. 28, n. 7, p. 849-857, 1985.
- GHOSE, A.K.; VISWANADHAN, V.N.; WENDOLOSKI, J.J. Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of AlogP and ClogP Methods. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 102, n. 21, p. 3762-3772, 1998.
- GUANGLI, M.; YIYU, C. Predicting Caco-2 Permeability Using Support Vector Machine and Chemistry Development Kit. *J Pharm Pharmaceut Sci*, vol. 9, nº 2, p. 210-221, 2006.
- HERLICH, P., SCHWEIGEL, M. Nitrofurans. A group of synthetic antibiotics with a new mode of action: Discrimination of specific messenger RNS classes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 73, n. 10, p. 3386-3390, 1976.
- HERSH, A.L.; CHAMBERS, H.F.; MASELLI, J.H.; GONZALES, R. National trends in ambulatory visits and antibiotic prescribing for skin and soft-tissue infections. *Arch. Intern. Med.*, v.168, n. 14, p. 1585-1591, 2008.
- HIDALGO, I.J. Assessing the absorption of New Pharmaceuticals. *Curr. Topics in Medicinal Chemistry*, v.1, p.385-401, 2001.
- HIDRON, A.I.; KOURBATOVA, E.V.; HALVOSA, J.S. *et al.* Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital:

- emergence of community-associated MRSA nasal carriage. *Clin. Infect. Dis.*, v. 41, n. 2, p. 159-166, 2005.
- HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, v. 350, p. 1670-1673, 1997.
- HIRANO, K.; YOSHINA, S.; OKAMURA, K.; SUZUKA, I. Electrophilic aspect of the antibacterial activity of nitrofurantoin derivatives. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, v. 40, n. 10, p. 2229-2233, 1967.
- HUANG, S.S.; PLATT, R. Risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after previous infection or colonization. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36, n. 3, p. 281-285, 2003.
- IRVINE, J.D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.; CHEONG, J.; TOLAN, J.W.; SELICK, H.E.; GROVE, J.R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.*, v. 88, p. 28-33, 1999.
- JONKER, J. W.; SMIT, J. W.; BRINKHUIS, R. F.; MALIEPAARD, M.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M.; SCHINKEL, A. H. Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 92, p. 1651-1656, 2000.
- JÓNSDÓTTIR, S.Ó.; JØRGENSEN, F. S.; BRUNAK, S. Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. *Bioinformatics*, v. 21, n. 10, p. 2145-2160, 2005.
- JORGE, S.D.; MASUNARI, A.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PASQUALOTO, K.F.M.; TAVARES, L.C. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, n. 17, p. 3028-3036, 2009.
- KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening, parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* v.41, p.1007-1010, 1998.
- KARLSSON, J.; UNGELL, A.; GRASJO, J.; ARTURSSON, P. Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. *Eur. J. Pharm. Sci.*, n. 9, p. 47-56, 1999.
- KELDENICH, J. Measurement and Prediction of Oral Absorption. *Chemistry & Biodiversity*, v. 6, p. 2000-2013, 2009.
- KLEVEN, R.M.; EDWARDS, J.R.; GAYNES, R.P. The impact of antimicrobial-resistant, health care-associated infections on mortality in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, v. 47, p. 927-930, 2008.
- KOBAYASHI, M.; SADA, N.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K.; MIYAZAKI, K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *Int. J. Pharm.*, v. 221, p. 87-94, 2001.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982, 783p.
- KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara 2007/2008**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 14^a ed., 2007, p. 10.23-10.27; 19.11-19.12.
- KRARUP, H. L.; CHRISTENSEN, I. T.; HOVGAAARD, L.; FRØKJÆR, S. Predicting drug absorption from molecular surface properties based on molecular dynamics simulations. *Pharmaceut. Res.*, v. 15, p. 972-978, 1998.
- KUBINYI, H. QSAR and 3D QSAR in drug design. Part 1: methodology. *DDT*, Kidlington, v. 2, n. 12, p. 538-546, 1997a.
- KUBINYI, H. QSAR and 3D QSAR in drug design. Part 2: applications and problems. *DDT*, Kidlington, v. 2, n. 11, p. 457-467, 1997b.
- LEACH, A.R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. Prentice Hall: Great Britain, 2nd ed, 2001, p.695-719.
- LECLERCQ, R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 15, p. 224-231, 2009.

- LENTZ, K.A.; HAYASHI, J.; LUCISANO, L.J.; POLLI, J.E. Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and a application to the biopharmaceutics classification system. *Int. J. Pharm.*, v. 200, p. 41-51, 2000.
- LI, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *DDT*, v. 6, nº 7, p. 357-366, 2001.
- LODE, H.M. Clinical impact of antibiotic-resistant Gram-positive pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 15, p. 212–217, 2009.
- 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.*, v. 23, p. 23–25, 1997.
- LODE, H. M. Clinical impact of antibiotic-resistant Gram-positive pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 15, p. 212–217, 2009.
- LOGAN, C. Use of Animals for the Determination of Absorption and Bioavailability. In: Han van de Waterbeemd *et al.* **Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2003, p. 132-154.
- LOMBARDINO, J.G.; LOWE III, J. A. The role of the medicinal chemist in drug Discovery – then and now. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
- MAKHEY, V.D.; GUO, A.; NORRIS D.A.; H.U. P.; YAN, J.; SINKO, P.J. Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells. *Pharm Res.*, v. 15, p.1160-7, 1998.
- MAO, Q.; UNADKAT, J. D. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *The AAPS Journal*, v. 7, p. 118–133, 2005.
- MARIAPPAN T. T.; SINGH S. Evidence of Efflux-Mediated and Saturable Absorption of Rifampicin in Rat Intestine Using the Ligated Loop and Everted Gut Sac Techniques. *Molecular Pharmaceutics*, v.1, n. 5, p. 363–367, 2004.
- MARTIN, Y.C. 3D QSAR: Current State, Scope and Limitations. In: KUBINYI, H.; FOLKERS, G.; MARTIN, Y.C. (Eds.) *3D QSAR in Drug Design*, Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 1998, v. 12-14, p. 3-23.
- MASUNARI, A.; NASCIMENTO, F.L.L.; FURLANETTO, M.; SANTOS, M.G.B.; PENNA, T.C.V.; MAMIZUKA, E.M.; TAVARES, L.C. Determinação da atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente às cepas padrão e multi-resistente de *Staphylococcus aureus*. In: VII Semana de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, São Paulo. *RBCF/Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 39, supl. 3, p.192-194, 2003.
- MASUNARI, A.; TAVARES, L.C. A new class of nifuroxazide analogues: Synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 4229–4236, 2007.
- MATHEWS, W.C.; CAPERNA, J.C.; BARBER, R.E. *et al.* Incidence of and risk factors for clinically significant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a cohort of HIV-infected adults. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, v. 40, p. 155-160, 2005.
- MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. *Comp. Biochem. Phys. Part A*, v. 146, p. 601-620, 2007.
- MCDONALD, P.; MITCHELLI, E.; JOHNSON, H.;ROSSNEY, A.; HUMPHREYS, H.; GLYNN, G.; BURD, M.; DOYLE, D.; MCDONNELL, R. Epidemiology of MRSA: the North/South study of MRSA in Ireland 1999. *J. Hosp. Infect.*, Londres, v. 54, n. 2, p. 130-134, 2003.
- MICHEL, M.; GUTMANN, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. *Lancet*, v. 349, p. 1901–1906, 1997.
- MILLER, L.G. ; PERDREAU-REMGTON, F. ; BAYER, A.S. *et al.* Clinical and epidemiologic characteristics cannot distinguish community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection from methicillin-susceptible *S. aureus* infection: a prospective investigation. *Clin. Infect. Dis.*, v. 44, p. 471-482, 2007.

- MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections among dialysis patients--United States, 2005.; v. 56, p. 197, 2007a.
- MMWR: Morbidity and Mortality Weekly Report. Severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia associated with influenza-Louisiana and Georgia, December 2006-January 2007, v. 56, p. 325, 2007b.
- NETO, J.M.M.; MOITA, G.C. Uma Introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim. Nova*. v.21, n.4, p.467-469, 1998.
- NEUHOFF, S.; UNGELL, AL.; ZAMORA, I.; ARTURSSON P. pH dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 monolayers. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 25, n. 2-3, p. 211-220, 2005.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; FORTINEAU, N.; POIREL, L. Superbugs in the coming new decade: multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, p. 436–440, 2007.
- NORINDER, U.; BERGSTRÖM, C.A.S. Prediction of ADMET Properties. *Chem. Med. Chem.*, v. 1, p. 920 – 937, 2006.
- NORINDER, U.; OSTERBERG, T.; ARTURSSON, P. Theoretical calculation and prediction of intestinal absorption of drugs in humans using MolSurf parametrization and PLS statistics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, p. 49-56, 1999.
- OLIVEIRA, G.A.; DELLA`AQUILA, A.M.; MASIERO, R.L.; LEVY, C.E.; GOMES, M.S.; CUI, L. ; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect. Contr. Hosp. Epidem.*, v. 22, n. 7, p. 443-448, 2001.
- OTTER, J.A.; FRENCH, G.L. Nosocomial transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect. Dis.*, v. 6, p. 753-755, 2006.
- PALM, K.; STENBERG, P.; LUTHMAN, K.; ARTURSSON, P. Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm. Res.* v.14p. 568-571, 1997.
- PANNUTI, C.S.; GRINBAUM, R.S. An overview of nosocomial infection control in Brazil. *Infec. Contr. Hosp. Epidem.*, v. 16, p.10-174, 1995.
- PAULA, F.R.; SERRANO, S.H.PI.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quim. Nova*, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.
- PETRI JR., W.A. Antimicrobial agents. In: HARDMAN, JG; LIMBIRD, LE; GILMAN, AG. **GOODMAN & GILMAN'S: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw, 10 ed, 2001, p. 1171.
- PICKETT, S. D.; MCLAY, I. M.; CLARK, D. E.: Enhancing the hit-to-lead properties of lead optimization libraries. *J. Chem. Inform. Computer Sci.* 2000, **40**, 263–272.
- PINTO, M.; *et al.*, Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, v. 47, p. 323-330, 1983.
- PISCOPO, E.; DIURNO, M.V.; GAGLIARDI, R.; MAZZANI, O., FRANCESCO, F.M., PARRILI, C. Structure-activity relationships of hidrazono derivatives of biological interest. *Boll.-Chem. Soc. Ital. Biol. Sper.*, v. 55, n. 4, p. 311-316, 1989.
- QUARONI, A.; HOCHMAN, J. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 22, n. 1, p. 3-53, 1996.
- REYES, J.; RINCON, S.; DIAZ, L., PANESSO, D.; CONTRERAS, G.A. *et al.* Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clin. Infect. Dis.*, v. 49, n. 12, p. 1861-1867, 2009.
- ROBERTS, S.A. High-throughput screening approaches for investigating drug metabolism and pharmacokinetics. *Xenobiotica*, v. 31, n. 8/9, p. 557-589, 2001.
- RUBAS, W.; JEZYK, N.; GRASS, G.M. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm. Res.*, v. 10, p. 113-118, 1993.

- SADER, H.S.; STREIT, J.M.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002-2004). *Clin Microbiol Infect.*, v. 12, p. 844-852, 2006.
- SARAVOLATZ, L.D.; MARKOWITZ, N.; ARKING, L.; POHLOH, D.; FISHER, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community-acquired outbreak. *Ann. Intern. Med.*, v. 96, p. 11-16, 1982.
- SCHINKEL, A.H.; JONKER, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3–29.
- SEITHEL, A.; KARLSSON, J.; HILGENDORF, C.; BJORQUIST, A.; UNGELL, A.L., 2006. Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 28, 291–299.
- SHORR, A.F. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin. Infect. Dis.*, v. 45, suppl. 3, p. 171-176, 2007.
- SING, A.; TUSCHAK, C.; HORMANSDORFER, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat. *N. Engl. J. Med.*, v. 358, 1200-1201, 2008.
- SONG, C.M.; LIMAND, S.J.; TONG, J.C. Recent advances in computer-aided drug design. *Briefings in Bioinformatics*, v. 10, n. 5, p. 579-591, 2009.
- SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. RBCF. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 515-527, 2007.
- SPINDLE, S.J.; STRAUSBAUGH, L.J.; JACOBSON, C. Infections caused by *Staphylococcus aureus* in a veterans' affairs nursing home care unit: A 5-year experience. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 16, p. 217-223, 1995.
- SREIDER, C.M.; GRINBLAT, T.; STOPPANI, A.O.M. Catalysis of nitrofurantoin redox-cycling and superoxide anion production by heart lipoamide dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.*, v. 40, n. 8, p. 1849-1857, 1990.
- STANKOVIC, C.; MAHAJAN, P.V.; ASMAR, B.I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of community-acquired pneumonia. *Curr Infect. Dis. Rep.*, v. 9, n. 3, p. 223-227, 2007.
- STENBERG, P., 2001. Computational Models for the Prediction of Intestinal Membrane Permeability. Acta Universitatis Upsaliensis. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy* 247. 66 pp. Uppsala. ISBN 91-554-4934-4.
- STENBERG, P.; LUTTMAN, K.; ARTURSSON, P. Virtual screening of intestinal drug permeability. *J. Control Release*, v. 65, p. 231-243, 2000.
- STEWART, B.H.; CHAN, O.H.; LU, R.H., *et al.* Comparison of intestinal permeabilities determined in multipole *in vitro* and *in situ* models: Relationship to absorption in humans. *Pharm. Res.*, v. 12, p. 693-699, 1995.
- TAVARES, L.C.; AMARAL, A.T. Partition coefficient determination of nitrofurans derivatives for a QSAR study. In: Workshop on chemical structure-biological activity, São Paulo, 1991. Resumos de Trabalhos. São Paulo: IQ/USP, p. 8, 1991.
- TAVARES, L.C.; CHISTÉ, J.J.; SANTOS, M.G.B.; PENNA, T.C.V. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs II. *Boll. Chim. Farm.*, v. 138, n. 8, p.432-436, 1999a.
- TAVARES, L.C.; MILANI, S.R.; RODRIGUES, A.M.; SANTOS, M.G.B.; PENNA, T.C.V. Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de derivados do 5-nitro-2-furfurilideno. *Ver. Farm. Quim.*, v. 32, n. 1, p.44-48, 1999b.
- TENOVER, F.C.; SCHABERG, D.R. Molecular biology resistance. In: BRACHMAN, P.S.; BENNET, J.V. **Hospital Infections**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 4 ed, 1998, p.237-247.
- TETKO, I. V., OPREA T. I. Early ADME/T predictions: toy or tools? In: **Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening**. Cambridge: RSCPublishing, 1 ed., 2008.
- THEUS, P.M.; WEUFFEN, W.; TIEDT, H. Untersuchungen über nitrothiohen- und Nitrofuranderivative II. *Arch. Pharmaz.*, v. 301, n. 2, p. 139-161, 1968a.

- THEUS, P.M.; WEUFFEN, W.; TIEDT, H. Untersuchungen über nitrothiohen- und Nirofuranderivative III. *Arch. Pharmaz.*, v. 301, n. 2, p. 139-161, 1968b.
- TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *Gen. Pharmacol.*, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.
- TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* (2 volumes), Wiley-VCH, 2009.
- TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiology: an introduction**. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 10 ed, 2010, p.574-575
- TRABULSI, L.R; ALTERHIEM, F.; GOMPERTZ, O.F; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo: editora Atheneu, 3 ed, 1999, p.149.
- TSUJI, A.; TAMAI, I. Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.*, v. 13, p. 963-977, 1996.
- UNGELL, A.L. *In vitro* absorption studies and their relevance to absorption from the GI tract. *Drug Dev. Indust. Pharm.*, v.23, p 879-892, 1997.
- UNGELL, A.L.B. Caco-2 replace or refine? *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 4, p. 423-430, 2004.
- VALERIO, L. G. *In silico* toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 241, p. 356–370, 2009.
- VÉGH, D.; KOVÁČ, J.; DANDÁROVA, M. Nucleophilic substitution on 2-(2-bromovinyl)-5-nitrothiophene, new one step method for preparation of new biologically active ethylenic derivatives of 5-nitro-2-thiophene. *Tetrahedron Lett.*, v. 21, p. 969-970, 1980.
- VENKATESH, S.; LIPPER, R.A. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization, *J. Pharm. Sci.* **89**:145-154 (2000).
- VENUTI, M.C. The role of recombinant DNA technology in medicinal chemistry and discovery. In: WOLFF, M.E. **Burger's medicinal chemistry and drug discovery: principles and practice**. New York: John Wiley & Sons, 5 ed, v. 1, 1995, cap. 16, p. 661-696.
- VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTHSIEGEL, R.L.; CHAVIÉRE, G.; BALAKARA, N.; PÉRIE, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochem. Pharmacol.*, v. 57, n. 5, p. 549-557, 1999.
- VOZYAKOVA, T.I., OLEINIK, A.F., NOVITSKII, K.Y. Synthesis and reactions of arylfuran derivatives, *V.Nauchn Konf. Khim. Teknol. Furanovyykh Soedin*, p. 100-101, 1978: *Chem. Abstr.* 92 180897, 1980.
- YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. *In Silico* Approaches for Predicting ADME Properties of Drugs. *Drug Metab. Pharmacokin.*, v. 10, n. 5, p. 327-338, 2004.
- WALSH, F.M; AMYES, S.G.B. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, v. 7, p. 439–444, 2004.
- WANG, J.L.; CHEN, S.Y.; WANG, J.T.; WU, G.H.M.; CHIANG, W.C.; HSUEH, P.R. *et al.* Comparison of both clinical features and mortality risk associated with bacteremia due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S. aureus*. *Clin. Infect. Dis.*; v. 46, p. 799-806, 2008.
- WARD, W.C.; DODD, M.C. A comparative study of the *in vitro* bacteriostatic action of some simple derivatives of furan, thiophene, and pyrrole. *J. Bacteriol.*, v. 56, n. 5, p. 649-652, 1948.
- WATERBEEMD, H.V. Improving Compound Quality through *in vitro* and *in silico* Physicochemical Profiling. *Chemistry & Biodiversity*, v. 6, 1760-1766, 2009.
- WERMUTH, C.G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2003, 968p.
- WESSEL, MD; JURIS, PC; TOLAN, JW; MUSKAL, SM. Prediction of human intestinal absorption of drug compounds from molecular structure. *J Chem Inform Comput Sci.*, 38, 726-735, 1998.

- WESTERHUIS J.A.; KOURTI T.; MACGREGOR J.F. Analysis of multiblock and hierarchical pca and pls models. *J. Chemometrics*, v.12, p. 301–321, 1998.
- WILS, P.; WARNEY, A.; PHUNG-PA, V.; *et al.* High lipophilicity decreases drug transport across intestinal epithelial cells. *J. Pharm. Exp. Ther.* v. 269, p.654-658, 1994.
- ZILBERBERG, M.D.; SHORR, A.F.; KOLLEF, M.H. Growth and Geographic Variation in Hospitalizations with Resistant Infections, United States, 2000–2005. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 14, n. 11, P. 1756-1758, 2008.

CAPÍTULO 3

ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Ensaios de citotoxicidade visando aos estudos de permeabilidade *in vitro* com membranas de células Caco-2

A avaliação da toxicidade dos compostos e solventes utilizados em ensaios de permeabilidade com membranas celulares é parâmetro de grande importância para aumentar a confiança nos resultados obtidos com estes experimentos *in vitro*, uma vez que danos celulares que causam perda da função ou até mesmo a morte celular podem levar a elevados valores de permeabilidade (BLANCHFIELD, 2003).

Há uma série de métodos padronizados para avaliar a toxicidade de substâncias frente às células Caco-2. Estes consistem em colocar a substância em contato com a cultura de células e verificar as alterações celulares resultantes por diferentes modos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO *et al.*, 2000). O parâmetro mais comumente utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que também pode ser avaliada por meio de vários tipos de ensaios. Todavia, é aconselhável empregar técnica que requeira menor tempo e mínima variação na análise das amostras (MOSMANN, 1983).

O ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) é um teste usado para avaliar rápida e objetivamente a viabilidade celular, baseando-se em uma reação colorimétrica. Na mitocôndria de células viáveis, a enzima succinato desidrogenase converte o sal de MTT em formazan, produto de coloração azul escuro que é quantificado por medição colorimétrica subsequente à lise celular. Como as células danificadas ou mortas exibem reduzidos ou nulos níveis de atividade da desidrogenase, este ensaio colorimétrico da atividade mitocondrial pode ser usado para determinar a viabilidade celular espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983).

3.1.2 Toxicidade dos nitrocompostos

Os nitrocompostos têm sido alvo de inúmeras discussões visando ao esclarecimento de sua toxicidade. Sabe-se, no entanto, que seu mecanismo de toxicidade está associado à formação de produtos resultantes da redução *in vivo* e *in vitro* do grupo nitro ligado a anéis aromáticos (TOCHER, 1997).

Xu e colaboradores (2002) demonstraram que a toxicidade dessa classe de compostos depende de sua estabilidade química, que está relacionada à proporção e à posição de grupos nitro ligados aos anéis aromáticos, afetando diretamente a deslocalização eletrônica. O oxigênio é a molécula reativa responsável pela quebra de ligações nos anéis aromáticos, que são posteriormente metabolizados por reações catalisadas por mono- e di-oxigenases (SPAIN, 1995). No entanto, o acentuado caráter retirador de elétrons dos grupos nitro em compostos polinitroaromáticos causa deficiência de elétrons no anel, favorecendo reações iniciais de redução. O ataque oxidativo de compostos nitroaromáticos ocorre em condições aeróbias, enquanto o metabolismo redutivo dos compostos polinitroaromáticos pode ocorrer tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. Assim, a formação de derivados hidroxil, que resultam da oxidação do anel aromático por mono- e di-oxigenases e subsequente abertura do anel, representa a explicação mecanística para a degradação aeróbia de compostos mononitroaromáticos, e para alguns dinitroaromáticos (ROLDÁN *et al.*, 1998; SPIESS *et al.*, 1998; ZABLOTOWICZ *et al.*, 1999; NISHINO *et al.*, 2000).

Os derivados hidroxiamino, que resultam do processo de redução do grupo nitro, podem interagir com biomoléculas, como o DNA, causando efeitos tóxicos e mutagênicos. Os efeitos tóxicos estão relacionados ao caráter eletrofílico destes derivados, enquanto os efeitos mutagênicos ocorrem principalmente devido à formação de adutos de grupos hidroxiamino por meio da esterificação com o ácido nucleico guanina. Adicionalmente, alguns compostos nitroaromáticos são intrinsecamente tóxicos e agem como desacopladores da fosforilação oxidativa, inibindo a geração da força motriz de prótons necessária para a síntese de ATP (ROLDÁN *et al.*, 2008).

Em mamíferos, os compostos nitroaromáticos são transformados em metabólitos conjugados que são posteriormente dissociados e/ou reduzidos pela microbiota intestinal. As nitrorredutases destas bactérias podem estimular a toxicidade, enquanto as acetiltransferases estimulam a mutagenicidade destes compostos (AIUB *et al.*, 2006). Em alguns casos, a toxicidade resultante da atividade de alguns nitrocompostos em mamíferos torna-se questionável, uma vez que a mesma não é reproduzida em procedimentos experimentais *in vitro*. Neste sentido, a atividade mutagênica de alguns nitrofurânicos e nitroimidazóis foi avaliada e demonstrada por meio do Teste de Ames realizado em *Salmonella typhimurium* (FERREIRA, FERREIRA, 1986; DAYAN *et al.*, 1985). Todavia, estes compostos não apresentaram mutagenicidade em células de mamíferos (DAYAN *et al.*, 1985).

Até o presente momento, não existem dados na literatura acerca da toxicidade dos fármacos nifuroxazida e nitrofurantoína frente às células Caco-2, sendo necessária sua avaliação previamente à condução dos estudos de permeabilidade.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivos gerais

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a citotoxicidade da nitrofurantoína, nifuroxazida e derivados frente às células Caco-2, visando à realização de ensaios de permeabilidade *in vitro*.

3.2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, pretendeu-se realizar:

- ✓ Avaliação da citotoxicidade do co-solvente dimetilssulfóxido (DMSO) usado na solubilização dos compostos 5-nitro-heterocíclicos frente às células Caco-2;

- ✓ Avaliação da citotoxicidade da nitrofurantoína, nifuroxazida e derivados frente às células Caco-2 visando à determinação das concentrações a serem utilizadas nos ensaios de permeabilidade de acordo com os resultados de citotoxicidade.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material

3.3.1.1 Série de compostos

Os compostos 5-nitro-heterocíclicos derivados da nifuroxazida utilizados no presente estudo foram planejados, sintetizados e disponibilizados pelo Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos do Departamento de Tecnologia Químico-Farmacêutica/Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares.

Foram selecionados 10 compostos pertencentes a uma série com estrutura análoga à nifuroxazida, representados na Tabela 3.1, bem como os fármacos nifuroxazida e nitrofurantoína (Sigma-Aldrich), representados na Figura 3.1.

Tabela 3. 1. Estrutura química dos derivados 5-nitro-heterocíclicos utilizados no presente estudo e sua pureza.

id	substância	sigla	A	R	Pureza (%) ^a
1	5-nitro-2-furilideno benzidrazida	HFUR	O	-H	97,05
2	5-nitro-2-furilideno 4-metilbenzidrazida	MeFUR	O	-CH ₃	97,47
3	5-nitro-2-furilideno 4-etoxibenidrazida	EtoFUR	O	-OCH ₂ CH ₃	99,93
4	5-nitro-2-furilideno 4-aminobenidrazida	AminoFUR	O	-NH ₂	99,85
5	5-nitro-2-furilideno 4-bromobenidrazida	BrFUR	O	-Br	99,77
6	5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida	HTIO	S	-H	99,94
7	5-nitro-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida	MeTIO	S	-CH ₃	96,86
8	5-nitro-2-tiofilideno 4-etoxibenidrazida	EtoTIO	S	-OCH ₂ CH ₃	97,89
9	5-nitro-2-tiofilideno 4-aminobenidrazida	AminoTIO	S	-NH ₂	98,10
10	5-nitro-2-tiofilideno 4-bromobenidrazida	BrTIO	S	-Br	99,15

^aDados fornecidos pelo Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos do Departamento de Tecnologia Químico-Farmacêutica/Faculdade de Ciências Farmacêuticas, de acordo com resultados obtidos nas análises elementares e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN ¹H e ¹³C encontram-se nos anexos A e B, respectivamente.

Figura 3. 1. **A.** Estrutura molecular da nitrofurantoína (id 14). **B.** Estrutura molecular da nifuroxazida (id 13).

3.3.1.2 Substâncias Químicas de Referência

⇒ Nifuroxazida

Fornecedor: Sigma-Aldrich

Lote: 5082X

Teor: 99,9%

Fabricação: 08/2005

Validade: 03/2012

⇒ **Nitrofurantoína**

Fornecedor: Sigma-Aldrich

Lote: SZE9058X

Teor: 99,9%

Fabricação: 02/2009

Validade: 02/2016

3.3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente trabalho foram:

- Agitador magnético Fisatom, modelo 752;
- Agitador termostatizado Tecnal, modelo TE-424;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AX200;
- Bujão de crioconservação Volta, modelo XC 20.
- Fluxo laminar Telstar, modelo AV-100;
- Fluxo laminar Veco, modelo LFS 12;
- Incubadora de CO₂ Thermo, modelo Forma Series II;
- Leitora de placas – Spectra Fluor plate reader, Tecan;
- Microscópio Bioval, modelo L2000A;
- Microscópio Invertido Olympus, modelo CKX41;
- Micropipetas de volume variável HT Labmate;
- Pipetadores automáticos HT Swiftpet;
- Phmetro Metrohm, modelo 827.

3.3.1.4 Reagentes e materiais empregados no cultivo celular, citotoxicidade e experimentos de permeabilidade

Os reagentes e materiais empregados no cultivo celular, citotoxicidade e experimentos de permeabilidade foram:

- Dimetilssulfóxido ASC Carlo Erba;
- Filtros esterilizantes - TPP;
- Garrafas de cultivo celular 25 e 75 mm² - TPP;
- Glicose - Sigma-Aldrich;
- Kit MTT para citotoxicidade - Sigma-Aldrich (MTT em pó 15 mg/frasco, solução de solubilização de MTT - 10% de Triton X-100 plus e 0,1 N HCl em isopropanol anidro);
- Meio DMEM em pó - Cultilab;
- Meio DMEM líquido sem fenol - Cultilab;
- Pipetas sorológicas estéreis e descartáveis de volumes variados - TPP;
- Placas de 96 poços com fundo chato – TPP;
- Sais de ácido N-2, hidroxietilpiperazina-N-etanosulfônico (HEPES) - Sigma-Aldrich;
- Solução tampão Hanks - Cultilab;
- Solução de aminoácidos não essenciais - Sigma-Aldrich;
- Solução de antibióticos estreptomicina 100 µg/mL / penicilina 100UI Cultilab;
- Solução de glutamina 200 mM - Sigma-Aldrich;
- Solução de Tripsina 0,25% e EDTA 1 mM - Cultilab;

- Soro fetal bovino – Cultilab.

3.3.1.5 Infra-estrutura

O cultivo celular e experimentos de citotoxicidade foram conduzidos no Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares (LPFCC) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob a responsabilidade da Profa. Assoc. Sílvia Storpirtis.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Cultivo das células Caco-2

A linhagem de células Caco-2 (ATCC #HTB-37) foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com alta concentração de D-glicose (4,5 g/L), 2,2 g/L de bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% de solução de glutamina 200 mM, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O banco celular foi mantido em incubadora sob temperatura de 37 °C, atmosfera constituída de 5% de CO₂ e 90% de umidade relativa, cultivado em garrafas de 75 mm², sendo o meio substituído a cada dois dias.

O subcultivo era realizado quando a cultura atingia, no mínimo, 80% de cobertura da garrafa (cerca de 3 a 4 dias). O meio de cultivo era aspirado e descartado, as células que formavam a membrana aderida à parede da garrafa eram isoladas com 2 mL de solução de tripsina (0,25%) e EDTA (1 mM) e incubadas a 37 °C por 5 minutos. As células eram ressuspensas em meio DMEM e divididas na proporção 1:4 em novas garrafas contendo 15 mL deste meio. Todas as células utilizadas neste estudo estavam entre as passagens 40 e 50.

3.3.2.2 Ensaios de citotoxicidade *in vitro* para determinação da viabilidade das células Caco-2 em presença dos nitrocompostos

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com protocolo descrito no guia ISO 10993-5 (ISO, 2009), que dispõe sobre técnicas para avaliação *in vitro* da citotoxicidade.

As células Caco-2 foram semeadas com meio DMEM em microplacas de 96 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço, incubadas por 24 h a 37 °C com 5% de CO₂ e 90% de umidade. Os compostos 5-nitro-heterocíclicos foram dissolvidos em dimetilssulfóxido (DMSO), solvente frequentemente utilizado quando compostos com baixa hidrossolubilidade são avaliados em ensaios de permeabilidade, e diluídos em seguida em meio DMEM sem fenol pH 7,4 para preparar amostras de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. Cada concentração foi avaliada em doze repetições para todos os compostos.

Amostras contendo 1% de DMSO (v/v) em DMEM foram empregadas para avaliar o efeito de toxicidade deste co-solvente (controle DMSO). Amostras de DMEM foram usadas como controle negativo, e, como controle positivo, 50% de DMSO (v/v) em DMEM, garantindo a total inviabilidade celular. O controle DMSO e o controle positivo foram avaliados em sextuplicata e o controle negativo em doze repetições para cada placa de 96 poços.

Os experimentos foram iniciados substituindo-se o meio de cultura em cada poço com 100 µL de cada amostra ou controle, seguida por incubação a 37 °C por 4 h. As soluções em cada poço foram, então, aspiradas e as células novamente incubadas a 37 °C por 2h com 30 µL da solução de MTT (solução 5 mg/mL diluída em meio de DMEM sem fenol e tampão PBS 9:1 v/v). Após o período de incubação, os cristais de formazan foram solubilizados com 70 µL da solução de solubilização de MTT (10% de Triton X-100 plus e 0,1 N HCl em isopropanol anidro). A placa foi posteriormente levada ao agitador orbital, com agitação de 100 rpm por 15 minutos para facilitar a solubilização dos cristais de formazan, que foram espectrofotometricamente quantificados em comprimento de onda de 570 nm e 690 nm. A viabilidade celular foi calculada em relação à medida da absorbância das células expostas ao controle negativo, que representou 100% de viabilidade celular.

3.3.2.3 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em doze repetições. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada com o programa Statistica (Statistica Software, StatSoft, Oklahoma, EUA). Teste-t foi empregado para comparar os resultados da nifuroxazida aos da nitrofurantoína. Análise de variância (ANOVA) de um fator foi aplicada para comparações múltiplas entre os nitrocompostos e os controles DMSO. Em ambas as análises, as médias foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

A quantificação da citotoxicidade foi determinada medindo-se o dano celular de acordo com o protocolo estabelecido na ISO 10993-5 (ISO, 2009). Este guia internacional considera como efeito citotóxico uma redução na viabilidade celular maior do que 30%. Por esta razão, a viabilidade celular de 70% foi usada como valor limítrofe.

Na Figura 3.2, a citotoxicidade dos compostos 5-nitro-heterocíclicos frente às células Caco-2 é apresentada em forma de porcentagem de viabilidade celular comparada aos controles negativo (viabilidade total das células - 100%) e positivo (dano completo às células - 0%). O desvio padrão foi calculado para as doze replicatas de cada concentração para determinar a variação na citotoxicidade para cada composto.

Figura 3. 2. Viabilidade das células Caco-2 incubadas por 4 horas com: **A.** nifuroxazida e nitrofurantoína, **B.** derivados furânicos e **C.** derivados tiofênicos, todos avaliados pela técnica do MTT. A linha vermelha separa os valores de viabilidade celular acima e abaixo de 70%. ▲ T-test foi usado para comparar os resultados entre a nitrofurantoína e nifuroxazida. *Teste ANOVA foi aplicado para comparações múltiplas entre os nitrocompostos e o controle DMSO. Em ambas as análises, as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

De acordo com a Figura 3.2, a nitrofurantoína apresentou-se como a substância menos tóxica frente às células Caco-2, uma vez que os valores de viabilidade celular foram superiores a 83% para todas as concentrações. Para a nifuroxazida, estes valores foram somente superiores a 70% para as concentrações de 2, 4 e 6 µg/mL, com esta última correspondendo a aproximadamente 0,022 mM. O teste-t revelou diferenças aparentes ($p < 0,075$) na citotoxicidade destes fármacos em 6 e 8 µg/mL, e diferenças significativas ($p < 0,05$) em 10 µg/mL.

Os derivados tiofênicos etóxi-, bromo- e amino-substituídos (EtoTIO, BrTIO e AminoTIO, respectivamente) apresentaram-se como os derivados da nifuroxazida menos tóxicos, com viabilidades celulares acima de 70% para todas as concentrações avaliadas, sendo o BrTIO o menos tóxico. O derivado tiofênico não-substituído (HTIO), e os derivados furânicos bromo- e amino-substituídos (BrFUR e AminoFUR, respectivamente) resultaram em viabilidades celulares superiores a 70% em 2, 4 e 6 µg/mL, enquanto os derivados furânicos não-substituído (HFUR), metil- e etóxi-substituídos (MeFUR e EtoFUR) resultaram em viabilidades celulares superiores a 70% apenas em 2 e 4 µg/mL, sendo o derivado metil o mais tóxico. O derivado tiofênico metil-substituído (MeTIO) reduziu a viabilidade celular das células Caco-2 para menos de 70% em todas as concentrações. O teste ANOVA revelou que somente o composto MeTIO apresentou diferenças significativas de toxicidade em relação ao controle DMSO em todas as concentrações avaliadas.

3.4 DISCUSSÃO

A viabilidade das membranas de células Caco-2 ao serem expostas aos compostos e solventes utilizados em experimentos de permeabilidade é pré-requisito indispensável para atestar a confiabilidade dos resultados provenientes destes estudos. Mudanças significativas nas funções celulares, especialmente aquelas relacionadas ao transporte celular de compostos, são comuns em células que iniciaram o programa de morte celular. Portanto, torna-se essencial a avaliação da viabilidade celular na presença das substâncias em todas as concentrações que serão usadas em ensaios de permeabilidade.

Os fármacos nifuroxazida e nitrofurantoína foram utilizados como referências para a comparação com a citotoxicidade e permeabilidade dos compostos da série em estudo, uma vez que são compostos nitro-heterocíclicos antimicrobianos utilizados na terapêutica.

Tendo em vista que os compostos 5-nitro-heterocíclicos foram dissolvidos em DMSO, fez-se necessária a avaliação da toxicidade deste co-solvente frente às monocamadas celulares na concentração experimental (1% v/v em DMEM). Os resultados apresentados mostram que a viabilidade celular para o controle de DMSO foi de aproximadamente 90%, valor este que, de acordo com a ISO 10993-5 (ISO, 2009), não inviabiliza seu emprego nos ensaios de permeabilidade. Além disso, Da Violante e colaboradores (2002) concluíram que o DMSO pode ser usado em concentrações mais elevadas (até 10% v/v) em experimentos de permeabilidade com células Caco-2 sem causar dano celular significativo, o que suporta os resultados do presente estudo e o uso deste co-solvente em futuros ensaios de permeação.

A faixa de concentração avaliada neste estudo foi selecionada por razões associadas aos subsequentes testes de permeabilidade. Primeiro, esta faixa foi sugerida pelo conhecimento prévio relacionado à absorção da nitrofurantoína, composto estruturalmente relacionado à nifuroxazida e seus derivados. Sabe-se que o primeiro é rapidamente absorvido no intestino delgado, atingindo elevados níveis de concentração plasmática em poucos minutos (BUZARD *et al.*, 1961). Uma alta taxa de permeabilidade através das membranas de células Caco-2 também é esperada para os análogos, portanto, valores menores de concentrações iniciais seriam preferidos para que as condições *sink* sejam mantidas. Adicionalmente, concentrações mais altas foram preparadas, porém houve freqüente observação de precipitação devido à baixa solubilidade da nifuroxazida e seus derivados em meios aquosos.

Os resultados apresentados neste estudo indicam que não se observou toxicidade significativa para a nitrofurantoína e para alguns derivados da nifuroxazida, como EtoTIO, BrTIO e AminoTIO, para todas as concentrações avaliadas. Entretanto, significativa toxicidade, indicada por viabilidades celulares menores que 70%, foi observada para a nifuroxazida em concentrações acima de

0,03 mM (8 µg/mL) após período de incubação por 4 horas. Blumenstiel e colaboradores (1999), utilizando diversos derivados nitrofurânicos com atividade frente ao *Trypanosoma cruzi*, demonstraram que a nifuroxazida e a nifuprazina não apresentaram efeitos tóxicos às células de mamíferos (macrófagos) quando incubadas por três dias em concentrações menores que 10 mM. Em estudo de citotoxicidade conduzido por Rossa e colaboradores (2003), observou-se que o nitrofurano quinifuril apresentou alta toxicidade frente a células leucêmicas de camundongo e reduzida toxicidade em células animais não tumorais.

A partir do exposto, torna-se plausível supor que a toxicidade dos nitrocompostos é dependente de múltiplos fatores, como sua estrutura química, tempo de exposição, dose utilizada e linhagem celular. As células Caco-2 foram mais susceptíveis aos compostos 5-nitro-heterocíclicos que os macrófagos (BLUMENSTIEL *et al.*, 1999), provavelmente porque as primeiras são derivadas de um carcinoma, ou seja, são células tumorais de mamíferos. Como os ensaios de citotoxicidade do presente estudos foram realizados previamente à maturação celular em células epiteliais, é esperado que estas células apresentem maior viabilidade celular durante a condução dos testes de permeabilidade, ou seja, no estágio em que elas já estarão diferenciadas.

Como o tratamento das células com a maioria dos compostos, com exceção do derivado MeTIO, resultou em viabilidades celulares acima de 70% em 2 e 4 µg/mL, esta última foi selecionada para os futuros ensaios de permeabilidade através de membranas de células Caco-2.

O tratamento com o derivado tiofênico metil-substituído (MeTIO) resultou em viabilidade celular frente as células Caco-2 menor que 70% para todas as concentrações analisadas; portanto, este fora retirado da série de compostos 5-nitro-heterocíclicos para futura avaliação da permeabilidade. Todavia, cabe ressaltar que o derivado furânico metil-substituído (MeFUR) foi mais tóxico em 6, 8 e 10 µg/mL. Excetuando-se estes últimos, a viabilidade das células Caco-2 foi maior para as células tratadas com derivados tiofênicos, em comparação com seus respectivos derivados furânicos. Este resultado pode ser explicado pelo maior raio atômico do átomo de enxofre em comparação com o átomo de oxigênio. Dessa forma, a maior toxicidade dos derivados furânicos poderia estar associada ao átomo de oxigênio,

que, devido à sua maior capacidade de doar elétrons, poderia aumentar a reatividade do grupo nitro ligado ao anel furânico. As diferenças de citotoxicidade entre os derivados furânicos e tiofênicos relativas aos seus volumes moleculares e cargas de superfície poderiam ser explicadas com base nas diferenças em suas propriedades lipofílicas e eletrostáticas. A Figura 3.3A ilustra a superfície de densidade eletrônica do BrTIO, o composto menos tóxico da série, e seu correspondente BrFUR, evidenciando o maior raio atômico do enxofre e a maior densidade eletrônica no átomo de oxigênio (região vermelha). A Figura 3.3B ilustra a superfície de potencial eletrostático do BrTIO e do BrFUR, o que indica que a porção mais reativa da molécula é maior em derivados furânicos, em comparação com os derivados tiofênicos.

Figura 3. 3. A. Superfície de densidade eletrônica do BrTIO (acima) e BrFUR (abaixo). **B.** Superfície de potencial eletrostático do BrTIO (acima) and BrFUR (abaixo).

A toxicidade de composto MeTIO poderia estar relacionada ao aumento da hidrofobicidade conferido à molécula pelo grupo metil, uma vez que todos os outros substituintes possuem maior caráter hidrofílico. Portanto, a citotoxicidade deste derivado da nifuroxazida poderia ser influenciada pela reatividade do átomo no anel ligado ao grupo nitro como pelo substituinte no anel benzênico.

Adicionalmente à avaliação da citotoxicidade das substâncias que serão utilizadas nos futuros ensaios de permeabilidade, há outras técnicas que podem ser utilizadas como indicativo da integridade da monocamada celular durante o experimento de permeabilidade. A resistência elétrica transepitelial (RET) é extensivamente utilizada como um indicador da viabilidade celular (HIDALGO *et al.*, 1996), em combinação com o uso de substâncias-padrão, ou seja, compostos com valores de permeabilidade aparente conhecidos (FDA, 2000). Estes dois métodos foram empregados durante a avaliação da permeabilidade dos derivados da nifuroxazida e a comparação dos resultados destas análises com os dados de citotoxicidade aumentaram a confiança nos dados de permeabilidade obtidos.

Além de sua utilização como ferramenta de triagem para a avaliação da permeabilidade intestinal, as células Caco-2 têm sido também utilizadas na tentativa de prever a toxicidade de candidatos a novos fármacos orais e adjuvantes de formulações em células epiteliais (KONSOULA, BARILE, 2005; SHAH, PALAMAKULA, KHAN, 2004; RHOADS *et al.*, 2010). Consequentemente, a interpretação dos resultados poderia ser estendida a fim de concluir que o derivado MeTIO apresenta elevada toxicidade ao epitélio intestinal, o que inviabilizaria seu uso como fármaco. Por outro lado, os derivados EtoTIO, BrTIO e AminoTIO apresentaram toxicidade menor que a nifuroxazida, o que poderia torná-los possíveis candidatos a um novo fármaco para ser administrado por via oral no tratamento de infecções causadas por bactérias MRSA.

3.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo possibilitaram as seguintes conclusões:

- A concentração de dimetilssulfóxido (DMSO) utilizada como co-solvente para os ensaios de citotoxicidade (1% v/v) não resultou em danos às células Caco-2, uma vez que os valores de viabilidade celular foram de aproximadamente 90%.

- As células Caco-2 apresentaram viabilidade adequada para a realização dos estudos de permeabilidade quando expostas a todos os compostos análogos à nifuroxazida, exceto o derivado tiofênico metil-substituído (MeTIO). Os derivados tiofênicos etóxi- e bromo-substituídos (EtoTIO e BrTIO) apresentaram-se como os compostos menos tóxicos da série. Excetuando-se os derivados metil-substituídos, observaram-se valores de viabilidade celular superiores para todos os derivados tiofênicos presentes na série em estudo, em comparação com seus respectivos derivados furânicos.
- A concentração de 4 µg/mL foi selecionada para os ensaios de permeabilidade, uma vez que todos os compostos analisados frente às células Caco-2, exceto do derivado MeTIO, resultaram em viabilidades celulares maiores que 70% para esta concentração.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIUB, C.A.; MAZEI, J.L.; PINTO, L.F.; FELZENSZWALB, I. Evaluation of nitroreductase and acetyltransferase participation in N-nitrosodiethylamine genotoxicity. *Chem. Biol. Interact.*, v. 161, p. 146–154, 2006.
- BLANCHFIELD, J.T.; DUTTON, J.L.; HOGG, R.C.; GALLAGHER, O.P.; CRAIK, D.J.; JONES, A.; ADAMS, D.J.; LEWIS, R.J.; ALEWOOD, P.F.; TOTH, I. Synthesis, Structure Elucidation, *in vitro* Biological Activity, Toxicity, and Caco-2 Cell Permeability of Lipophilic Analogues of r-Conotoxin MII. *J. Med. Chem.*, v. 46, 1266-1272, 2003.
- BLUMENSTIEL, K.; SCHÖNECK, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L.; KRAUFT-SIEGEL, R.L. Nitrofurans as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase *Biochem. Pharmacol.*, v. 58, p. 1791-1799, 1999.
- BUZARD, J.A.; CONKLIN, J.D.; O'KEEFE, E.; PAUL, M.F. Studies on the absorption, distribution and elimination of nitrofurantoin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 131, p. 38-43, 1961.
- DA VIOLANTE, G.; ZERROUK, N.; RICHARD, I.; PROVOT, G.; CHAUMEIL, J.C.; ARNAUD, P. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biol. Pharm. Bull.*, v. 25, p. 1600-1603, 2002.
- DAYAN, J.; DEGUINGAND, C.; TRUZMAN, C. Study of the mutagenic activity of 6 hepatotoxic pharmaceutical drugs in the *Salmonella typhimurium* microsome test, and the HGPRT Na⁺/K⁺ ATPase system in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, v. 157, n. 1, p. 1-12, 1985.
- FERREIRA, R.C.C.; FERREIRA, L.C.S. CL 64.855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug, is also mutagenic in the salmonella/microsome assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 1, p. 49-52, 1986.
- HIDALGO, I. H. Cultured intestinal epithelial cell models. In: BORCHARD, T.; Smith, P.L.; Wilson, G., Models of Assessing Drug Absorption and Metabolism. New York: Plenum Press, p. 35-50, 1996.

- KONSOULA, R.; BARILE, F.A. Correlation of *in vitro* cytotoxicity with paracellular permeability in Caco-2 cells. *Toxicol. in Vitro*, v. 19, n. 675–684, 2005.
- ISO – International Organization for Standardization. ISO 10993-5 – Biological Evaluation of medical devices. Part 5: Testes for *in vitro* cytotoxicity, 3^a Ed, ISO, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, n. 65, p. 55-63, 1983.
- NISHINO, S.F.; PAOLI, G.C.; SPAIN, J.C. Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, p. 2139–2147, 2000.
- RHOADS, L.S.; SILKWORTH, W.T.; ROPPOLO, M.; WHITTINGHAM, M.S. Cytotoxicity of nanostructured vanadium oxide on human cells *in vitro*. *Toxicol. in Vitro*, v. 24, n. 292–296, 2010.
- ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicology in Vitro*, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.
- ROLDÁN M.D.; BLASCO, R.; CABALLERO, F.J.; CASTILLO, F.J. Degradation of p-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.*, v. 169, p. 36–42, 1998.
- ROLDÁN, M.D.; PÉREZ-REINADO, E.; CASTILLO, F.; MORENO-VIVÍNA, C. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial Nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 32, p. 474–500, 2008.
- ROSSA, M.M.; ROCHA-E-SILVA, T.A.A.; TERRUGGI, C.H.B.; TEDESCO, A.C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; BORISSEVICH, I.E.; DEGTEREV, I.A. Comparison of the cytotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells. *Pharmacol. Res.*, v. 48, p. 369-375, 2003.
- SHAH, R.B.; PALAMAKULA, A.; KHAN, M.A. Cytotoxicity Evaluation of Enzyme Inhibitors and Absorption Enhancers in Caco-2 Cells for Oral Delivery of Salmon Calcitonin. *J. Pharm. Sci.*, v. 93, n. 1070-1082, 2004.
- SPAIN, J.C. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 49, p. 523–555, 1995.
- SPIESS, T.; DESIRE, F.; FISCHER, P.; SPAIN, J.C.; KNACKMUSS, H-J.; LENKE, H. A new 4-nitrotoluene degradation pathway in a *Mycobacterium* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 446–452, 1998.
- TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *Gen. Pharmacol.*, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.
- XU, M.; ZHANG, A.; HAN, S.; WANG, L. Studies of 3D-Quantitative Structure-Activity Relationships on a set of nitroaromatic compounds: CoMFA advanced CoMFA and CoMSIA. *Chemosphere*, v. 48, p. 707-715, 2002.
- ZABLOTOWICZ, R.M.; LEUNG, K.T.; ALBER, T.; CASSIDY, M.B.; TREVORS, J.T.; LEE, H.; VELDHUIS, L.; HALL, J.C. Degradation of 2,4-dinitrophenol and selected nitroaromatic compounds by *Sphingomonas* sp. UG30. *Can. J. Microbiol.*, v. 45, p. 840–848, 1999.

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 Quantificação da quantidade permeada em estudos *in vitro* e desenvolvimento e validação de método bioanalítico

A quantificação das amostras provenientes de experimentos de permeabilidade requer o desenvolvimento de métodos analíticos, o que caracteriza um dos grandes desafios para estes tipos de estudo. Os compostos, na maioria das vezes, apresentam-se em concentrações significativamente reduzidas, tornando imprescindível que o método apresente adequada sensibilidade para ser eficientemente utilizado com segurança e confiabilidade, possibilitando a interpretação apurada dos dados provenientes dos estudos de permeabilidade. As técnicas analíticas baseadas em cromatografia a líquido dotadas de detectores com alto grau de sensibilidade são as mais empregadas na quantificação de fármacos em estudos de permeabilidade (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

Apesar de se tratar de uma técnica *in vitro*, os ensaios de permeabilidade de fármacos através de membranas das células Caco-2 podem ser considerados, sob alguns aspectos, como um ensaio *in vivo*. Tais aspectos estão relacionados à composição dos meios e soluções onde os ensaios são realizados, uma vez que mimetizam as condições fisiológicas, garantindo, com isso, a viabilidade celular e também a possibilidade de se obter resultados correlacionáveis aos esperados *in vivo*. Desta forma, os métodos analíticos utilizados na quantificação dos fármacos em estudo de permeabilidade podem ser considerados métodos bioanalíticos e seguir os mesmos critérios utilizados para esses métodos (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

A validação de um método bioanalítico consiste em utilizar parâmetros de desempenho analítico que permitam determinar se o método está adequado ao uso pretendido. Para que um método seja adequado aos estudos de permeabilidade, é de grande importância que seja validado segundo os parâmetros estabelecidos na legislação vigente para os métodos bioanalíticos de quantificação de fármacos em matrizes biológicas. Para os estudos de biodisponibilidade ou bioequivalência, e também se estendendo para os estudos de permeabilidade *in vitro*, os requisitos

apresentados na resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003) são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, estabilidade e recuperação.

4.1.2 Métodos para a quantificação da nifuroxazida e nitrofurantoína

Vários métodos analíticos capazes de separar e quantificar fármacos pertencentes ao grupo dos agentes antibacterianos nitrofurânicos já foram relatados na literatura.

A nifuroxazida foi quantificada em preparações farmacêuticas usando métodos espectrofotométricos diretos (SZUMINSKA, CISAK, 1988; SZUMINSKA, CISAK, 1990), técnicas polarográficas e voltamétricas (SZUMINSKA, CISAK, 1988; SZUMINSKA, CISAK, 1990; RADI *et al.*, 1998; YUGANDHAR-SREEDHAR, 1999) e método espectrofluorimético (BELAL, 2008). Foram aplicadas para análise da nifuroxazida em fluidos biológicos várias técnicas polarográficas e voltamétricas (YUGANDHAR-SREEDHAR, 1999; RADI, EL-RIES, 1999), bem como a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (GUINEBAULT *et al.*, 1981). Recentemente, a resolução de misturas contendo nifuroxazida foi obtida usando-se CLAE (METWALLY *et al.*, 2006), cromatografia em camada delgada (CCD) e densitometria (METWALLY *et al.*, 2006; AYAD, 2006), além de uma série de métodos espectrofotométricos (METWALLY *et al.*, 2006; AYAD, 2006).

Foram empregadas para a determinação de nitrofurantoína em preparações farmacêuticas a espectrofotometria (AGRAWAL, PATEL, 1986; SASTRY *et al.*, 1992; WALASH *et al.*, 1994; PALABIYIK, ONUR, 2004), a polarografia por pulso diferencial (SRIDEVI, REDDY, 1991; REDDY, REDDY, 1992), a colorimetria (WALASH *et al.*, 1993), a CCD (KANIYOU, 1994), uma série de métodos voltamétricos (KHODARI *et al.*, 1999, HAMMAM, 2002; GUZMAN *et al.*, 2004, a CLAE (BELAL, 1988; KANIYOU, 1994; HASSAN *et al.*, 1990; SHINDLE *et al.*, 1995; PALABIYIK, ONUR, 2004; KANIYOU, 1994) e a espectrofluorimetria (BELAL, 2008). A nitrofurantoína foi quantificada em fluidos biológicos usando voltametria (KHODARI *et al.*, 1999; HAMMAM, 2002) e CLAE (ROSEBOOM, KOSTER, 1978; VREE *et al.*, 1979;

HOENER, WOLFF, 1980; MUTH *et al.*, 1996; ARANCIBIA *et al.*, 2003). Galeano (1997) empregou a CLAE para a quantificação de nitrofurantoína em leite e Leitner e colaboradores (2001) utilizou a mesma técnica acoplada a espectrômetro de massa para a quantificação deste fármaco em tecidos animais.

Até o presente momento, não foram encontrados métodos na literatura reportando a determinação e quantificação da nifuroxazida e da nitrofurantoína em meios para ensaios de permeabilidade, como o tampão Hanks.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivos gerais

Este estudo teve como objetivo geral desenvolver e validar métodos bioanalíticos por CLAE para a série de compostos de derivados 5-nitro-heterocíclicos de interesse, visando à quantificação de suas frações permeadas nos ensaios de permeabilidade *in vitro* usando células Caco-2.

4.2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, pretendeu-se realizar:

- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação por CLAE em tampão Hanks da amoxicilina, padrão de baixa permeabilidade empregado nos ensaios de permeabilidade *in vitro* utilizando células Caco-2;
- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação por CLAE em tampão Hanks do metoprolol, padrão de alta permeabilidade empregado nos ensaios de permeabilidade *in vitro* utilizando células Caco-2;
- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação por CLAE dos fármacos nifuroxazida e nitrofurantoína em tampão Hanks;

- Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para quantificação por CLAE da série de compostos 5-nitro-heterocíclicos derivados da nifuroxazida em tampão Hanks.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Material

4.3.1.1 Série de compostos

A série de compostos foi previamente descrita no Capítulo 3, item 3.3.1.1.

4.3.1.2 Substâncias Químicas de Referência

⇒ **Amoxicilina**

Fornecedor: Sigma-Aldrich

Lote: SZE7346X

Teor: 99,3%

Fabricação: 12/2007

Validade: 12/2013

⇒ **Metoprolol**

Fornecedor: Medley Farmacêutica Ltda

Lote: 9183

Teor: 100%

Fabricação: 07/2008

Validade: 07/2012

⇒ **Nifuroxazida**

Fornecedor: Sigma-Aldrich

Lote: 5082X

Teor: 99,9%

Fabricação: 08/2005

Validade: 03/2012

⇒ **Nitrofurantoína**

Fornecedor: Sigma-Aldrich

Lote: SZE9058X

Teor: 99,9%

Fabricação: 02/2009

Validade: 02/2016

4.3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente estudo foram:

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu composto por bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático de amostras SIL-10ADVP, detector DAD SPD-M10AVVP, forno de coluna CTO10AVP; Certificado de Qualificação Operacional e de Performance Nº 512/11 – HPLC Instrumentação Analítica;

- Balança analítica Shimadzu, modelo AX200;
- Banho ultrassônico Unique, modelo USC-2800A;
- Micropipetas de volume variável HT Labmate;
- Pipetadores automáticos HT Swiftpet;
- pHmetro Metrohm, modelo 827;
- Sistema de filtração a vácuo Quimis.

4.3.1.4 Solventes, reagentes e materiais empregados

Foram utilizados os seguintes solventes, reagentes e materiais no presente estudo:

- Acetato de amônio PA Merck;
- Acetonitrila grau cromatográfico Merck;
- Ácido ortofosfórico PA Merck;
- Água ultra-pura obtida em equipamento Millipore, modelo MilliQ Academic;
- Balão volumétrico âmbar Pirex[®] de 5, 10, 50, 100, 1.000 e 2.000 mL;
- Coluna cromatográfica Hypersil phenyl-2, 150 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μ m, Thermo Scientific;
- Fosfato dibásico de sódio PA Merck;
- Fosfato monobásico de potássio PA Merck;
- Hidróxido de sódio PA Merck;
- Metanol grau cromatográfico Merck;
- Membranas filtrantes Sartorius de acetato de celulose com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μ m;
- Ponteiros descartáveis Brand[®];
- Pré-coluna cromatográfica Hypersil fenil, 10 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 μ m, Thermo Scientific;
- Provetas Pirex[®] de 100, 500 e 1000 mL;
- Trietilamina PA Merck;

- Unidades filtrantes Millipore, tipo HV Millex em polietileno com membrana Durapore com 13 mm de diâmetro e poros de 0,45 µm;
- Vial Shell âmbar, volume 1 mL, dimensões 8 x 40 mm.

4.3.1.5 Infra-estrutura

As etapas de desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para quantificação de todas as substâncias no presente estudo foram realizadas no Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares (LPFCC) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob a responsabilidade da Profa. Assoc. Sílvia Storpirtis.

4.3.2 Métodos

4.3.2.1 Desenvolvimento do método bioanalítico de quantificação de amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e compostos 5-nitro-heterocíclicos

Na literatura encontram-se descritos diversos métodos para a quantificação por CLAE de amoxicilina nas mais variadas matrizes (ABREU *et al.*, 2003; FOROUTAN *et al.*, 2007; TAVAKOLI *et al.*, 2007; DELIS *et al.*, 2009; SHUKLA *et al.*, 2009; RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2011), assim como para o metoprolol (MUSCH *et al.*, 1989; RANTA *et al.*, 2002; DELAMOYE *et al.*, 2004; DONGRE *et al.*, 2008). Todavia, há poucos métodos descritos para quantificação da nifuroxazida em plasma e urina (GUINEBAULT *et al.*, 1981) e em preparações farmacêuticas (METWALLY *et al.*, 2006), por CLAE.

O desenvolvimento do método de quantificação da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos iniciou-se a partir de método de quantificação descrito por Abreu e colaboradores (2003), Dongre e colaboradores (2008) e Guinebault e colaboradores (1981), respectivamente, todos utilizando CLAE com detector UV-VIS. Os métodos são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1. Condições relativas aos métodos de partida encontrados na literatura para o desenvolvimento e validação dos métodos de quantificação por CLAE da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão Hanks.

Analito	Fase móvel	Fase estacionária	Fluxo (mL/min)	Comprimento de onda (nm)
amoxicilina ^a	tampão aquoso (fosfato 0,01 mol/L pH 4,8) e acetonitrila 95:5 (v/v)	coluna Lichrosorb RP (250 mm, 4,6 mm, 10 µm) com pré-coluna Securityguard C18 (4,0 mm, 3,0 mm, 10 µm), Phenomenex	1,3	229
metoprolol ^b	tampão aquoso (triethylamina pH 3) e acetonitrila 85:15 (v/v)	coluna Hypersil BDS cyano (250 mm, 4,6 mm, 5 µm)	1	220
nifuroxazida ^c	acetonitrila-ácido ortofosfórico (30:70 v/v, pH 2,5)	coluna Spherisorb ODS (150 mm, 4,6 mm, 5 µm)	1	370

^a Abreu e colaboradores (2003)

^b Dongre e colaboradores (2008)

^c Guinebault e colaboradores (1981)

4.3.2.2 Preparo de soluções-padrão da curva analítica

As soluções-padrão das curvas de calibração foram preparadas a cada dia de análise a partir de solução-estoque na concentração de 1 mg/mL, recentemente preparada. Todas as soluções-estoque foram preparadas a partir da pesagem de 25 mg dos compostos, seguida de sua solubilização em balão volumétrico calibrado de 25 mL, utilizando-se como solvente metanol para a amoxicilina, água ultrapurificada para o metoprolol, e DMSO para os compostos 5-nitro-heterocíclicos. Devido à fotossensibilidade dos nitrocompostos, suas soluções foram preparadas em balões volumétricos âmbar.

A partir das soluções-estoque foram preparadas as soluções-padrão por diluições sucessivas em tampão Hanks até atingir as concentrações de uso para construção da curva analítica. Os valores das concentrações empregadas, em ng/mL, estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4. 2. Valores de concentrações (ng/mL) das soluções-padrão utilizadas na construção da curva analítica e linearidade para quantificação da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão Hanks.

Substância	1	2	3	4	5	6	7	8
Amoxicilina	100	250	500	750	1000	1500	2000	-
Metoprolol	25	50	100	250	500	1000	2000	-
AminoFUR/BrFUR/AminoTIO	10	15	30	50	100	250	500	1000
EtoTIO	10	15	30	50	100	250	500	-
Demais 5-nitro-heterocíclicos	20	30	50	100	250	500	1000	-

4.3.2.3 Preparo de amostras de padrão de controle de qualidade

As amostras de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) para a amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos foram preparadas a partir de soluções-estoque obtidas conforme procedimento descrito no item 3.2.5. Os respectivos valores de concentrações encontram-se descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4. 3. Valores de concentrações (ng/mL) das amostras de controle de qualidade utilizadas na quantificação da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão de Hanks.

Substância	CQB	CQM	CQA
Amoxicilina	250	1200	1800
Metoprolol	50	725	1500
EtoTIO	30	200	400
Demais 5-nitro-heterocíclicos	30	400	800

*CQB: Controle de qualidade baixo; CQM: Controle de qualidade médio; CQA: Controle de qualidade alto.

Após o preparo, estas amostras de padrão de controle de qualidade foram aliqüotadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas em freezer a -20 °C.

Para a análise das amostras provenientes dos estudos de permeabilidade, optou-se pela injeção direta no sistema cromatográfico, sem a necessidade de procedimentos de extração e purificação.

4.3.2.5 Parâmetros de validação do método para quantificação de amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em solução tampão de Hanks

A validação do método foi realizada por meio da determinação dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, estabilidade e recuperação, conforme a Resolução 899/03 (BRASIL, 2003), que dispõe sobre as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos bioanalíticos.

Especificidade

A especificidade é definida como a capacidade do método em distinguir a substância analisada de todas as outras presentes na amostra (CAUSON, 1997). Na análise de amostras provenientes dos estudos de permeabilidade, interferentes potenciais incluem componentes endógenos, metabólitos, produtos de decomposição, além de adjuvantes como soro fetal ou muco simulado, quando utilizados.

Tal parâmetro foi investigado pela análise de seis amostras de tampão Hanks em comparação com solução contendo amoxicilina, metoprolol ou cada um dos compostos 5-nitro-heterocíclicos, próxima ao limite de quantificação, a fim de que possíveis interferências provenientes do tampão fossem avaliadas.

Linearidade

A linearidade indica a relação entre concentração de analito e resposta do método (BRESSOLLE *et al.*, 1996), representada, neste estudo, pela área do sinal cromatográfico. É obtida por meio da construção da curva analítica, que representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (BRASIL, 2003).

Para a construção da curva analítica foram utilizadas soluções de amoxicilina, metoprolol ou compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão Hanks nas concentrações descritas no Quadro 4.1, em triplicata. Estabeleceu-se correlação linear entre valores de concentração, considerados variáveis independentes (x), e as

áreas dos sinais cromatográficos do padrão, consideradas variáveis dependentes (y). Os parâmetros de correlação foram estimados empregando-se o método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003).

Precisão

A precisão de um método analítico representa o grau de concordância dos resultados obtidos quando um procedimento analítico é aplicado repetidamente. A precisão intra-dia refere-se à repetição do método com o mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos reagentes, em curto intervalo de tempo (no mesmo dia). A precisão inter-dias é obtida por meio de alteração de condições, como mudança de analista ou reagentes e utilização do método durante várias semanas ou meses (CAUSON, 1997).

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15% (BRASIL, 2003), segundo a equação:

$$CV(\%) = \frac{DP}{C_{média}} \times 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

Em que:

CV(%) = coeficiente de variação em porcentagem

DP = desvio-padrão

C_{média} = concentração média determinada

Esse parâmetro foi determinado analisando-se amostras de controle de qualidade em três concentrações diferentes para cada fármaco, em seis réplicas no mesmo dia (precisão intra-dia) e em dois dias consecutivos (precisão inter-dias).

Exatidão

A exatidão de métodos analíticos é uma medida de erro sistemático e é definida como concordância entre o valor determinado e o valor real (CAUSON, 1997).

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, e seu desvio não deve exceder 15%. Conforme a equação a seguir, tem-se:

$$Exatidão = \frac{C_{média}}{C_{teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

Em que:

$C_{média}$ = concentração média determinada

$C_{teórica}$ = concentração teórica, nominal

O referido parâmetro foi determinado pela análise de amostras de controle de qualidade em três diferentes concentrações e em seis réplicas em um mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dois dias diferentes (exatidão inter-dias).

Limite de detecção (LD) e limite inferior de quantificação (LIQ)

De acordo com a Resolução 899/03, o limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Para a determinação deste parâmetro, foram feitas injeções em ordem decrescente de concentração até que o sinal cromatográfico atingisse área referente a três vezes o ruído da linha base, no tempo de retenção do pico de interesse.

O limite inferior de quantificação deve representar a menor concentração que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Para a determinação do LIQ, as injeções foram feitas até que a área do pico fosse dez vezes superior ao ruído da linha base no tempo de retenção do pico de interesse. O pico de resposta da substância no LIQ deve ser

identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80-120% (BRASIL, 2003).

Estabilidade

A determinação da estabilidade de um fármaco em uma matriz biológica depende de vários fatores, tais como propriedades químicas do analito, condições de armazenamento da amostra, tipo de matriz biológica e material de acondicionamento (UNITED STATES, 2001). A determinação da estabilidade de uma amostra é fundamental para garantir que a concentração da substância a ser analisada não sofreu alteração entre a coleta e o momento da análise (CAUSON, 1997). Assim, é importante que se determine a estabilidade das amostras em temperatura ambiente e em ciclos de congelamento e descongelamento.

As amostras são consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20%. Conforme recomendado pela Resolução 899/03 (BRASIL, 2003), foram determinadas as estabilidades descritas a seguir.

Estabilidade de curta duração

Foram utilizadas três amostras de padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), mantidas à temperatura ambiente durante 6 horas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise de amostras recém-preparadas.

Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

Foram utilizadas três amostras de padrão de controle de qualidade em três concentrações (baixa, média e alta), submetidas às seguintes condições: congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, seguido de descongelamento à temperatura ambiente e posterior congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A concentração dos

analitos nas amostras de padrão de controle de qualidade foi determinada após seu descongelamento e comparada aos resultados de amostras recém-preparadas.

Recuperação

A recuperação indica a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. São desejáveis valores de recuperação próximos a 100% para as substâncias em estudo. No entanto, admitem-se valores menores, desde que sejam obtidos resultados precisos e exatos (BRASIL, 2003).

Esse parâmetro não foi determinado na validação dos métodos em questão, uma vez que não se realizou qualquer procedimento de extração com as amostras provenientes do experimento de permeabilidade, sendo realizada a injeção direta das amostras sem tratamento prévio.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Desenvolvimento e validação do método de quantificação da amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e compostos 5-nitro-heterocíclicos

Foram desenvolvidos métodos cromatográficos para a quantificação da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos, descritos na Tabela 4.4.

Tabela 4. 4. Condições relativas aos métodos de quantificação por CLAE desenvolvidos e validados para os compostos 5-nitro-heterocíclicos em estudo.

Analito	Fase móvel ^a	Fluxo (mL/min)	Temperatura do forno de coluna (° C)	λ (nm)	Tempo de retenção (min)
amoxicilina	10 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 4,8 e acetonitrila (95:5 v/v)	1,0	40	235	3,0
metoprolol	0,7% de trietilamina em pH 3,0 e acetonitrila (70:30 v/v)	1,0	40	220	3,4
nifuroxazida	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (80:20 v/v)	1,4	30	370	7,2
nitrofurantoína	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (80:20 v/v)	1,0	30	370	4,7
HFUR	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (65:35 v/v)	1,0	30	370	5,4
MeFUR	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (65:35 v/v)	1,0	30	370	5,7
EtoFUR	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (65:35 v/v)	1,2	30	370	4,5
AminoFUR	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (65:35 v/v)	1,0	30	370	3,5
BrFUR	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (55:45 v/v)	1,2	30	370	3,5
HTIO	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (65:35 v/v)	1,0	30	370	5,9
EtoTIO	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (55:45 v/v)	1,2	30	370	3,8
AminoTIO	5 mM de NaH ₂ PO ₄ em pH 3,1 e acetonitrila (65:35 v/v)	1,2	30	370	3,5

^aPara todos os métodos empregou-se coluna phenyl-2 HYPERSIL, 150 mm x 4,6 mm, 5µm, Thermo Scientific como fase estacionária e volume de injeção de 50 µL.

As fases móveis foram filtradas em membrana de acetato de celulose, com 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 μm e degaseificadas em banho ultrassônico por vinte minutos.

Os métodos descritos foram validados segundo os critérios estabelecidos na Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2003).

4.4.1.1 Especificidade

Os métodos desenvolvidos mostraram-se seletivos para todos os analitos em estudo, não ocorrendo interferências perceptíveis nos picos em seus respectivos tempos de retenção (Tabela 4.4).

Nas Figuras 4.1 a 4.12 estão representados os cromatogramas das injeções da solução de branco (tampão Hanks pH 7,4) e das injeções de amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 1. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de amoxicilina 250 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 2. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de metoprolol 250 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 3. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de nifuroxazida 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 4. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de nitrofurantoina 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 5. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de HFUR 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 6. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de MeFUR 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 7. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de EtoFUR 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 8. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de AminoFUR 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 9. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de BrFUR 30 ng/mL em solução tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 10. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de HTIO 30 ng/mL em solução tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 11. A – Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de EtoTIO 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

Figura 4. 12. A - Cromatograma de injeções de solução branco (tampão Hanks); B – Cromatograma de injeções de solução de AminoTIO 30 ng/mL em tampão Hanks pH 7,4.

4.4.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada pela injeção em triplicata de soluções-padrão de amoxicilina, metoprolol e dos compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão Hanks nas concentrações previamente descritas na Tabela 4.2.

As curvas de linearidade para os métodos validados e os parâmetros dos gráficos estão representados nas Figuras 4.13 a 4.24.

Figura 4. 13. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação da amoxicilina em tampão Hanks empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 14. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do metoprolol em tampão Hanks empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 15. Curva analítica e parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação da nifuroxazida em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 16. Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação da nitrofurantoína em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 17. Curva analítica referente ao método analítico desenvolvido para quantificação do HFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 18. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do MeFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 19. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do EtoFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 20. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do AminoFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 21. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do BrFUR em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 22. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do HTIO em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 23. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do EtoTIO em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

Figura 4. 24. Curva analítica e seus parâmetros referentes ao método analítico desenvolvido para quantificação do AminoTIO em solução proveniente de estudo de permeabilidade empregando-se CLAE-UV. Cada ponto representa a média de três determinações.

4.4.1.3 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram determinadas em dois níveis: intra-dia e inter-dias (2 dias consecutivos), sendo ambas avaliadas pela análise dos resultados obtidos das injeções de soluções-padrão controle previamente descritas na Tabela 4.3.

Os resultados para precisão, calculada em relação à área dos cromatogramas, e exatidão, calculada em relação às concentrações determinadas, relativos à amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos estão apresentados nas Tabelas 4.5 a 4.16.

Tabela 4. 5. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a amoxicilina utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
250	2,6	2,1	101,7	104,1
1200	0,4	0,5	102,5	102,5
1800	0,9	1,3	101,9	99,7

Tabela 4. 6. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o metoprolol utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
50	3,6	5,8	104,1	99,8
725	0,7	3,7	101,8	98,2
1500	1,3	2,9	98,5	101,2

Tabela 4. 7. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a nifuroxazida utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	5,2	7,1	106,1	103,4
400	0,4	0,3	97,1	97,0
800	0,2	0,3	98,0	98,3

Tabela 4. 8. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para a nitrofurantoína utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	4,1	3,7	102,9	105,5
400	0,3	0,3	102,8	102,5
800	6,7	5,7	105,6	103,8

Tabela 4. 9. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o HFUR utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	4,0	4,6	104,8	102,5
400	1,0	0,7	98,6	98,8
800	0,7	0,4	98,6	98,7

Tabela 4. 10. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o MeFUR utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	1,5	2,3	112,0	114,0
400	0,3	0,5	100,5	100,8
800	0,2	0,2	102,5	102,1

Tabela 4. 11. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o EtoFUR utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	3,3	3,6	112,1	110,8
400	0,6	0,6	102,2	100,7
800	0,1	0,4	102,8	101,2

Tabela 4. 12. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o AminoFUR utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	1,7	2,7	103,1	103,6
400	0,5	0,5	102,4	101,1
800	0,6	0,4	101,8	100,2

Tabela 4. 13. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o BrFUR utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	2,2	3,4	100,7	103,1
400	0,6	0,7	102,7	102,7
800	0,3	0,6	101,1	100,2

Tabela 4. 14. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o HTIO utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	3,3	3,2	107,4	108,6
400	0,5	1,0	98,2	96,1
800	0,3	0,2	100,4	99,4

Tabela 4. 15. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o EtoTIO utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	3,7	3,9	93,5	92,7
400	2,3	1,5	100,2	100,0
800	0,8	0,6	104,2	104,7

Tabela 4. 16. Precisão e exatidão calculados a partir da determinação de três concentrações diferentes em um mesmo dia (intra-dia) e em dias consecutivos (inter-dias) para o derivado tiofênico substituído com o grupo amino (AminoTIO) utilizando CLAE-UV.

Concentração (ng/mL)	Precisão CV (%)		Exatidão (%)	
	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)	Intra-dia (n=6)	Inter-dias (n=12)
30	1,3	3,3	98,6	100,9
400	0,6	0,7	102,0	100,2
800	0,5	0,5	101,6	100,9

4.4.1.4 Limite de detecção (LD) e limite inferior de quantificação (LIQ)

Os valores relativos aos LD e LIQ determinados neste estudo para a amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos estão apresentados na Tabela 4.17, bem como os valores de precisão e exatidão de LIQ.

Tabela 4. 17. LD e LIQ obtidos na validação dos métodos para quantificação de amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos empregando-se CLAE-UV.

Analito	LD	LIQ	Precisão (LIQ)	Exatidão (LIQ)
amoxicilina	40 ng/mL	100 ng/mL	4,0%	94,8%
metoprolol	7 ng/mL	25 ng/mL	8,7%	98,5%
nifuroxazida	6 ng/mL	20 ng/mL	4,3%	107,8%
nitrofurantoína	6 ng/mL	20 ng/mL	2,8%	94,7%
HFUR	6 ng/mL	20 ng/mL	5,8%	110,0%
MeFUR	6 ng/mL	20 ng/mL	3,7%	113,6%
EtoFUR	6 ng/mL	20 ng/mL	4,0%	83,5%
AminoFUR	3 ng/mL	10 ng/mL	3,5%	108,9%
BrFUR	3 ng/mL	10 ng/mL	4,8%	94,2%
HTIO	6 ng/mL	20 ng/mL	6,3%	107,7%
EtoTIO	3 ng/mL	10 ng/mL	3,8%	83,6%
AminoTIO	3 ng/mL	10 ng/mL	9,4%	115,3%

4.4.1.5 Estabilidade

Estabilidade de curta duração

Os resultados da avaliação da estabilidade de curta duração das amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) de amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em tampão Hanks mantidas à temperatura ambiente por 6 horas estão apresentados nas Tabelas 4.18 a 4.29.

Tabela 4. 18. Estabilidade da amoxicilina em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
250	254,1	2,5	101,6	246,4	3,1	100,0	-1,6
1200	1229,9	0,3	102,4	1228,7	0,8	102,5	0,1
1800	1835,3	0,9	101,9	1822,2	0,4	101,2	-0,7

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 19. Estabilidade do metoprolol em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
50	54,2	3,0	108,4	53,1	3,8	97,9	-11,5
725	719,3	0,7	99,2	718,2	3,2	99,8	0,6
1500	1497,7	0,6	99,8	1489,6	2,1	99,4	-0,4

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 20. Estabilidade da nifuroxazida em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	31,8	5,2	106,0	30,3	3,5	101,2	-4,8
400	388,4	0,4	97,1	390,5	0,7	97,6	0,5
800	784,5	0,2	98,0	787,3	0,1	98,4	0,4

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 21. Estabilidade da nitrofurantoína em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	30,8	4,1	102,9	32,3	2,2	107,7	4,8
400	411,2	0,3	102,8	407,0	0,2	101,7	-1,1
800	845,0	6,7	105,6	800,6	0,9	100,0	-5,4

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 22. Estabilidade do HFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	31,4	4,0	104,8	31,5	1,0	105,2	0,4
400	394,5	1,0	98,6	400,3	0,7	100,0	1,4
800	789,4	0,7	98,6	788,1	0,3	98,5	-0,1

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 23. Estabilidade do MeFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	33,6	1,5	112,0	34,4	2,7	113,9	1,9
400	402,0	0,3	100,5	400,6	0,5	100,1	-0,4
800	820,1	0,2	102,5	815,1	0,2	101,8	-0,7

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 24. Estabilidade do EtoFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	33,2	3,3	110,8	34,3	3,2	114,4	3,6
400	402,9	0,6	100,7	403,4	0,6	100,8	0,1
800	809,7	0,1	101,2	795,2	0,1	99,4	-1,8

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 25. Estabilidade do AminoFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	30,9	1,7	103,1	30,1	3,1	100,4	-2,7
400	409,9	0,5	102,4	409,0	0,5	102,2	-0,2
800	814,9	0,6	101,8	813,2	0,2	101,6	-0,2

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 26. Estabilidade do BrFUR em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	29,9	2,2	100,7	30,9	3,2	103,2	2,5
400	410,9	0,6	102,7	408,9	0,8	102,2	-0,5
800	809,3	0,3	101,1	802,2	0,9	100,2	-0,9

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 27. Estabilidade do HTIO em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	32,2	3,3	107,4	33,0	1,8	110,1	2,7
400	393,0	0,5	98,2	391,2	0,4	97,8	-0,4
800	803,2	0,3	100,4	803,8	0,2	100,5	0,1

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 28. Estabilidade do EtoTIO em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	28,0	3,7	93,5	26,7	1,9	89,1	-4,4
200	200,5	2,3	100,2	196,2	1,4	98,1	-2,1
400	417,1	0,8	104,2	415,8	1,3	103,9	-0,3

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 29. Estabilidade do AminoTIO em tampão Hanks após 6 horas em temperatura ambiente (TA). Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras em TA por 6 horas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	29,3	1,3	98,6	28,7	2,3	95,9	-2,6
400	407,9	0,6	102,0	415,4	0,4	103,8	1,8
800	813,4	0,5	101,6	813,3	0,8	101,5	-0,1

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Estabilidade em ciclo de congelamento e descongelamento

Nas Tabelas 4.30 a 4.41 encontram-se os resultados da avaliação da estabilidade das amostras de controle de qualidade de amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos após ciclos de congelamento e descongelamento obtidos pela comparação dos resultados das soluções congeladas a -20 °C por 48 horas com amostras recém-preparadas.

Tabela 4. 30. Estabilidade da amoxicilina em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
250	254,1	2,5	101,6	258,8	3,2	103,5	1,9
1200	1229,9	0,3	102,4	1210,0	0,6	100,8	-1,6
1800	1835,3	0,9	101,9	1747,8	2,9	97,1	-4,8

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 31. Estabilidade do metoprolol em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração ng/mL	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			Desvio ^a
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	
50	54,2	3,0	108,4	53,9	7,0	99,4	-9,0
725	719,3	0,7	99,2	719,5	4,5	100,0	0,8
1500	1497,7	0,6	99,8	1419	0,9	94,7	-5,1

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 32. Estabilidade da nifuroxazida em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			Desvio ^a
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	
30	31,8	5,2	106,0	30,2	3,1	100,6	-5,4
400	388,4	0,4	97,1	390,6	0,2	97,6	0,5
800	784,5	0,1	98,0	781,5	0,3	97,6	-0,4

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 33. Estabilidade da nitrofurantoína em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			Desvio ^a
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	
30	30,8	4,1	102,9	29,9	6,4	99,8	-3,1
400	411,2	0,3	102,8	393,0	0,1	98,2	-4,6
800	845,0	6,7	105,6	800,7	0,2	100,0	-5,6

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 34. Estabilidade do HFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	31,4	4,0	104,8	29,9	4,1	99,8	-5,0
400	394,5	1,0	98,6	386,9	1,1	96,7	-1,9
800	789,4	0,7	98,6	784,7	0,6	98,1	-0,5

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 35. Estabilidade do MeFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	33,6	1,5	112,0	33,8	2,4	114,3	2,3
400	402,0	0,3	100,5	419,9	0,4	104,9	4,4
800	820,1	0,2	102,5	788,1	0,5	98,5	-4,0

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 36. Estabilidade do EtoFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	33,2	3,3	110,8	32,0	3,2	106,6	-4,2
400	402,9	0,6	100,7	418,0	0,5	104,5	3,8
800	809,7	0,1	101,2	829,0	0,3	103,7	2,5

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 37. Estabilidade do AminoFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			Desvio ^a
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	
30	30,9	1,7	103,1	32,1	2,3	107,1	4,0
400	409,9	0,5	102,4	394,5	1,0	98,6	-3,8
800	814,9	0,6	101,8	772,2	0,6	96,3	-5,5

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.**Tabela 4. 38.** Estabilidade do BrFUR em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			Desvio ^a
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	
30	29,9	2,2	100,7	32,8	1,9	106,8	6,1
400	410,9	0,6	102,7	401,8	0,8	100,4	-2,3
800	809,3	0,3	101,1	774,0	0,6	96,7	-4,4

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.**Tabela 4. 39.** Estabilidade do HTIO em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			Desvio ^a
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	
30	32,2	3,3	107,4	33,1	2,8	110,4	3,0
400	393,0	0,5	98,2	373,9	2,0	93,4	-4,8
800	803,2	0,3	100,4	787,9	0,2	98,5	-1,9

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 40. Estabilidade do EtoTIO em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	28,0	3,7	93,5	28,2	3,9	94,1	0,6
200	200,5	2,3	100,2	190,2	1,5	95,1	-5,1
400	417,1	0,8	104,2	398,1	1,3	99,5	-4,7

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

Tabela 4. 41. Estabilidade do AminoTIO em tampão Hanks após congelamento por 48 horas em temperatura -20° C. Resultados representam a média de seis determinações.

Concentração (ng/mL)	Amostras recém-preparadas			Amostras congeladas			
	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Conc deter.	Precisão CV (%)	Exatidão (%)	Desvio ^a
30	29,3	1,3	98,6	29,4	4,1	97,2	-1,4
400	407,9	0,6	102,0	389,8	0,9	97,4	-4,6
800	813,4	0,5	101,6	781,1	0,4	97,6	-4,0

^aDesvio = desvio em relação à amostra recém-preparada.

4.5 DISCUSSÃO

A condução apropriada do desenvolvimento e validação dos métodos bioanalíticos para a quantificação de amostras nos estudos de permeabilidade *in vitro* é mandatória para a adequada aplicação destes na triagem do perfil farmacocinético de novos candidatos a fármacos. Estas etapas são consideradas grandes desafios para o emprego dessa técnica *in vitro*, uma vez que reduzidas concentrações de quantidade permeada são geralmente obtidas. Nestes experimentos, o método bioanalítico deve apresentar grande sensibilidade, sendo capaz de detectar e quantificar as substâncias de interesse com níveis de precisão e exatidão adequados. Além disso, a especificidade do método deve ser suficientemente alta para evitar a interferência dos diversos compostos constituintes

dos meios empregados nos estudos, que são constituídos por grande variedade de sais e suplementos, tais como aminoácidos, fontes de carboidratos e soro fetal bovino. Compostos oriundos do metabolismo celular também podem representar potencial interferente, o que torna complexa a matriz em análise.

A seleção dos fármacos amoxicilina e metoprolol como padrões de baixa e alta permeabilidade, respectivamente, para a condução dos ensaios de permeabilidade, foi realizada de acordo com a lista de recomendação do guia da agência regulatória norte-americana (FDA – *Food and Drug Administration*) que dispõe sobre bioensaios (UNITED STATES, 2000), bem como na simplicidade e facilidade de execução dos métodos de detecção por CLAE-UV descritos na literatura para estes fármacos.

Os métodos desenvolvidos mostraram-se adequados para a quantificação de amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em amostras provenientes dos experimentos de permeabilidade, de acordo com os resultados referentes à validação do método, tais como, especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite inferior de quantificação e estabilidade, justificando sua utilização na quantificação destes compostos fármacos nos estudos.

O método desenvolvido para os compostos 5-nitro-heterocíclicos baseou-se em método descrito para a quantificação de nifuroxazida em plasma (GUINEBAULT, 1981), sendo que a série de compostos estudados é análoga a este fármaco. O método descrito por Guinebault apresentou limite de quantificação de 2 ng/mL, que é inferior ao desenvolvido neste trabalho (10 ou 20 ng/mL). A maior sensibilidade daquele deve-se, provavelmente, à etapa de extração das amostras que precede sua quantificação, a qual permite a posterior solubilização da nifuroxazida em mistura de acetonitrila e água (10:90 v/v), diminuindo a presença de interferentes. Todavia, o método desenvolvido neste estudo permite a injeção direta das amostras provenientes do estudo de permeabilidade, que, além de facilitar o procedimento, reduz o custo do método, não sendo necessários investimentos no preparo e extração das amostras, além de evitar a perda das mesmas, cujo volume é reduzido (aproximadamente 200 µL).

Com o método inicialmente desenvolvido para o derivado tiofênio etóxi-substituído (EtoTIO), Tabela 3.1, não se observou linearidade empregando-se a concentração de 1000 ng/mL na curva analítica, devido à baixa solubilidade deste composto em tampão Hanks. Deste modo, a maior concentração utilizada para a construção da curva analítica foi 500 ng/mL, com a qual se obteve adequada linearidade. Da mesma forma, não foi observada linearidade para o método desenvolvido para o derivado tiofênico bromo-substituído (BrTIO) com o emprego na curva analítica de concentrações iguais ou superiores a 500 ng/mL, novamente devido à baixa solubilidade da substância em tampão Hanks. Com isso, a concentração inicial a ser utilizada no ensaio de permeabilidade para o BrTIO deveria ser inferior a 500 ng/mL, o que demandaria técnica bioanalítica de sensibilidade superior à CLAE, como por exemplo, CLAE com detector de espectrofotometria de massas. Devido à inviabilidade de se realizar desenvolvimento e validação de método com a referida técnica, este composto foi retirado da série em estudo para a realização dos ensaios de permeabilidade *in vitro* empregando células Caco-2.

Devido à fotossensibilidade dos compostos 5-nitro-heterocíclicos, suas soluções foram preparadas, desde a pesagem dos compostos, sob proteção da luz, por meio da redução da luz no ambiente e do uso de vidraria âmbar. Desta forma, permitiu-se sua quantificação dentro dos critérios de validação bioanalítica, especialmente aqueles relacionados à estabilidade, de acordo com a Resolução 899/03 (BRASIL, 2003). Para comprovação da eficiência da manipulação dos compostos 5-nitro-heterocíclicos sob proteção da luz na manutenção de sua estabilidade, foram realizados testes visando à quantificação de soluções de diferentes concentrações preparadas em presença e ausência de luz. A comparação dos resultados obtidos evidenciou a preservação da estabilidade dos compostos apenas quando as soluções foram preparadas em condição de baixa luminosidade. Adicionalmente, trabalhos reportados na literatura comprovam que a manipulação e o armazenamento das soluções dos compostos 5-nitro-heterocíclicos sob proteção da luz é eficaz na preservação de sua estabilidade (HASSAN *et al.*, 1990; MUTH *et al.*, 1996; BELAL, 2008).

4.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- O método desenvolvido e validado que empregou CLAE-UV para a quantificação de amoxicilina nos ensaios de permeabilidade *in vitro* usando células Caco-2 mostrou-se adequado considerando-se as recomendações da Resolução 899/03 (BRASIL, 2003);
- O método desenvolvido e validado que empregou CLAE-UV para a quantificação de metoprolol nos ensaios de permeabilidade *in vitro* usando células Caco-2 mostrou-se adequado considerando-se as recomendações da Resolução 899/03 (BRASIL, 2003);
- Os métodos desenvolvidos e validados que empregaram CLAE-UV para a quantificação de nitrofurantoína e nifuroxazida nos ensaios de permeabilidade *in vitro* usando células Caco-2 mostraram-se adequados considerando-se as recomendações da Resolução 899/03 (BRASIL, 2003);
- Os métodos desenvolvidos por CLAE-UV para a quantificação dos análogos à nifuroxazida HFUR, MeFUR, EtoFUR, AminoFUR, BrFUR, HTIO, EtoTIO e AminoTIO nos ensaios de permeabilidade *in vitro* usando células Caco-2 mostraram-se adequados considerando-se as recomendações da Resolução 899/03 (BRASIL, 2003).

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.R.P.; ORTIZ, R.A.M. CASTRO, S.C.; PEDRAZZOLI JR, J. HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration. *J Pharm Pharmaceut Sci.*, v. 6, n. 2, p. 223-230, 2003.
- AGRAWAL, Y.K.; PATEL, D.R. Spectrophotometric determination of nitrofurazone. *Anal Lett*, v. 19, n. 11, p. 1289–1296, 1986.
- ARANCIBIA, V.; VALDERRAMA, M.; MADARIAGA, A.; ZUNIGA, M.C.; SEGURA, R. Extraction of nitrofurantoin and its toxic metabolite from urine by supercritical fluids. Quantitation by high performance liquid chromatography with UV detection. *Talanta*, v. 61, n. 3, p. 377–383, 2003.

- AYAD, M.M.; YOUSSEF, N.F.; ABDELLATIF, H.E.; SOLIMAN, S.M. A comparative study on various spectrometries with thin layer chromatography for simultaneous analysis of drotaverine and nifuroxazide in capsules. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 54, n.6, p. 807–813, 2006.
- BELAL, F. Simultaneous high performance liquid chromatographic determination of phenazopyridine and nitrofurantoin in tablets. *Chromatographia*, v. 25, n. 1, p. 61–63, 1988.
- BELAL, T.S. A Simple and Sensitive Spectrofluorimetric Method for Analysis of Some Nitrofurantoin Drugs in Pharmaceutical Preparations. *J. Fluoresc.*, v. 18, p. 771–780, 2008.
- BRASIL. Resolução RDC n.899, de 29 de maio de 2003. “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. [A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Regulamento técnico para medicamentos genéricos]. Via Internet, no endereço eletrônico <http://e-legis.bvs.br/leisref/publi/showAct.php?id=1237&word>. 2009.
- BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M. AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.686, n.1, p.3-10, 1996.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion, *J. Chromatogr. B.: Biomed. Sci. Appl.*, v.689, n.3, p.269-282, 1997.
- DELAMOYE, M.; DUVERNEUIL, C.; PARAIRE, F.; MAZANCOURT, P.; ALVAREZ, J.-C. Simultaneous determination of thirteen β -blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection. *Forensic Science International*, v. 141, p. 23–31, 2004.
- DELIS, G.; BATZIAS, G.; KOUNENIS, G.; KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU, M. Application and validation of a LC/fluorescence method for the determination of amoxicillin in sheep serum and tissue cage fluid. *J. Pharm. Biom. Anal.*, v. 49, p. 375–380, 2009.
- DONGRE, V.G.; SHAH, S.B.; KARMUSE, P.P.; PHADKE, M.; JADHAV, V.K. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, p. 583–586, 2008.
- FOROUTAN, S.M.; ZARGHI, A.; SHAFATI, A.; KHODDAM, A.; MOVAHED, H. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by isocratic reversed-phase HPLC using UV detection. *J. of Pharmac. and Biomed. Anal.*, v. 45, p. 531–534, 2007.
- GALEANO, T.; GUIBERTEAU, A.; ACEDO, M.I.; CORREA, C.A.; SALINAS, F. Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, v. 764, p. 243, 1997.
- GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS *et al.* **Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1ª ed, 2009, cap. 19, pag 204-211.
- GUINEBAULT, P.R.; BROQUAIRE, M.; BRAITHWAITE, R.A. Determination of nifuroxazide in biological fluids by automated high-performance liquid chromatography with large-volume injection. *J Chromatogr.*, v. 204, p. 329-333, 1981.
- GUZMAN, A.; AGU,I.L.; PEDRERO, M.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J.M. Voltammetric determination of antibacterial nitro-compounds at activated carbon fibre microelectrodes. *Electroanalysis*, v. 16, n. 21, p.1763–1770, 2004.
- HAMMAM, E. Determination of nitrofurantoin drug in pharmaceutical formulation and biological fluids by square-wave cathodic adsorptive stripping voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 30, n. 3, p. 651–659, 2002.
- HASSAN, S.M.; IBRAHIM, F.A.; EL-DIN, M.S.; HEFNAWY, M.M. Stability-indicating high performance liquid chromatographic assay for the determination of some pharmaceutically important nitro-compounds. *Chromatographia*, v. 30, p. 176–180,1990.
- HOENER, B.A.; WOLFF, J.L. High-performance liquid chromatographic assay for the metabolites of nitrofurantoin in plasma and urine. *Chromatogr. B*, v. 182, p. 246, 1980.
- KANIOU, I.; ZACHARIADIS, G.; KALLIGAS, G.; TSOUKALI, H.; STRATIS, J. Separation and determination of carbadox, nitrofurazone, nitrofurantoin, furazolidone, and furaltadone in their

- mixtures by thinlayer and high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.*, v. 17, n. 6, p. 1385–1398, 1994.
- KHODARI, M.; MANSOUR, H.; MERSAL, G.A.M. Cathodic-stripping voltammetric behaviour of nitrofurazone and its determination in pharmaceutical dosage forms, urine and serum by linear sweep voltammetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 20, n. 3, p. 579–586, 1999.
- LEITNER, A.; ZOLLNER, P.; LINDNER, W. Determination of the metabolites of nitrofurantoin in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 939, p. 49, 2001.
- METWALLY, F.H.; ABDELKAWY, M.; NAGUIB, I.A. Determination of nifuroxazide and drotaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations by three independent analytical methods. *J. AOAC Int.*, v. 89, n. 1, p. 78–87, 2006.
- MUSCH, G.; BUELENS, Y.; MASSART, D.L. A strategy for the determination of beta blockers in plasma using solid-phase extraction in combination with high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, v. 7, n. 4, p. 483–497, 1989.
- MUTH, P.; METZ, R.; SLEMS, B.; BOLTEN, W.W.; VERGIN, H. Sensitive determination of nitrofurantoin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 729, p. 251–258, 1996.
- PALABIYIK, I.M.; ONUR, F. Liquid chromatographic and spectrophotometric determination of phenazopyridine hydrochloride, ampicillin trihydrate and nitrofurantoin in pharmaceutical preparations. *Anal. Lett.*, v. 37, n. 10, p. 2125–2150, 2004.
- RADI, A.; EL-LABAN, S.; KENAWY, I.M.M. Determination of nifuroxazide in capsules by differential pulse polarography. *Anal. Sci.*, v. 14, n. 3, p. 607–608, 1998.
- RADI, A.; EL-RIES, M.A. Determination of nifuroxazide in human serum by adsorptive stripping voltammetry. *Anal. Sci.*, v. 15, n. 4, p. 385–388, 1999.
- RAMBLA-ALEGRE, M.; MARTÍ-CENTELLES, R.; PESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Application of a liquid chromatographic procedure for the analysis of penicillin antibiotics in biological fluids and pharmaceutical formulations using sodium dodecyl sulphate/propanol mobile phases and direct injection. *J. Chromatogr. A*, doi:10.1016/j.chroma.2010.12.015, 2011.
- RANTA, V.-P.; TOROPAINEN, E.; TALVITIE, A.; AURIOLA, S.; URTTI, A. Simultaneous determination of eight β -blockers by gradient high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and fluorescence detection in corneal permeability studies *in vitro*. *J. Chromatogr. B*, v. 772, p. 81–87, 2002.
- REDDY, C.S.; REDDY, S.J. Electrochemical reduction of nitrofurazone and its determination in pharmaceutical dosage forms by differential pulse polarography. *Electroanalysis*, v. 4, n. 5, p. 595–599, 1992.
- ROSEBOOM, H.; KOSTER, H.A. The determination of nitrofurantoin and some structurally related drugs in biological fluids by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, v. 101, p. 359, 1978.
- SASTRY, B.S.; RAO, J.V.; RAO, T.T.; SASTRY, C.S.P. Four spectrophotometric methods for determination of nitrofurazone in pharmaceutical formulations. *Mikrochim Acta*, v. 108, p. 185–193, 1992.
- SHINDE, V.M.; TENDOLKAR, N.M.; DESAI, B.S. Simultaneous determination of nitrofurantoin and trimethoprim in capsules by HPLC. *Indian Drugs*, v. 32, n. 6, p. 283–286, 1995.
- SHUKLA, C.; PATEL, V.; JULURU, R.; STAGNI, G. Quantification and Prediction of Skin Pharmacokinetics of Amoxicillin and Cefuroxime. *Biopharm. Drug Dispos.*, v. 30, p. 281–293, 2009.
- SRIDEVI, C.; REDDY, S.J. Electrochemical behaviour of nitrofurantoin and assay of its formulations. *Electroanalysis*, v. 3, p. 435–438, 1991.
- SZUMINSKA, E.; CISAK, A. Polarographic and spectrophotometric determination of nifuroxazide in pharmaceuticals. I. Determination of nifuroxazide in capsules. *Acta Pol. Pharm.*, v. 45, n. 6, p. 551–558, 1988.

- SZUMINSKA, E.; CISAK, A. Polarographic and spectrophotometric determination of nifuroxazide in pharmaceuticals. II. Determination of nifuroxazide in suspensions. *Acta Pol Pharm.*, v. 47, p. 1–2, 1990.
- TAVAKOLI, N.; VARSHOSAZ, J.; DORKOOSH, F.; ZARGARZADEH, M.R. Development and validation of a simple HPLC method for simultaneous in vitro determination of amoxicillin and metronidazole at single wavelength. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 325–329
- UNITED STATES. Department of Healthy and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System.** US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2000.
- UNITED STATES. Department of Healthy and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation**, 25p, 2001.
- VREE, T.B.; HEKSTER, A.; BAARS, A.M.; DAMSMA, J.E.; VAN DER KLEIJN, E. Determination of nitrofurantoin (Furadantine) and hydroxymethylnitrofurantoin (Urfadyn) in plasma and urine of man by means of high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, v. 162, p. 110, 1979.
- YUGANDHAR-SREEDHAR, N.; REDDY-SAMATHA, K.; KUMAR-REDDY, P.R. Electrochemical reduction behaviour and analysis of nifuroxazide in formulations and urine samples. *Indian Drugs*, v. 36, n. 8, p. 509–512, 1999.
- WALASH, M.I.; EL-BRASHY, A.M.; SULTAN, M.A. Colorimetric determination of some aromatic nitro-compounds of pharmaceutical interest. *Anal. Lett.*, v. 26, n. 3, p. 499–512, 1993.
- WALASH, M.I.; EL-BRASHY, A.M.; EL-DIN, M.S.; ABUIRJEIE, M.A.; EL-RAHMAN-SULTAN, M.A. Zero-crossing first derivative spectrophotometry for the simultaneous determination of phenazopyridine and nitrofurantoin in tablets. *Pharmazie*, v. 49, n. 9, p. 698–699, 1994.

CAPÍTULO 5

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA PERMEABILIDADE
EMPREGANDO CÉLULAS CACO-2**

5.1 INTRODUÇÃO

5.1.1 Emprego das células Caco-2 em ensaios de permeabilidade

A partir da década de 1980, as células Caco-2 tornaram-se promissora ferramenta nos estudos de avaliação das funções das células intestinais por apresentarem peculiaridades interessantes em relação aos outros tipos celulares até então disponíveis. Destaca-se, entre estas, sua capacidade de diferenciação espontânea em cultivo *in vitro*, expressando muitas características morfológicas e bioquímicas presentes no intestino delgado humano (ARTURSSON, BORCHARD, 1997). Mantidas as condições adequadas de cultivo, as células Caco-2 crescem formando uma monocamada de células cilíndricas polarizadas, com microvilosidades na borda apical, apresentando, ainda, as junções oclusivas entre células adjacentes e expressando proteínas de transporte, proteínas de efluxo e enzimas de conjugação fase II. Uma diferença funcional entre células epiteliais humanas e células Caco-2 é a falta de expressão de isozimas citocromo P450, em especial CYP3A4, a qual é normalmente expressa em altos níveis no intestino. Todavia, as células Caco-2 podem expressar altos níveis desta enzima quando incubadas com vitamina D3 (PINTO *et al.*, 1983; BREEMEN, LI, 2005).

Aplicações para a utilização de técnicas que empregam as membranas Caco-2 vêm aumentando vertiginosamente, pois a partir destes estudos pode-se: estudar as funções das células epiteliais do intestino; investigar estratégias de formulações com intuito de melhorar a permeabilidade de determinado fármaco através da membrana; investigar o potencial efeito tóxico de determinados compostos; avaliar o metabolismo pré-sistêmico de fármacos, caracterizar possíveis interações entre fármacos envolvendo o processo de absorção e uso em bioensaios. Nos últimos 20 anos, houve crescimento no emprego das células Caco-2 como rápida ferramenta para a triagem *in vitro* da permeabilidade intestinal, dando suporte ao desenvolvimento de fármacos e direcionando as alterações das características físico-químicas responsáveis pela absorção (ARTURSSON, MAGNUSSON, 1990; RUBAS, JEZYK, GRASS, 1993; ARTURSSON, BORCHARD, 1997; GINSK, POLLI, 1999; LENTZ *et al.*, 2000).

Para a condução dos experimentos de permeabilidade *in vitro*, as monocamadas de células Caco-2 são geralmente cultivadas em suportes plásticos semipermeáveis que mantêm o livre acesso de íons e nutrientes constituintes do meio de cultivo em ambos os lados da membrana formada, garantindo as condições mais próximas possíveis das encontradas no intestino humano. Na Figura 5.1 representa-se o cultivo das células Caco-2 em suporte permeável para realização dos experimentos de permeabilidade. Os compostos em estudo são adicionados no compartimento apical ou basolateral da monocamada. Durante incubação, alíquotas da solução tampão empregada no experimento são retiradas em diferentes tempos do compartimento oposto para a determinação da concentração dos compostos em estudo e o cálculo de suas velocidades de permeabilidade, chamada de coeficiente de permeabilidade aparente (BREEMEN, LI, 2005).

Figura 5. 1. Esquema do suporte de cultivo de células Caco-2 *in vitro* empregado nos estudos de permeabilidade (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

No entanto, essa técnica apresenta limitações ao emprego de células Caco-2 para avaliar a permeabilidade, sendo as principais:

1) o número reduzido de transportadores, como peptídeos, o que pode explicar por que antimicrobianos betalactâmicos, como cefalexina e amoxicilina apresentam baixa permeabilidade através da monocamada de células de Caco-2, mas são completamente absorvidos *in vivo* (CHONG *et al.*, 1996);

2) a baixa permeabilidade de compostos hidrofílicos com baixo peso

molecular, como ranitidina, atenolol, furosemida e hidroclorotiazida, que apresentam baixa permeabilidade (igual ou menor à do manitol) através de células Caco-2, embora em humanos a absorção seja maior que 50% (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000);

3) a presença de co-solventes, como metanol, etanol, propilenoglicol e polietilenoglicol, em concentrações maiores que 1-2% (v/v), que podem danificar a membrana;

4) a aderência física do fármaco ao filtro de policarbonato, apresentando reduzida permeação, principalmente, para aqueles que apresentam alta lipofilicidade;

5) o tempo elevado de crescimento das células Caco-2, as quais requerem período de cultura de até três semanas, em condições adequadas.

Além disso, fatores como temperatura, nutrientes, tempo e intervalo entre os repiques podem influenciar as características da membrana formada. Durante os estudos de transporte transepitelial de fármacos, algumas condições devem ser definidas previamente, como a concentração do fármaco a ser empregada, a duração do estudo e o intervalo de coleta de amostras, o pH e composição do meio e a velocidade de agitação do sistema, entre outros. Essas variáveis podem influenciar consideravelmente nas características da membrana formada, bem como nos resultados de permeabilidade obtidos. As diferenças em relação à expressão de transportadores e dificuldade em reproduzir resultados de permeabilidade têm sido discutidas por diferentes pesquisadores (ARTURSSON, MAGNUSSON, 1990; BEHRENS, KISSEL, 2003; SUN, LENNERNÄS, WELAGE, 2002; ANDERLE, NIEDERER, RUBAS, 1998).

A capacidade de previsão e utilidade do modelo de células Caco-2, no que diz respeito à análise do potencial de absorção de substâncias, foi demonstrada inúmeras vezes por vários pesquisadores (ARTURSSON, KARLSSON, 1991; RUBAS, JEZYK, GRASS, 1993; KIM, BURTON, BORCHARD, 1993; CONRADI, WILKINSON, RUSH, 1993; RUBAS, VILLAGRAN, CROMWELL, 1995; GINSK, POLLI, 1999). A melhor correlação com a situação *in vivo* é obtida para os

compostos que são transportados pela via passiva transcelular.

Uma das primeiras tentativas de correlacionar a absorção oral de fármacos em humanos com sua permeabilidade passiva em monocamadas de células Caco-2 revelou que estas podem ser usadas para identificar candidatos a fármacos com problemas potenciais de absorção (ARTURSSON, KARLSSON, 1991). Em alguns estudos empregando principalmente fármacos transportados pela via passiva transcelular constatou-se que por meio de monocamadas de células Caco-2 foi possível classificar as permeabilidades dos fármacos analisados da mesma forma que em modelos de absorção mais complexos, como a perfusão *in situ* (RUBAS, VILLAGRAN, CROMWELL, 1995; KIM, BURTON, BORCHARD, 1993; CONRADI, WILKINSON, RUSH, 1993; MASUNGI, BORREMANS, WILLEMS, 2004).

A via paracelular passiva é menos permeável nas monocamadas celulares do que *in vivo*, provavelmente devido à menor quantidade de poros nas junções oclusivas das primeiras (TANAKA, TAKI, SAKANE, 1995) e devido à menor área de superfície absorptiva nas monocamadas celulares (MADARA, HECHT, 1999). Os dados de permeabilidade obtidos, todavia, indicam que a seletividade deste transporte é comparável com a situação *in vivo*, sendo a classificação dos compostos qualitativa, e não quantitativa.

A correlação entre a absorção de compostos ativamente transportados e sua permeabilidade *in vitro* tem gerado resultados variáveis, tendo sido prevista em alguns casos. Entretanto, para confirmar os resultados encontrados, uma caracterização mais extensiva da expressão dos transportadores envolvidos precisa ser realizada antes das correlações serem estabelecidas (LENNERNÄS, NILSSON, AQUILONIUS, 1993; LENNERNÄS *et al.*, 1996; HU, BORCHARD, 1990; STEWART, CHAN, LU, 1995).

Alguns pesquisadores publicaram estudos correlacionando dados de permeabilidade aparente com fração absorvida *in vivo* em humanos, empregando compostos absorvidos por diferentes mecanismos. Yee (1997) realizou estudo com 36 compostos estruturalmente diversos, e concluiu que as células Caco-2 são uma ferramenta valiosa para a predição da absorção em humanos. Os dados obtidos permitiram ao pesquisador classificar os valores de permeabilidade aparente de

acordo com a fração absorvida, sendo que um fármaco pode ser considerado pouco absorvido (0 – 20%) quando o valor de P_{app} for menor que 1×10^{-6} cm/s, moderadamente absorvido (20 – 70%) quando o valor de P_{app} estiver entre 1 a 10×10^{-6} cm/s e bem absorvido (70 – 100%) quando P_{app} for maior que 10×10^{-6} cm/s (YEE, 1997). Dois anos mais tarde, Biganzoli e colaboradores (1999) descreveram o uso do modelo de células Caco-2 para a caracterização da permeabilidade intestinal de uma série de agentes antimicrobianos de origem natural e sintética e compararam os valores de P_{app} com a biodisponibilidade oral em humanos. De acordo com os resultados obtidos, sugeriu-se classificação específica para antimicrobianos, sendo que valores de P_{app} menores que $0,2 \times 10^{-6}$ cm/s estão relacionados a compostos com biodisponibilidade menor que 1%; valores de P_{app} entre $0,2$ e 2×10^{-6} cm/s se referem a fármacos com biodisponibilidade entre 1 e 90%; e valores de P_{app} maiores que 2×10^{-6} cm/s correspondem a substâncias com biodisponibilidade acima de 90% (BIGANZOLI *et al*, 1999).

Os resultados gerados nos diversos estudos relacionando valores de permeabilidade aparente e frações absorvidas em humanos atestam a aplicação do modelo de células Caco-2 como ferramenta adequada para a triagem de potenciais problemas relacionados à absorção de novos candidatos a fármacos. Adicionalmente, este modelo é capaz de identificar quais são os principais mecanismos de absorção dos compostos em estudo, tornando-se ferramenta bastante promissora, intensamente utilizada por diversos grupos de pesquisa e indústrias farmacêuticas nas etapas iniciais do processo de desenvolvimento de fármacos, nas quais pouco se conhece sobre o composto.

5.1.2 Permeabilidade intestinal dos fármacos nifuroxazida e nitrofurantoína

Informações a respeito da absorção oral da nifuroxazida bem como de sua permeabilidade intestinal são escassas. Todavia, é consenso que este fármaco apresenta baixa absorção (CAEKENBERGHE, BREYSSSENS, 1987; CEDILLO-RIVERA, MUNOZ, 1992; ERCEFURYL, 2007), o que explica sua utilização na

terapêutica como antimicrobiano para tratamento de infecções no trato gastrointestinal (ERCEFURYL, 2007).

Em estudo realizado por Guinebault e colaboradores (1981), a administração oral de 800 mg diários de nifuroxazida a humanos por 22 dias resultou em picos de concentração plasmática do fármaco inalterado de 0,5-3,0 ng/mL. Labaune e colaboradores (1986) reportaram que o nível de nifuroxazida inalterada em amostras de sangue e urina coletadas em intervalos de até 48 h após a administração oral do fármaco em humanos não excedeu o limite de detecção (1 ng/mL) após administração de dose única oral de 600 mg. Os autores sugerem que a nifuroxazida possa ter sido extensivamente metabolizada, ficando retida nos tecidos ou não ter sido significativamente absorvida. Os pesquisadores realizaram ainda estudos de distribuição e eliminação do fármaco em camundongos por meio da administração de 10 e 100 mg/Kg de nifuroxazida por intubação gástrica. Os dados indicam que aproximadamente 50% da dose administrada por via oral foram absorvidos e que a nifuroxazida seja, na realidade, extensivamente metabolizada, ao invés de ter baixa absorção.

A nitrofurantoína tem sido extensivamente estudada em relação à sua farmacocinética, principalmente devido à sua excreção no leite humano. Embora tenha limitada solubilidade em água, dissolve-se facilmente em soluções alcalinas e na urina. Buzard e colaboradores (1961) constataram que este fármaco é rapidamente absorvido pelo intestino delgado, fornecendo níveis plasmáticos elevados em poucos minutos. Alguma absorção foi observada também no cólon, porém não foi possível realizar o experimento a partir do estômago ou ceco. A presença de alimentos no trato gastrointestinal ou o atraso no esvaziamento gástrico aumentam a absorção da nitrofurantoína pelo aumento de sua velocidade de dissolução. A biodisponibilidade é de 87% quando administrada na ausência de alimentos e aumenta para 94% na presença destes. As concentrações plasmáticas máximas após dose oral única de 100 mg são geralmente atingidas em 1-2 horas após a ingestão e chegam a 1 mg/mL (SHAH, WADE, 1989).

Demonstrou-se que a nitrofurantoína é ativamente transportada para o leite de humanos e de ratos, alcançando concentrações 20 a 100 vezes maiores do que a

prevista por difusão passiva, respectivamente (GERK *et al.*, 2001a; GERK *et al.*, 2001b). Posteriormente, constatou-se que a BCRP é o transportador responsável por este fenômeno (MERINO *et al.*, 2005). Apesar da atividade da BCRP, expressa no jejuno em níveis consideravelmente superiores aos de muitos outros transportadores ABC (TAIPALESUU *et al.*, 2001), o que se observa é uma elevada permeabilidade intestinal da nitrofurantoína.

A presença da BCRP em células Caco-2 foi constatada por XIA e colaboradores (2005), que concluíram que sua expressão é polarizada na porção apical destas células, sendo capaz de transportar eficientemente seus substratos para fora das células. LIN e colaboradores (2011) avaliaram a permeabilidade de alguns fármacos frente às células Caco-2 utilizando inibidores para os transportadores de efluxo P-gp e BCRP. Para a nitrofurantoína, os resultados de *P_{app}* da porção apical para a basolateral e da porção basolateral para a apical foram de 0,8 e 18,8 x 10⁻⁶ cm/s, respectivamente, em ausência do inibidor de BCRP. Em presença do inibidor, os valores foram de 4,0 e 7,2 x 10⁻⁶ cm/s, respectivamente, demonstrando a influência deste transportador na absorção da nitrofurantoína.

Até o presente momento, não existem dados na literatura acerca da permeabilidade através de monocamadas de células Caco-2 do fármaco nifuroxazida, bem como da série de análogos à nifuroxazida presente neste estudo.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivos gerais

Este estudo tem como objetivo geral a avaliação da permeabilidade *in vitro* da série de compostos análogos à nifuroxazida, empregando células Caco-2.

5.2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, pretende-se realizar:

- Avaliação da integridade e da adequação das condições de cultivo das membranas de células Caco-2 por meio da medida da resistência elétrica transepitelial (RET) e do emprego de padrões de baixa (amoxicilina) e alta (metoprolol) permeabilidade;
- Avaliação da permeabilidade *in vitro* dos fármacos nifuroxazida e da nitrofurantoína empregando células Caco-2;
- Avaliação da permeabilidade *in vitro* da série de compostos 5-nitro-heterocíclicos análogos à nifuroxazida empregando células Caco-2.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Material

5.3.1.1 Série de compostos

A série de compostos estudados foi previamente descrita no Capítulo 3, item 3.3.1.1.

5.3.1.2 Substâncias Químicas de Referência

As substâncias químicas de referência foram previamente descritas no Capítulo 4, item 4.3.1.2.

5.3.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no presente estudo foram previamente descritos nos Capítulos 3 e 4, itens 3.3.1.3 e 4.3.1.3, respectivamente. Adicionalmente, empregou-se:

- Minivoltímetro Millicell ERS[®] Millipore.

5.3.1.4 Solventes, reagentes e materiais empregados

Os solventes, reagentes e materiais empregados neste estudo foram previamente descritos nos Capítulos 3 e 4, itens 3.3.1.3 e 4.3.1.3, respectivamente. Adicionalmente, foram empregadas:

- Placas Transwell de 6 e 12 poços com *inserts* de polycarbonato com 4 µm de poro, Corning®.

5.3.1.5 Infra-estrutura

Os ensaios de permeabilidade foram realizados no Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares (LPFCC) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Sílvia Storpirtis.

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Cultivo de células Caco-2

O cultivo das células Caco-2 foi previamente descrito no Capítulo 3, item 3.3.2.1.

Para os experimentos de permeabilidade, as células foram transferidas para placas Transwell® contendo 6 ou 12 poços, ambos com suporte de polycarbonato de 0,4 µm de poro, e área de 4,64 cm² e 1,12 cm², respectivamente, empregando suspensão de células com densidade de 5 x 10⁴ células/cm².

5.3.2.2 Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2

As membranas formadas com as células em cultivo sobre as placas do experimento de permeabilidade foram monitoradas quanto ao valor da resistividade

elétrica utilizando o minivoltímetro Millicell ERS® - Millipore. A determinação do valor da resistência elétrica transepitelial ($\text{ohm} \times \text{cm}^2$) foi realizada aos 10, 15 e 21 dias de cultivo e nos tempos iniciais e finais de cada experimento de permeabilidade. Os meios utilizados apresentaram valor de pH de 7,4.

5.3.2.3 Realização dos experimentos de permeabilidade

Previamente ao estudo de permeabilidade, as células foram lavadas com tampão Hank's contendo 200 mM de sais de HEPES (tampão de permeabilidade) com pH ajustado para 7,4. As células foram mantidas com este tampão por 20 minutos a 37° C. A resistência elétrica transepitelial (RET) foi medida em cada membrana. Foram consideradas aptas para o início do experimento as membranas que apresentaram valor de RET acima de 200 $\text{mohm} \times \text{cm}^2$.

Os experimentos foram iniciados com a adição de solução dos compostos em tampão Hanks pH 7,4 nos compartimentos apicais das placas Transwell®, sendo que o pH do compartimento basolateral foi mantido a 7,4. As placas foram mantidas sob agitação em agitador orbital a 37° C (25 rpm). Foram realizadas coletas de 200 μL das amostras a partir do compartimento basolateral em tempos previamente determinados para cada composto. Após cada amostragem, procedeu-se à reposição de 200 μL de tampão de permeabilidade fresco, mantido a 37 °C, com a finalidade de manutenção do volume do meio no compartimento. Na Tabela 5.1 são descritas as concentrações iniciais e tempos de coleta para cada composto estudado.

Tabela 5. 1. Valores de concentrações iniciais e tempos de coleta para cada composto em estudo nos experimentos de permeabilidade através de monocamadas de células Caco-2.

Composto	Concentração inicial (µg/mL)	Tempos de coleta (min)
amoxicilina	25	30, 60, 90 e 120
metoprolol	5	30, 60, 90 e 120
nifuroxazida	4	15, 30, 45, 60, 90 e 120
nitrofurantoína	4	15, 30, 45, 60, 90 e 120
HFUR	4	15, 30, 45 e 60
MeFUR	4	15, 30, 45 e 60
EtoFUR	4	15, 30, 45 e 60
AminoFUR	4	15, 30, 45 e 60
BrFUR	1	15, 30, 45 e 60
HTIO	4	15, 30, 45 e 60
EtoTIO	0,5	60, 90, 120 e 180
AminoTIO	4	15, 30, 45 e 60

Os valores de Permeabilidade Aparente (*P_{app}*) em cm/s foram determinados segundo a equação 5.1:

$$P_{app} = \frac{VR}{A \times C_0} \times \frac{dC}{dt}$$

Equação 5.1

Em que:

P_{app} = Permeabilidade Aparente

VR = Volume do compartimento receptor (basolateral) em cm³

A = Área do suporte permeável de cultivo celular

C₀ = Concentração inicial adicionada no compartimento doador (apical)

dC/dt = Diferencial da concentração em relação ao tempo do experimento.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Avaliação da integridade de membranas de células Caco-2 por meio da resistência elétrica transepitelial (RET)

A integridade das membranas formadas pelas células Caco-2 cultivadas no suporte de realização dos estudos de permeabilidade foi avaliada por meio da determinação dos valores da RET. Foram utilizados eletrodos inseridos na câmara apical e na câmara basolateral.

Os resultados de RET obtidos aos 10, 15 e 21 dias de cultivo das células nas placas de permeabilidade com meio DMEM em pH 7,4 e os resultados da avaliação nos tempos iniciais e finais do experimento de permeabilidade do derivado EtoTIO em tampão Hanks com pH ajustado para pH 7,4 estão apresentados nas Figuras 5.2 e 5.3, respectivamente.

Figura 5. 2. Valores de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 aos 10,15 e 21 dias de cultivo em meio com pH 7,4. Média de seis determinações.

Figura 5. 3. Valores de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos com as membranas de células Caco-2 nas condições dos experimentos de permeabilidade do derivado EtoTIO no tempo inicial (T_0) e final (180 minutos). Média de seis determinações.

Os valores de RET obtidos ($\text{ohm} \times \text{cm}^2$) variaram de 652 para 468. Apesar da redução dos valores de RET, estes não atingiram valores inferiores a $200 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$.

5.4.2 Permeabilidade da amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), metoprolol (padrão de alta permeabilidade) e compostos 5-nitro-heterocíclicos

Os valores de permeabilidade aparente (P_{app}) da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos, descritos na Tabela 5.2, foram determinados a partir da quantidade permeada destes através de membranas de células Caco-2, no sentido apical - basolateral.

Tabela 5. 2. Valores de *Papp* da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos determinados a partir da quantidade permeada destes através de monocamadas de células Caco-2.

Composto	<i>Papp</i> (10^{-6} cm/s)
amoxicilina	$0,69 \pm 0,04$
metoprolol	$27,27 \pm 3,34$
nifuroxazida	$7,86 \pm 0,94$
nitrofurantoína	$2,08 \pm 0,20$
HFUR	$53,89 \pm 0,60$
MeFUR	$39,66 \pm 0,67$
EtoFUR	$31,77 \pm 0,42$
AminoFUR	$15,55 \pm 2,40$
BrFUR	$26,03 \pm 3,03$
HTIO	$61,58 \pm 5,10$
AminoTIO	$42,95 \pm 3,44$

Nas Figuras 5.4 a 5.15 estão representados os gráficos de quantidade permeada da amoxicilina, metoprolol e compostos 5-nitro-heterocíclicos em função do tempo através das membranas de células Caco-2 mantidas em cultivo por 21 dias.

Figura 5. 4. Quantidade permeada de amoxicilina (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 5. Quantidade permeada de metoprolol (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 6. Quantidade permeada de nitrofurantoina (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 7. Quantidade permeada de nifuroxazida (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 8. Quantidade permeada de HFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 9. Quantidade permeada de MeFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 10. Quantidade permeada de EtoFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 11. Quantidade permeada de AminoFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 12. Quantidade permeada de BrFUR (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 13. Quantidade permeada de HTIO (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

Figura 5. 14. Quantidade permeada de AminoTIO (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo. Média de seis determinações.

5.5 DISCUSSÃO

A fim de evitar a perda de tempo e recursos com compostos com absorção intestinal insuficiente, sistemas de triagem adequados devem ser implementados nas fases iniciais do processo de descoberta de novos fármacos para avaliar e/ou prever a capacidade de uma substância ser absorvida. O transporte de compostos através de monocamadas celulares é uma importante ferramenta comumente usada para avaliar o potencial de permeabilidade de um composto durante as fases de avaliação e seleção no desenvolvimento de fármacos (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000; GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

Previamente à realização do experimento de permeabilidade *in vitro*, faz-se necessária a avaliação da integridade da monocamada, que, neste experimento, foi primeiramente avaliada pela determinação da RET. O emprego deste parâmetro como indicativo da integridade da membrana formada pelas células Caco-2 tem sido bastante difundido nesta técnica, tendo sido obtidas significativas correlações entre os valores da resistência elétrica e a permeabilidade de compostos absorvidos pela via paracelular, destacando-se o emprego do manitol. Hidalgo (1996) estabeleceu uma correlação inversa entre os valores de permeabilidade do manitol e a resistência elétrica transepitelial em função do tempo de cultivo das células Caco-2.

Observou-se a formação das estruturas que compõem as junções intercelulares, que tornam os espaços entre as células mais restritos, e o progressivo aumento do valor da RET, além da redução da permeabilidade do manitol.

No presente estudo, a avaliação da RET durante o cultivo das membranas demonstrou que os valores aumentam em função do tempo até atingirem valor estável médio de 580 a 650 ohm x cm² entre os 15º e 21º dias de formação das membranas. Os valores da RET obtidos demonstraram que as membranas formadas apresentaram adequada integridade, ocorrendo formação do complexo juncional intercelular. Valores similares aos obtidos estão publicados na literatura (BEHRENS, KISSEL, 2003; SCHMIDT, KELLYB, VAN DER WALLE, 2007; RUTISHAUSER *et al*, 2000). A avaliação da RET foi realizada também no início e final dos experimentos, sendo selecionadas apenas as membranas com valores de RET acima de 200 ohm x cm² para a condução dos ensaios. Observou-se redução média de 60 ohm x cm² em cada hora de experimento, porém, os valores nunca foram inferiores a 200 ohm x cm², mantendo média de 470 ohm x cm² ao final de 3 horas de experimento.

Outra maneira de avaliar a integridade e viabilidade das membranas durante a realização dos experimentos de permeabilidade é a determinação da permeabilidade de compostos com dados de *Papp* já conhecidos. Muitos fármacos são utilizados para essa finalidade, destacando-se o manitol, a digoxina, a cimetidina e a fluoresceína. A amoxicilina e o metoprolol foram empregados neste estudo como padrão de baixa e alta permeabilidade, respectivamente, para a avaliação da integridade e adequação das condições de cultivo das membranas de células Caco-2 por estarem inseridos na lista de recomendação do guia da agência regulatória norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*), que dispõe sobre bioensaios (UNITED STATES, 2000). A média dos valores obtidos de *Papp* para a amoxicilina foi 0,69 x 10⁻⁶ cm/s, e, para o metoprolol, 27,27 x 10⁻⁶ cm/s. Estes valores encontram-se de acordo com aqueles obtidos em literatura, indicando adequação das condições de cultivo das células Caco-2 e confiabilidade em relação aos resultados obtidos para os compostos 5-nitro-heterocíclicos (SUN, LENNERNÄS, WELAGE, 2002; TEKSIN, SEO, POLLI, 2010; MASUNGI *et al.*, 2004).

O emprego de substâncias com características farmacocinéticas conhecidas e com estrutura semelhante aos candidatos a novos fármacos é de grande valia nas triagens de permeabilidade em ensaios com células Caco-2, aumentando a confiabilidade dos resultados. Tendo em vista o atual conhecimento em relação à absorção intestinal do fármaco nitrofurantoína, bem como a semelhança estrutural entre este e a nifuroxazida e seus derivados, realizou-se a avaliação de sua permeabilidade *in vitro* no presente estudo como parâmetro para os outros compostos 5-nitro-heterocíclicos. Adicionalmente, a existência na literatura de valores de *Papp* para a nitrofurantoína calculados através de ensaios com células Caco-2 permitiu a comparação destes com os resultados obtidos em nosso laboratório.

A *Papp* da nitrofurantoína foi calculada usando-se os valores de quantidade permeada obtidos entre os tempos 45 e 120 minutos, uma vez que os valores das concentrações nos tempos menores que 45 minutos encontraram-se abaixo do limite de quantificação da curva analítica para este fármaco (20 ng/mL).

O valor de *Papp* calculado no presente estudo ($2,08 \times 10^{-6}$ cm/s) é aproximadamente 2-3 vezes maior que os valores encontrados por Lin e colaboradores (2011) (0,6, 0,8 e $1,1 \times 10^{-6}$ cm/s). Esta diferença pode ser atribuída à forma de determinação de *Papp*, que fora realizada de maneiras diversas em ambos os laboratórios. No presente estudo, para todos os compostos avaliados, foram realizados um número mínimo de 3 coletas da porção basolateral para a construção da curva de concentração em relação ao tempo do ensaio de permeabilidade. Lin e colaboradores, por sua vez, realizaram uma única coleta ao final do experimento e consideraram como primeiro ponto da curva o tempo zero, com concentração correspondente igual a zero. O emprego deste método para os dados do presente estudo demonstram a influência na adoção de abordagens diversas no cálculo da permeabilidade aparente, uma vez que o valor de *Papp* para o presente estudo passaria a ser $1,4 \times 10^{-6}$ cm/s, valor mais próximo ao obtido por aqueles pesquisadores. Dessa forma, além das variabilidades relacionadas às condições de cultivo e condições experimentais, a padronização do cálculo de *Papp* também se faz necessária, a fim de que os valores possam ser comparáveis.

Analisando os resultados obtidos em ambos os laboratórios de acordo com o trabalho de Yee (1997), a média dos valores encontrados no trabalho de Lin e colaboradores (2011) classificaria a nitrofurantoína como um fármaco de baixa absorção (entre 0 e 20% de absorção), enquanto a média de valores obtida neste estudo classificaria este composto como um fármaco de absorção moderada (entre 20 e 70% de absorção). Realizando-se a mesma análise de acordo com a classificação de Biganzoli e colaboradores (1999), os resultados de *Papp* de Lin e colaboradores (2011) classificariam a nitrofurantoína como fármaco de moderada absorção (entre 1 e 90% de biodisponibilidade), enquanto os resultados do presente estudo classificariam a nitrofurantoína como fármaco de elevada absorção (biodisponibilidade acima de 90%). De acordo com estas análises, torna-se plausível afirmar que a classificação dos valores de permeabilidade através de células Caco-2 de Biganzoli e colaboradores (1999) esteja mais próxima do que ocorre *in vivo* com este fármaco, que apresenta taxas de absorção de 87-94% (SHAH, WADE, 1989). Estas relacionam-se tanto com a faixa de absorção moderada (entre 1 e 90% de biodisponibilidade) como com a faixa de alta absorção (biodisponibilidade acima de 90%). Dessa forma, torna-se evidente que os valores encontrados por Lin e colaboradores e aqueles presentes neste estudo, apesar de apresentarem pequena diferença numérica devido à diferença na forma de seu cálculo, classificam o fármaco de maneira semelhante ao que ocorre *in vivo*.

A *Papp* da nifuroxazida foi calculada usando-se os valores de quantidade permeada obtidos entre os tempos 30 e 120 minutos, uma vez que os valores das concentrações nos tempos menores que 30 minutos encontraram-se abaixo do limite de quantificação da curva analítica para este fármaco (20 ng/mL).

O valor médio de *Papp* encontrado para a nifuroxazida, $7,86 \times 10^{-6}$ cm/s, classificaria este composto, de acordo com Yee (1997), como um fármaco de absorção moderada (entre 20 e 70% de absorção). Todavia, pela classificação de Biganzoli e colaboradores (1999), este seria um fármaco de elevada absorção (> 90% de absorção). Até o presente momento, não foram encontrados valores na literatura de *Papp* calculados através de ensaios com células Caco-2 para a nifuroxazida, sendo o presente estudo o primeiro relato deste parâmetro para o fármaco. Apesar de poucas informações a respeito da farmacocinética da

nifuroxazida estarem disponíveis na literatura, acredita-se que ela apresenta baixa absorção e, por consequência, tem sido utilizada como antimicrobiano para o tratamento de infecções gastrintestinais (CAEKENBERGHE, BREYSSSENS, 1987; CEDILLO-RIVERA, MUNOZ, 1992; ERCEFURYL, 2007). Todavia, há indícios de que este fármaco apresente considerável absorção e seja extensivamente metabolizado no fígado (GUINEBAULT, BROQUAIRE, THEBAULT, 1981), o que explicaria os baixos níveis de nifuroxazida inalterada encontrados em estudos realizados com plasma humano após administração oral deste fármaco (CAEKENBERGHE, BREYSSSENS, 1987; CEDILLO-RIVERA, MUNOZ, 1992). O elevado valor de *Papp* encontrado para a nifuroxazida no presente estudo, levando-se em consideração que na técnica de membranas Caco-2 não ocorre metabolização hepática, corrobora, portanto, com a hipótese de que este fármaco tenha considerável absorção e extensiva metabolização *in vivo*.

Adicionalmente, esta hipótese é corroborada também pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Disposição de Fármacos (BDDCS, do inglês *Biopharmaceutical Drug Disposition and Classification System*), desenvolvido para prever a disposição *in vivo* de fármacos a partir de medidas de solubilidade e metabolismo (rota de eliminação). Este sistema é formado por 4 classes de fármacos divididos em relação à sua solubilidade (alta ou baixa) e metabolismo (extensivo ou baixo), que se relaciona diretamente à permeabilidade. Dessa forma, os fármacos pertencentes à classe II, como a nifuroxazida, que apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade, são extensivamente metabolizados (WU, BENET, 2005).

Todos os valores de *Papp* dos derivados da nifuroxazida calculados no presente estudo foram superiores a 10×10^{-6} . Dessa forma, tanto pela classificação de Yee como pela classificação de Biganzoli, estes compostos podem ser considerados candidatos a novos fármacos com considerável potencial para apresentarem elevada permeabilidade *in vivo*. Os derivados tiofênicos apresentaram valores de permeabilidade mais elevados que os derivados furânicos, com valores mínimos de $42,95 \times 10^{-6}$ (AminoTIO) e $15,55 \times 10^{-6}$ (AminoFUR), respectivamente. Este fato poderia ser explicado pela maior lipofilicidade dos primeiros em relação aos últimos, que facilitaria a passagem através das membranas de células Caco-2. Adicionalmente, devido à maior permeabilidade dos derivados tiofênicos por

consequência de sua lipofilicidade, estes poderiam ter maior distribuição pelo organismo, o que os tornaria mais indicados que os derivados furânicos no tratamento das principais infecções causadas por MRSA, que atingem pele e tecidos moles. O tratamento destas infecções deve ser realizado com fármaco o qual possua alta capacidade de distribuição pelos tecidos, sendo este capaz de alcançar seu alvo.

Além da maior permeabilidade apresentada pelos derivados tiofênicos, estes se mostraram menos tóxicos nos ensaios de citotoxicidade previamente discutidos (Capítulo 3), constatando-se que a toxicidade dos derivados da nifuroxazida possa ser influenciada tanto pela reatividade do átomo no anel ligado ao grupo nitro como pelo substituinte no anel benzênico. Compostos com substituintes mais hidrofóbicos, por conferirem maior toxicidade à molécula, devem ser evitados dentro desta série de compostos.

No entanto, cabe ressaltar que a maior lipofilicidade dos derivados tiofênicos acarreta menor solubilidade em meios aquosos, conforme observado na etapa de desenvolvimento dos métodos de quantificação deste estudo (Capítulo 4). A baixa solubilidade do derivado BrTIO, por exemplo, impossibilitou a análise de sua permeabilidade através de células Caco-2, pois necessitaria de método bionalítico de sensibilidade mais elevada que CLAE-UV para a quantificação de amostras de concentração reduzida, assim como ocorreu com o derivado EtoTIO.

Apesar dos problemas relacionados à solubilidade, os derivados tiofênicos foram os que apresentaram melhores resultados em relação à citotoxicidade e permeabilidade, e seriam, portanto, mais promissores que os derivados furânicos. Dentre estes derivados, o composto identificado como aquele com maior potencial para o desenvolvimento de um novo fármaco, ou seja, que apresentou melhor relação entre citotoxicidade, permeabilidade e solubilidade foi o derivado AminoTIO. No desenvolvimento de um produto contendo este composto, os problemas relacionados à solubilidade poderiam ser minimizados pelo emprego de conhecimentos farmacotécnicos de melhoria da solubilidade, tais como a micronização, o emprego de dispersões sólidas, a formação de complexos solúveis como ciclodextrinas ou dendrímeros, além do uso de sistemas nanoestruturados,

como nanocápsulas e nanopartículas (FERRAZ, 2009).

Como próxima etapa no desenvolvimento de um novo fármaco com atividade frente a cepas multirresistentes de *S. aureus*, devem ser realizados ensaios com o derivado AminoTIO visando ao aprofundamento dos conhecimentos adquiridos em relação à sua permeabilidade. Faz-se mister a realização de estudos mecanísticos relacionados à absorção deste composto, como elucidação da predominância de transporte ativo ou passivo e influência de sistemas de efluxo, como ocorre com a nitrofurantoína, que é substrato da BCRP. Adicionalmente, devem ser realizados estudos *in vitro* visando à avaliação de sua metabolização, empregando-se, por exemplo, modelos que utilizam células hepáticas.

5.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- Os valores de resistência elétrica transepitelial obtidos durante o cultivo das membranas de células Caco-2 e durante os experimentos de permeabilidade apresentaram-se dentro dos preconizados para este tipo de ensaio, demonstrando a viabilidade e integridade das membranas para a realização destes experimentos. Os valores de permeabilidade aparente obtidos para a amoxicilina e para o metoprolol estão de acordo com valores descritos na literatura, demonstrando a viabilidade, integridade e adequação das condições de cultivo das membranas de células Caco-2;
- O valor de *P_{app}* da nitrofurantoína ($2,08 \times 10^{-6}$ cm/s) encontra-se de acordo com o que ocorre *in vivo* com este fármaco, de acordo com a classificação de Yee (1997). O valor de *P_{app}* da nifuroxazida ($7,86 \times 10^{-6}$ cm/s) corrobora com a hipótese de que este fármaco apresente considerável absorção e seja extensivamente metabolizado no fígado, de acordo com as classificações de Yee (1997) e Biganzoli (1999);

- Os valores de *Papp* dos derivados da nifuroxazida mostram que estes podem ser considerados candidatos a novos fármacos com potencial para apresentarem elevada absorção *in vivo*, de acordo com as classificações de Yee (1997) e Biganzoli (1999). Os derivados tiofênicos apresentaram valores de permeabilidade maiores que os derivados furânicos, sendo o derivado AminoTIO o composto com maior potencial para o desenvolvimento de um novo fármaco frente a cepas multirresistentes de *S. aureus*, pois apresentou a melhor relação entre citotoxicidade, permeabilidade e solubilidade.

5.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERLE, P.; NIEDERER, E.; RUBAS, W.; *et al.* P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J. Pharm. Sci.* v. 87, p. 757–762, 1998.
- ARTURSSON, P.; BORCHARD, R.T. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm. Res.*, v. 14, n. 12, p. 1655-1658, 1997.
- ARTURSSON, P.; KARLSSON, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 175, p.880-885, 1991.
- ARTURSSON, P.; MAGNUSSON, C. Epithelial transport of drug in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.*, v. 79, n. 7, p. 595-600, 1990.
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharm. Toxicol. Methods*, v. 44, p. 301-312, 2000.
- BEHRENS, I; KISSEL, T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 19, p. 433–442, 2003.
- BIGANZOLI, E.; CAVENAGHI, L.A.; ROSSI, R.; BRUNATI, M. C.; NOLLI, M. L. Use of a Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of antibiotics. *Il Farmaco*, v. 54, p. 594-599, 1999.
- BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v. 1, n. 2, p. 175-185, 2005.
- BUZARD, J. A.; CONKLIN, J. D.; O'KEEFE, E.; PAUL, M. F. Studies on the absorption, distribution and elimination of nitrofurantoin in the rat. *The Journal of Pharmacol. and Experimental Therapeutics*, v. 131, n.1, p.38-43, 1961
- CAEKENBERGHE, D. L. V.; BREYSSSENS, J. In Vitro Synergistic Activity between Bismuth Subcitrate and Various Antimicrobial Agents against *Campylobacter pyloridis* (*C. pylori*). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 31, n. 9, p. 1429-1430, 1987.
- CEDILLO-RIVERA, R.; MUNOZ, O. *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.*, v. 37, p. 221-224, 1992.
- CHONG, S.; DANDO, S.A.; SOUCEK, K.M.; MORRISON, R.A. *In vitro* permeability through Caco-2 cells is not quantitatively predictive of *in vivo* absorption for peptide-like drugs absorbed via the dipeptide transporter system. *Pharm. Res.*, v.13, p.120-123, 1996.

- CONRADI, R.A.; WILKINSON, K.F.; RUSH, B.D., *et al.* *In vitro/in vivo* models for peptide oral absorption: comparison of Caco-2 cell permeability with rat intestinal absorption of rennin inhibitory peptides. *Pharm. Res.*, v. 10, p. 1790-1792, 1993.
- ERCEFURYL: nifuroxazida. Istanbul: Sanofi-Aventis, 2007. Bula de medicamento. Acessado em 12 de abril de 2011. Endereço: http://urunler.sanofi.com.tr/Ercefuryl_kapsul_RR.pdf.
- FERRAZ, H. G. Novas ferramentas farmacotécnicas para modular a biodisponibilidade de medicamentos. In STORPIRTIS *et al.*, **Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas**. Guanabara Koogan, 1ª ed, Rio de Janeiro, p. 66-71, 2009.
- GERK, P.M.; KUHN, R.J.; DESAI, N.S.; MCNAMARA, P.J. Active transport of nitrofurantoin into human milk. *Pharmacotherapy*, v. 21, p. 669-675, 2001a.
- GERK, P.M.; OO, C.Y.; PAXTON, E.W.; MOSCOW, J.A.; MCNAMARA, P.J. Interactions between cimetidine, nitrofurantoin and probenecid active transport into rat milk. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 296, p. 175-180, 2001b.
- GINSKI, J.M.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution/absorption relationships from a dissolution/ Caco-2 system. *Int. J. Pharm.*, v. 177, p. 117-125, 1999.
- GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In STORPIRTIS *et al.*, **Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas**. Guanabara Koogan, 1ª ed, Rio de Janeiro, p. 204-211, 2009.
- GUINEBAULT, P. R.; BROQUAIRE, M.; THEBAULT, J.; *et al.* In Aiache, J. M.; Hirtz, J., **First European Congress of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics**, v. 2, Technique and Documentation, Paris, France, p. 151, 1981.
- HIDALGO, I. H. Cultured intestinal epithelial cell models. In: BORCHARD, T.; Smith, P.L.; Wilson, G., **Models of Assessing Drug Absorption and Metabolism**. New York: Plenum Press, p. 35-50, 1996.
- HU, M.; BORCHARD, R.T. Mechanism of L- α -methyldopa transport through a monolayer of polarized human intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* v. 7, p. 1313-1319, 1990.
- KIM, D.-C.; BURTON, P.S.; BORCHARD, R.T. A correlation between the permeability characteristics of a series of peptides using an in vitro cell culture model (Caco-2) and those using an in situ perfused rat ileum model of the intestinal mucosa. *Pharm. Res.*, v. 10, p. 1710-1714, 1993.
- LABAUNE, J. P.; MOREAU, J. P.; BYRNE, R.. Coomparative physiological disposition of two nitrofurantoin anti-microbial agents. *Biopharmaceutics & Drug disposition*, v. 7, p. 431-441, 1986.
- LENNERNÄS, H.; NILSSON, D.; AQUILONIUS, S.-M.; *et al.* The effect of L-leucine on the absorption of levodopa, studied by regional jejunal perfusion in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* v. 35, p. 243-250, 1993.
- LENNERNÄS, H.; PALM, K.; FAGERHOLM, U.; ARTURSSON, P. Correlation between paracellular and transcellular drug permeability in the human jejunum and Caco-2 monolayers. *Int. J. Pharm.* v. 127, p. 103-107, 1996.
- LENTZ, K.A.; HAYASHI, J.; LUCISANO, L.J.; POLLI, J.E. Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and a application to the biopharmaceutics classification system. *Int. J. Pharm.*, v. 200, p. 41-51, 2000.
- LIN, X.; SKOLNIK, S.; CHEN, X.; WANG, J. Attenuation of Intestinal Absorption by Major Efflux Transporters: Quantitative Tools and Strategies Using a Caco-2 Model. *Drug metabolism and disposition*, v. 39, n. 2, p. 265-274, 2011.
- MADARA, J.L.; HECHT, G. Tight (occluding) junctions in cultured (and native) epithelial cells. In: MATLIN AND VALENTICH. **Functional Epithelial Cells in Culture**. New York: Alan R Liss, p. 131-163, 1999.
- MASUNGI, C.; BORREMANS, C.; WILLEMS, B.; *et al.* Usefulness of a Novel Caco-2 Cell Perfusion System. I. In Vitro Prediction of the Absorption Potential of Passively Diffused Compounds. *J. Pharm. Sci.*, v. 93, n. 10, p. 238-241, 2004.
- MERINO, G.; JONKER, J.W.; WAGENAAR, E.; VAN HERWAARDEN, A. E.; SCHINKEL, A.H. The

- breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol.*, v. 67, p. 1758–1764, 2005.
- PINTO, M.; *et al.*, Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell*, v. 47, p. 323-330, 1983.
- RUBAS, W.; JEZYK, N.; GRASS, G.M. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm. Res.*, v. 10, p. 113-118, 1993.
- RUBAS, W., VILLAGRAN, J., CROMWELL, *et al.* Correlation of solute flux across Caco-2 monolayers and colonic tissue *in vitro*. *S.T.p. pharma Sci*, v. 5, p. 93-97, 1995.
- RUTISHAUSER, B. R; BRAUN, A.; GÜNTHER, M.; WUNDERLI-AlLENSPACH, H. Formation of Multilayers in the Caco-2 Cell Culture Model: A Confocal Laser Scanning Microscopy Study. *Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 4 p.460-465, 2000.
- SCHMIDT, E.; KELLYB, S.M.; VAN DER WALLE, C.F. Tight junction modulation and biochemical characterisation of the zonula occludens toxin C-and N-termini. *FEBS Letters*, n. 58, 2974–2980, 2007.
- SHAH, R. R.; WADE, G. Reappraisal of the risk/benefit of nitrofurantoin: review of toxicity and efficacy. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev.*, v. 8, n. 4, p. 183-201, 1989.
- STEWART, B.H.; CHAN, O.H., LU, R.H., *et al.* Comparison of intestinal permeabilities determined in multipole *in vitro* and *in situ* models: Relationship to absorption in humans. *Pharm. Res.*, v. 12, p. 693-699, 1995.
- SUN, D.; LENNERNÄS, H.; WELAGE, L.S.; *et al.* Comparison of human duodenum and Caco-2 gene expression profiles for 12,000 gene sequence tags and correlation with permeability of 26 drugs. *Pharm. Res.* v. 19, n. 10, p. 1400–1416, 2002.
- TAIPALENSUU, J.; TORNBLOM, H.; LINDBERG, G.; *et al.* Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 299, p.164–170, 2001.
- TANAKA, Y., TAKI, Y., SAKANE, T., *et al.* Characterization of drug transport through tight-junctional pathway in Caco-2 monolayer: Comparison with isolated rat jejunum and colon. *Pharm. Res.*, v. 12, p. 522-528, 1995.
- TEKSIN, Z.S.; SEO, P.R.; POLLI, J.E. Comparison of Drug Permeabilities and BCS Classification: Three Lipid-Component PAMPA System Method versus Caco-2 Monolayers. *The AAPS Journal*, v. 12, n. 2, p. 2507-2521, 2010.
- UNITED STATES. Department of Healthy and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry: Waiver of *In Vivo* Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System.** US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 2000.
- XIA, C. Q.; LIU, N.; YANG, D.; MIWA, G.; GAN, L.-S. Expression, localizations, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug metabolism and disposition*, v. 33, p. 637–643, 2005.
- WU, C-Y.; BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharm. Res.* 22:11–23, 2005.
- YEE, S. *In vitro* Permeability across Caco-2 cells (Colonic) can predict *In vivo* (small intestine) absorption in man: fact or myth. *Pharm. Res.* v.14, n.6, p. 763-66, 1997.

CAPÍTULO 6

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DA PERMEABILIDADE
EMPREGANDO O PROGRAMA VOLSURF**

6.1 INTRODUÇÃO

6.1.1 O programa VolSurf

A interação das moléculas com membranas biológicas, como a membrana intestinal, é mediada por propriedades de superfície como forma, forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e hidrofobicidade. Grande parte destas propriedades pode ser representada em campos moleculares tridimensionais (3D) de energia de interação (MIF, do inglês *Molecular Interaction Fields*). Estes MIF podem ser automaticamente convertidos em descritores moleculares mais simples, usando-se um método chamado VolSurf.

O VolSurf, programa computacional especificamente desenhado para produzir descritores relacionados às propriedades farmacocinéticas, é capaz de converter o tamanho e a distribuição espacial dos contornos das interações moleculares sem necessidade de alinhamento das moléculas. A ideia básica é a compressão da informação presente em mapas 3D em alguns poucos descritores numéricos bidimensionais, facilitando o entendimento e interpretação dos modelos (CRUCIANI, PASTOR, GUBA, 2000; CRUCIANI *et al.*, 2000).

Um mapa tridimensional (mapa 3D) pode ser visualizado como uma matriz 3D que contém forças de atração e repulsão entre uma sonda química e uma molécula-alvo. Um mapa 3D é, portanto, a imagem de uma interação molecular sonda-alvo, na qual cada pixel contém informação sobre uma coordenada cartesiana e uma propriedade química. A interação sonda-alvo é calculada no programa GRID em posições amostrais (pontos da grade virtual) distribuídos através e em torno da molécula. Com a sonda em cada ponto da grade virtual por vez, a interação é calculada a partir da seguinte equação:

$$E_{xyz} = \sum_{i=1}^n E_{LJ} + \sum_{i=1}^n E_{el} + \sum_{i=1}^n E_{hb} + S$$

na qual E indica a soma da energia entre a sonda no ponto da grade virtual e cada átomo da molécula-alvo para o potencial de Lennard-Jones (LJ), para os termos

eletrostáticos (E_l) e ligações de hidrogênio (hb), além do termo entrópico no ponto especificado da grade virtual (S). A energia total E_{xyz} é então designada àquele ponto e codificada em arquivo para posterior análise, e as energias podem ser representadas como superfícies de contorno tridimensional, juntamente com a estrutura da molécula-alvo. Campos de interação com a sonda água (OH_2), a sonda hidrofóbica (DRY), a sonda átomo de oxigênio carbonílico sp^2 (O) e a sonda grupo NH neutro plano (N1) são calculados em torno de moléculas alvo (CRUCIANI, PASTOR, CLEMENTI, 2000).

A compressão da informação pelo VolSurf é feita pela seleção dos descritores mais apropriados para o tipo de mapa 3D em estudo e sua parametrização. São gerados 28 descritores a partir da sonda OH_2 , 24 descritores a partir da sonda DRY, 6 descritores da sonda O e 6 descritores da sonda N1, além de aproximadamente 40 descritores não derivados de MIF.

Após a geração dos descritores, métodos estatísticos devem ser empregados para construir os modelos de previsão da permeabilidade. Como a permeabilidade é um processo multifatorial e, geralmente, são empregados nos estudos *in silico* conjuntos de dados onde as variáveis são altamente correlacionadas e/ou onde o número de variáveis excede o número de valores de dados, dois métodos são extensivamente usados nestas situações: a análise por componentes principais, para os métodos de reconhecimento de padrões ou de classificação e a regressão por quadrados mínimos parciais, para os métodos de calibração (LEACH, 2001). Estas duas ferramentas estatísticas de extração e racionalização da informação a partir de descrições multivariadas de um sistema são amplamente empregadas na quimiometria e podem ser utilizadas no programa VolSurf.

Inicialmente, os dados a serem investigados são organizados em uma matriz de n medidas de diferentes naturezas (variáveis independentes ou descritores, previamente calculados) realizadas em m amostras (objetos ou compostos), de modo que a matriz ($\mathbf{X}$) é formada por $n \times m$ elementos. Cada coluna da matriz $\mathbf{X}$ corresponde a um descritor calculado, que, por serem de diferentes naturezas, podem apresentar unidades ou ordens de grandezas distintas e, portanto, as colunas da matriz $\mathbf{X}$ usualmente são pré-processadas. Os métodos de pré-tratamento de dados mais utilizados neste tipo de análise são a centragem na média

e o autoescalamento dos dados. O autoescalamento consiste em subtrair a média de cada medida da coluna e dividir cada valor pelo desvio-padrão da coluna; a finalidade de autoescalar os dados é fazer com que cada variável tenha média igual a zero e variância unitária (NETO, MOITA, 1998; FERREIRA, 2002; FERREIRA, MONTANARI, GAUDIO, 2002).

Figura 6. 1. Fluxograma representando as etapas de cálculo dos MIF, geração de tabela de descritores e organização dos dados na matriz X (FERNANDES *et al.*, 2011).

O objetivo do método PCA é agrupar variáveis correlacionadas, substituindo os descritores originais por um novo conjunto chamado componentes principais (PCs, do inglês *Principal Components*), nas quais os dados são projetados. Estas PCs não são correlacionadas entre si e são construídas por meio de uma simples combinação linear das variáveis originais. É importante destacar que as PCs retêm a maior parte da variabilidade do conjunto de dados, ainda que em um espaço dimensional muito menor. A primeira componente principal, PC1, é definida na direção da variância máxima de todo o conjunto de dados. A PC2 é a direção que descreve o máximo de variância do subespaço ortogonal à PC1. As componentes subsequentes são sucessivamente ortogonais umas às outras e descrevem o

máximo da variância restante (FERREIRA, 2002; FERREIRA, MONTANARI, GAUDIO, 2002). O método PCA condensa toda a informação em duas matrizes menores, chamadas (1) matriz de escores (do inglês *scores*) ou matriz **T**, que quantifica a distribuição dos compostos (objetos) nas componentes principais e (2) a matriz de pesos (do inglês *loadings*) ou matriz **P**, que quantifica a contribuição dos descritores para cada componente principal (CRUCIANI, PASTOR, GUBA, 2000; CRUCIANI, PASTOR, CLEMENTI, 2000; CRUCIANI *et al.*, 2000).

O programa VolSurf também dispõe da ferramenta quimiometria consenso de PCA (CPCA, do inglês *consensus principal component analysis*), método hierárquico capaz de prover informação a respeito da importância relativa de cada bloco de descritores VolSurf na análise, como os blocos de descritores de tamanho e forma, descritores hidrofílicos, descritores hidrofóbicos e descritores mistos. Em suma, o CPCA utiliza exatamente a mesma função que o PCA e tenta explicar da melhor forma toda a variância da matriz **X**, porém a análise é feita em dois níveis: (1) o nível de bloco, o que expressa a “opinião” de cada sonda ou bloco de descritores e o super nível, o que expressa o “consenso” entre todos os blocos. O CPCA fornece a solução do super nível de maneira idêntica à solução encontrada no PCA, ou seja, as mesmas matrizes de **T** e **P** são obtidas. Adicionalmente, o CPCA produz blocos de escores (**T_b**) e blocos de pesos (**P_b**) para cada uma das sondas usadas e uma matriz de pesos que expressa a participação de cada bloco nos escores totais. Os blocos de pesos são essencialmente idênticos ao “pedaço” do peso correspondente ao seu bloco, porém com uma normalização diferente. Ao contrário, o bloco de escores representa um ponto de vista particular do modelo de acordo com determinada sonda e fornece informações únicas não disponíveis quando o método de PCA regular é empregado (CRUCIANI, PASTOR, GUBA, 2000; CRUCIANI, PASTOR, CLEMENTI, 2000; CRUCIANI *et al.*, 2000).

No método de regressão PLS, o bloco **X** de variáveis independentes (descritores) é correlacionado com o vetor **Y** (permeabilidade) de tal forma que as coordenadas projetadas, **T**, são bons preditores de **Y**. Em outras palavras, a atividade biológica é incluída no procedimento de decomposição. O método de PLS decompõe a matriz **X** em outras duas matrizes menores, assim como o PCA. A matriz de pesos contém informação sobre os descritores por meio de variáveis

latentes (LVs, do inglês *latent variables*), que são combinações lineares das variáveis X originais. A matriz de escores contém informação sobre os objetos, descritos em termos das LVs. O conceito da LV é equivalente ao conceito da PC no método PCA. Dessa forma, a primeira LV é definida na direção da variância máxima de todo o conjunto de dados e as LVs subsequentes são sucessivamente ortogonais umas às outras, descrevendo o máximo da variância restante. O modelo de regressão é geralmente validado internamente pelo método de validação cruzada *leave-one-out* (LOO), para verificar sua capacidade de futuras previsões (CRUCIANI, PASTOR, GUBA, 2000; CRUCIANI, PASTOR, CLEMENTI, 2000; CRUCIANI *et al.*, 2000, FERREIRA *et al.*, 1999).

É importante salientar que a interpretação dos modelos é fundamental em sua validação, uma vez que há necessidade de avaliar se os descritores podem ser traduzidos em propriedades que influenciam a permeabilidade. Além disso, os modelos *in silico* gerados devem fornecer previsões em uma velocidade adequada e devem servir como alicerce para seleção de moléculas para síntese.

6.2 OBJETIVOS

6.2.1 Objetivos gerais

Este estudo teve como objetivo a avaliação *in silico* da permeabilidade através de células Caco-2 da série de compostos análogos à nifuroxazida (variável dependente) por meio de descritores calculados pelo programa VolSurf (variável independente), a fim de obter modelos capazes de prever o comportamento destes e outros derivados em ensaios *in vitro* com células Caco-2.

6.2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, pretendeu-se realizar:

- Análise exploratória dos compostos análogos à nifuroxazida empregando-se o método de CPCA para identificar os blocos de variáveis e as

propriedades mais importantes que influenciam sua permeabilidade através de células Caco-2;

- Construção de modelo de regressão pelo método de PLS empregando os dados de *Papp* obtidos nos experimentos de permeabilidade usando células Caco-2 e identificação das propriedades que a influenciam de forma mais significativa.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Série de compostos

Foram utilizados 17 compostos tanto para a análise exploratória como para a construção do modelo de regressão, sendo 9 compostos 5-nitrofurânicos e 2 compostos usados como padrões de alta e baixa permeabilidade cujos valores de *Papp* foram obtidos neste estudo. Os demais compostos (6) foram adicionados aos estudos *in silico* por terem seus valores de *Papp* também obtidos no Laboratório de Permeabilidade de Fármacos em Culturas Celulares (LPFCC) do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Sílvia Storpirtis (GONÇALVES, 2010).

Os logaritmos negativos dos valores de permeabilidade aparente obtidos nos ensaios *in vitro* ($-\log P_{app}$) foram usados na derivação do modelo de regressão. Para facilitar as análises, os compostos foram divididos em 3 classes de permeabilidade, sendo que aqueles com valores de $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/s ($-\log P_{app} > 6,0$) foram classificados como compostos com baixa permeabilidade, aqueles com valores de P_{app} entre 1×10^{-6} e 10×10^{-6} cm/s ($6,0 > -\log P_{app} > 5$) foram classificados como compostos com média permeabilidade e aqueles com valores de $P_{app} > 10 \times 10^{-6}$ cm/s ($-\log P_{app} < 5,0$) foram classificados como compostos com alta permeabilidade.

Apresentam-se na Tabela 6.1 as estruturas dos compostos, bem como seus respectivos valores de *Papp*, $-\log P_{app}$ e sua classificação em baixa, média ou alta permeabilidade.

Tabela 6. 1. Estruturas dos compostos empregados nos estudos de análise exploratória e regressão e seus valores de *Papp*, bem como suas classificações como compostos de baixa, média ou alta permeabilidade.

Composto	Estrutura	<i>Papp</i> (x 10 ⁻⁶ m/s)	-log <i>Papp</i>	Classe <i>Papp</i>
amoxicilina		0,68	6,16	baixa
hidroclorotiazida		0,80	6,10	baixa
fluoresceína		0,90	6,05	baixa
nitrofurantoína		2,08	5,68	média
rifampicina		4,95	5,31	média
nifuroxazida		7,86	5,10	média

Continuação na página seguinte.

Composto	Estrutura	<i>Papp</i> (x 10 ⁻⁶ m/s)	-log <i>Papp</i>	Classe <i>Papp</i>
lamivudina		11,00	4,96	alta
zidovudina		12,00	4,92	alta
AminoFUR		15,55	4,81	alta
quetiapina		17,00	4,77	alta
BrFUR		26,03	4,58	alta
metoprolol		27,27	4,56	alta
EtoFUR		31,77	4,50	alta

Continuação na página seguinte.

Composto	Estrutura	P_{app} ($\times 10^{-6}$ m/s)	$-\log P_{app}$	Classe P_{app}
MeFUR		39,66	4,40	alta
AminoTIO		42,95	4,37	alta
HFUR		53,89	4,27	alta
HTIO		61,58	4,21	alta

6.3.2 Modelagem Molecular

As estruturas tridimensionais dos vinte compostos, em suas formas neutras, foram construídas empregando-se o programa Spartan para Windows 4.0 (Wavefunction, Inc., Irvine, CA). A estrutura cristalizada da nifuroxazida (PNIEWSKA, JANUCHOWSKI, 1999) foi usada como geometria de referência na construção dos compostos 5-nitro-heterocíclicos. As estruturas de referência dos demais compostos foram extraídas do banco de dados do Pubchem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>). Cada modelo foi parametrizado empregando-se o método de mecânica molecular *Merck Molecular Force Field* MMFF (HALGREN, 1996). As cargas atômicas parciais foram calculadas empregando-se o método semi-empírico AM1 (DEWAR *et al.*, 1985; DEWAR *et al.*, 1990). As condições de término e os métodos de parametrização usados foram os padrões do Spartan (LEACH, 2001).

6.3.3 Cálculo dos descritores moleculares

Moléculas com a energia minimizada foram salvas como arquivos em formato SDF para caracterização multivariada baseada nos campos de interação molecular com sondas químicas. Para esta etapa, foi utilizado o programa GRID (KASTENHOLZ *et al.*, 2000) na ferramenta VolSurf+ para Windows (version 1.0.4, Molecular Discovery Ltd. Pinner, Middlesex, UK, 2009, <http://www.moldiscovery.com>).

A resolução da grade virtual foi ajustada para 0,5 Å de aresta em células cúbicas e as seguintes sondas foram usadas: OH₂, DRY, O e N1. A partir dos MIFs, a ferramenta VolSurf+ derivou uma série de 128 descritores independentes do alinhamento molecular para cada molécula (Tabela 6.2).

Tabela 6. 2. Descritores moleculares ou variáveis independentes calculados para o conjunto de compostos investigado e respectivas sondas de origem.

Número	Descritor	Descrição	Sonda
1	V	Volume molecular	OH2
2	S	Superfície molecular	OH2
3	R	Razão volume/superfície	OH2
4	G	Globularidade molecular	OH2
5-12	W1-W8	Regiões hidrofílicas	OH2, O e N1
13-20	D1-D8	Regiões hidrofóbicas	DRY
21-26	WO1 - WO6	Volumes de doadores de ligação de hidrogênio	O
27-32	WN1 - WN6	Volumes de aceptadores de ligação de hidrogênio	N1
33-36	Iw1-Iw4	Momentos de energia de interação	OH2
37-44	Cw1-Cw8	Fatores de capacidade	OH2
45-48	ID1-ID4	Momentos de energia de interação hidrofóbica	DRY
49-56	CD1-CD8	Fatores de capacidade para DRY	DRY
57-58	HL1-HL2	Balanço hidrofílico-lipofílico	OH2 e DRY
59	A	Momento anfifílico	OH2 e DRY
60	CP	Agregação crítica	OH2 e DRY
61	POL	Polarizabilidade	-

Continuação na página seguinte.

Mariane Ballerini Fernandes

Número	Descritor	Descrição	Sonda
62	MW	Peso molecular	-
63-64	FLEX, FLEX_RB	Parâmetros de flexibilidade	-
65	NCC	Número de centros com carga	-
66	DIFF	Difusividade	-
67	LOGP N-oCT	LogP octanol/água	-
68	LOGP c-Hex	LogP ciclo-hexano/água	-
69-72	PSA, HSA, PSAR, PHSAR	Áreas de superfície polar e hidrofóbica	OH2, DRY, O e N1
73-79	LgD5 - LgD10	LogD	-
80	AUS7.4	Espécies disponíveis na forma molecular	-
81-87	%FU4 - %FU10	% de espécies não ionizadas	-
88-97	DRDRDR, DRDRAC, DRDRDO, DRACAC, DRACDO, DRDODO, ACACAC, ACACDO, ACDODO, DODODO	Áreas farmacofóricas 3D tripletes DRY, doadoras de ligação de hidrogênio, aceptoras de ligação de hidrogênio e DRY e doadoras e aceptoras de ligação de hidrogênio	-
98	SOLY	Solubilidade intrínseca	-
99-108	LgS3 - LgS11	Solubilidade em vários PHs	-
109	PB	% de ligação a proteínas plasmáticas	-
110	VD	Volume de distribuição	-
111	CACO2	Permeabilidade através de células Caco-2	-
112	SKIN	Permeabilidade através da pele	-
113	LgBB	Log da permeação através da barreira hemato-encefálica	-
114	MetStab	Estabilidade metabólica	-
115	HTSFlag	Bandeira de triagem de ensaios miniaturizados em larga escala	-
116-120	L0lgS - L4lgS	Coeficientes de perfil de solubilidade	-
121-128	DD1 - DD8	Diferenças de volumes hidrofóbicos	DRY

Previamente à construção dos modelos foi realizado o pré-tratamento no programa VolSurf+ dos descritores utilizando o autoescalamento, de forma a apresentarem média igual a zero e desvio-padrão unitário.

6.3.4 Análise exploratória pelo método CPCA

Foi realizada análise prévia do modelo de CPCA gerado empregando todos os descritores pré-processados. Um bloco de pesos foi gerado para o modelo proposto, expressando a participação de cada bloco de descritores nos escores totais. A partir deste gráfico, foram selecionados os quatro blocos de descritores mais relevantes, ou seja, aqueles com valores de pesos mais elevados tanto para a PC1 quanto para a PC2. Para os blocos selecionados, foram gerados modelos empregando apenas um dos blocos ou uma combinação deles com 2, 3 e 4 blocos. Selecionou-se o modelo com a melhor explicação da variância e separação entre os grupos de compostos.

6.3.4 Modelo de regressão pelo método PLS

A princípio, foram construídos modelos empregando todos os descritores pré-processados. A seleção de variáveis foi realizada pela importância da variável na projeção (VIP, do inglês *Variable Importance of Projection*), que estima a importância de cada variável na projeção usada no modelo de PLS tanto em relação à Y quanto em relação à X, porém não considera o sinal dos coeficientes (CHONG, JUN, 2005). Os coeficientes, por sua vez, representam a contribuição de cada descritor do modelo em relação à Y. Os pesos referem-se à variância interna, ou seja, a importância de cada variável em relação à X. Em suma, o gráfico VIP mostra quais são os descritores mais importantes para X e Y, a tabela de coeficientes indica quais deles aumentam ou diminuem os valores de Y e o gráfico de pesos mostra quais os descritores mais importantes para X.

A avaliação estatística do modelo foi realizada pelo procedimento de validação cruzada do tipo *leave-one-out* (LOO). O número de LVs significativas foi determinado pela seleção dos maiores valores de coeficientes de avaliação (r^2) e coeficientes de correlação da validação cruzada (q^2), calculados pelo programa VolSurf. O desvio padrão do erro de cálculo (SDEC, do inglês *Standard deviation of error of calculation*) e o desvio padrão do erro de previsão (SDEP, do inglês *Standard deviation of error of prediction*) foram calculados para cada modelo.

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Análise exploratória pelo método CPCA

O modelo de CPCA com o bloco tamanho/forma (do inglês *size/shape*) foi selecionado por ter apresentado a melhor relação entre explicação da variância e separação entre os grupos de compostos na matriz dos escores. Na Figura 6.1, encontram-se os gráficos de escores e pesos para as duas primeiras componentes ou fatores de análise (PC1 x PC2), que classificam os compostos investigados.

Figura 6. 2. Gráficos dos escores (A) e pesos (B) da análise exploratória para as duas primeiras PCs [PC1 ou fator 1 (66,52%), PC2 ou fator 2 (23,95%)], que explicam 90,47% da variância do sistema.

Para esta análise, as duas primeiras PCs são responsáveis por explicar 90,47% da variância total dos dados, sendo que a PC1 descreve 66,52% e a PC2 23,95% da variância total do sistema.

Na Figura 6.3, está representada a projeção dos análogos EtoTIO, MeTIO e BrTIO sobre o gráfico de escores obtido no modelo de CPCA.

Figura 6. 3. Projeção dos análogos EtoTIO, MeTIO e BrTIO sobre o gráfico de escores obtido no modelo de CPCA.

6.4.2 Modelo de regressão pelo método PLS

A análise de regressão pelo método PLS reduziu o número de variáveis e gerou modelo contendo os descritores %FU10, LOGP c-Hex, FLEX, DD3, ID3, %FU4, ACDODO, LgS11 e DODODO.

A Tabela 6.3 mostra a variância acumulada, bem como a importância relativa de cada variável independente representada pelos valores de pesos para as quatro LVs.

Tabela 6. 3. Variância (%) e variância acumulada (%) para as quatro LVs calculadas. Os valores dos pesos para cada fator também estão listados.

	LV1	LV2	LV3	LV4
Variância %	49,23	10,23	5,58	6,54
Variância acumulada %	49,23	59,45	65,03	71,57
R²	0,79	0,91	0,93	0,94
Q²	0,71	0,79	0,79	0,75
%FU10	0,17	0,22	0,24	0,25
LOGP c-Hex	0,16	0,17	0,17	0,15
FLEX	0,14	0,12	0,13	0,19
DD3	0,13	0,24	0,16	0,11
ID3	0,02	-0,25	-0,38	-0,40
%FU4	-0,12	-0,22	-0,17	-0,20
ACDODO	-0,13	-0,09	-0,12	-0,10
LgS11	-0,13	-0,15	-0,26	-0,30
DODODO	-0,15	-0,13	-0,14	-0,11

O modelo selecionado contém 2 LVs, sendo a primeira responsável por 49,23% da variância e a segunda por 10,23%, totalizando 59,46% de explicação da variância do sistema.

Na Figura 6.4 encontram-se os gráficos de escores e pesos para as duas primeiras variáveis latentes (LV1 x LV2), que quantificaram a distribuição da permeabilidade dos compostos investigados.

Figura 6. 4. Gráficos dos escores (A) e pesos (B) do modelo de regressão para as duas primeiras LVs [LV1 (49,23%; LV2 (10,23%)], que explicam 59,46% da variância do sistema. **A.** A área em vermelho representa a região dos compostos com permeabilidade mais baixa; a área em azul, os compostos com permeabilidade mais alta.

Na Tabela 6.4 encontram-se os valores experimentais de $-\log P_{app}$, os valores previstos de $\log P_{app}$ pelo modelo de regressão gerado, bem como o erro entre estes. A correlação entre valores de $-\log P_{app}$ experimentais e previstos pode ser observada na Figura 6.5.

Tabela 6. 4. Valores experimentais e previstos de $-\log P_{app}$ pelo modelo de regressão selecionado.

Composto	$-\log P_{app}$ experimental	$-\log P_{app}$ previsto	Erro
amoxicilina	6,16	5,56	0,60
hidroclorotiazida	6,10	5,96	0,14
fluoresceína	6,05	6,27	-0,22
nitrofurantoína	5,68	5,02	0,66
rifampicina	5,31	5,53	-0,22
nifuroxazida	5,10	5,37	-0,27
lamivudina	4,96	4,97	-0,01
zidovudina	4,92	5,33	-0,41
AminoFUR	4,81	5,06	-0,25
quetiapina	4,77	4,71	0,06
BrFUR	4,58	4,48	0,10
metoprolol	4,56	4,62	-0,06
EtoFUR	4,50	4,20	0,30
MeFUR	4,40	4,60	-0,20
AminoTIO	4,37	4,47	-0,10
HFUR	4,27	4,46	-0,19
HTIO	4,21	4,12	0,09

Figura 6. 5. Valores experimentais *versus* valores previstos de $-\log P_{app}$ pelo modelo de regressão selecionado.

Na Figura 6.6, está representada a projeção dos análogos EtoTIO, MeTIO e BrTIO sobre o gráfico de escores obtido no modelo de PLS.

Figura 6. 6. Projeção dos análogos EtoTIO, MeTIO e BrTIO sobre o gráfico de escores obtido no modelo de PLS.

6.5 DISCUSSÃO

A triagem computacional ou virtual da permeabilidade intestinal de candidatos a novos fármacos tem recebido enorme atenção nos últimos anos, sendo importante no entendimento dos mecanismos envolvidos na absorção oral de fármacos e na previsão dos mecanismos de permeabilidade. Dados obtidos em experimentos de permeabilidade *in vitro* podem ser empregados em processos de modelagem computacional que sejam capazes de relacioná-los às estruturas moleculares dos compostos, gerando modelos que irão provavelmente substituir grande parte da triagem inicial convencional por ensaios experimentais, por exemplo, com células Caco-2 (YAMASHITA, HASHIDA, 2004; UNGELL, 2004).

No presente estudo, foram realizadas análises de reconhecimento de padrões e de calibração em um conjunto de 17 compostos cujos dados de permeabilidade *in vitro* através de células Caco-2 (*Papp*) foram obtidos sob as

mesmas condições, no mesmo laboratório, garantindo a confiabilidade e qualidade dos dados para a construção dos modelos. Devido à natureza multifatorial da permeabilidade e ao caráter multivariado dos dados, utilizou-se como método de classificação o CPCA e como método de regressão, o PLS.

O método de CPCA usando descritores do bloco tamanho/forma foi empregado para identificar as propriedades moleculares com maior impacto na permeabilidade *in vitro* através de células Caco-2, tendo em vista a elevada porcentagem de explicação do modelo pelas duas primeiras PCs (90,47%). Além disso, o modelo gerado foi capaz de separar os compostos classificados como substâncias de alta, média e baixa permeabilidade. Analisando-se o gráfico de escores (Figura 6.2A), observa-se que os primeiros situam-se nos quadrantes inferiores (valores negativos para a PC2), os segundos encontram-se espalhados pelo gráfico, enquanto os últimos foram inseridos nos quadrantes superiores (valores positivos para a PC2). Dessa forma, torna-se evidente que a PC2 discrimina mais claramente os compostos mais permeáveis dos menos permeáveis. Este resultado é expressivo, dado que nenhuma classificação dos compostos, ou seja, nenhuma informação com relação à sua permeabilidade foi fornecida ao CPCA. Em outras palavras, a PC2 do modelo foi capaz, sem qualquer informação externa, de prever qualitativamente a permeabilidade da maioria dos compostos.

Uma inspeção mais detalhada do gráfico de escores indica que todos os compostos com baixa permeabilidade (100%) foram inseridos na região dos quadrantes superiores. Dos compostos com média permeabilidade, a nitrofurantoína, que possui o valor mais baixo de *Papp* deste grupo, foi agrupada juntamente com os compostos de baixa permeabilidade; a nifuroxazida, que possui o valor mais elevado de *Papp* deste grupo, foi agrupada juntamente com os compostos de alta permeabilidade. A rifampicina, por sua vez, foi inserida no modelo em uma região afastada das demais substâncias. Além deste composto apresentar as maiores diferenças estruturais relacionadas à tamanho e forma em comparação aos demais compostos usados neste estudo, sabe-se que este fármaco é substrato da P-gp, ou seja, é secretado de volta para o compartimento apical (GONÇALVES, 2010). Poder-se-ia afirmar, portanto, que o modelo ora proposto não agrupa de forma satisfatória os compostos que possuem transporte de efluxo ocasionado pela P-gp. Dos

compostos com alta permeabilidade, 9 (82%) apresentaram-se agrupados nos quadrantes inferiores, enquanto apenas 2 (lamivudina e zidovudina) foram inseridos nos quadrantes superiores. Estes fármacos também são substratos da P-gp (GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009), e, da mesma forma que a rifampicina, foram inseridos no gráfico em região afastada dos demais compostos, o que corrobora com a hipótese de que o modelo não agrupa de forma satisfatória os compostos que possuem este mecanismo de permeabilidade.

Os modelos de absorção e de permeabilidade e os conjuntos de dados em que foram baseados têm um problema em particular no que diz respeito ao transporte ativo, seja de influxo ou efluxo. No passado, os conjuntos de dados eram modelados sob a suposição de que a absorção ou o processo de permeação eram desprovidos de transporte ativo, e muitos dos compostos hoje investigados provavelmente terão mecanismos de absorção dependentes de transportadores ainda não conhecidos. Todavia, se um modelo com boa estatística e boa capacidade preditiva é obtido, apesar do fato de alguns compostos do conjunto de treinamento (ou seja, os compostos utilizados para obter o modelo) estarem envolvidos em transporte ativo, duas explicações podem surgir: 1) a quantidade de transporte ativo de um composto em particular é insignificante, ou 2) o modelo derivado de alguma forma considera também as informações relativas ao transporte ativo, embora esta não fosse a intenção inicial, na maioria dos casos (NORINDER, BERGSTRÖM, 2006).

De acordo com o gráfico de pesos (Figura 6.2B), o fator 2 (PC2) tem importantes contribuições, ou seja, valores mais altos dos pesos para os descritores WO1, WN1 e G. Os dois primeiros influenciam os compostos com baixa permeabilidade, enquanto o último influencia os compostos com alta permeabilidade. O descritor WO1 (volumes doadores de ligação de hidrogênio) pode ser definido como o envelope molecular que gera interações atrativas de doadores de hidrogênio. O descritor WN1 (volumes de aceitadores de ligação de hidrogênio), por sua vez, refere-se ao envelope molecular que gera interações atrativas de aceitadores de hidrogênio. Dessa forma, moléculas com elevado número de aceitadores e doadores de ligação de hidrogênio apresentam menor permeabilidade, uma vez que sua lipofilicidade diminui, dificultando a passagem pela via passiva

através da membrana de células Caco-2. Observa-se, todavia, que, conforme anteriormente discutido, as moléculas lamivudina e zidovudina foram agrupadas em regiões positivas para a PC2 (quadrantes superiores), apesar de serem fármacos de alta permeabilidade. Ambos os fármacos, além de serem substratos da P-gp, teriam contribuição importante de transporte ativo de influxo em sua permeabilidade devido às suas semelhanças estruturais a aminoácidos. Assim, como o modelo agrupou na região de compostos de baixa permeabilidade moléculas com grande número de doadores e aceptadores de ligação de hidrogênio, que podem utilizar processos ativos para atravessar as células, torna-se plausível supor que o modelo de CPCA não foi capaz de agrupar de forma satisfatória os compostos que apresentam este tipo de transporte ativo de influxo referente a estas moléculas (NORINDER, BERGSTRÖM, 2006; GONÇALVES, SOUZA, STORPIRTIS, 2009).

O descritor G (globularidade molecular) é definido como a relação entre a superfície molecular de um composto e a superfície de uma esfera com o mesmo volume e está diretamente relacionado à flexibilidade. Moléculas esféricas, ou seja, com menor flexibilidade, possuem globularidade próxima a 1,0, enquanto moléculas com valores superiores a 1,0 têm formato mais oval, apresentando maior flexibilidade. No modelo gerado pelo método de CPCA, quanto maior o valor do descritor, maior a permeabilidade. Em outras palavras, quanto maior a flexibilidade da molécula, ou seja, quanto maior sua liberdade conformacional, maior sua capacidade de contornar as barreiras físicas da membrana de células Caco-2, facilitando sua passagem através desta pela via passiva.

De acordo com o modelo de CPCA, portanto, as propriedades determinantes da permeabilidade através de células Caco-2 para os compostos em estudo seriam de natureza topológica, representada pelos descritores WO1, WN1, e estérica, representada pelo descritor G. Estas estão de acordo com o atual conhecimento relacionado à interação das moléculas com membranas biológicas, que é mediada por propriedades de superfície como forma, forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e lipofilicidade.

A fim de verificar a previsão de compostos externos ao modelo proposto, a projeção dos análogos à nifuroxazida EtoTIO, MeTIO e BrTIO foi realizada (Figura 6.3). Embora não se tenha obtido valor de permeabilidade aparente para estes 3

derivados, era esperado que eles tivessem comportamento semelhante aos outros derivados, ou seja, apresentassem alta permeabilidade. Observa-se que os 3 derivados foram inseridos na mesma região que seus análogos e que os outros compostos de alta permeabilidade, indicando capacidade de previsão importante do modelo de CPCA, apesar do pequeno número de compostos do conjunto de treinamento.

A partir do modelo gerado pelo método CPCA, não foi possível extrair informação a respeito da permeabilidade entre os derivados da nifuroxazida, ou seja, se os derivados tiofênicos possuem maior permeabilidade que os derivados furânicos, conforme verificado nos experimentos *in vitro*.

O método de PLS usando os descritores %FU10, LOGP c-Hex, FLEX, DD3, ID3, %FU4, ACDODO, LgS11 e DODODO foi utilizado para a construção de modelo de regressão empregando os dados de *Papp* obtidos nos experimentos de permeabilidade usando-se células Caco-2, tendo em vista a elevada porcentagem de explicação do modelo pelas duas primeiras LVs (59,46%) e confiabilidade matemática dos principais parâmetros estatísticos do modelo selecionado, como r^2 (0,91) e q^2 (0,79). Além disso, o modelo gerado foi capaz de separar os compostos classificados como substâncias de alta, média e baixa permeabilidade (Figura 6.4A). Os primeiros situam-se em regiões com valores positivos para a LV1, os segundos encontram-se em regiões com valores de LV1 mais próximos a zero, enquanto os últimos foram inseridos em regiões com valores negativos para LV1. Dessa forma, torna-se evidente que a LV1 discrimina mais claramente os compostos mais permeáveis dos menos permeáveis.

De acordo com os valores previstos de $-\log P_{app}$, foi possível calcular a porcentagem de erros e acertos em relação à classificação previamente estabelecida. Para os compostos com baixa permeabilidade, apenas um composto (33%), fluoresceína, foi classificado pelo modelo de PLS de maneira correta; todos os compostos de média permeabilidade (100%) foram classificados de maneira correta, assim como 9 compostos de alta permeabilidade (82%). Nenhuma substância de baixa permeabilidade foi classificada como de alta; o contrário é também verdadeiro. Assim, apenas a amoxicilina, a hidroclorotiazida, a zidovudina e o AminoFUR (23%) foram classificados de maneira incorreta, demonstrando um

adequado ajuste dos dados pelo modelo, que também pode ser visualizado na correlação entre os valores de $\log P_{app}$ experimentais e previstos (Figura 6.5). Os compostos previamente classificados como substâncias de baixa permeabilidade apresentam, como mecanismo principal de permeabilidade, o transporte passivo paracelular. A baixa porcentagem de acerto em relação a esta classe de compostos evidencia uma possível dificuldade do modelo em incluir parâmetros para este tipo de transporte.

Por meio do cálculo do desvio padrão dos erros de previsão da permeabilidade através das células Caco-2, presentes na Tabela 6.4, pode-se identificar possíveis amostras atípicas para o modelo. Aqueles compostos cujos erros são maiores que o valor de 2 desvios-padrão poderiam ser consideradas amostras atípicas. Para este modelo, o desvio padrão do erro foi 0,30, ou seja, as substâncias com valores de erro superiores a 0,60 unidades logarítmicas devem ser analisadas. Apenas a nitrofurantoína apresentou erros de previsão interna acima de 0,60 unidades logarítmicas (0,66). Apesar do erro não mudar a classificação prévia deste fármaco como composto de média permeabilidade, o valor de $\log P_{app}$ previsto apresentou considerável diminuição, ou seja, para o modelo, este fármaco teria valor maior de P_{app} ($\sim 6,50 \times 10^{-6}$ cm/s) em relação à observação experimental ($2,08 \times 10^{-6}$ cm/s). Sabe-se que este fármaco, conforme anteriormente exposto (capítulo 5), é substrato da proteína de efluxo BCRP. De forma análoga ao que ocorreu com o modelo de CPCA com os compostos substratos da P-gp, provavelmente o modelo gerado por PLS não incluiu as informações relativas ao transporte de efluxo ocasionado por este carregador.

Entretanto, os fármacos que são substratos da P-gp, rifampicina, zidovudina e lamivudina, foram agrupados pelo modelo em uma mesma região, que apresenta valores positivos para a LV2, além de terem apresentado erros de previsão menores que 0,41 unidades logarítmicas. Adicionalmente, apenas a zidovudina foi classificada de forma incorreta. Dessa forma, seria plausível supor que o modelo de PLS gerado e seus descritores foram capazes de incluir a informação a respeito do transporte pela P-gp, ao contrário do modelo gerado pelo método CPCA e dos descritores empregados neste.

Os descritores de carga, %FU10 e %FU4, de características hidrofóbicas, LOGP c-Hex, LogS1, DD3, ID3, FLEX e de natureza topológica, DODODO e ACDODO, relacionaram as propriedades estruturais dos compostos em estudo ao valores de *Papp*. De acordo com o gráfico de pesos (Figura 6.4B) e com a Tabela 6.3, torna-se evidente que descritores %FU10 e LOGPc-Hex são os responsáveis pelas contribuições mais significativas em relação à LV1, ambos correlacionando-se diretamente com a permeabilidade.

O descritor %FU10 representa a porcentagem de espécies não ionizadas em pH 10. Fármacos são, em geral, ácidos ou bases fracas cujas formas neutra e ionizada se mantêm em equilíbrio quando em solução. A forma neutra, mais lipossolúvel, é absorvida por difusão através das membranas e depende do seu coeficiente de partição. A forma ionizada também é absorvida por difusão, de acordo com a Teoria do pH de Partição (WATERBEEMD, 2009), todavia, o processos ativos teriam participação maior em sua permeabilidade. Dessa forma, de acordo com o modelo, quanto maior a porcentagem de moléculas não ionizadas em pH 10 para um determinado composto, maior sua permeabilidade. Em outras palavras, moléculas pouco ionizadas em pH 10 possuem valores maiores de pKa, ou seja, quanto maior o pKa do composto, maior a concentração de moléculas na forma molecular em pH 7,4, pH usado para os ensaios *in vitro*, facilitando sua passagem pela via passiva transcelular através da membrana de células Caco-2.

O descritor LOGP c-Hex (LogP ciclo-hexano/água) refere-se ao logaritmo do coeficiente de partição entre ciclo-hexano e água. O valor do coeficiente de partição (log P) é um parâmetro frequentemente usado em estudos de QSAR como medida que expressa a lipofilicidade de compostos bioativos. Assim, compostos com coeficientes maiores, ou seja, com maior propensão à distribuição em ciclo-hexano, tendem a ser mais permeáveis pela via passiva transcelular, uma vez que apresentam maior lipofilicidade.

De acordo com o modelo de PLS, portanto, as propriedades com maior influência sobre a permeabilidade através de células Caco-2 para os compostos em estudo para seriam de natureza topológica, representada pelo descritor FU10%, e lipofílica e estérica, representada pelo descritor LOGP c-Hex, estando, assim como

as propriedades identificadas no modelo de CPCA, de acordo com o atual conhecimento relacionado à interação das moléculas com membranas biológicas.

A fim de verificar a previsão de compostos externos ao modelo proposto, a projeção dos derivados da nifuroxazida EtoTIO, MeTIO e BrTIO foi realizada de forma análoga à projeção ao modelo de CPCA (Figura 6.6).

Observa-se que os derivados EtoTIO, MeTIO e BrTIO foram inseridos na mesma região que seus análogos e que os outros compostos de alta permeabilidade, indicando, apesar do pequeno número de compostos do conjunto de treinamento, capacidade de previsão importante do modelo de PLS de acordo com os mecanismos de permeabilidade através de células Caco-2. Faz-se mister ressaltar, todavia, que ocorreu separação dos compostos tiofênicos e furânicos, com os primeiros sendo inseridos em regiões de valores positivos e os últimos, em regiões de valores negativos para a LV2. A diferença entre estes compostos está relacionada com o menor raio atômico do oxigênio e sua maior densidade eletrônica, conforme discutido no capítulo 3.

A separação entre derivados tiofênicos e furânicos na LV2 pode ser relacionada aos descritores com maiores influências sobre esta variável. Identifica-se, pela Figura 6.3B e pela Tabela 6.3, que os descritores ID3 e DD3 têm as mais importantes contribuições para a LV2.

O descritor de momento de energia de interação hidrofóbica (ID3) descreve a distância entre o centro de massa molecular e o baricentro das regiões de interação hidrofóbica. Menores distâncias estão relacionadas aos derivados tiofênicos, e maiores distâncias, aos derivados furânicos. Este fato pode ser explicado, pois o centro de massa dos compostos tiofênicos está deslocado para a região do átomo de enxofre, que seria a região mais hidrofóbica da molécula, o que diminui as distâncias entre os centros. Entretanto, o derivado BrTIO foi inserido na região dos derivados furânicos. Neste caso, o centro de massa molecular está mais distante do baricentro das regiões de interação hidrofóbica, uma vez que o átomo de bromo causa este deslocamento.

O descritor de diferença de volume hidrofóbico (DD3) representa a diferença entre o volume hidrofóbico máximo (obtido por meio de uma variação conformacional

da molécula) e o volume hidrofóbico da estrutura 3D importada ao programa VolSurf. Maiores diferenças estão relacionadas aos derivados tiofênicos e menores, aos derivados furânicos. Novamente, o átomo de enxofre tem papel fundamental nesta distinção. Para as moléculas que possuem enxofre, o volume hidrofóbico aumenta com a maior exposição deste átomo de acordo com a variação conformacional.

Apesar da separação entre os derivados tiofênicos e furânicos em relação à LV2, não foi possível extrair informação a partir do modelo gerado pelo método PLS a respeito da maior permeabilidade dos primeiros verificada experimentalmente. Todavia, o modelo é capaz de indicar que provavelmente os análogos à nifuroxazida não possuem transporte de efluxo pela P-gp, dada a distância entre eles e os compostos substratos deste transportador.

Tendo em vista a adequabilidade do modelo desenvolvido pelo método de PLS, este poderia ser usado para a previsão quantitativa e qualitativa da permeabilidade através de células Caco-2 para outros compostos 5-nitro-heterocíclicos, com o objetivo de desenvolver novo fármaco com atividade frente a cepas multirresistentes de *S. aureus* ou outras indicações terapêuticas, como Doença de Chagas. Entretanto, cabe ressaltar que os modelos *in silico* devem ser aprimorados, englobando novas informações provenientes dos ensaios experimentais. Para tanto, o próximo passo seria o aumento do banco de dados usado para sua construção, visando ao aumento do número de compostos no conjunto de treinamento e também ao emprego de um conjunto de avaliação para a validação externa, tornando o modelo cada vez mais robusto.

Além disso, devem ser realizados estudos *in silico* com os análogos da nifuroxazida abordados neste projeto, incorporando-se outros derivados e compostos 5-nitro-heterocíclicos visando à maior compreensão dos mecanismos de transporte através da membrana de células Caco-2. É necessário investigar com maior profundidade se estes derivados não são substratos da P-gp e se seriam substratos da BCRP, como a nitrofurantoína, por meio, por exemplo, do método de ancoramento com membrana (MI-QSAR, do inglês *Membrane Interaction QSAR*) (KULKARNI, HOPFINGER, 1999). Além disso, devem ser investigados possíveis mecanismos de transporte de influxo com os principais transportadores expressos pelas células Caco-2. Para tanto, podem ser realizados estudos de ancoramento

molecular (*docking*) entre eles e estas proteínas. Adicionalmente, devem ser realizados estudos *in silico* visando à avaliação das outras etapas da farmacocinética, como a metabolização destes fármacos, empregando-se, por exemplo, estudos de ancoramento molecular entre estes compostos e a enzima CYP3A4.

6.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

- O modelo obtido por meio do emprego do método de CPCA foi capaz de separar as moléculas em grupos de compostos de baixa, média e alta permeabilidade, sendo os derivados da nifuroxazida classificados como compostos de alta permeabilidade. No entanto, poder-se-ia afirmar que o modelo ora proposto não agrupa de forma satisfatória os compostos que possuem transporte de efluxo ocasionado pela P-gp e transporte ativo de influxo dos fármacos lamivudina e zidovudina. As propriedades determinantes para os compostos em estudo da permeabilidade através de células Caco-2, de acordo com este modelo, seriam de natureza topológica e eletrônica, representadas pelos descritores WO1, WN1, e estérica, representada pelo descritor G.
- O modelo obtido por meio do emprego do método de PLS apresentou medidas estatísticas adequadas e foi capaz de separar as moléculas em grupos de compostos de baixa, média e alta permeabilidade, sendo os derivados da nifuroxazida classificados como compostos de alta permeabilidade. Informação a respeito de transporte de efluxo por P-gp provavelmente está englobada no modelo. As propriedades determinantes para os compostos em estudo da permeabilidade através de células Caco-2, de acordo com este modelo, seriam de natureza topológica, representada pelo descritor FU10%, e lipofílica e estérica, representada pelo descritor LOGP c-Hex. Os descritores ID3 e DD3, relacionados a baricentros e

volumes hidrofóbicos, respectivamente, são os principais responsáveis pela separação em relação à LV2 entre derivados tiofênicos e furânicos, justificada pela presença do átomo de enxofre nos primeiros. O método mostrou-se adequado e pode ser usado como ferramenta de previsão quantitativa e qualitativa para outros compostos 5-nitro-heterocíclicos.

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHONG, I.G.; JUN, C.H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, v. 78, n-1-2, p.103-112, 2005.
- CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.11, suppl. 2, p. 29–39, 2000.
- CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; CLEMENTI, S. Handling information from 3D grid maps for QSAR studies. *Molecular Modeling and Prediction of Bioactivity*. K. Gundertofte and F.E. Jørgensen (eds.) Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, p. 73-82, 2000.
- CRUCIANI, G.; CRIVORI, P.; CARRUPT, P-A.; TESTA, B. Molecular Fields in Quantitative Structure-Permeation Relationships: the VolSurf Approach. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* 503, p. 17-30, 2000.
- DEWAR, M.J.S.; ZOEBSCH, E.G.; HEALY, E.F.; STEWART, J.J.P. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 107, p. 3902-3909, 1985.
- DEWAR, M.J.S.; HEALY, E.F.; HOLDER, A.J.; YUAN, Y.C. *J. Comput. Chem*, v. 11, p. 541-542, 1990.
- FERNANDES, M.B.; SCOTTI, M.T.; SCOTTI, L.; TAVARES, L.C. Estudos *in silico* aplicados à avaliação da farmacocinética e toxicidade. In: STORPIRTIS *et al.* **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1ª ed, 2011, cap. 19, p. 143-154.
- FERREIRA, M.M.C. Multivariate QSAR. *J Braz Chem Soc*. v.13, n.6, p.742-753, 2002.
- FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova*. v. 22, n.5, p.724-731, 1999.
- FERREIRA, M.M.C.; MONTANARI, C.; GAUDIO, A. Seleção de variáveis em qsar. *Quim Nova*. v. 25, n. 3, p. 439-448, 2002.
- GONÇALVES, J.E. Padronização das condições para cultura de células Caco-2 visando à obtenção de membranas viáveis ao estudo da permeabilidade *in vitro* da rifampicina. 2010. 137f. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas–USP/SP, 2010.
- GONÇALVES, J.E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS *et al.* **Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1ª ed, 2009, cap. 19, pag 204-211.
- HALGREN, T.A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.*, v. 17, p. 490–519, 1996.
- KASTENHOLZ, M.A., PASTOR, M., CRUCIANI, G., HAAKSMA, E. E. J., FOX, T. GRID/CPCA: A New Computational Tool To Design Selective Ligands, *J. Med. Chem.*, v. 43, p. 3033-3044, 2000.
- KULKARNI, A.S.; HOPFINGER, A.J. Membrane-interaction QSAR analysis: Application to the estimation of eye irritation by organic compounds. *Pharm. Res.*, v. 16, p. 1244–1252, 1999.
- LEACH, A.R. 2001. **Molecular Modeling: Principles and Applications**. London: Prentice Hall.
- NETO, J.M.M.; MOITA, G.C. Uma Introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim. Nova*. v.21, n.4, p.467-469, 1998.

- NORINDER, U.; BERGSTRÖM, C.A.S. Prediction of ADMET Properties. *Chem. Med. Chem.*, 1, p. 920 – 937, 2006.
- PNIEWSKA, B.; JANUCHOWSKI, M. Structural Investigation of nifuroxazide, p-hydroxy-N-(5-nitrofurfurylidene) benzhydrazide. *Pol. J. Chem.*, v. 72, p. 2629, 1999.
- UNGELL, A.L.B. Caco-2 replace or refine? *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 1, n. 4, p. 423-430, 2004.
- YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. In Silico Approaches for Predicting ADME Properties of Drugs. *Drug Metab. Pharmacokin.*, v. 10, n. 5, p. 327-338, 2004.
- WATERBEEMD, H.V. Improving Compound Quality through *in vitro* and *in silico* Physicochemical Profiling. *Chemistry & Biodiversity*, v. 6, 1760-1766, 2009.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- As células Caco-2 apresentaram viabilidade adequada para a realização dos estudos de permeabilidade quando expostas a todos os compostos análogos à nifuroxazida, exceto o derivado tiofênico metil-substituído (MeTIO). Os derivados tiofênicos etóxi- e bromo-substituídos (EtoTIO e BrTIO) apresentaram-se como os compostos menos tóxicos da série. Excetuando-se os derivados metil-substituídos, observaram-se valores de viabilidade celular superiores para todos os derivados tiofênicos presentes na série em estudo, em comparação com seus respectivos derivados furânicos.
- Os métodos desenvolvidos por CLAE-UV para a quantificação de metoprolol (padrão de alta permeabilidade), amoxicilina (padrão de baixa permeabilidade), nitrofurantoína, nifuroxazida e dos análogos HFUR, MeFUR, EtoFUR, AminoFUR, BrFUR, HTIO, EtoTIO e AminoTIO, nos ensaios de permeabilidade *in vitro* usando células Caco-2 mostraram-se adequados considerando-se as recomendações do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (Resolução 899/03).
- Os valores de *Papp* obtidos para a amoxicilina, o metoprolol e a nitrofurantoína estão de acordo com valores descritos na literatura, demonstrando a viabilidade, integridade e adequação das condições de cultivo das membranas de células Caco-2. O valor de *Papp* da nifuroxazida indica que este fármaco apresenta considerável absorção e seja extensivamente metabolizado no fígado. Os valores de *Papp* dos derivados da nifuroxazida mostram que estes apresentam alta permeabilidade, portanto, têm potencial para apresentarem elevada absorção *in vivo*. Os derivados tiofênicos apresentaram valores de permeabilidade maiores que os derivados furânicos, sendo o derivado AminoTIO o composto com maior potencial para o desenvolvimento de um novo fármaco frente a cepas MRSA, uma vez que apresentou a melhor relação entre citotoxicidade, permeabilidade e solubilidade.

- O modelo obtido por meio do emprego do método de CPCA foi capaz de separar as moléculas em grupos de compostos de baixa, média e alta permeabilidade, sendo os derivados da nifuroxazida classificados como compostos de alta permeabilidade. No entanto, poder-se-ia afirmar que o modelo ora proposto não agrupa de forma satisfatória os compostos que possuem transporte de efluxo ocasionado pela P-gp e transporte ativo de influxo dos fármacos lamivudina e zidovudina. As propriedades determinantes, para os compostos em estudo, da permeabilidade através de células Caco-2, de acordo com este modelo, seriam de natureza topológica, representada pelos descritores WO1, WN1, e estérica, representada pelo descritor G. O modelo obtido por meio do emprego do método de PLS apresentou validação estatística adequada e foi capaz de separar as moléculas em grupos de compostos de baixa, média e alta permeabilidade, sendo os derivados da nifuroxazida classificados como compostos de alta permeabilidade. Informação a respeito de transporte de efluxo por P-gp provavelmente está englobada no modelo. As propriedades determinantes para os compostos em estudo da permeabilidade através de células Caco-2, de acordo com este modelo, seriam de natureza topológica, representada pelo descritor FU10%, e lipofílica e estérica, representada pelo descritor LOGPc-Hex. Os descritores ID3 e DD3, relacionados a baricentros e volumes hidrofóbicos, respectivamente, são os principais responsáveis pela separação em relação à LV2 entre derivados tiofênicos e furânicos, justificada pela presença do átomo de enxofre nos primeiros. Não foi possível, por estes modelos, prever se a permeabilidade dos derivados tiofênicos é maior que a dos furânicos, conforme observado experimentalmente.

ANEXO A

ESPECTROS DE RMN ^1H

RMN ^1H (DMSO - d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,25 (s, 1H, H₈); 8,44 (s, 1H, H₆); 7,94 (d, 2H, H_{11/15}, $J = 7,3$ Hz); 7,79 (d, 1H, H₃, $J = 3,9$ Hz); 7,64 – 7,54 (m, 3H, H₁₂, H₁₃, H₁₄); 7,27 (d, 1H, H₄, $J = 3,7$ Hz).

**Espectro de RMN ^1H do composto 5-nitro-furfurilideno-benzidrazida (HFUR).
Padrão de referência interna: TMS**

Espectro de RMN ^1H do composto 5-nitro-furfurilideno-4-metilbenzidrazida (MeFUR).

Padrão de referência interna: TMS

RMN ¹H (DMSO – d₆, 300 MHz): δ (ppm): 12,09 (s, 1H, H₈); 8,40 (s, 1H, H₆); 7,91 (d, 2H, H_{11/15}, J = 6,4 Hz); 7,79 (s, 1H, H₃); 7,25 (s, 1H, H₄); 7,06 (d, 2H, H_{12/14}, J = 6,1 Hz); 4,13 (d, 2H, CH₂); 1,38 (s, 3H, CH₃).

Espectro de RMN ¹H do composto 5-nitro-furfurilideno-4-etoxibenzidrazida (EtoFUR).

Padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO – d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,86 (s, 1H, H₈); 8,38 (s, 1H, H₆); 7,78 (d, 1H, H₃, $J = 3,9$ Hz); 7,70 (d, 2H, H_{11/15}, $J = 8,5$ Hz); 7,20 (d, 1H, H₄, $J = 3,9$ Hz); 6,63 (d, 2H, H_{12/14}, $J = 8,5$ Hz); 5,86 (s, 2H, NH₂).

Espectro de RMN ^1H do composto 5-nitro-furfurilideno-4-aminobenzidrazida (AminoFUR).

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ¹H do composto 5-nitro-furfurilideno-4-bromobenzidrazida (BrFUR).

Padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO – d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,21 (s, 1H, H₈); 8,71 (s, 1H, H₆); 8,12 (d, 1H, H₃, $J = 4,3$ Hz); 7,92 (d, 2H, H_{11/15}, $J = 6,9$ Hz); 7,65 – 7,52 (m, 4H, H₄, H₁₂, H₁₃, H₁₄).

**Espectro de RMN ^1H do composto 5-nitro-tiofilideno-benzidrazida (HTIO).
Padrão de referência interna: TMS**

RMN ^1H (DMSO – d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,13 (s, 1H, H₈); 8,69 (s, 1H, H₆); 8,12 (d, 1H, H₃, $J = 4,3$ Hz); 7,82 (d, 2H, H_{11/15}, $J = 8,0$ Hz); 7,56 (d, 1H, H₄, $J = 4,3$ Hz); 7,35 (d, 2H, H_{12/14}, $J = 8,1$ Hz); 2,39 (s, 3H, CH₃).

Espectro de RMN ^1H do composto 5-nitro-tiofilideno-4-metilbenzidrazida (MeTIO).

Padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO – d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,07 (s, 1H, H₈); 8,68 (s, 1H, H₆); 8,12 (d, 1H, H₃, $J = 4,3$ Hz); 7,89 (d, 2H, H_{11/15}, $J = 8,6$ Hz); 7,55 (d, 1H, H₄, $J = 4,3$ Hz); 7,06 (d, 2H, H_{12/14}, $J = 8,6$ Hz); 4,12 (q, 2H, CH₂, $J = 6,9$ Hz); 1,36 (t, 3H, CH₃, $J = 6,9$ Hz).

Espectro de RMN ^1H do composto 5-nitro-tiofilideno-4-etoxibenzidrazida (EtoTIO).

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H do composto 5-nitro-tiofilideno-4-aminobenzidrazida (AminoTIO).

Padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO – d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,25 (s, 1H, H₈); 8,69 (s, 1H, H₆); 8,12 (d, 1H, H₃, $J = 4,3$ Hz); 7,86 (d, 2H, H_{11/15}, $J = 7,9$ Hz); 7,76 (d, 2H, H_{12/14}, $J = 8,4$ Hz); 7,59 (d, 1H, H₄, $J = 4,1$ Hz).

Espectro de RMN ^1H do composto 5-nitro-tiofilideno-4-bromobenzidrazida (BrTIO).

Padrão de referência interna: TMS

ANEXO B

ESPECTROS DE RMN ^{13}C

RMN ^{13}C (DMSO – d_6 , 75 MHz) δ (ppm):
 163,4 (C9); 151,9 (C5); 151,8 (C2); 135,5
 (C6); 132,8 (C10); 132,1 (C13); 128,5 (C12,
 C14); 127,8 (C11, C15); 115,1 (C3); 114,6
 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-furfurilideno-benzidrazida (HFUR).
Padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C (DMSO – d_6 , 75 MHz) δ (ppm):
 163,2 (C9); 151,9 (C5); 151,8 (C2); 142,3
 (C13); 135,2 (C6); 129,9 (C10); 129,0
 (C12, C14); 127,8 (C11, C15); 115,0
 (C3); 114,6 (C4), 20,8 (CH₃).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-furfurilideno-4-metilbenzidrazida (MeFUR).

Padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C (DMSO – d_6 , 75 MHz) δ (ppm):
 161,6 (C9, C13); 152,0 (C5); 151,8 (C2);
 134,8 (C6); 129,9 (C11, C15); 124,6
 (C10); 114,9 (C12, C14); 114,7 (C3);
 114,2 (C4); 63,5 (CH₂); 14,5 (CH₃).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-furfurilideno-4-etoxibenzidrazida (EtoFUR).

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-furfurilideno-4-aminobenzidrazida (AminoFUR).

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-furfurilideno-4-bromobenzidrazida (BrFUR).

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-tiofilideno-benzidrazida (HTIO).
Padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C (DMSO – d_6 , 75 MHz) δ (ppm):
 163,1 (C9); 150,7 (C2); 146,9 (C5); 140,8
 (C13); 130,4 (C10); 130,2 (C12, C14);
 129,9 (C3); 129,4 (C4); 129,1 (C11, C15);
 127,8 (C6); 21,4 (CH₃).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-tiofilideno-4-metilbenzidrazida (MeTIO).

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-tiofilideno-4-etoxibenzidrazida
(EtoTIO).

Padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C (DMSO – d_6 , 75 MHz) δ (ppm):
163,4 (C9); 152,7 (C2); 147,5 (C5); 139,0
(C13); 130,5 (C11, C15); 129,7 (C3, C4);
128,7 (C6); 118,8 (C10); 112,6 (C12, C14).

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-tiofilideno-4-aminobenzidrazida
(AminoTIO).

Padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C do composto 5-nitro-tiofilideno-4-bromobenzidrazida (BrTIO).

Padrão de referência interna: TMS