UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

VINÍCIUS MARQUES SOARES

Estudo de permeabilidade em células Caco-2 de compostos análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente ao *Trypanosoma cruzi*

Dissertação para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Sílvia Storpirtis

São Paulo
2021

VINÍCIUS MARQUES SOARES

Estudo de permeabilidade em células Caco-2 de compostos análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente ao *Trypanosoma cruzi*

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Produção e Controle Farmacêuticos.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Sílvia Storpirtis

São Paulo
2021

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S676e

Soares, Vinícius Marques
Estudo de permeabilidade em células Caco-2 de compostos análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente ao Trypanosoma cruzi / Vinícius Marques Soares. - São Paulo, 2021.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos.
Orientador: Storpirtis, Sílvia

1. Permeabilidade. 2. Células Caco-2. 3. Nitrocompostos. 4. Citotoxicidade. 5. Doença de Chagas . I. T. II. Storpirtis, Sílvia, orientador.

Nome: SOARES, Vinícius Marques
Título: Estudo de permeabilidade em células Caco-2 de compostos análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente ao *Trypanosoma cruzi.*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em:

Comissão julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.ª.Dr.ª Sílvia Storpirtis
Orientadora / Presidente

Banca Examinadora:

Profa. Dra. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição:_____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

São Paulo, ____ de _____ de _____

Aos meus pais, Nilson e Mara

por sempre acreditarem em mim.

Pelas oportunidades de estudo que tornaram

possível a realização dos meus sonhos e me trouxeram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gratidão acima de tudo a Deus por iluminar o caminho para que este trabalho fosse factível.

A toda minha família, em especial aos meus pais Nilson e Mara que forjaram meu caráter e sempre me apoiam e fornecem respaldo em todos os âmbitos.

Agradeço a minha orientadora Silvia Storpirtis por todos os ensinamentos e instruções, pela paciência e compreensão. Presente em todas as situações, não apenas uma professora, mas um exemplo de educadora por quem sempre terei respeito e admiração.

A minha irmã e amiga Amanda, por confiar em mim e me permitir fazer parte da sua educação.

Agradeço aos amigos Vlademir de Oliveira Pinto, Tissiane Sanches Lopes e Heitor Oliveira de Almeida Leite por trazem motivação, apoio moral e valorização do meu trabalho. Em especial cito Renato Felipe de Andrade que sempre ao meu lado me inspira a ser o melhor de mim e a acreditar no meu potencial.

Ao professor Leoberto Costa Tavares e aos seus orientandos que vieram a participar de alguma etapa presente neste trabalho.

Ao professor Felipe Rebello Lourenço pelas orientações e disponibilidade para esclarecimentos e opiniões sempre que necessário.

Ao professor e amigo José Eduardo Gonçalves, sempre solícito em todas as situações.

À professora Letícia Veras Costa Lotufo e sua orientanda e minha amiga Larissa Almeida pelos treinamentos e parceria.

Agradeço a todos os membros universitários envolvidos neste trabalho que acreditaram que fosse possível e reconheceram sua importância, se dedicando juntamente a mim à sua realização.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, professores os quais tive oportunidade de aprender muito e a dividir experiências e ao programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“*A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável*.”

(Galileu Galilei)

RESUMO

SOARES, Vinícius Marques. **Estudo de permeabilidade em células Caco-2 de compostos análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente ao *Trypanosoma cruzi.*** p. 95 (Dissertação para a Defesa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2021.

A busca por alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas é de grande importância, pois, atualmente, existem apenas dois fármacos disponíveis no mercado, o benznidazol e o nifurtimox, que apresentam efeitos adversos consideráveis. Compostos 5-nitroheterocíclicos com atividade antiparasitária têm apresentado resultados encorajadores para o tratamento desta doença. Devido à preferência pela administração oral para o tratamento de doenças crônicas, estudar a permeabilidade de uma nova molécula é fundamental. O objetivo do trabalho foi avaliar a citotoxicidade e a permeabilidade de análogos da nifuroxazida (compostos 22, 23 e 24) com atividade frente ao *T. cruzi*, utilizando ensaios *in vitro* com monocamadas de células Caco-2, modelo *in vitro* mais empregado para a predição da permeabilidade e absorção *in vivo*. Realizaram-se testes de citotoxicidade destes compostos, empregando o ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazólio) para avaliar a viabilidade celular e determinar a concentração a ser utilizada nos experimentos de permeabilidade. Para a quantificação destas moléculas foi desenvolvido e validado um método bioanalítico de acordo com a legislação vigente. Obteve-se a viabilidade celular de até 70% nas concentrações de 9,3; 6,7 e 3,1 µg/mL (n=3) para os compostos 22, 23 e 24, respectivamente. O método desenvolvido demonstrou seletividade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade, tornando-o aplicável à quantificação dos compostos em estudo. Na avaliação da permeabilidade aparente (*Papp*), os padrões de alta (metoprolol) e baixa (hidroclorotiazida) apresentaram valores de *Papp* iguais a 29,4 e 0,54 x 10^{-6} cm/s, respectivamente. Para os análogos à nifuroxazida (C22, C23 e C24) foram obtidos os valores de 58,52; 53,97 e 46,07 x 10^{-6} cm/s, respectivamente, o que os classifica como compostos de alta permeabilidade. Os resultados são promissores e importantes para encorajar a continuidade da pesquisa com os candidatos a fármacos avaliados, colaborando com a obtenção de alternativas para o tratamento da referida doença, considerada uma doença negligenciada no Brasil.

Palavras-chave: Permeabilidade; Células Caco-2; Nitrocompostos; Citotoxicidade; Doença de Chagas; *T. cruzi;* Doenças Negligenciadas.

ABSTRACT

SOARES, Vinícius Marques. **Permeability study about Caco-2 cells of nifuroxazide-like compounds with potential activity against *Trypanosoma cruzi.*** p. 95 (Qualification of Master in Pharmaceutical Sciences) – Faculty Pharmaceutical Sciences University of São Paulo, 2021.

The search for therapeutic alternatives for the treatment of Chagas' disease has great importance, since that currently there are only two drugs available on the market: benznidazol and nifurtimox, which have considerable adverse effects. 5-nitroheterocyclic compounds with antiparasitic activity have shown encouraging results for the treatment of this disease. Due to the preference for oral administration for the treatment of chronic diseases, studying the permeability of a new molecule is essential. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity and permeability of nifuroxazide analogues (compounds 22, 23 and 24) with activity against *T. cruzi*, using *in vitro* assays with Caco-2 cell monolayers, the most used *in vitro* model for the prediction of permeability and *in vivo* absorption. Cytotoxicity tests of these compounds were performed, using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) to assess cell viability and determine the concentration to be used in the experiment's permeability. For the quantification of these molecules, a bioanalytical method was developed and validated according to the current legislation. Cell viability of up to 70% was obtained at concentrations of 9.3; 6.7 and 3.1 µg/mL (n=3) for compounds 22, 23 and 24, respectively. The developed method demonstrated selectivity, linearity, precision, accuracy and stability, making it applicable to the quantification of the compounds under study. In the assessment of apparent permeability (*Papp*), the high (metoprolol) and low (hydrochlorothiazide) patterns showed *Papp* values equal to 29.4 and 0.54 x 10^{-6} cm/s, respectively. For analogues to nifuroxazide (C22, C23 and C24) the values of 58.52 were obtained; 53.97 and 46.07 x 10^{-6} cm/s, respectively, which classifies them as compounds with high permeability. The results are promising and important to encourage the continuity of the research with the candidates of evaluated drugs, collaborating with the obtaining of alternatives for the treatment of the referred disease, considered a neglected one in Brazil.

Keywords: Permeability; Caco-2 cells; Nitrocomposites; Cytotoxicity; Chagas disease; *T. cruzi;* Neglected Diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estágios do ciclo reprodutivo do *Trypanosoma cruzi*.....29

Figura 2 - Estrutura química da nifuroxazida.....33

Figura 3 - Principais mecanismos de transporte através da membrana intestinal....38

Figura 4 - Membrana onde ocorre a diferenciação das células em enterócitos para o experimento de permeabilidade ……..……...…….....39

Figura 5 - Estrutura molecular, nomenclatura e Massa Molecular (MM) dos compostos 22, 23 e 24…….....….....43

Figura 6 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono do Composto 22…….....…....…….....….44

Figura 7 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono do Composto 23…….....…....…….....….....45

Figura 8 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono do Composto 24…….....…….....46

Figura 9 - Esquema do suporte de cultivo de células Caco-2 empregado nos estudos de permeabilidade…….....…….....56

Figura 10 - Representação dos resultados obtidos nos estudos de citotoxicidade, através da viabilidade das células Caco-2 incubadas por 6 horas com os análogos da nifuroxazida em estudo avaliados pelo ensaio MTT. Os valores de viabilidade celular acima e abaixo de 70% são separados pela linha vermelha.....…....….....59

Figura 11 - Concentrações (µg/mL) consideradas máximas para cada composto objetivando garantir uma viabilidade celular mínima de 70% (no máximo 30% de morte celular) nas condições do ensaio de permeabilidade.....61

Figura 12 - Cromatograma de Injeção de diluente (tampão Hank's) em 225 nm.....64

Figura 13 - Cromatograma de Injeção do mix de soluções (MTL, HCTZ, NFZ, C22, C23 e C24) na concentração de 5000 ng/mL para MTL e 1000 ng/mL para os demais compostos em tampão Hank's em 225 nm.....65

Figura 14 - Cromatograma de Injeção de diluente (tampão Hank's) em 270 nm.....65

Figura 15 - Cromatograma de Injeção do mix de soluções (MTL, HCTZ, NFZ, C22, C23 e C24) na concentração de 5000 ng/mL para MTL e 1000 ng/mL para os demais compostos em tampão Hank's em 270 nm.....66

Figura 16 - Cromatograma de Injeção de diluente (tampão Hank's) em 370 nm.....66

Figura 17 - Cromatograma de Injeção do mix de soluções (MTL, HCTZ, NFZ, C22, C23 e C24) na concentração de 5000 ng/mL para MTL e 1000 ng/mL para os demais compostos em tampão Hank's em 370 nm.....67

Figura 18 - Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação de Metoprolol em tampão Hank's.....68

Figura 19 - Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação de hidroclorotiazida em tampão Hank's.....68

Figura 20 - Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação de nifuroxazida em tampão Hank's.....69

Figura 21 - Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto 22 em tampão Hank's.....69

Figura 22 - Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto 23 em tampão Hank's.....70

Figura 23 - Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto 24 em tampão Hank's.....70

Figura 24 - Valores médios de resistência elétrica transepitelial (RET) das membranas de células Caco-2 determinados ao 10º, 15º e 21º dias de cultivo nas placas Transwell™.....78

Figura 25 - Valores médios de resistência elétrica transepitelial (RET) das membranas de células Caco-2 nas placas Transwell™, determinados nas condições do experimento de permeabilidade do metoprolol, hidroclorotiazida e dos compostos 5-nitroheterocíclicos no tempo inicial e final (120 minutos).....78

Figura 26 - Fração média (n=6) permeada de metoprolol (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.....79

Figura 27 - Fração média (n=6) permeada de hidroclorotiazida (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.....79

Figura 28 - Fração média (n=6) permeada de nifuroxazida (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.....79

Figura 29 - Fração média (n=6) permeada do composto 22 (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.....80

Figura 30 - Fração média (n=6) permeada do composto 23 (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.....80

Figura 31 - Fração média (n=6) permeada do composto 24 (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações (ng/mL) das soluções-padrão de metoprolol, hidroclorotiazida e dos 5-nitroheterocíclicos em tampão para a curva analítica, linearidade e os respectivos Controles de Qualidade de Diluição, Alta concentração, Média concentração, Baixa concentração e Limite Inferior de Quantificação.....53

Tabela 2 - Concentrações iniciais (ng/mL) e tempos de coleta dos compostos no experimento de permeabilidade empregando células Caco-2.....56

Tabela 3 - Limites do intervalo de confiança (IC 95%) obtidos por regressão não linear dos compostos 22, 23 e 24 em µM…….....60

Tabela 4 - Condições analíticas e parâmetros de adequabilidade dos métodos desenvolvidos para a quantificação dos padrões de alta e baixa permeabilidade e dos compostos 5-nitroheterocíclicos.....63

Tabela 5 - Composição do gradiente empregado nos métodos analíticos desenvolvidos.....63

Tabela 6 - Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para o metoprolol.....71

Tabela 7 - Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para a hidroclorotiazida.....71

Tabela 8 - Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para o nifuroxazida.....71

Tabela 9 - Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para o composto 22.....72

Tabela 10 - Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para o composto 23.....72

Tabela 11 - Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo da (intra) e em dias consecutivos (inter) para o composto 24.....72

Tabela 12 - Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento do metoprolol.....73

Tabela 13 - Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento da hidroclorotiazida. 74

Tabela 14 - Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento da nifuroxazida.....74

Tabela 15 - Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento do composto 22.....75

Tabela 16 - Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento do composto 23.....75

Tabela 17 - Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento do composto 24.....76

Tabela 18 - Valores de Permeabilidade aparente (*Papp* x10^{-6} cm/s) de metoprolol, hidroclorotiazida e dos 5-nitroheterocíclicos por meio da fração permeada através das membranas formadas por células Caco-2.....81

Tabela 19 - Correlação dos valores de *Papp* (x10^{-6} cm/s) do metoprolol, hidroclorotiazida e dos 5-nitroheterocíclicos com a classificação da fração possivelmente absorvida *in vivo* segundo a literatura.....82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-*T. cruzi*	Anti-*Trypanosoma cruzi*
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Apical
BL	Basolateral
Bz	Benznidazol
C22	Composto 22
C23	Composto 23
C24	Composto 24
Caco-2	Caucasian Colon Adenocarcinoma
CDC	Centers of Disease Control and Prevention
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CQA	Controle de Qualidade de Alta Concentração
CQB	Controle de Qualidade de Baixa Concentração
CQD	Controle de Qualidade de Diluição
CQM	Controle de Qualidade de Média Concentração
CV	Coeficiente de Variação
DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
ED50	Dose Efetiva para promover 50% da resposta efetiva
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DPR	Desvio Padrão Relativo
EDTA	Etilenodiamino Tetra-Acético
EUA	Estados Unidos da América
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FDA	Food and Drug Administration
HCTZ	Hidroclorotiazida
HEPES	Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic Acid
IC	Intervalo de Confiança
IC_{30}	Inhibitor Concentration of 30%
ISO	International Standard Organization
IV	Intravascular
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
MDCK	Martin-Darby Canine Kidney
MM	Massa Molecular
MS	Ministério da Saúde
MSKCC	Memorial Sloan Kettering
MTL	Metoprolol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazólio
NCEs	New Chemical Entities
NFZ	Nifuroxazida
OMS	Organização Mundial da Saúde

P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
P-GP	Glicoproteína-P
Papp	Permeabilidade Aparente
PA	Para Análise
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
pH	Potencial Hidrogeniônico
QSAR	Quantity Structure Activities Relations
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RET	Resistência Elétrica Transepitelial
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por Minuto
BCS	Biopharmaceutics Classification System
SINAN	Sistema de Informação de Agravo de Notificação
SKI	Sloan-Kettering Institute
T. cruzi	*Trypanosoma cruzi*
Teste t	Teste Student de Hipóteses
UI	Unidade Internacional
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VO	Via Oral
VIS	Visível
WHO	World Health Organization

LISTA DE/ SÍMBOLOS

%	Porcentagem
™	Marca Registrada
ºC	Grau Celsius
US$	Dólar Americano
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Ω	Ohm
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro Quadrado
CO_2	Dióxido de Carbono
g/L	Grama por Litro
g/mol	Grama por Mol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....25

2 REVISÃO DA LITERATURA.....28

2.1 DOENÇA DE CHAGAS.....28

2.2 FARMACOTERAPIA PARA A DOENÇA DE CHAGAS.....31

2.3 NITROCOMPOSTOS.....32

2.4 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS E A FARMACOCINÉTICA.....33

2.5 PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS E ABSORÇÃO PELA VIA ORAL.....35

2.5.1 Principais vias de absorção de fármacos.....37

2.6 TÉCNICAS IN VITRO PARA A AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS.....38

2.7 CÉLULAS CACO-2.....40

3 OBJETIVOS.....42

3.1 OBJETIVO GERAL.....42

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....42

4 MATERIAIS E MÉTODOS.....43

4.1 MATERIAIS.....43

4.1.1 Substâncias Químicas de Referência.....43

4.1.2 Série de compostos.....43

4.1.2.1 Síntese dos compostos.....44

4.1.3 Equipamentos.....47

4.1.4 Células, reagentes, solventes e materiais empregados nos experimentos.....47

4.2 INFRAESTRUTURA.....49

4.3 MÉTODOS.....49

4.3.1 Cultivo das células Caco-2.....49

4.3.2 Crioconservação do banco celular.....49

4.3.3 Padronização do ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células Caco-2 frente aos nitrocompostos para determinação da viabilidade celular...50

4.3.4 Desenvolvimento dos métodos bioanalíticos para a quantificação dos compostos nos experimentos de permeabilidade *in vitro* 51

4.3.4.1 Preparo das soluções-padrão 52

4.3.5 Validação dos Métodos Bioanalíticos para a Quantificação dos Compostos em Estudo.....52

4.3.5.1 Seletividade..... 52

4.3.5.2 Linearidade 53

4.3.5.3 Precisão 53

4.3.5.4 Exatidão 54

4.3.5.5 Limite Inferior de Quantificação..... 55

4.3.5.6 Estabilidade..... 55

4.3.6 Estudo de permeabilidade através das membranas de células Caco-2 55

4.3.7 Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2 57

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....58

5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE 58

5.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EM ESTUDO.....63

5.2.1 Preparo das soluções-padrão..... 63

5.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EM ESTUDO..... 64

5.3.1 Seletividade 64

5.3.2 Linearidade..... 67

5.3.3 Precisão e exatidão..... 71

5.3.4 Limite Inferior de Quantificação 73

5.3.5 Estabilidade..... 73

5.3.6 Avaliação *in vitro* da permeabilidade - Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2 através da resistência elétrica transepitelial (RET) 77

5.3.7 Avaliação *in vitro* da permeabilidade – Determinação da Permeabilidade aparente (*Papp*) do metoprolol (padrão de alta permeabilidade), da hidroclorotiazida (padrão de baixa permeabilidade) e dos 5-nitroheterocíclicos 78

6 CONCLUSÕES.....84

REFERÊNCIAS.....85

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas Aguda (DCA), também é conhecida como uma antropozoonose de grande prevalência e alta morbimortalidade (DIAS, 2016), é uma enfermidade de origem parasitária e afeta entre 6 e 7 milhões de pessoas no mundo, incluindo aquelas de países como o Canadá, os EUA (Estados Unidos da América) e alguns países europeus e do Pacífico Ocidental, apesar de ser endêmica da América Latina, em mais de 21 países, incluindo o Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, 2021).

Essa expansão da doença se deve à mobilidade da população, que vem aumentando. Dados epidemiológicos estimam que ocorram por ano 14.000 mortes devido à enfermidade, além de 30.000 casos novos, sendo que 70 milhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de serem infectadas (WHO, 2021).

Apesar de o Brasil ter sido certificado internacionalmente em 2006 por haver interrompido a transmissão da doença pelo vetor *Triatoma infestans* (espécie exótica), ainda há a estimativa de que no País haja, pelo menos, um milhão de pessoas contaminadas por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e que nas Américas, cerca de 12 milhões de pessoas foram acometidas pela doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A descoberta da DCA (nomeada em princípio de Tripanossomíase americana) em 1909 foi atribuída a Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, pesquisador e médico sanitarista do Instituto Oswaldo Cruz, nascido em 1878, em Oliveira-MG e doutorado na Faculdade do Rio de Janeiro. O descobridor também estudou outras doenças como a malária (GURGEL; MAGDALENA; PRIOLI, 2009).

Entre 2012 e 2016, mais de 79,0% dos casos mundiais da doença ocorreram no Brasil. A maior porcentagem de casos do País foi na região Norte (97,1%). A incidência média anual de DCA foi 0,1 casos/100 mil habitantes, com maiores incidências médias no Amapá (1,5 casos /100 mil habitantes) e no Pará (2,9 casos/100 mil habitantes). Esses casos confirmados no Brasil ocorreram pela falha nas intervenções preditivas, faltaram ações de suspeição e houve demora nos diagnósticos. Uma vigilância debilitada gera piora clínica e na evolução da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Tal doença é considerada negligenciada, por receber baixo investimento na pesquisa de novos fármacos, já que gera pouco lucro, acometendo, especialmente, populações mais pobres dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (LIESE; ROSENBERG; SCHRATZ, 2010).

O protozoário *T. cruzi* é o agente etiológico da DCA e sua transmissão ocorre principalmente por meio da alimentação hematófaga de um inseto triatomídeo (o “barbeiro”) (ARAUJO-JORGE; PIRMEZ, 1999). Os insetos hematófagos, ao se alimentarem, liberam tripomastigotas (forma morfológica do protozoário *T. Cruzi*) em suas fezes perto do local da ferida da picada (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017). Essa é a principal via de transmissão da doença (70% do total).

Outras formas de contaminação são: ingestão de alimentos contaminados com as fezes do vetor triatomídeo, transfusão sanguínea, transmissão congênita na fase fetal, transplante de órgãos infectados e acidentes laboratoriais com materiais contaminados (CAMANDAROBA; LIMA; ANDRADE, 2002; ROJAS et al., 2005; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017).

No Brasil, dos casos de transmissão da doença, 9% foram constatados tendo sido causados por via vetorial. Em 18% desses, não foi identificada a forma de transmissão e 72% dos casos ocorreram por transmissão oral. Entre 2008 a 2017, ocorreram casos confirmados de DCA na maioria dos estados brasileiros. A maior concentração dos casos (por volta de 95%) encontra-se na região Norte, sendo 83% desses no Pará. Isso se deve à transmissão oral na Amazônia Legal, devido à ingestão de alimentos contaminados como a bacaba, o açaí, o caldo de cana, etc. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Assim, pesquisar novas alternativas terapêuticas para essa doença é imprescindível, em razão do número reduzido de fármacos adequados ao seu tratamento. Os nitrocompostos e seus derivados são fármacos considerados fortes candidatos por apresentarem ótima ação antichagásica. Essas moléculas, quando modificadas, podem melhorar sua atuação biológica, com diminuição dos efeitos tóxicos (CERECETTO et al., 2000; AGUIRRE et al., 2005).

O fármaco ideal para tratamento da doença de Chagas (DC), segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), deveria curar em ambas as fases da doença (aguda e crônica), apresentar eficiência em poucas doses, além de ser de baixo custo, fácil acesso, não induzir resistência e causar baixos efeitos colaterais e teratogênicos, sem a necessidade de hospitalização (SOBRINHO et al., 2009).

Sabe-se que a descoberta de novos fármacos apresentando estrutura química

completamente nova é muito cara e envolve anos de investigação. A otimização de fármacos já disponíveis é uma alternativa financeiramente acessível e pode resultar em melhores e promissores agentes terapêuticos (YAMASHITA; HASHIDA, 2004).

Em sua maioria, o desenvolvimento de medicamentos tem como alvo a administração via oral, apesar de ser a via de mais complexa absorção. Porém, devido a comodidade de utilização e maior adesão por parte dos pacientes, a maioria dos medicamentos são formulações orais. Dessa forma, prever a absorção *in vivo*, bem como conhecer a biodisponibilidade de candidatos a fármacos é um fator não apenas relevante mas também crítico para o desenvolvimento farmacêutico (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

As células Caco-2 (Caucasian Colon Adenocarcinoma) são as mais estudadas e caracterizadas em experimentos de permeabilidade e são as mais usadas como modelo celular e técnicas *in vitro*, pois têm transportadores de influxo e efluxo, o que as difere de outros modelos (BALIMANE; CHONG, 2005; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Seu cultivo é feito em filtros permeáveis, sendo, então, referência para a predição da permeabilidade de fármacos *in vitro* (HUBATSCH, RAGNARSSON, ARTURSSON, 2007). A base do filtro pode ser constituída de polietileno tereftalato, poliéster ou policarbonato. O primeiro tipo é um material inerte com baixas propriedades de ligação às proteínas (VERHOECKX et al., 2015).

O presente estudo representa uma contribuição à pesquisa de novos fármacos antichagásicos com potencial administração por via oral. Neste, estão envolvidos dois grupos de pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, relacionados, respectivamente, ao desenvolvimento de projetos nas áreas de síntese de novos candidatos a fármacos (Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares - FBT-FCF-USP) e de avaliação da permeabilidade de fármacos e candidatos a fármacos empregando culturas celulares *in vitro* (Profª. Dr.ª Sílvia Storpirtis - FBF-FCF-USP).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇA DE CHAGAS

Em 1907, o pesquisador Chagas foi enviado à Lassance, MG, para conter a malária na construção da ferrovia central do Brasil. Durante sua pesquisa, teve a oportunidade de conhecer outros parasitas, culminando na descoberta do "barbeiro" (COUTINHO; DIAS, 1999). Com isso, identificou o agente infeccioso etiológico *Trypanosoma cruzi*, além de seu ciclo de vida, descrevendo os sintomas em pacientes contaminados que observou na época, tanto da fase aguda quanto da crônica, o que permitiu a ele reproduzir a doença, inoculando o agente *T. cruzi* em animais de laboratório (PITTELLA, 2009).

A DC se desenvolve em uma fase aguda e outra crônica (Figura 1). A aguda acontece dois meses depois da infecção, apresentando muitos parasitas no sangue, sem apresentar sintomas, na maioria dos casos. Já na crônica, os parasitas se fixam no coração e no sistema digestório, o que causa mais de 30% de problemas cardíacos e 10% dos sistemas gastrintestinais e neurológicos. A doença evoluída pode comprometer o músculo cardíaco e o sistema nervoso, levando a arritmias e insuficiência cardíaca progressiva, podendo chegar à morte súbita (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

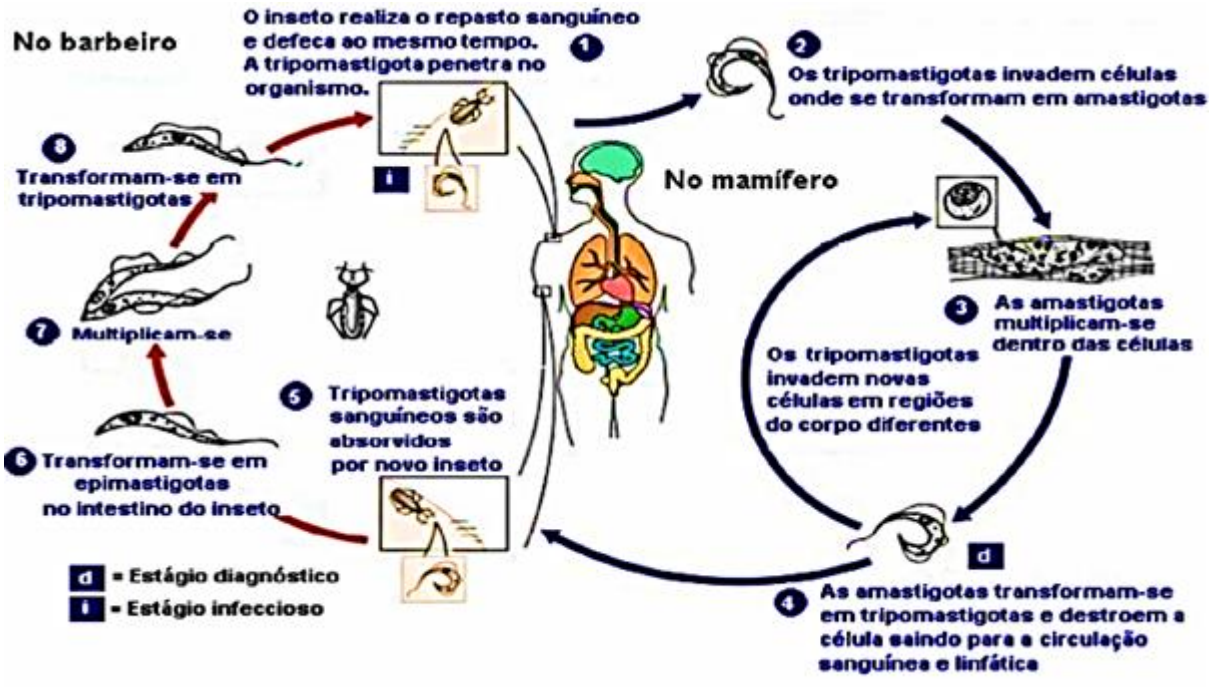
Chagas, então, ao buscar novos hospedeiros vertebrados para o protozoário identificado, encontrou-o em sangue de gatos e examinou moradores de casas que continham o "barbeiro" até diagnosticar o primeiro caso da doença: Berenice (KROPF, 2009), que apresentava edema generalizado e febre. Em seu sangue, havia o mesmo flagelo encontrado no intestino de um “barbeiro” analisado um ano antes. Berenice faleceu aos 72 anos, de acidente vascular cerebral, sem ter desenvolvido a forma crônica sintomática da doença (GARCIA, 2009).

O ciclo de vida do protozoário é heterogêneo (dividido em 2 etapas: uma ocorre no hospedeiro invertebrado - o inseto triatomídeo -, e outra em vertebrados que podem ser o homem e várias outras espécies de mamíferos). No inseto são encontradas três formas do parasita: esfero-amastigotas, epimastigotas e tripomastigota metacíclica, sendo esta última a forma infectante presente no “barbeiro”.

Após a infecção no mamífero, surgem as formas tripomastigotas (fase aguda da doença) presentes no sangue ou interstício extracelular; e a amastigota, presente nas células e tecidos atingidos (fase crônica da doença) (ARAUJO-JORGE; PIRMEZ, 1999; LANA; TAFURI, 2004; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017).

Os tripomastigotas não se replicam na corrente sanguínea (diferentemente dos tripanossomas africanos). Quando os parasitas entram em outra célula ou outro vetor, se alimentam deles e a replicação se retoma. O "barbeiro" se infecta ao ingerir sangue humano ou animal contendo parasitas circulantes. Ao serem ingeridos, os tripomastigotas são transformados em epimastigotas quando atingem o intestino médio do vetor, que mais adiante se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos no intestino posterior (Figura 1) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017).

Figura 1 - Estágios do ciclo reprodutivo do *Trypanosoma cruzi.*



Fonte: Rey (2008).

O desenvolvimento das formas evolutivas do *T. cruzi* ocorre em insetos como: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus lutzi*, *Triatoma infestans*, *Triatoma rubrovaria, Triatoma sórdida*, *Triatoma pseudomaculata*; sendo o

Triatoma infestans o causador majoritário das infecções chagásicas. Esse agente etiológico realiza a segunda fase do seu ciclo evolutivo em animais vertebrados como: seres humanos, cães, macacos, gambás, gatos, morcegos, porcos-espinhos, pacas, entre outros (COSTA et al., 2013).

Porém, de acordo o Ministério da Saúde (2019), o triatomídeo da espécie *Triatoma infestans*, no período de 2012 a 2016, foi o de menor captura, em plano nacional. Além disso, outras 6 espécies (*Rhodnius neglectus, Rhodnius nasutus, Rhodnius robustus, Triatoma maculata, Panstrongylus geniculatus e Triatoma vitticeps*), além daquelas já descritas anteriormente, estavam entre as 13 capturadas no período já descrito.

Segundo o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), 19.914 casos suspeitos de DCA, entre 2012 e 2016, foram registrados (94,0% descartados e 5,9% confirmados), 44,2% eram mulheres, e destas, 3,2% gestantes. A idade média dos doentes era de 32 anos, com faixa etária mais atingida entre 20 a 49 anos, sendo a maioria negra (80,0%) e com 1 a 9 anos de escolaridade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O Programa de Controle da DC não controla diretamente os vetores da doença, mas usa uma estratégia lógica que reduz a sua carga, prevenindo outras formas de transmissão e tratando pacientes já infectados. Essa estratégia, aparentemente simples, tenta superar o desafio de aplicar diversas atividades, combinando com diferentes cronogramas de implementação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Em 2005, no Estado de Santa Catarina, o surto de contaminação pelo *T. cruzi,* cujo primeiro caso teve possível relação com a ingestão do caldo de cana, ganhou mais visibilidade, pois mobilizou a vigilância em relação à transmissão oral da doença, com estratégias específicas de vigilância para a região. No Pará, com 89,0% desses eventos, houve muitos casos notificados no período de safra do açaí (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A mudança do quadro epidemiológico da DC no Brasil promoveu um novo modo de vigilância epidemiológica. Porém, o risco de transmissão vetorial dessa doença ainda existe, devido a fatores como: presença de triatomídeos autóctones com alta capacidade de colonização; existência de reservatórios de *T. cruzi*, com a proximidade das populações humanas cada vez mais frequente a esses ambientes; a

resistência de focos de *T. infestans*, em certos municípios do Rio Grande do Sul e da Bahia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No País, a vigilância e o controle da DC têm três eixos básicos com atuações conjuntas que focam em: (i) casos humanos, com detecção precoce, tratamento, prevenção, investigação dos modos de monitoramento da infecção por *Trypanosoma cruzi*, transmissão e análise de morbimortalidade; (ii) de vetores, objetivando eliminar a transmissão vetorial por *Triatoma infestans* e controlar as outras espécies; (iii) do ambiente, com atividades ambientais, de vigilância sanitária e epidemiológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

2.2 FARMACOTERAPIA PARA A DOENÇA DE CHAGAS

Sabe-se que não existe tratamento efetivo para a DC, especialmente para a sua fase crônica. Tem-se ainda que entre 1975 e 1999, dentre os 1.393 novos medicamentos registrados, apenas 1% dos fármacos se destinavam a doenças tropicais (SOBRINHO et al, 2007).

Essa moléstia infecciosa transfigurou-se em problema global, pois durante longo período foi negligenciada, já que a mesma não beneficiava a indústria farmacêutica pelo baixo poder aquisitivo dos pacientes, em geral (BEZERRA, 2012).

Analisando a farmacoterapia, a partir da década de 1970, os únicos fármacos para o tratamento da DC à venda eram o benznidazol e o nifurtimox, que ainda demonstram efeitos adversos consideráveis. Entretanto, na maioria dos países onde a doença é endêmica (Brasil, Chile, Venezuela, entre outros), o benznidazol é mais usado devido a sua menor toxicidade comparada ao nifurtimox (COURA; CASTRO, 2002; COURA; CANÇADO, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

O fármaco mais efetivo foi o nifurtimox (Lampit™, da Bayer), que gera radicais livres que reagem aerobiamente, atacando o *T. cruzi*, que não tem defesa contra eles (DIAS et al., 2009). Porém, a partir de 1980, o mesmo parou de ser vendido no Brasil e depois no Chile, na Argentina e no Uruguai, devido à falta de interesse pelo baixo lucro (COURA; DE CASTRO 2002; SOBRINHO et al., 2007).

Atualmente, somente está à venda no Brasil o Bz (N-benzil-2-nitro-l-imidazolacetamida ou simplesmente benznidazol), que apresenta ausência de cargas e grupos funcionais ácidos ou básicos e baixa solubilidade em água na faixa de pH de

interesse fisiológico (pH 1 a 8) (SOBRINHO et al., 2009).

O mecanismo de atuação do benznidazol (Bz) é a formação de ligações covalentes às macromoléculas do parasita, facilitando sua fagocitose e lise, inibindo seu crescimento pela enzima fumarato redutase (DIAS; COURA, 1997; SOBRINHO et al., 2007; DIAS et al., 2009). Porém, esse mecanismo causa diversos efeitos colaterais como: depressão da medula óssea, hipersensibilidade e polineuropatia periférica (DIAS; COURA, 1997).

Ribeiro (2017), salienta em 12 artigos de sua pesquisa de 2012 a 2016 que apenas 16 fármacos foram utilizados em estudos com base na estratégia de reposicionamento para o desenvolvimento de novos fármacos. Destaca-se que a maior parte dos trabalhos utilizados no estudo adotaram a tática de associar o fármaco benznidazol com outros compostos, ou realizar modificações farmacocinéticas no mesmo. Entretanto, em nenhuma das propostas foi citada a nifuroxazida, que no presente estudo é considerada um composto líder sobre determinados análogos.

Os derivados nitrofurânicos que atuam contra o *Trypanosoma cruzi* são uma alternativa muito vantajosa e possível para estudos de alteração molecular, em busca de novos compostos-protótipos melhorados (JORGE, 2011; ISHII et al., 2011).

Pacientes na fase crônica inicial e aqueles nos quais a infecção foi reativada (por imunossupressão, por exemplo) são também recomendados a fazer o tratamento antiparasitário, pois assim os adultos infectados (principalmente aqueles sem sintomas) se previnem ou reduzem a progressão da doença, inclusive congenitamente, em mulheres grávidas. Nessas, porém, o benznidazol e o nifurtimox não devem ser administrados, assim como não devem tomá-los pessoas com insuficiência hepática ou renal. Nos casos adicionais, pode ser preciso tratar especificamente os sintomas cardíacos ou digestivos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

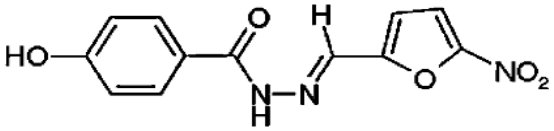
2.3 NITROCOMPOSTOS

Criados na década de 1940 e utilizados até hoje, os nitrocompostos são agentes terapêuticos de várias classes, como: anti-hipertensivos, antiparasitários, inseticidas, antibacterianos, sedativos, vasodilatadores, antipiréticos, antineoplásicos, analgésicos, anti-inflamatórios, etc. O grupo nitro desses compostos (chamado de parasitóforo) tem ação antiparasitária, em especial, quando se liga com os anéis

tiofênico, imidazólico e furânico (TAVARES et al., 1999; KATZUNG, 2001; SWEETMAN, 2002; RAETHER; HANEL, 2003; RANG; DALE; RITTER, 2004).

Outras vantajosas propriedades da nifuroxazida são: ela é inapta a produzir considerável resistência bacteriana e é suscetível a alterações sintéticas (JORGE et al., 2009). O tipo de estrutura da nifuroxazida (Figura 2), que permite modificações químicas por planejamento molecular racional, torna essa molécula capaz de criar compostos análogos (MASUNARI; TAVARES, 2007).

Figura 2 - Estrutura química da nifuroxazida.



Fonte: Masunari e Tavares (2007).

A criação de novas moléculas empregando grupos nitro restringe sua aplicação em virtude da toxicidade potencial desse grupamento. Entretanto, há estratégias para diminuir essa toxicidade (SOUZA, 2011).

Há a possibilidade de realizar estudos, também para melhorar o perfil antiparasitário dos compostos nitroheterocíclicos (CERECETTO et al., 2000; AGUIRRE et al., 2005). Entre esses, um antimicrobiano de amplo espectro, a nifuroxazida, se mostrou uma boa escolha para alterações estruturais em estudos de Relação Estrutura Atividade Quantitativa (Quantity Structure Activities Relations - QSAR) (TAVARES, 1993; TAVARES; PENNA; AMARAL, 1997; RANDO et al., 2002).

Dessa forma, compostos com estrutura análoga à nifuroxazida são considerados promissores na busca de novos fármacos antichagásicos, com o objetivo de aprimorar sua atividade biológica, assim como reduzir seus efeitos tóxicos. O próximo passo no desenvolvimento desses fármacos é a análise dos processos que governam sua farmacocinética, objetivando-se, principalmente, a possível administração por via oral.

2.4 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS E A FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética é o estudo quantitativo, por modelos matemáticos, de processos de absorção e destino de fármacos. A absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção são fenômenos farmacocinéticos que envolvem a

passagem do fármaco pelas membranas celulares e barreiras biológicas (DELUCIA, 2014).

Atualmente, a síntese de novos fármacos para o tratamento da DC é a estratégia mais utilizada, apesar de custosa e dispendiosa. Ultimamente, as pesquisas de novas entidades químicas (NCEs, do inglês *New Chemical Entities*) exigem investimentos da ordem de milhões de dólares em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e englobam muitos anos de trabalho de profissionais multidisciplinares. Presume-se gastos de US$ 500 milhões até US$ 1 bilhão e um tempo de pesquisa de cerca de 15 anos, desde a criação da ideia do projeto até a última fase de pesquisa clínica, podendo chegar a valores acima de US$ 1 bilhão em alguns casos (LOMBARDINO; LOWE III, 2004; FEE, 2007; UCHÔA; COSTA, 2011).

A maioria dos estudos relativos à doença baseia-se na pesquisa de novas drogas. Estes novos compostos se encontram nas fases pré-clínicas e agem contra o parasito por muitos meios diferentes ainda não elucidados. (RIBEIRO, 2017).

Estudos relativamente recentes demonstram que ensaios de farmacocinética e toxicidade de fármacos são realizados mais eficazmente e com maior antecedência do que eram feitos no passado (SONG; LIMAND; TONG, 2009; WATERBEEMD; GIFFORD, 2003). Esses podem ser inseridos na Clínica Médica fundamentalmente pelos seguintes processos: acaso, triagem empírica, extração de substâncias ativas de fontes naturais, alteração molecular de medicamentos e planejamento racional (DELUCIA, 2014). Por isso, a indústria farmacêutica foi incentivada a implementar parâmetros de triagem adequados de alta competência, com vantagens custo-efetivas e altamente prenunciadores em relação ao perfil ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) *in vivo* (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Comprimidos de liberação prolongada de benznidazol, usando polímeros como excipientes, ocasionaram redução na frequência de administração do fármaco, o que seria benéfico aos pacientes pela redução do abandono da terapia. Porém, estudos realizados em coelhos não deram resultado positivo, exigindo mais estudos de biodisponibilidade para a criação dessa nova formulação (DAVANÇO; CAMPOS; PECCIININI, 2016).

Entre os parâmetros que dificultam a administração do benznidazol estão a estabilidade e a biodisponibilidade, pois exigem frequência diária e longo tratamento (DAVANÇO; CAMPOS; PECCIININI, 2016), além da forma farmacêutica não ser

acessível a crianças e idosos (MANARIN et al, 2013). Estas dificuldades podem ser vencidas pela criação de novos sistemas de liberação e uso da tecnologia farmacêutica (DA CUNHA FILHO et al., 2013).

Para atingir a produtividade determinada pelos altos investimentos em P&D de fármacos, as grandes indústrias farmacêuticas mundiais têm apostado em testes de triagem mais racionais e breves, minimizando custos e tempo (YAMASHITA; HASHIDA, 2004; UCHÔA; COSTA, 2011).

As quimiotecas, de forma racional, são avaliadas por vários modelos computacionais (*in silico*) para particularidades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicidade; e as moléculas escolhidas para a síntese passam por testes experimentais *in vitro* e posteriormente *in vivo*, possibilitando a identificação de NCEs com propriedades adequadas (YAMASHITA; HASHIDA, 2004; FERNANDES et al*.,* 2011).

O composto GNF6702, na época do desenvolvimento, demonstrou atuação significativa contra o *T. cruzi*, inibindo de maneira não competitiva o proteassoma do parasito (uma enzima muito importante para células eucarióticas), não agindo sobre o proteassoma humano. O composto passou por ensaios pré-clínicos de toxicidade (KHARE et al., 2016).

Os testes experimentais em consonância com o prognóstico *in silico* servem de apoio para *a* previsão da absorção. Portanto, experimentos farmacocinéticos *in vitro* e *in vivo* são e sempre serão essenciais para a determinação de um novo candidato a fármaco (WESTERHUIS; KOURTI; MACGREGOR, 1998; CRUCIANE, 2006; FERNANDES et al*.,* 2011).

A tática farmacêutica do reposicionamento de fármacos para doenças negligenciadas é valiosa também, pois além de reduzir tempo e investimento, esses fármacos já possuem perfil toxicológico e farmacocinético desenvolvido (ALBERCA et al., 2016).

2.5 PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS E ABSORÇÃO PELA VIA ORAL

Tem-se que em se tratando da via de administração de fármacos, a via oral (vo) é a mais conveniente no tratamento de doenças crônicas pela comodidade na administração do medicamento, baixo custo e alta adesão, empregando-se, em geral,

formas farmacêuticas produzidas de maneira mais simples. Assim, essas propriedades vantajosas na absorção por esta via são relevantes na busca de um novo candidato a fármaco (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

A possibilidade de uso da via oral influenciará vários aspectos clínicos importantes. O controle das concentrações plasmáticas de fármacos será facilitado, mantendo-as estáveis por certo tempo, usando sistemas de libertação controlada. Além disso, também será possível garantir que a molécula chegue até o alvo terapêutico específico, o que tornará o tratamento mais viável (THANKI et al., 2013).

Em teoria, seria factível controlar as variações na concentração do fármaco, reduzindo os efeitos colaterais. A efetivação da via oral evitaria também o desconforto das agulhas, aumentando a cooperação do paciente na terapêutica. Sem citar a redução do risco de infecção no ato de perfurar a pele para a via iv (intravascular), o que evitaria também a necessidade de pessoal especializado para fazer a administração (THANKI et al., 2013).

Mesmo que a vo seja mais vantajosa do que a via iv, ela possui desvantagens, devido, por exemplo, à baixa permeabilidade de alguns fármacos ao longo do trato gastrintestinal; a sua instabilidade química e a baixa solubilidade em água; além da variação do pH que pode afetar a absorção e a estabilidade dos fármacos. As enzimas intestinais e hepáticas também podem influir na rápida degradação dos fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; GONÇALVES; STORPIRTIS, 2011; LUO et al., 2014).

Para isso, é importante entender os processos de solubilização e absorção dos compostos na elaboração de moléculas propícias à administração oral, pois diversos fatores podem influenciar nesse processo, como: lipofilicidade, esvaziamento gástrico, dissolução, absorção por transporte ativo ou passivo, pH, tamanho de partícula e alimentos (BUENO; RECH, 2009). Um outro desafio corresponde ao fato de que as altas concentrações de fármaco por via oral podem danificar as mucosas gástrica e intestinal (LUO et al., 2014).

Após serem ingeridos, os fármacos têm que superar barreiras complexas como a instabilidade no trato gastrintestinal e o metabolismo pré-sistêmico. Dessa maneira, é preciso melhorar a viabilidade deste processo, para haver melhor tolerância da administração oral, e maior biodisponibilidade dos fármacos como aqueles administrados por via iv (FERREIRA; FIGUEIRAS, 2015).

A via iv é tida como a via mais interessante no tocante à cinética dos fármacos, já que é mais fácil predizer seu comportamento na corrente sanguínea. Por essa via, o fármaco estará totalmente biodisponível, em relação à dose administrada (FERREIRA; FIGUEIRAS, 2015).

Ao receber tratamento pela via iv, o doente poderá sentir-se incapaz por sentir dependente, já que os horários do tratamento são muito rigorosos. Assim, a quimioterapia por via oral apresenta-se como uma opção conveniente e interessante em relação à via iv (FERREIRA; FIGUEIRAS, 2015).

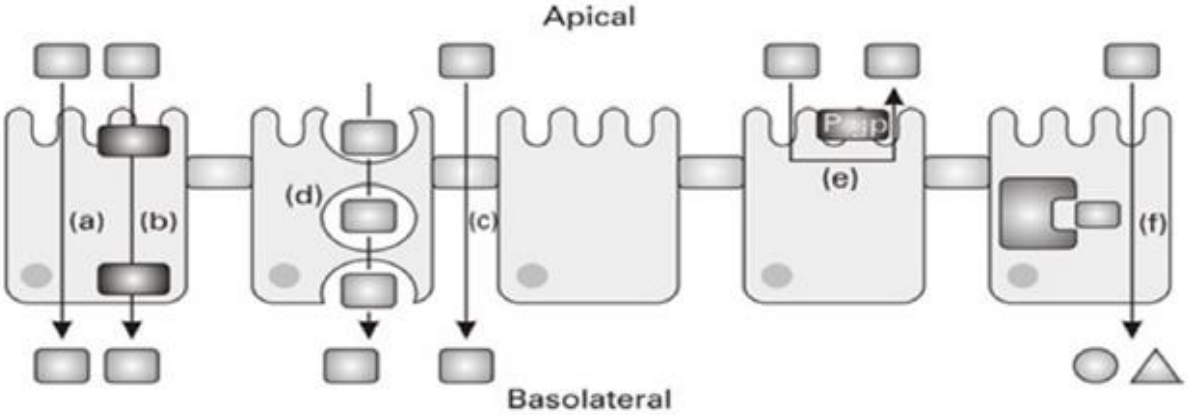
2.5.1 Principais vias de absorção de fármacos

A difusão é um mecanismo essencial de absorção intestinal de fármacos. Ela é controlada pelo gradiente de concentração e pode acontecer entre as células (transporte paracelular) ou através das células (transporte transcelular) (LI, 2001; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Em geral, esse transporte é mediado parte pelo transportador e parte por rotas passivas. Fármacos hidrofílicos e peptídeos utilizam a via de transporte paracelular, em geral. Substâncias muito hidrofílicas, hipoteticamente, podem usar também a via transcelular. Porém, segundo estudos recentes, as *tight junctions* (junções apertadas e justas entre as membranas laterais das células que impedem o fluxo de materiais e vedam o espaço intercelular) podem limitar o transporte paracelular (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012).

Conforme a literatura, certos fármacos hidrofílicos semelhantes a nutrientes podem ser transportados de forma ativa ou passiva mediada por transportador através do epitélio intestinal (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012). Tendo isso, conforme pode-se observar na Figura 3, o transporte de fármacos pelo epitélio intestinal pode se dar por um ou mais mecanismos. Nas letras (e) e (f) estão indicados dois mecanismos que bloqueiam a absorção, enquanto (a) indica a permeabilidade passiva transcelular; (b) o transporte mediado por carreadores de membrana; (c) a permeabilidade passiva paracelular; (d) o transporte vesicular (transcitose); (e) o transporte mediado por carreadores de excreção e (f) a presença de enzimas metabolizadoras.

Figura 3 - Principais mecanismos de transporte através da membrana intestinal.



Fonte: Gonçalves et al., (2012).

No epitélio intestinal, certas substâncias que penetram na membrana plasmática das células da mucosa são levadas de volta ao lúmen intestinal (efluxo) através do transportador chamado glicoproteína-P (P-gp) (LI, 2001; SOUZA, FREITAS, STORPIRTIS, 2007).

A via da transcitose para o lado seroso do epitélio é uma rota pouco interessante para o transporte intestinal de fármacos devido à sua reduzida capacidade de transporte na mucosa. Por isso, é a via para fármacos muito potentes (como antígenos peptídicos) que, por causa de seu tamanho molecular, não são transportados por outras vias (ARTURSSON; PALM; LUTHMAN, 2012).

2.6 TÉCNICAS *IN VITRO* PARA A AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE FÁRMACOS

Para a avaliação da permeabilidade intestinal, há várias técnicas além dos modelos *in vitro*. São exemplos os seguintes modelos: computacionais, físico-químicos, modelos *in vivo,* modelos de perfusão *in situ*. O modelo que utiliza células Caco-2 e o ensaio PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) são os métodos mais aceitos pela indústria farmacêutica, sem contar o uso de células MDCK (*Martin-Darby Canine Kidney*). O primeiro possui mecanismos múltiplos, se diferenciando e exibindo propriedades morfológicas e funcionais semelhantes às dos enterócitos (KRATZ, 2011).

No início do desenvolvimento de um novo fármaco, para os estudos de permeabilidade, as técnicas *in vitro* são menos custosas do que as *in vivo* em animais

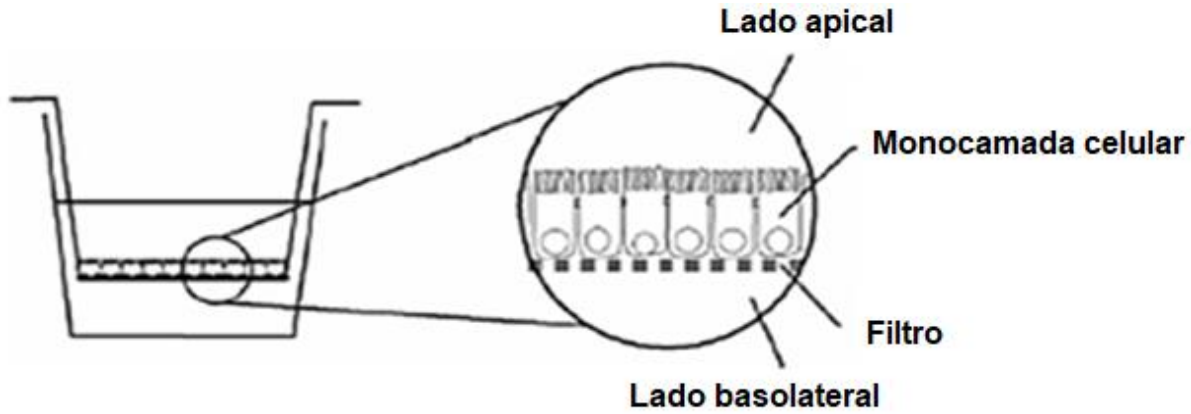
e seres humanos (GUANGLI; YIYU, 2006). Os métodos *in vitro* possuem vantagens e desvantagens. Essa técnica é mais rápida e sem interferência de fatores biológicos, mesmo não simulando a membrana biológica com exatidão (SILVA, 2010).

Além disso, fatores fisiológicos como a taxa de trânsito gastrintestinal, a taxa de esvaziamento gástrico e o pH gastrintestinal não podem ser incorporados na interpretação dos dados, o que configura uma questão muito discutida quanto aos sistemas *in vitro*. Um fator negativo dessa técnica é a falta de sangue e nervos que restringe a viabilidade e dificulta a criação de tecidos, podendo causar danos morfológicos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Uma precaução considerada essencial é evitar contaminação da cultura celular. Com 3 semanas de antibióticos no meio de cultura, uma infecção subclínica não identificável poderia alterar os resultados (VERHOECKX et al., 2015).

A diferenciação da linhagem Caco-2 ocorre em um mosaico (Figura 4) devido à sua heterogeneidade. A monocamada dessa linhagem será homogeneamente diferenciada dentro de 18 a 21 dias, em geral. A integridade das monocamadas é verificada antes dos estudos de transporte, utilizando um protocolo que tem como base a medida da resistência elétrica transepitelial (RET), o que se considera essencial para atestar a integridade e a qualidade da monocamada de células epiteliais polarizadas (VERHOECKX et al., 2015).

Figura 4 - Membrana onde ocorre a diferenciação das células em enterócitos para o experimento de permeabilidade.



Fonte: Verhoeckx et al. (2015).

2.7 CÉLULAS CACO-2

Utiliza-se com frequência as células Caco-2 para identificar estruturas facilmente absorvidas pelo epitélio intestinal (LI, 2001). Essas células têm origem em um adenocarcinoma de cólon humano, tendo sido isoladas e cultivadas pela primeira vez em 1977 por Jorgen Fogh e colaboradores na pesquisa de mecanismos de células de tumores e nos estudos de terapia antineoplásica realizada no *Sloan-Kettering Institute (SKI)* do *Memorial Sloan Kettering* – (MSKCC). Verificou-se com esses estudos que, em cultivo adequado, as células cancerígenas se diferenciavam em estruturas similares a enterócitos (FOGH; WRIGHT; LOVELESS, 1977; PINTO, 1983).

Essas células têm também habilidade espontânea de se diferenciar em cultivo *in vitro*, apresentando muitas características bioquímicas e morfológicas do intestino delgado humano (ARTURSSON; KARLSSON, 1991).

Em cultivo ideal, as células Caco-2 formam uma monocamada de células cilíndricas polarizadas que, ao crescerem, formam microvilosidades na borda apical. Entre as células anexas, formam-se junções oclusivas que apresentam ação enzimática de hidrolases comuns do intestino delgado. Ao serem cultivadas em circunstâncias equiparadas às do intestino *in vivo*, são usados suportes de filtros permeáveis, para deixar livre o trânsito de íons e nutrientes de cada lado da membrana formada (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007). Apesar de ser uma referência em testes de absorção de fármacos, existem alguns fatores que limitam o uso das células Caco-2 (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007). Alguns desses são os seguintes: 1) Pequeno número de transportadores (peptídeos, por exemplo) (CHONG et al., 1996); 2) Permeabilidade reduzida (igual ou menor que o manitol, embora em humanos seja maior que 50%) para compostos hidrofílicos com pequeno peso molecular (atenolol, ranitidina, hidroclorotiazida, furosemida, etc.); 3) Emprego de co-solventes (propilenoglicol, metanol, polietilenoglicol e etanol) que podem causar danos à membrana; 4) Pouca permeação do fármaco e aderência ao filtro de policarbonato; 5) Crescimento lento de suas células, necessitando uma cultura de até 3 semanas, com nutrientes, temperatura e tempo de intervalo entre os repiques que devem ser controlados para não alterar a membrana formada (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

O emprego dessas células em modelos *in vitro* de culturas em monocamadas

tornou-se importante no desenvolvimento de novos fármacos, pois além de mostrarem mecanismos de absorção, permitindo a predição em humanos da absorção oral de fármacos, podem auxiliar na identificação de possíveis problemas de solubilidade e permeabilidade (ARTURSSON, PALM, LUTHMAN, 1996; LENTZ et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2001; NEUHOFF et al., 2005).

Em muitas áreas da ciência, a cultura de células abre portas para novas possibilidades. A linhagem de células Caco-2, se corretamente desenvolvida, pode fornecer dados sobre propriedades bioquímicas de barreira da mucosa intestinal, sendo possível descobrir conhecimentos preciosos sobre a absorção de fármacos e componentes da dieta, interessantes para as indústrias alimentícia e farmacêutica (VERHOECKX et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo do estudo foi avaliar a permeabilidade de alguns compostos 5-nitroheterocíclicos análogos à nifuroxazida com potencial atividade frente ao agente etiológico da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), através do emprego de ensaios *in vitro* com células Caco-2, visando ao desenvolvimento racional de novos fármacos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a citotoxicidade de três análogos à nifuroxazida e do co-solvente dimetilssulfóxido (DMSO) que é usado na solubilização dos compostos frente às células Caco-2, visando à determinação das concentrações a serem utilizadas nos ensaios de permeabilidade;
- Desenvolver e validar métodos bioanalíticos para quantificação do metoprolol, hidroclorotiazida, nifuroxazida e de seus três análogos por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a permeabilidade do metoprolol, hidroclorotiazida, nifuroxazida e de seus três análogos pelo emprego de ensaios *in vitro* com células Caco-2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Substâncias Químicas de Referência

- Hidroclorotiazida

Teor: 99,3%

- Succinato de Metoprolol

Teor: 99,5%

- Nifuroxazida

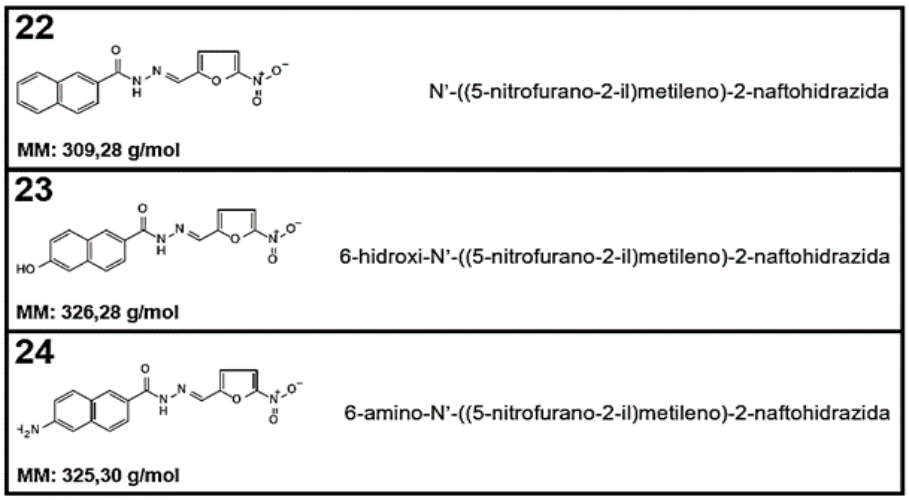
Teor: 99,9%

4.1.2 Série de compostos

Os compostos utilizados neste estudo são nitroderivados da nifuroxazida e foram planejados, sintetizados e disponibilizados pelo Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos do Departamento de Tecnologia Químico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do professor Dr. Leoberto Costa Tavares.

Selecionaram-se três compostos (identificados como compostos 22, 23 e 24) entre os mais reativos e promissores dos análogos sintetizados para este estudo, representados na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura molecular, nomenclatura e Massa Molecular (MM) dos compostos 22, 23 e 24.

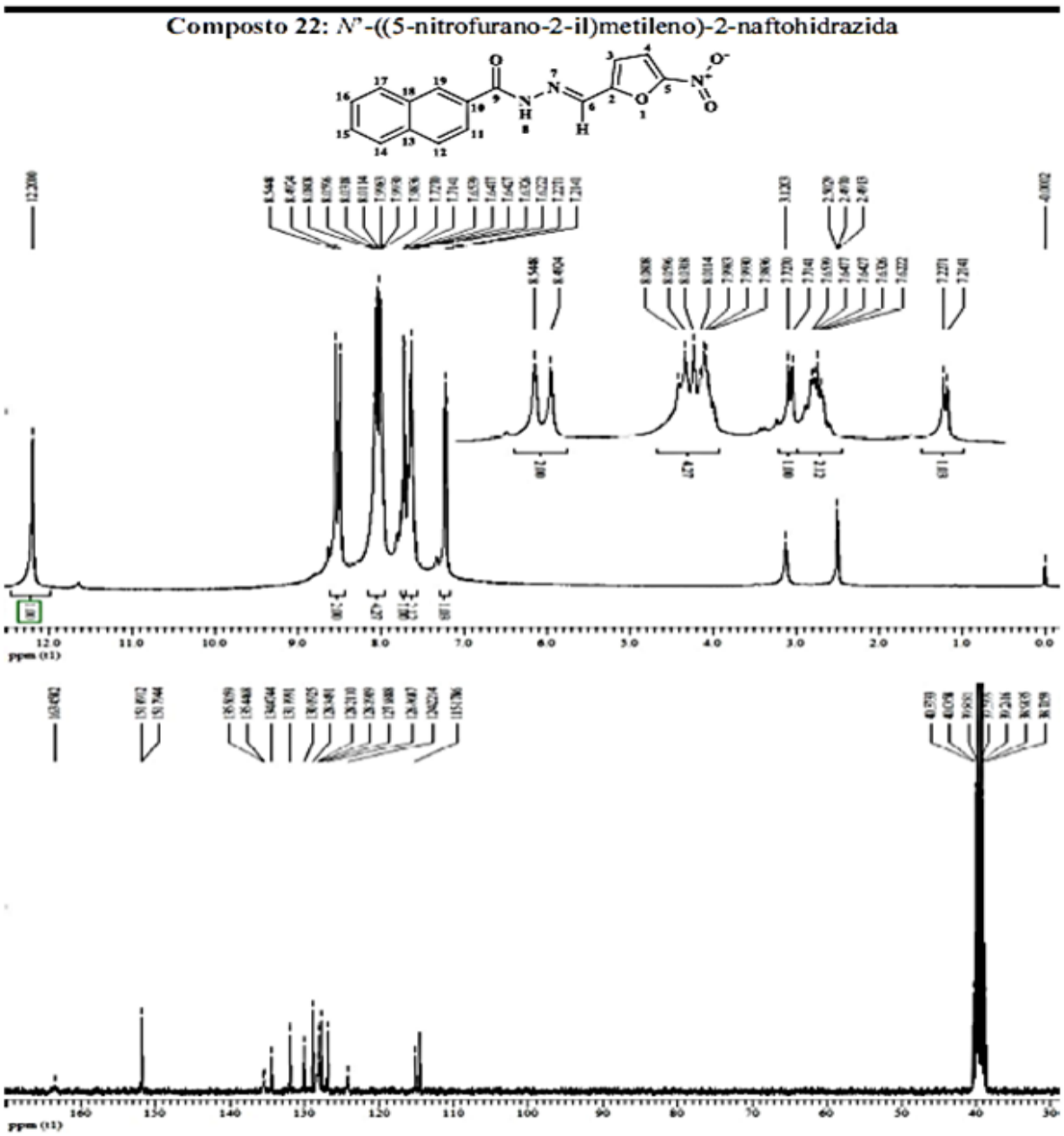


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

4.1.2.1 Síntese dos compostos

Após sintetizados (SILVA NETO, 2017), os compostos foram submetidos à Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio e carbono para determinar a sua pureza (Figuras 6, 7 e 8).

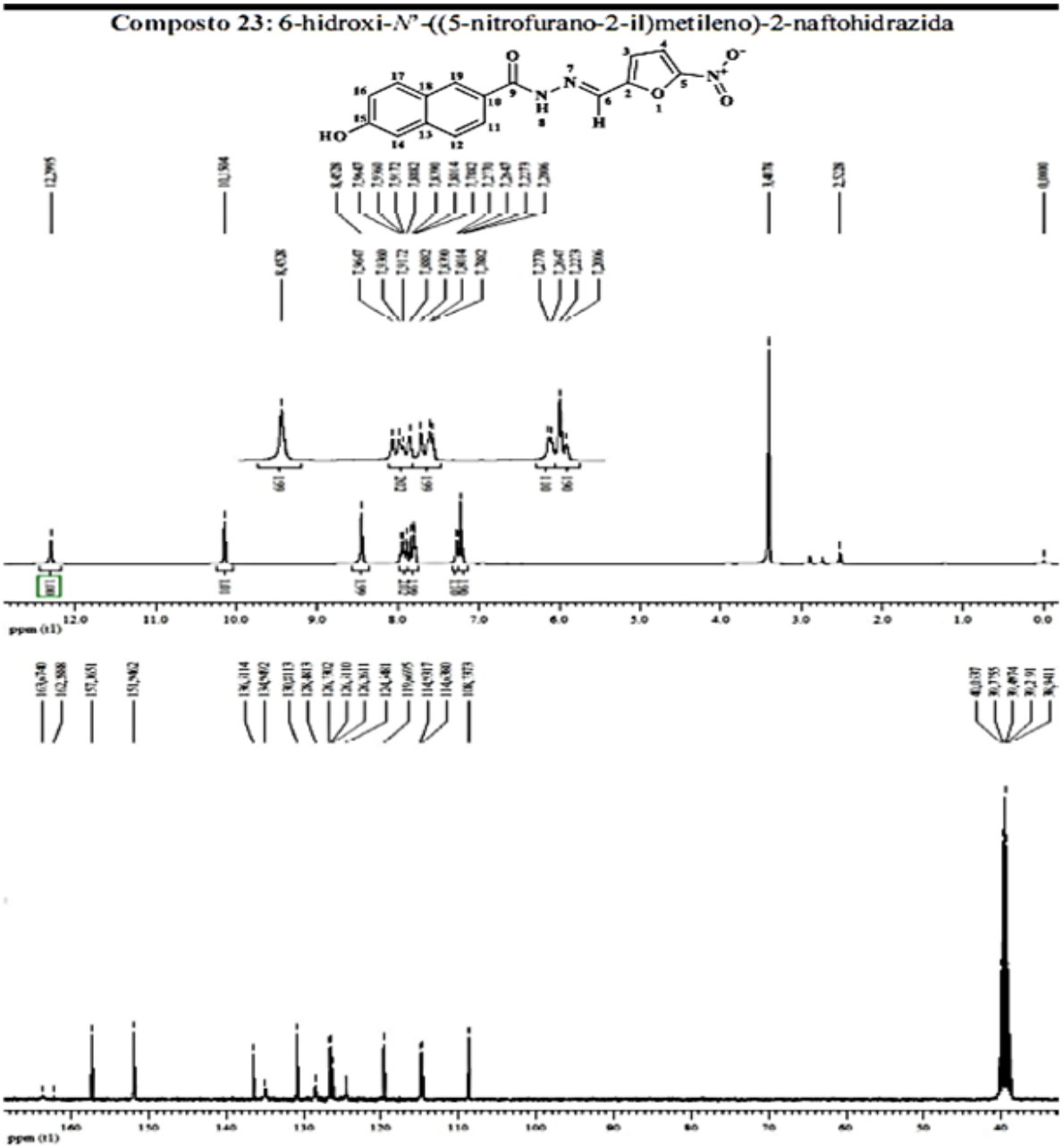
Figura 6 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono o Composto 22



Sólido amarelo (93%); ff 249 – 250 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz): δ(ppm): 12.20 (s, 1H, H8), 8.54/8.49 (d, 2H, H6, H19), 8.08/7.98 (m, 4H, H11, H12, H14, H17), 7.72/7.21 (d, 1H, H3); ^{13}C NMR {H} (DMSO-d_6, 75 MHz): δ (ppm): 1.63.48 (C9), 151.89 (C2), 151.79 (C5), 135.50 (C18), 135.33 (C6), 134.47 (C10), 131.99 (C13), 130.09 (C17), 128.94 (C19), 128.21 (C15), 128.09 (C14) 127.68 (C16), 126.96 (C11), 115.17 (C4/C3); Anal. Elem. Calc.: ($C_{16}H_{11}N_3O_4$): C, 62.14%; H, 3.58%; N, 13.59%. Exp.: C, 62.47%; H, 3.70%; N, 13.49%.

Fonte: SILVA NETO, 2017.

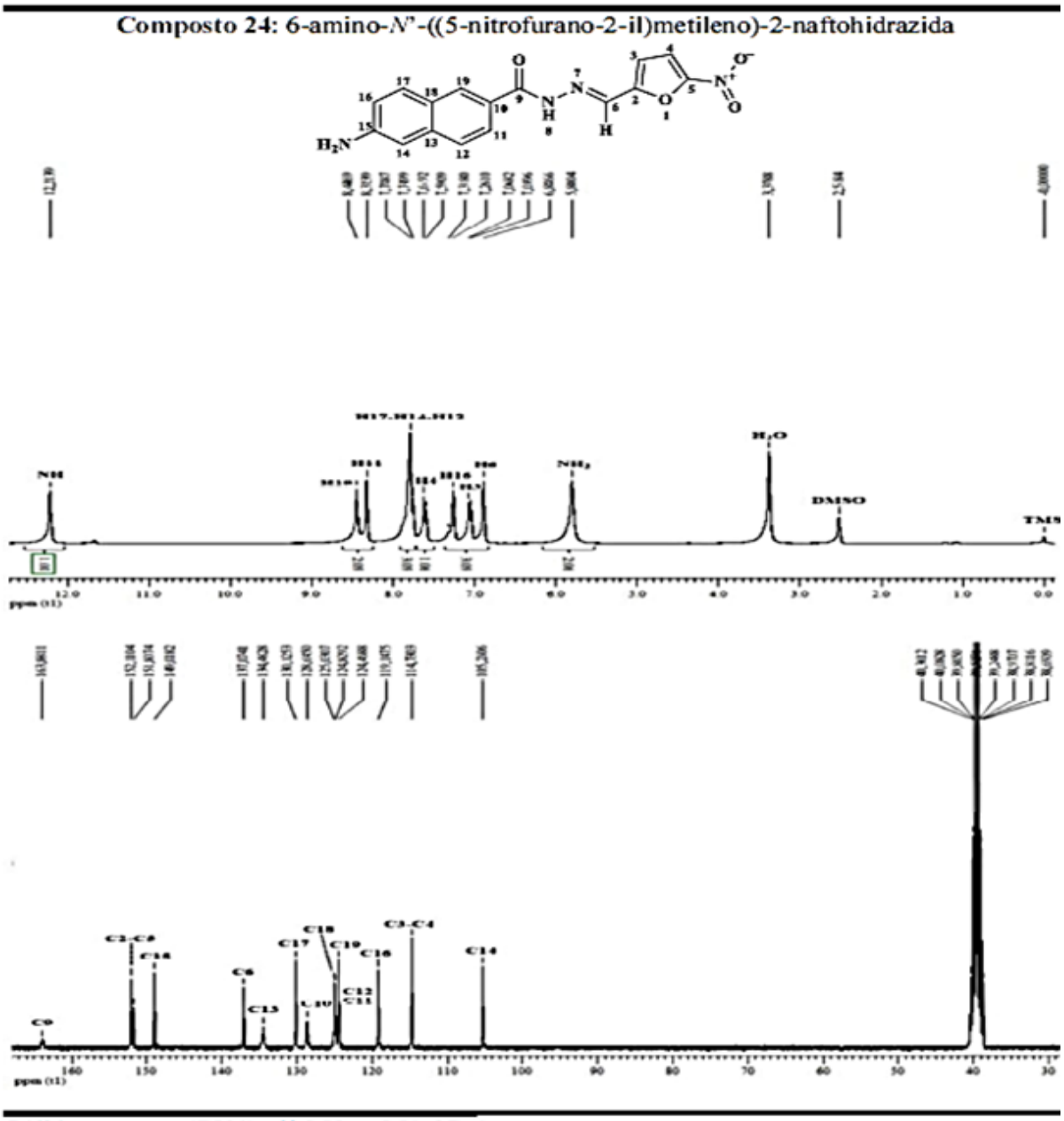
Figura 7 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono do Composto 23.



Sólido amarelo (84%); ff 268 – 269 °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz): δ(ppm): 12.29 (s, 1H, H8), 10.15 (s, 1H, H6), 7.27 (s, 1H, OH), 8.45/7.20 (m, 8H, H3/H4, H11/H12/H14, H16/H17/H19); ^{13}C NMR {H} (DMSO-d_6, 75 MHz): δ (ppm): 163.67 (C9), 162.28 (C15), 157.36 (C2), 151.94 (C5), 114.93 (C4), 114.63 (C3), 136.51/119.66 (C11, C12, C13, C116, C17, C18, C19); Anal. Elem. Calc.: ($C_{16}H_{11}N_3O_5$): C, 59.08%; H, 3.41%; N, 24.59%. Exp.: C, 52.91%; H, 4.41%; N, 11.56%.

Fonte: SILVA NETO, 2017.

Figura 8 – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono do Composto 24.



Sólido marrom (75%); ff 250 – 251 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz): δ(ppm): 12.21 (s, 1H, H8), 8.44/8.32 (d, 2H, H11, H19), 7.78/7.74 (d, 3H, H12, H14, H17), 7.61/7.59 (d, 1H, H4), 7.31, (s, 1H, H16), 7.06/7.03 (d, 1H, H3), 6.88 (s, 1H, H6), 5.80 (s, 2H, NH_2); ^{13}C NMR {H} (DMSO-d_6, 75 MHz): δ (ppm): 163.88 (C9), 152.11/152.08 (C2, C5), 149.01 (C15), 137,07 (C6), 134.48 (C13), 130.12 (C17), 128,64 (C10), 125.03/124.66 (C11, C12, C18, C19), 119.14 (C16), 114.73 (C4, C3), 105.26 (C14); Anal. Elem. Calc.: ($C_{16}H_{12}N_4O_4$): C, 59.26%; H, 3.37%; N, 17.28%. Exp.: C, 52.56%; H, 4.11%; N, 16.40%.

Fonte: SILVA NETO, 2017.

4.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético Fisatom™, modelo 752;
- Agitador termostatizado Tecnal™, modelo TE-424;
- Balança analítica Shimadzu™, AX 200;
- Banho ultrassônico Unique™, modelo USC-2800ª;
- Bujão de crioconservação Volta™, modelo XC 20;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu™ composto por bomba LC-10ADVP, degaseificador DGU-14A, injetor automático de amostras SIL-10ADVP, detector ADA SPD-M10AVVP, forno de coluna CTO10AVP; com data de Qualificação Operacional e de Performance inferior a um ano;
- Fluxo laminar Telstar™, modelo AV-100;
- Incubadora de CO_2 Thermo™, modelo Forma Series II;
- Leitora de placas – Spectra™ Fluor plate reader, Tecan™;
- Micropipetas de volume variável HT Labmate™;
- Microscópio Bioval™, modelo L2000A;
- Microscópio invertido Olympus™, modelo CKX41;
- Mini Voltímetro Millicell ERS™ Millipore;
- PHmetro Metrohm™, modelo 827;
- Pipetadores automáticos HT Swiftpet™;
- Sistema de filtração a vácuo Quimis™.

4.1.4 Células, reagentes, solventes e materiais empregados nos experimentos

- Acetonitrila grau cromatográfico Merck™;
- Ácido ortofosfórico PA Merck™;
- Água ultra-pura obtida em equipamentos Millipore, modelo Milli-Q™ Academic;
- Balão volumétrico âmbar Pirex™, de 5, 10, 50, 100, 1000 e 2000 mL;
- Células Caco-2 (TC-7), passagem 64 – Instituto Adolfo Lutz;
- Coluna Cromatográfica Hypersil™ phenyl-2, de 150 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, contendo partículas de 5 µm, Thermo Scientific™;
- Filtros esterilizantes – TPP™;
- Dimetilsulfóxido ASC Carlo Erba™;

- Fosfato dibásico de sódio PA Merck™;
- Garrafa de cultivo celular 25 e 75 mm^2 – Corning;
- Glicose – Sigma-Aldrich™;
- Hemocitômetro Neubauer™;
- Hidróxido de sódio PA Merck™;
- Kit MTT para citotoxicidade - Sigma-Aldrich™ (MTT em pó 1 g/frasco, solução de solubilização de MTT – 10% de Triton X-100 plus e 0,1 N HCl em isopropanol anidro);
- Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) em pó – Cultilab™;
- Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)líquido sem fenol-Cultilab™;
- Membranas filtrantes Sartorius™ - acetato de celulose com 47 mm e poro de 0,22 µm;
- Metanol grau cromatográfico Merck™;
- Pipetas sorológicas estéreis e descartáveis de volumes variados – TPP™;
- Placas de 96 poços com fundo chato – TPP™;
- Placas Transwell™ de 6 ou 12 poços com *inserts* de policarbonato com 4 µm de poro, Corning™;
- Ponteiras descartáveis Brand™;
- Provetas Pirex™ de 100, 500 e 1000 mL;
- Sais de ácido N-2,hidroxietilpiperazina-N-etanosulfonico (HEPES) – Sigma-Aldrich™;
- 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 tampão Hank's – Cultilab™;
- Solução de Tripsina 0,25% e EDTA 1 mM – Cultilab™;
- Soro fetal bovino – Cultilab™;
- 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;
- Vials Shell™ âmbar, volume 1 mL, dimensões 8 x 40 mm.

4.2 INFRAESTRUTURA

Os experimentos descritos no presente trabalho foram realizados no Laboratório CITOS de Permeabilidade Celular do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob a orientação e responsabilidade da Prof.ª Dr.ª Sílvia Storpirtis.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Cultivo das células Caco-2

As células Caco-2 (CCIAL 064) foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz (IAL – São Paulo-SP, Brasil) na passagem 64 e cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose (4,5 g/L); 1% de solução de aminoácidos não essenciais, com 10% de soro fetal bovino; 1% de solução de glutamina 200 mM; 2,2 g/L de bicarbonato de sódio e substâncias antimicrobianas (penicilina 100 UI e estreptomicina 100 µg/mL) (GONÇALVES et al., 2012).

O banco celular foi conservado em cultivo em garrafas de 75 cm², e seu meio foi substituído a cada dois dias, e armazenado em incubadora a 37º C, 5% de CO_2 e 90% de umidade relativa. O subcultivo foi realizado quando a cultura atingiu, no mínimo, 80% de cobertura da garrafa, em cerca de 3 a 4 dias, da seguinte forma: o meio de cultivo foi aspirado e descartado, as células que formam a membrana aderida à parede da garrafa foram isoladas com utilização de 2 mL de solução de tripsina (25%) e EDTA (1mM) e incubadas a 37°C por 5 minutos. As células foram, então, ressuspendidas em meio DMEM e divididas na proporção 1:4 em novas garrafas contendo 14 mL do meio DMEM.

4.3.2 Crioconservação do banco celular

Assim que adquiridas, as células foram repicadas para garrafas de 75 cm^2 e mantidas nas mesmas condições de cultivo até que todas atingissem, no máximo, 90% de cobertura da área da garrafa. Utilizou-se um número de garrafas proporcional à quantidade que se pretendia obter de criotubos que iriam ser crioconservados.

Atingindo a confluência esperada, as células foram suspendidas, contadas e posteriormente ressuspensas em soro fetal bovino. Assim, foram adicionadas nos criotubos de 1 mL na densidade máxima de 1 x 10^6 células/criotubo, onde, 500 µL foram da suspensão e os outros 500 µL foram da solução de congelamento (80% de soro fetal bovino e 20% de DMSO). Em seguida, os criotubos foram armazenados em freezer a -80ºC por 24 horas e, após esse período, podiam ser crioconservados (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2018).

4.3.3 Padronização do ensaio de citotoxicidade *in vitro* em células Caco-2 frente aos nitrocompostos para determinação da viabilidade celular

Os compostos em estudo foram dissolvidos em DMSO - solvente frequentemente utilizado quando compostos com baixa hidrossolubilidade são avaliados em ensaios de permeabilidade - na concentração de 10 mM. Em condições experimentais, esse co-solvente foi utilizado na concentração máxima de 0,05%. Sendo assim, o controle negativo elimina qualquer dúvida sobre sua interferência nos resultados de toxicidade dos análogos em estudo, não inviabilizando o emprego do mesmo nos ensaios seguintes (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

As células Caco-2 foram semeadas em meio DMEM em microplacas de 96 poços na densidade de 1 x 10^4 células por poço (5 x 10^4 células/mL em 200 µL de meio). Após 24 horas de incubação a 37°C com 5% de CO_2 e 90% de umidade relativa, os compostos foram diluídos em meio DMEM e adicionados em concentrações de 0,0032 µM a 50 µM, cada concentração em triplicata, e incubadas por 6 horas. Foi utilizado DMSO 50% como controle positivo e DMSO 0,05% como controle negativo.

Após 6 horas de incubação, o sobrenadante foi trocado por meio de cultura com MTT (0,5 mg/mL). Três horas depois, o sobrenadante foi extraído, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO, e a absorbância foi medida a 570 nm (MOSMANN, 1983). Esse ensaio foi repetido em triplicata em diferentes dias e passagens de células.

Há uma série de métodos padronizados para avaliar a toxicidade de moléculas frente às células de mamíferos como as de Caco-2. O teste utilizado no presente estudo foi o ensaio MTT, teste usado para aferir rápida e objetivamente a viabilidade celular, a partir de uma reação colorimétrica.

Em células viáveis, a mitocôndria, com a ação da enzima succinato desidrogenase, converte o sal MTT em formazan, produto que possui coloração azul escuro e que é quantificado por medição colorimétrica. Como as células danificadas ou mortas possuem níveis reduzidos ou nulos de atividade da desidrogenase, este ensaio colorimétrico da atividade mitocondrial pode ser usado para definir a viabilidade celular espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983).

4.3.4 Desenvolvimento dos métodos bioanalíticos para a quantificação dos compostos nos experimentos de permeabilidade *in vitro*

Os estudos de permeabilidade requerem um prévio desenvolvimento e validação de método bioanalítico, que apresente uma sensibilidade adequada para ser eficientemente utilizado com segurança e confiabilidade, possibilitando a interpretação apurada dos dados provenientes desses experimentos.

A cromatografia líquida está entre as técnicas analíticas mais empregadas na quantificação de fármacos em estudos da permeabilidade. A composição dos meios de cultura e as soluções utilizadas a fim de mimetizar as condições fisiológicas e garantir uma correlação com os resultados esperados *in vivo* conferem ao experimento características próximas de um experimento *in vivo.* Sendo assim, os métodos podem ser chamados de bioanalíticos, seguindo-se os critérios estabelecidos para os mesmos (GONÇALVES; SOUZA; STORPIRTIS, 2009).

Na busca por um método cromatográfico eficiente que tivesse aplicação para todos os compostos em estudo, visando à redução de tempo e otimização das análises, utilizou-se da Qualidade por Design Analítica (QAbD) por meio do software Minitab™ v.15.0. Foi empregada a CLAE acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE - PDA) e a coluna Hypersil phenyl-2, de 150 mm de comprimento e 4,60 mm de diâmetro interno, com partículas de 5 µm. O comprimento de onda empregado para cada composto foi estabelecido com base no ponto com maior absorção do espectro obtido entre 190 nm e 400 nm dos mesmos.

4.3.4.1 Preparo das soluções-padrão

As soluções padrão utilizadas na validação e no experimento de permeabilidade foram elaboradas a partir da solução estoque na concentração de 0,1 mg/mL preparadas diariamente. Para todos os compostos, essa concentração foi obtida a partir da pesagem de 1 mg dos compostos solubilizados em balões âmbar de 10 mL calibrados. Para o metoprolol e a hidroclorotiazida, o diluente empregado foi água ultrapurificada e para a nifuroxazida e os demais 5-nitroheterocíclicos utilizou-se DMSO. A partir de diluições sucessivas das soluções estoque em tampão Hank's foram obtidas as soluções padrão de concentrações empregadas nos experimentos.

4.3.5 Validação dos Métodos Bioanalíticos para a Quantificação dos Compostos em Estudo

No desenvolvimento do método para os estudos de permeabilidade é importante que este seja validado segundo parâmetros de desempenho bioanalítico estabelecidos na legislação para quantificação de fármacos em matrizes biológicas. Dessa forma, procedeu-se de acordo com a definição dos parâmetros de limite de detecção, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade, conforme a Resolução RDC 27 (BRASIL, 2012; NETO et al., 2013).

4.3.5.1 Seletividade

Capacidade do método desenvolvido de diferenciar/separar e quantificar os analitos em meio aos componentes da matriz (BRASIL, 2012).

Avaliaram-se possíveis interferências da matriz empregada nos ensaios de permeabilidade (tampão Hank's pH 7,4) e o co-solvente DMSO empregado na solubilização dos nitrocompostos. Foi comparada a resposta obtida em soluções individuais dos compostos e uma única solução contendo todos na concentração do limite de quantificação, ambas solubilizadas com o tampão Hank's.

4.3.5.2 Linearidade

A determinação da linearidade é importante para avaliar se os resultados obtidos pelo método são diretamente proporcionais à concentração do analito (BRASIL, 2012).

Foi elaborada a curva analítica em triplicata do metoprolol (MTL), da hidroclorotiazida (HCTZ) e dos compostos em estudo utilizando as concentrações descritas na Tabela 1. Em virtude do comprimento de onda com maior absorção para metoprolol ainda apresentar um sinal inferior ao dos demais compostos, optou-se por adotar concentrações mais elevadas para esse, considerando o não impacto para os experimentos de permeabilidade.

Tabela 1 – Concentrações (ng/mL) das soluções-padrão de metoprolol, hidroclorotiazida e dos 5-nitroheterocíclicos em tampão para a curva analítica, linearidade e os respectivos Controles de Qualidade de Alta, Média e Baixa concentração e Limite Inferior de Quantificação.

COMPOSTO	**1 (CQD)**	**2**	**3 (CQA)**	**4 (CQM)**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9 (CQB)**	**10 (LIQ)**
METOPROLOL	5250	5000	2500	2000	1500	1000	800	600	400	200
HIDROCLOROTIAZIDA E TODOS OS 5-NITRO-HETEROCÍCLICOS	1050	1000	800	500	400	300	200	100	50	25

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

4.3.5.3 Precisão

Concordância entre os resultados encontrados a partir de múltiplas aferições durante a aplicação do método. A precisão intracorrida refere-se à proximidade dos resultados obtidos em um mesmo dia, com um mesmo analista, mesmos reagentes e condições. Já a precisão intercorrida pode ser obtida com variações de condições, reagentes e em intervalos de tempo correspondentes a diferentes corridas em diferentes dias (BRASIL, 2012).

Adotou-se para o parâmetro de precisão (intra e inter), as concentrações de Controle de Qualidade de Diluição (CQD), Controle de Qualidade de Alta Concentração (CQA), Controle de Qualidade de Média Concentração (CQM), Controle de Qualidade de Baixa Concentração (CQB) e Limite Inferior de Quantificação (LIQ) descritas na Tabela 1, determinadas em sextupicatas.

O Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV) deve ser utilizado para expressar a precisão do método desenvolvido, não sendo admitidos valores superiores a 15%, exceto para o Limite Inferior de Quantificação (LIQ), no qual aceitam-se valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2012). A Equação 1 é utilizada para a obtenção do CV ou DPR.

$$CV(\%) = \frac{DP}{Cmédia} \times 100 \qquad (1)$$

Em que:

CV (%) = coeficiente de variação

DP = desvio padrão

$C_{média}$ = concentração média experimental

4.3.5.4 Exatidão

Concordância entre o resultado obtido e um valor de referência. Assim como na precisão, a exatidão intracorrida refere-se à proximidade dos resultados obtidos em um mesmo dia, com um mesmo analista, mesmos reagentes e condições. Já a exatidão intercorrida pode ser obtida com variações de condições, reagentes e em intervalos de tempo correspondentes a diferentes corridas em diferentes dias (BRASIL, 2012).

Adotou-se também para o parâmetro de exatidão (intra e inter) as concentrações de CQD, CQA, CQM, CQB e LIQ descritas na Tabela 2, determinadas em sextuplicatas.

A relação entre a concentração média obtida pelo experimento e a concentração teórica expressa o parâmetro da exatidão. Não se admitem valores fora da faixa de ± 15% do valor nominal para as concentrações de controle de qualidade e ± 20% do valor nominal para LIQ. A Equação 2 é utilizada para a obtenção do CV ou DPR (BRASIL, 2012).

$$Exatidão = \frac{Cmédia}{Cteórica} \times 100 \qquad (2)$$

Em que:

$C_{média}$ = concentração média experimental

$C_{teórica}$ = concentração teórica/nominal

4.3.5.5 Limite Inferior de Quantificação

Menor concentração capaz de apresentar exatidão e precisão aceitáveis dentro da faixa de trabalho estabelecida. A razão entre o sinal do pico de interesse deveria ser dez vezes maior do que o ruído da linha de base do tempo de retenção do mesmo. Para tal, foram feitas sucessivas injeções até que se alcançasse o parâmetro com exatidão e precisão especificadas nos respectivos itens para LIQ (BRASIL, 2012).

4.3.5.6 Estabilidade

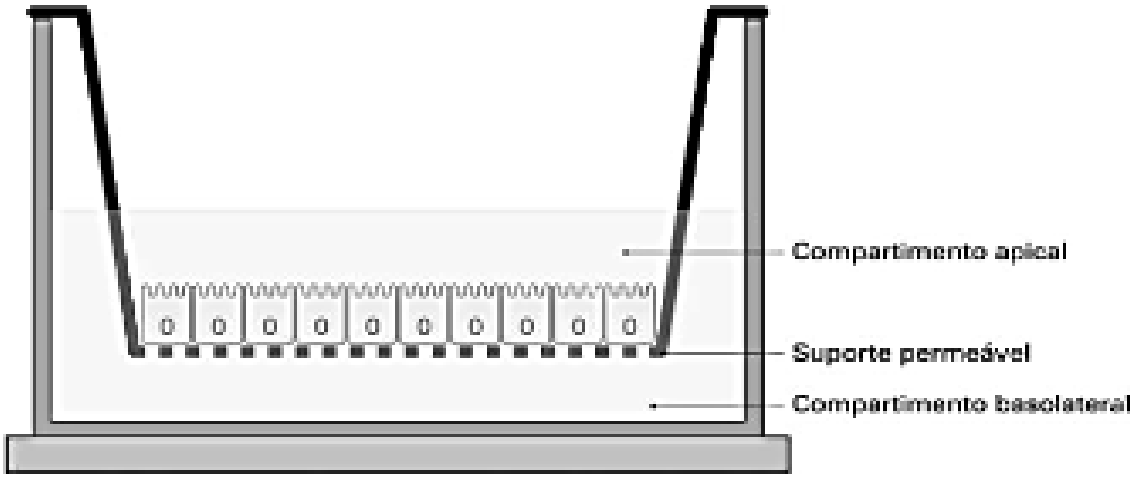
Visa definir se a concentração do analito permanece dentro dos limites determinados, dentro da matriz utilizada e sob as condições analisadas (BRASIL, 2012). Neste parâmetro, objetivou-se adotar condições que mimetizassem as utilizadas durante o experimento de permeabilidade (6 horas em temperatura ambiente, 2 horas em temperatura de 37ºC e ciclos de congelamento a -20ºC por 24h e descongelamento), nas concentrações de CQB e CQA descritas na Tabela 2 para todos os compostos. Para que as amostras sejam consideradas estáveis, após exposição ao estresse, devem apresentar um desvio inferior a 15% em comparação à resposta das soluções recém preparadas (BRASIL, 2012).

4.3.6 Estudo de permeabilidade através das membranas de células Caco-2

Para a avaliação *in vitro* da permeabilidade, as células foram transferidas para placas Transwell™ (Figura 10), onde havia doze poços com suporte de policarbonato de área 1,12 cm^2 e 0,4µm de poro, por meio de uma suspensão de células com densidade de $5x10^4$ cel/cm^2. As placas eram mantidas em incubadora a 37°C, em atmosfera constituída de 5% de CO_2, 90% de umidade relativa e em meio de cultura com pH 7,4 por 21 dias, podendo estar aptas para o experimento após esse período (GONÇALVES et al., 2012).

Antes do experimento, as células foram lavadas com solução tampão Hank's contendo 200 mM de sais HEPES (tampão de permeabilidade) com pH ajustado para 7,4 e foram deixadas no mesmo por 20 minutos a 37ºC. Foram mantidos os volumes de tampão no compartimento apical (AP) de 500 µL e no basolateral (BL) de 1500 µL.

Figura 9 - Esquema do suporte de cultivo de células Caco-2 empregado nos estudos de permeabilidade.



Fonte: Gonçalves; Souza; Storpirtis, (2009).

Todos os estudos de transporte dos candidatos a fármacos estudados foram efetivados à temperatura de 37°C com as placas mantidas em agitador orbital a 25 rpm. As soluções com os compostos foram preparadas utilizando tampão Hank's pH 7,4. Na Tabela 2 estão descritas as concentrações iniciais e os tempos de amostragem (200 µL) a partir do compartimento basolateral. Após cada amostragem, foi realizada a reposição do volume de 200 µL de tampão, mantido a 37ºC, para a manutenção do volume do compartimento.

Tabela 2 – Concentrações iniciais (ng/mL) e tempos de coleta no experimento de permeabilidade empregando células Caco-2.

Analito	Concentração Inicial (ng/mL)	Tempos de Coleta (minutos)
METOPROLOL	5000	15,30,60,90 e 120
HIDROCLOROTIAZIDA	1000	15,30,60,90 e 120
NIFUROXAZIDA	1000	15,30,60,90 e 120
COMPOSTO 22	1000	15,30,60,90 e 120
COMPOSTO 23	1000	15,30,60,90 e 120
COMPOSTO 24	1000	15,30,60,90 e 120

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Os valores de permeabilidade aparente (*Papp*) foram calculados de acordo com a velocidade (cm/s) de transporte dos fármacos, medida pelo fluxo dos mesmos através das células, conforme a Equação 3:

$$Papp = \frac{VR}{A \times C_o} \times \frac{dC}{dt} \quad (3)$$

Em que:

Papp= Permeabilidade Aparente

VR= Volume do compartimento receptor (basolateral) em cm^3

A= Área do suporte permeável de cultivo celular

C_0= Concentração inicial adicionada no compartimento doador apical (apical)

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

4.3.7 Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2

A resistência elétrica transepitelial (RET) foi medida individualmente em cada membrana no 10º, 15º e 21º dias de cultivo e ao início (0 minuto) e fim (120 minutos) do experimento. Membranas com RET acima de 350 Ω x cm^2 foram consideradas íntegras e aptas para o experimento. Realizou-se, também, a quantificação de uma substância padrão de baixa permeabilidade (hidroclorotiazida - HCTZ) e outra de alta permeabilidade (metoprolol - MTL), além da própria nifuroxazida (NFZ), considerada o composto líder sobre seus demais análogos em estudo.

Nos estudos de permeabilidade, a viabilidade das membranas das células Caco-2 garante a confiabilidade dos resultados, pois a perda de função ou a morte das células causa altos níveis de permeabilidade, o que poderia levar a resultados não confiáveis (BLANCHFIELD et al., 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

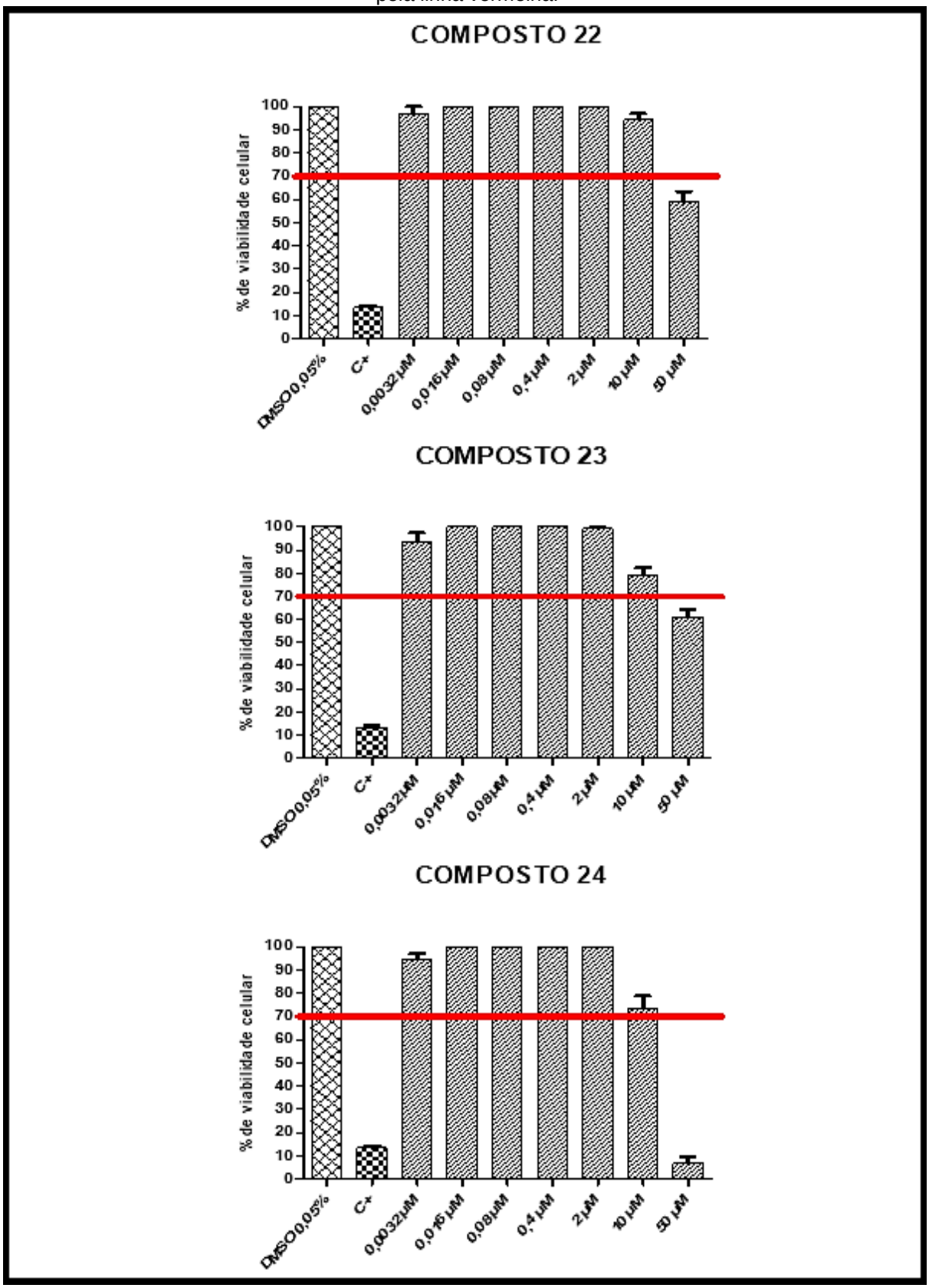
Os valores de IC_{30} (concentração inibitória de 30% da viabilidade celular) ou viabilidade celular de 70%, com intervalos de confiança (IC) de 95% foram calculados por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prisma™ 5, a partir do tratamento das células em baixas e altas concentrações dos compostos (0,00032 a 50μM), o que possibilitou uma extensa faixa para avaliação (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Em concentrações maiores, observou-se corriqueira precipitação no meio de cultura devido à baixa hidrossolubilidade dos nitrocompostos.

Os resultados foram demonstrados em porcentagem em relação à média das absorbâncias das células do grupo de controle negativo (DMSO 0,05%), que apresentou 100% de sobrevivência relativa das células (total viabilidade celular).

Utilizou-se o protocolo estabelecido por Mosmann (1983) para a avaliação da citotoxicidade, que foi determinada medindo-se o dano celular, porém adotando-se os critérios estabelecidos pelo guia ISO 10993-5. De acordo com o guia internacional, para que um composto seja considerado citotóxico, deve provocar uma redução na viabilidade celular de mais de 30%. Assim, adotou-se a viabilidade celular de 70% como o valor máximo permitido (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

Na Figura 10, a citotoxicidade dos compostos em estudo frente às células Caco-2 é apresentada na forma de viabilidade celular comparada ao controle positivo-DMSO 50% (danos às células de 87%) e controle negativo-DMSO 0,05% (viabilidade de 100%), estando de acordo com a ISO 10993-5 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

Figura 10 - Representação dos resultados obtidos nos estudos de citotoxicidade, através da viabilidade das células Caco-2 incubadas por 6 horas com os análogos da nifuroxazida em estudo avaliados pelo ensaio MTT. Os valores de viabilidade celular acima e abaixo de 70% são separados pela linha vermelha.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Até a concentração de 2 µM, a presença dos compostos não causou interferência significativa no crescimento celular, porém, na concentração de 10 µM, os resultados relativos ao composto 24 apresentaram-se abaixo da linha vermelha (70% de viabilidade celular). O mesmo ocorreu com os compostos 22 e 23 na concentração de 50 µM.

A partir dos resultados obtidos por regressão não linear (Tabela 3), optou-se por adotar os valores do limite inferior do Intervalo de Confiança (IC 95%) como concentrações limítrofes capazes de provocar no máximo 30% de dano celular e garantir um mínimo de 70% de viabilidade celular, quando essas estiverem expostas aos respectivos compostos durante o experimento de permeabilidade.

Essa escolha visa adotar valores mais confiáveis em relação à toxicidade dos mesmos, provocando o mínimo de morte celular possível, para que os resultados do referido ensaio não sejam comprometidos. Foram utilizadas algumas técnicas combinadas para esse monitoramento (descritas no item 4.3.4), que são corriqueiramente utilizadas como indicadores da confiabilidade do experimento devido à permeabilidade da membrana de células Caco-2 (HIDALGO *et al*., 1996; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2000).

Tabela 3 - Limites do intervalo de confiança (IC 95%) obtidos por regressão não linear dos compostos 22, 23 e 24 em µM.

Substância	Limite Inferior (µM)	Limite Superior (µM)
Composto 22	→ 30,2 ←	39,8
Composto 23	→ 20,7 ←	33,9
Composto 24	→ 9,6 ←	12,1

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Conforme a Figura 11 e a Tabela 3, o composto 22 demonstrou ser uma substância menos tóxica frente às células Caco-2, visto que, dentre os demais, aquele atingiu a viabilidade mínima de 70% em concentração (9,3 µg/mL= 30,2 µM), mais elevada que o composto 23 (6,7 µg/mL = 20,7 µM) e o composto 24 (3,1 µg/mL = 9,6 µM). O primeiro apresentou, no geral, valores de viabilidade celular maiores que os outros compostos nas concentrações seguintes a 2 µM.

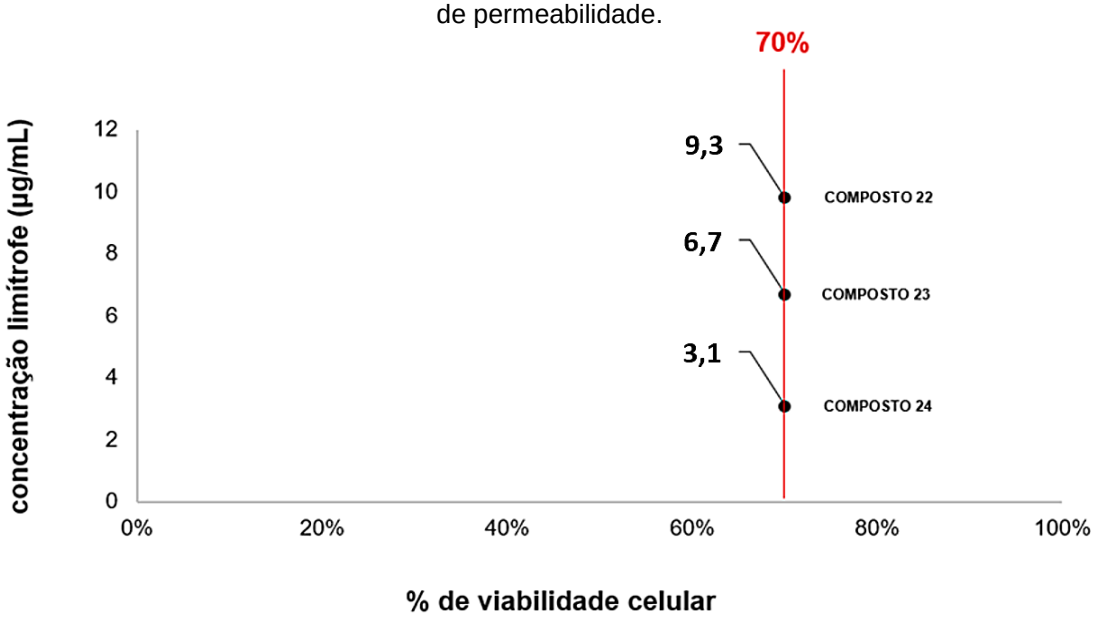
A citotoxicidade de produtos nitroheterocíclicos pode ser explicada a partir da geração de ânions nitroradicais e derivados hidroxilaminas (CHUNG; BOSQUESI; DOS SANTOS, 2011).

Experimentos *in vitro* demonstraram que os ácidos nucléicos do *T. cruzi* interagem com produtos da redução do grupo nitro, sendo os parasitas mais vulneráveis aos radicais livres do que as células de mamíferos que possuem enzimas que previnem o efeito letal desses, sendo menos tóxicos a essas células. Acredita-se assim que o principal alvo dos radicais livres seja o DNA (DECLERCK; DE RANTER, 1986; LA-SCALEA, 1998).

Apesar do nifurtimox obter valor de ED50 (Dose Efetiva para promover metade da resposta referente à eficácia do fármaco) à concentração de 3 mM contra o *T. cruzi;* e a nifuroxazida ter obtido valores inferiores a 1 mM para o mesmo parâmetro, a mesma não demonstrou toxicidade para a célula hospedeira em concentrações inferiores a 10 mM (BLUMENSTIEL et al., 1999). A uma concentração de 5 mM, a nifurprazina não apresentou citotoxicidade frente às células de mamíferos (macrófagos).

Dessa forma, os valores do Figura 11 foram levados em conta para o desenvolvimento e validação dos métodos bioanalíticos empregados no estudo de permeabilidade.

Figura 11 – Concentrações (µg/mL) consideradas máximas para cada composto objetivando garantir uma viabilidade celular mínima de 70% (no máximo 30% de morte celular) nas condições do ensaio de permeabilidade.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Tendo em vista que o experimento de permeabilidade dura em média 3 horas, os resultados obtidos trazem grande confiabilidade em relação à toxicidade, visto que

o período de tratamento das células Caco-2 nos ensaios de citotoxicidade foi de 6 horas, buscando um intervalo maior que trouxesse mais segurança na exposição das mesmas aos nitrocompostos.

Apesar das frequentes discussões sobre a toxicidade dos nitrocompostos, é sabido que esse mecanismo está relacionado a produtos da biorredução *in vitro* e *in vivo* do grupo nitro ligado a anéis aromáticos, que pode ocorrer tanto na presença como na ausência de oxigênio (rotas aeróbica e anaeróbica) (TOCHER, 1997).

Um estudo anterior com nitrocompostos mostrou que valores de viabilidade celular superiores a 70% para a nifuroxazida ocorreram até uma concentração de 6 µg/mL (0,022 mM), entretanto, a nifurantoína apresentou 83% de viabilidade celular a 10 µg/mL. Ambos os fármacos foram incubados por 4 horas (FERNANDES et al., 2012a).

Entende-se, assim, que diversas variáveis podem ser responsáveis pela toxicidade dos nitrocompostos, como o tempo de tratamento das células com os compostos em estudo, concentração utilizada e a própria estrutura química.

Derivados nitrofurânicos como o nifurtimox e a nifuroxazida, podem atuar sendo substratos da enzima tripanotiona redutase (62% e 75% respectivamente) no *T. cruzi* que ao metaboliza-los produz espécies reativas de oxigênio causadoras do estresse oxidativo responsável por provocar danos celulares. Assim, essa enzima incorpora parte do sistema celular que evita o estresse oxidativo (IRIBARNE et al., 2007; BLUMENSTIEL et al., 1999).

A possibilidade da nifuroxazida ter uma atividade anti *T. cruzi* superior ao fármaco de referência - atualmente tido como bom agente contra o parasita -, encoraja o avanço das pesquisas com os análogos em estudo levando a crer que estes tenham atividade igual ou superior ao composto de origem.

5.2 DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EM ESTUDO

As Tabelas 4 e 5 descrevem os parâmetros analíticos do método desenvolvido.

Tabela 4 – Condições analíticas e parâmetros de adequabilidade dos métodos desenvolvidos para a quantificação dos padrões de alta e baixa permeabilidade e dos compostos 5-nitroheterocíclicos.

Analito	Tempo de Retenção ± (min.)	λ (nm)	Fluxo (mL/min.)	Temperatura da Coluna (ºC)	Fase Móvel	Fator de Calda	Resolução
METOPROLOL	7,673	225	1,4	30ºC	vide tabela 5	1,6	≥1,5
HIDROCLOROTIAZIDA	1,890	270				0,9	≥1,5
NIFUROXAZIDA	2,443	370				1,0	≥1,5
COMPOSTO 22	6,827	370				1,2	≥1,5
COMPOSTO 23	3,758	370				1,1	≥1,5
COMPOSTO 24	4,374	370				1,1	≥1,5

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Os métodos desenvolvidos contemplam um fluxo constante, no entanto, empregou-se uma composição gradiente (Tabela 5) dos solventes utilizados, objetivando uma corrida cromatográfica capaz de eluir todos os compostos no menor tempo possível. O tampão empregado consiste na solução de fosfato de sódio monobásico à 5 mM em pH 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico.

Tabela 5 – Composição do gradiente empregado nos métodos analíticos desenvolvidos

GRADIENTE		
Tempo (minutos)	**Tampão (TP - %)**	**Acetonitrila (ACN - %)**
0	65	35
2	65	35
12	70	30
14	70	30
16	65	35
20	65	35

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

5.2.1 Preparo das soluções-padrão

As soluções padrão utilizadas na validação e no experimento de permeabilidade partiram da solução estoque na concentração de 0,1 mg/mL preparadas diariamente. Para todos os compostos essa concentração foi obtida a partir da pesagem de 1 mg dos compostos solubilizados em balões âmbar de 10 mL calibrados. Para o metoprolol e a hidroclorotiazida, o diluente empregado foi água ultrapurificada e para a nifuroxazida e os demais 5-nitroheterocíclicos utilizou-se DMSO. Foram realizadas diluições sucessivas.

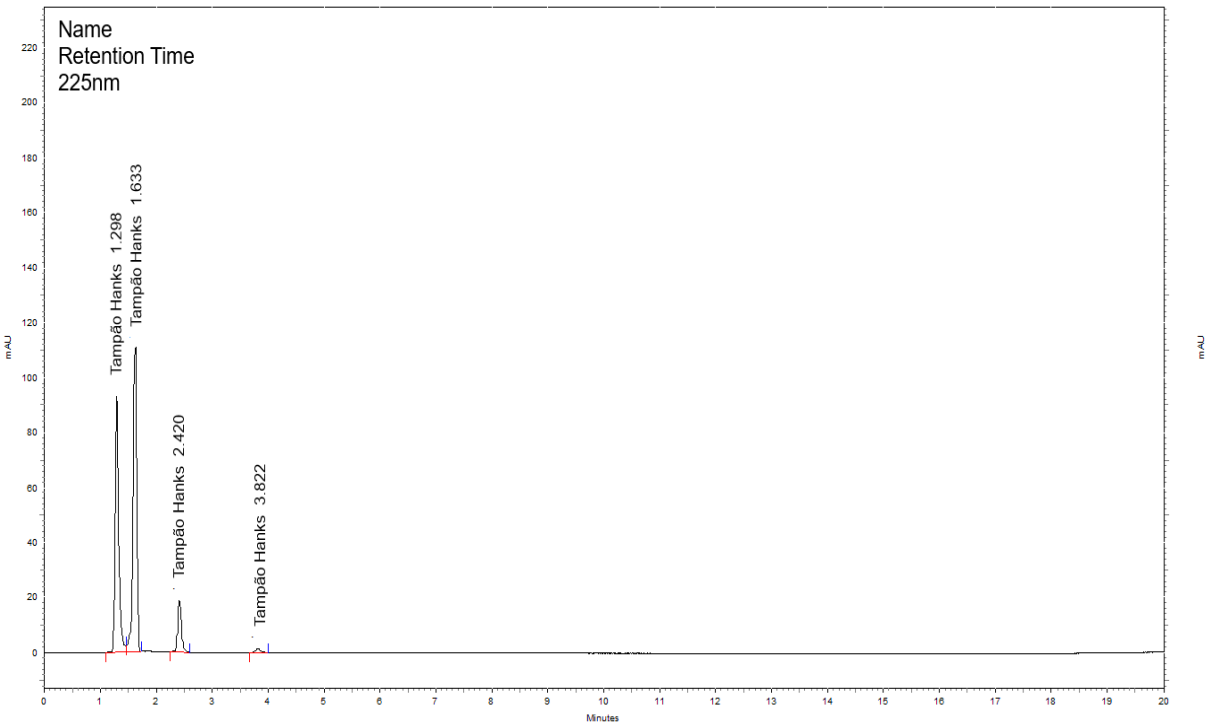
5.3 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS EM ESTUDO

5.3.1 Seletividade

Através dos cromatogramas seguintes apresentados nas Figuras 12 a 16 demonstra-se que a aplicação do método desenvolvido é seletiva para os compostos em estudo solubilizados na matriz (tampão Hank's).

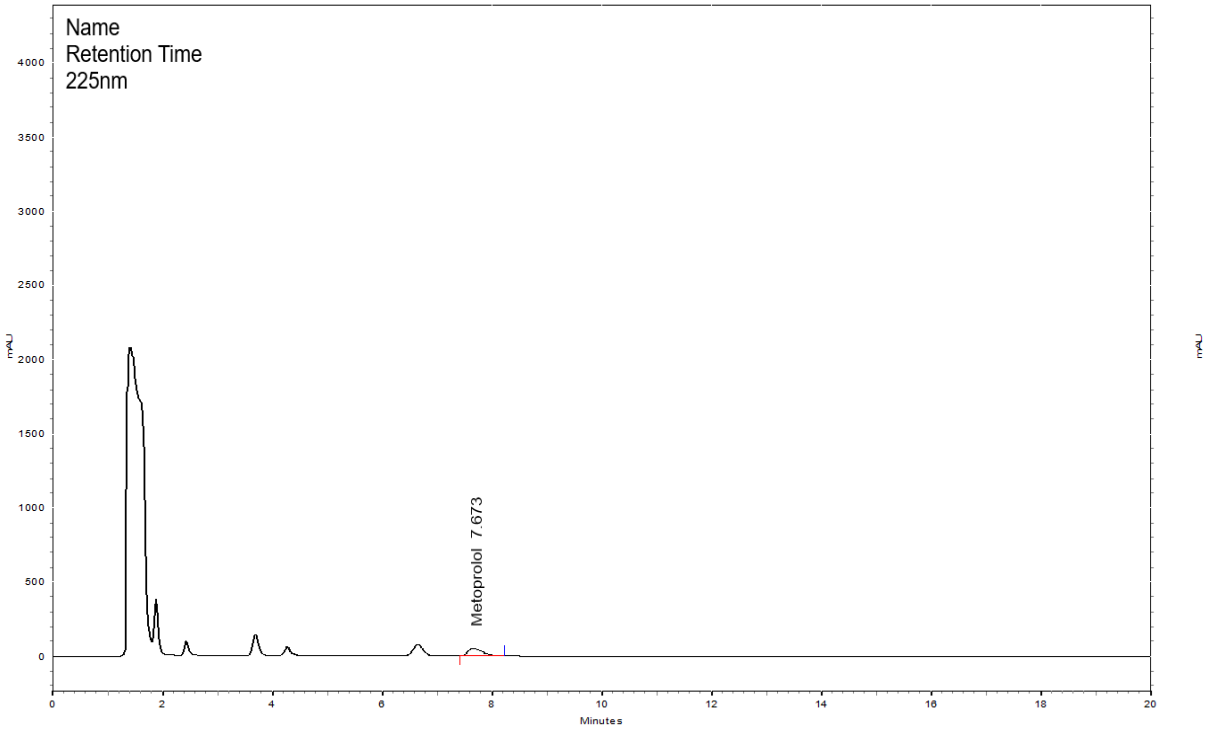
Os métodos desenvolvidos apresentaram adequabilidade em todas as aplicações e corridas cromatográficas para os picos dos analitos. Os parâmetros avaliados e validados foram: fator de calda (*tailing factor*), resolução e pureza de pico, sendo este último determinante para garantir a seletividade dos métodos, admitindo-se valores iguais ou superiores à 99,0%.

Figura 12 – Cromatograma de Injeção de diluente (tampão Hank's) em 225 nm.



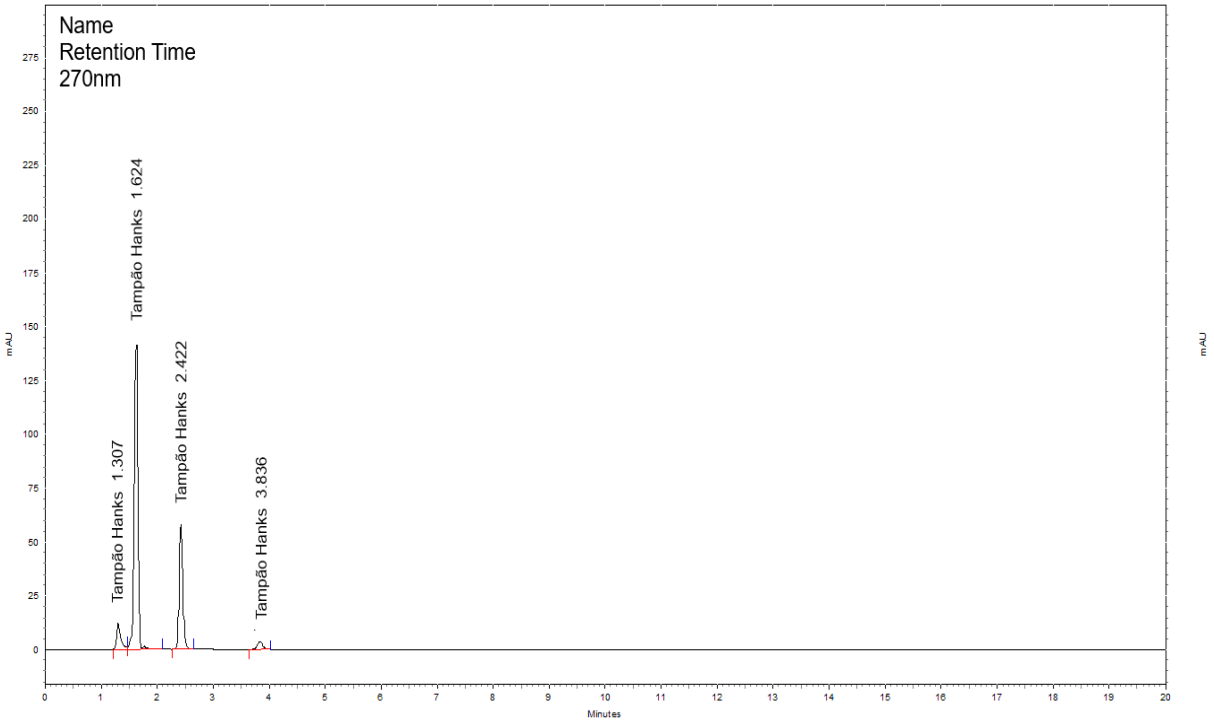
Fonte: Figura elaborada pelo autor

Figura 13 – Cromatograma de Injeção do mix de soluções (MTL, HCTZ, NFZ, C22, C23 e C24) na concentração de 5000 ng/mL para MTL e 1000 ng/mL para os demais compostos em tampão Hank's em 225 nm.



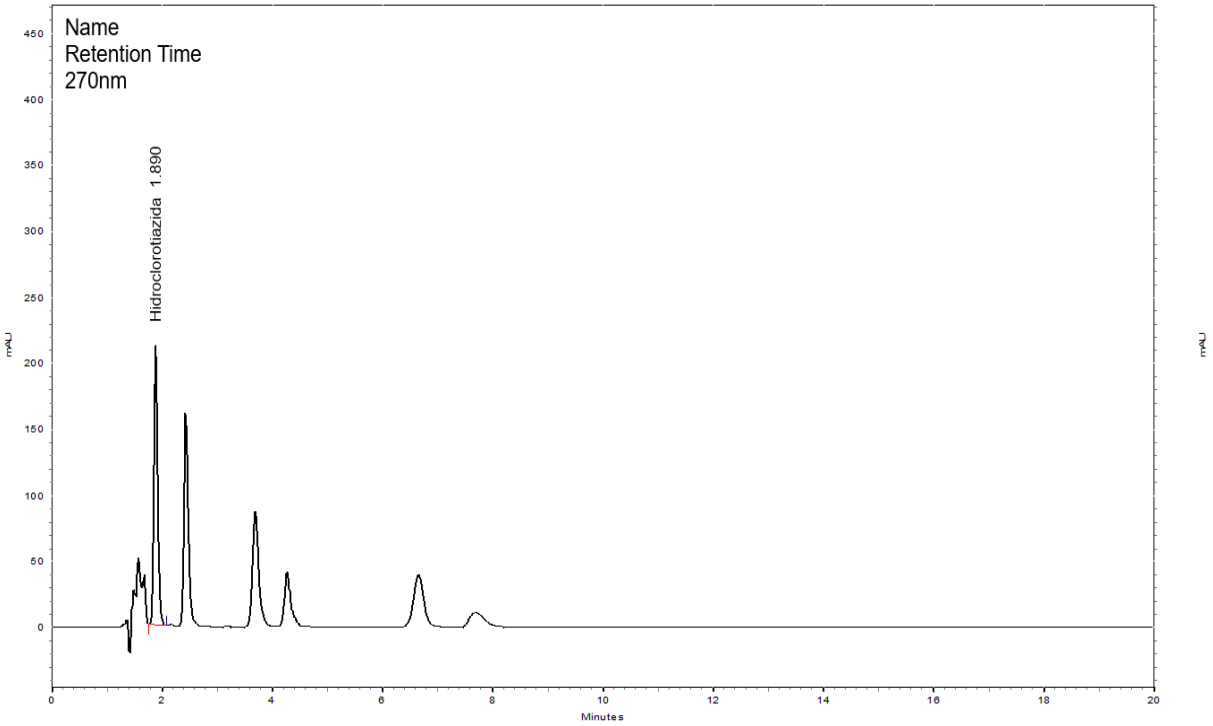
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 14 – Cromatograma de Injeção de diluente (tampão Hank's) em 270 nm.



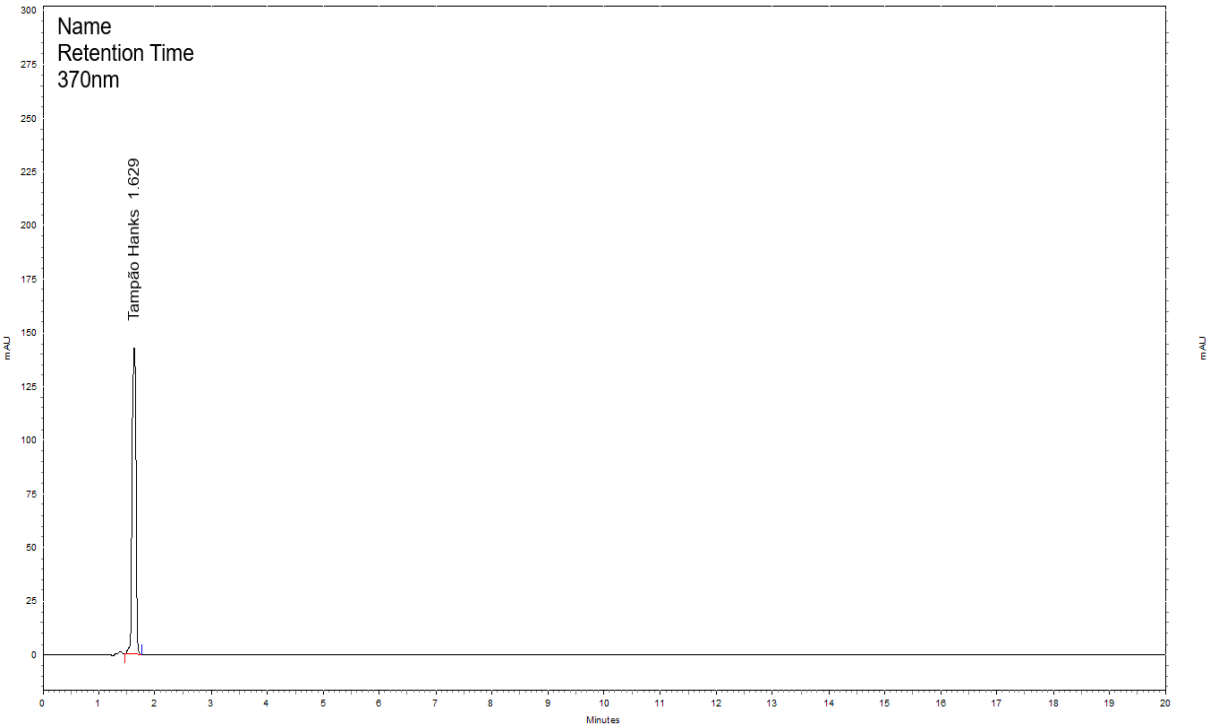
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 15 – Cromatograma de Injeção do mix de soluções (MTL, HCTZ, NFZ, C22, C23 e C24) na concentração de 5000 ng/mL para MTL e 1000 ng/mL para os demais compostos em tampão Hank's em 270 nm.



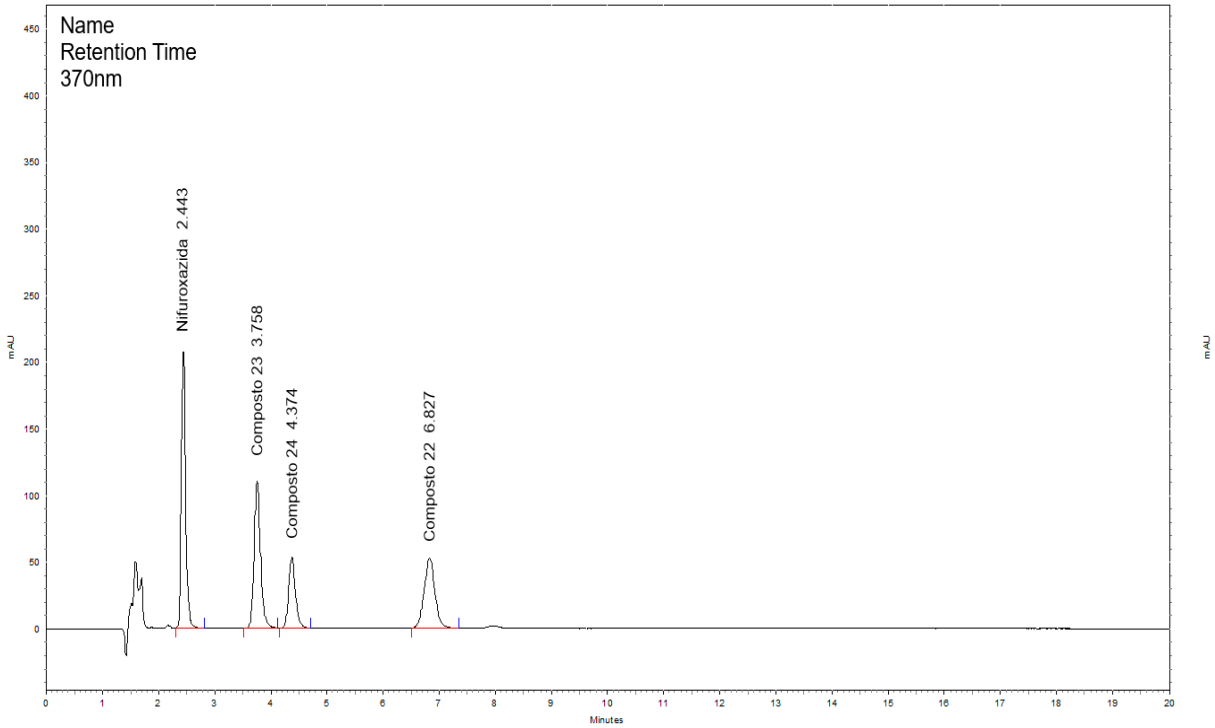
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 16 – Cromatograma de Injeção de diluente (tampão Hank's) em 370 nm.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 17 – Cromatograma de Injeção do mix de soluções (MTL, HCTZ, NFZ, C22, C23 e C24) na concentração de 5000 ng/mL para MTL e 1000 ng/mL para os demais compostos em tampão Hank's em 370 nm.

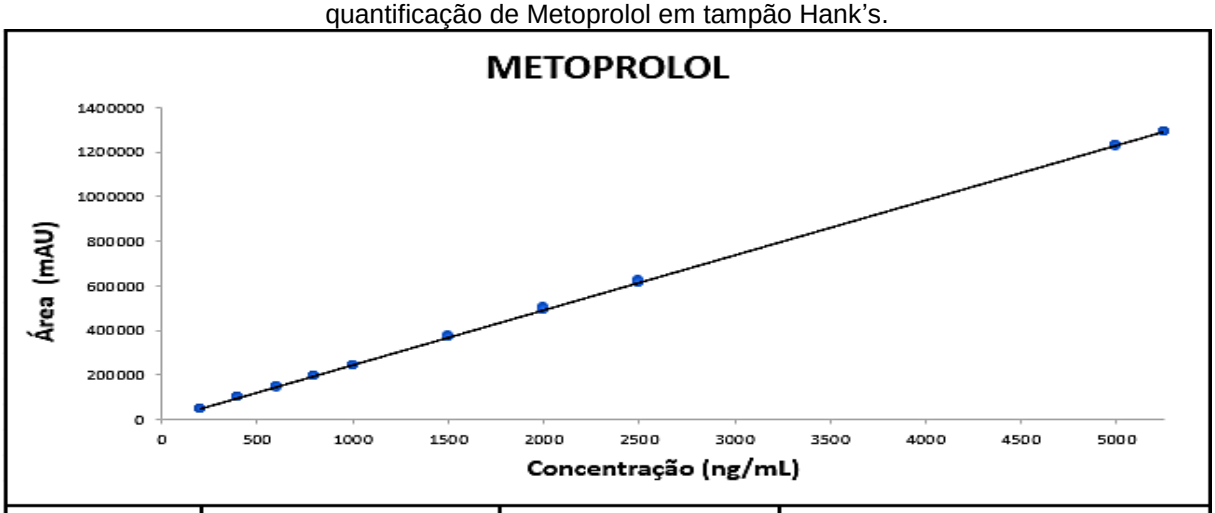


Fonte: Figura elaborada pelo autor

5.3.2 Linearidade

Foi avaliada através das injeções em triplicata de soluções padrão de metoprolol, hidroclorotiazida e todos os 5-nitroheterocíclicos em estudo, nas concentrações descritas na Tabela 2. Seguem as curvas de linearidade e os parâmetros avaliados nas Figuras 18 a 23.

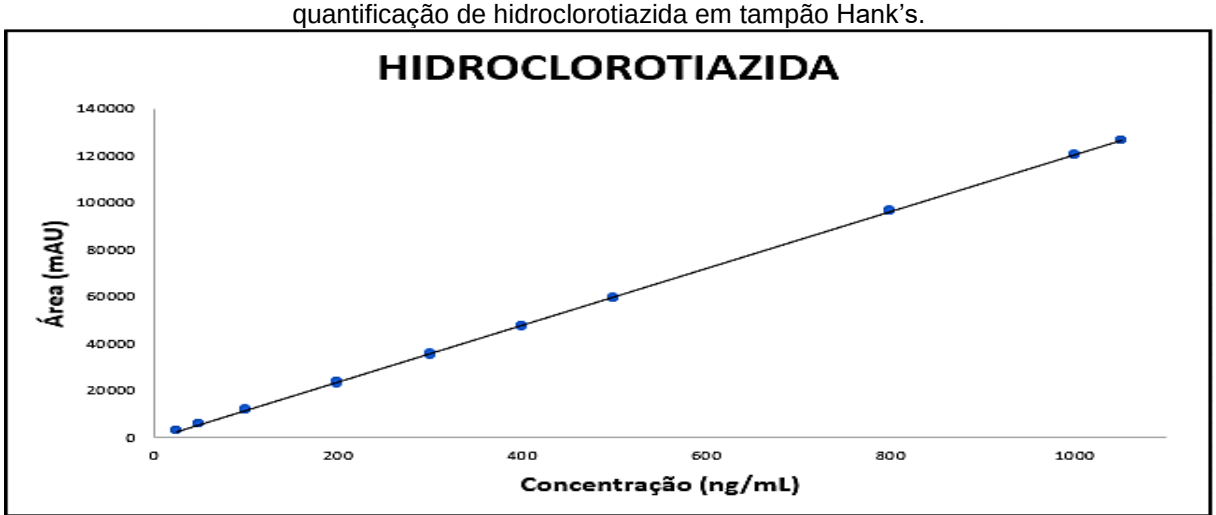
Figura 18 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação de Metoprolol em tampão Hank's.



Parâmetro	Coeficiente Angular (a)	Coeficiente Linear (b)	Coeficiente de Determinação (R^2)
Valor	246,06	-155,93	0,9999

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

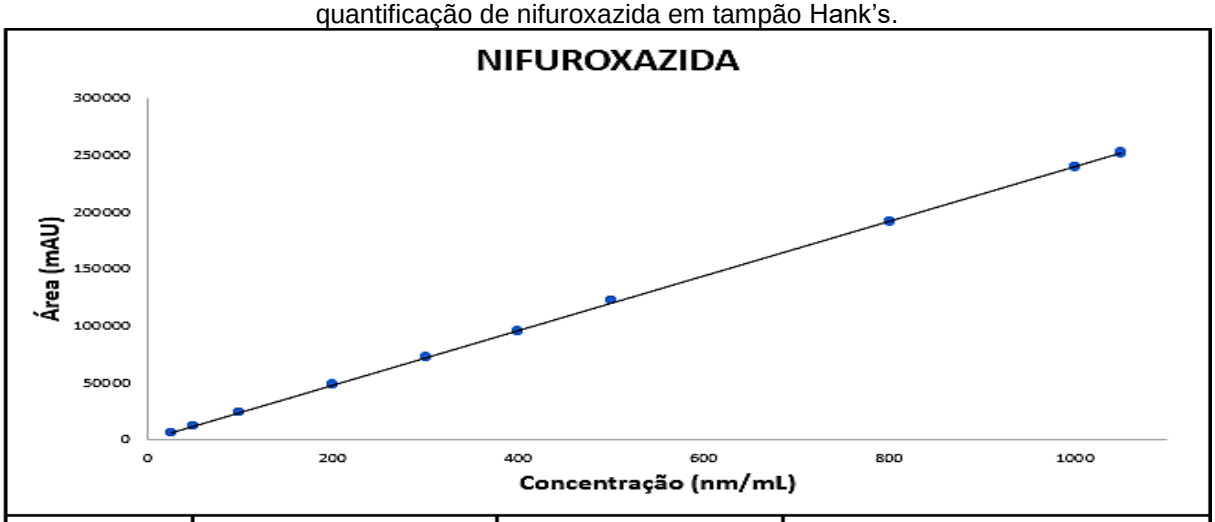
Figura 19 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação de hidroclorotiazida em tampão Hank's.



Parâmetro	Coeficiente Angular (a)	Coeficiente Linear (b)	Coeficiente de Determinação (R^2)
Valor	120,74	-367,84	0,9999

Fonte: Figura elaborado pelo autor.

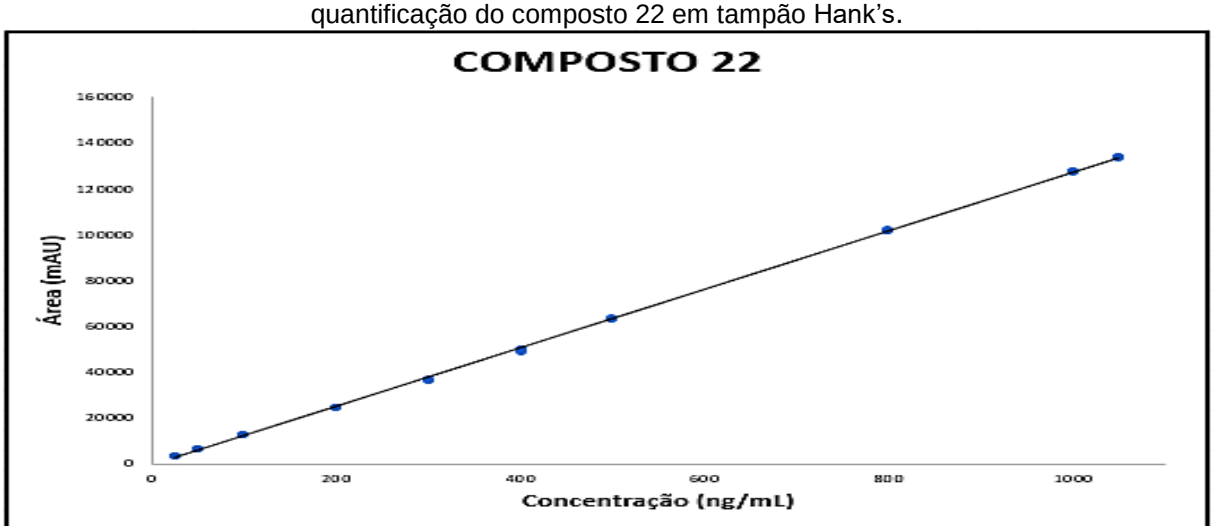
Figura 20 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação de nifuroxazida em tampão Hank's.



Parâmetro	Coeficiente Angular (a)	Coeficiente Linear (b)	Coeficiente de Determinação (R^2)
Valor	239,64	-125,4	0,9999

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

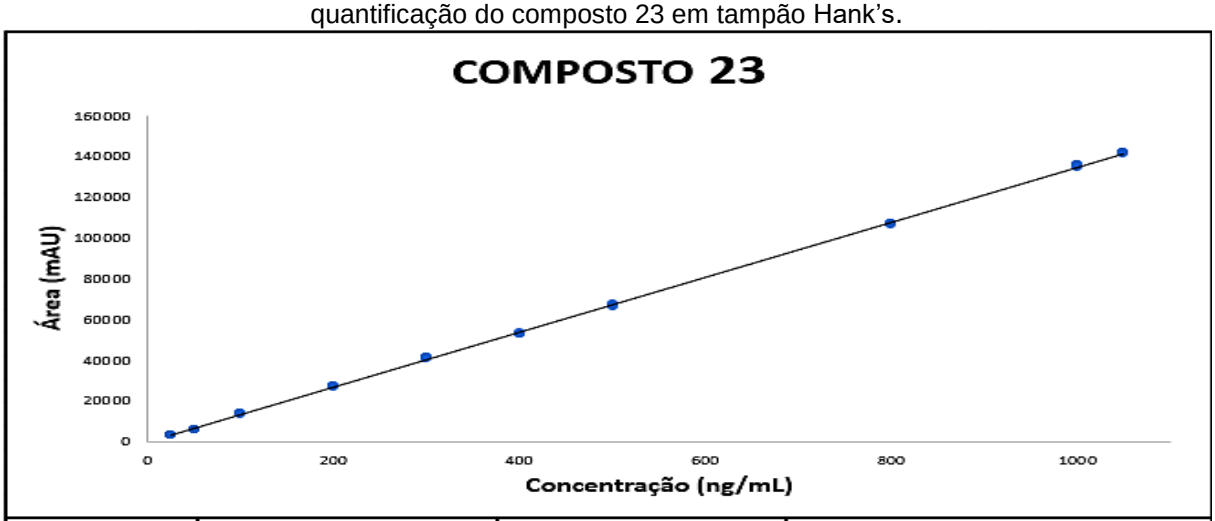
Figura 21 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto 22 em tampão Hank's.



Parâmetro	Coeficiente Angular (a)	Coeficiente Linear (b)	Coeficiente de Determinação (R^2)
Valor	128,02	-630,18	0,9998

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

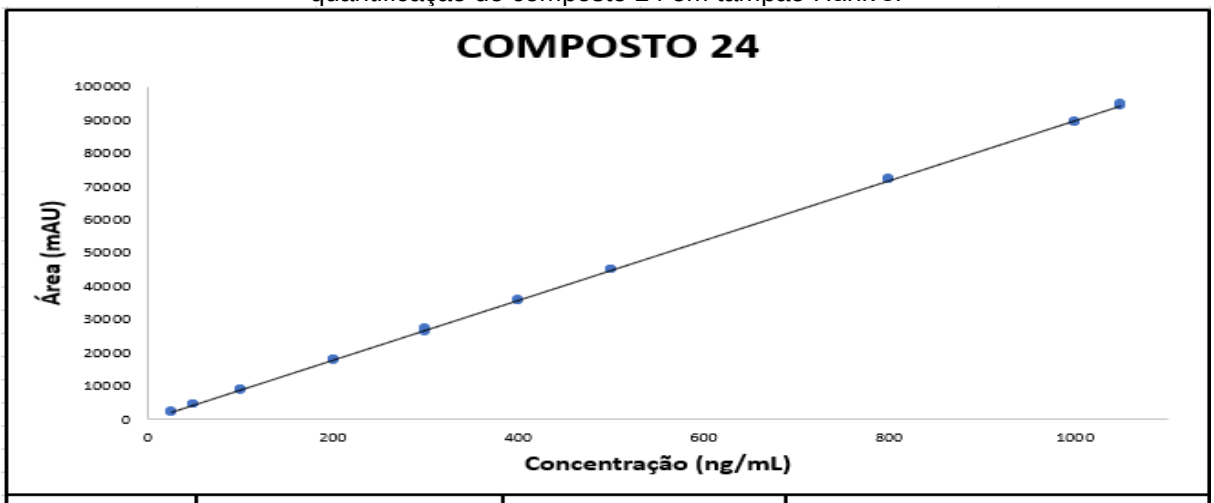
Figura 22 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto 23 em tampão Hank's.



Parâmetro	Coeficiente Angular (a)	Coeficiente Linear (b)	Coeficiente de Determinação (R^2)
Valor	135,04	-442,16	0,9998

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 23 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto 24 em tampão Hank's.



Parâmetro	Coeficiente Angular (a)	Coeficiente Linear (b)	Coeficiente de Determinação (R^2)
Valor	89,89	-163,99	0,9999

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

5.3.3 Precisão e exatidão

A exatidão e a precisão (intra e inter) foram estabelecidas em sextuplicatas nas concentrações de CQD, CQA, CQM, CQB e LIQ em tampão Hank's (Tabela 2).

Para metoprolol, hidroclorotiazida, nifuroxazida e os nitrocompostos em estudo, os resultados de precisão foram calculados em relação às áreas obtidas nos cromatogramas e a exatidão em relação às concentrações determinadas. Os dados estão apresentados nas Tabelas de 6 a 11.

Tabela 6 – Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para o metoprolol.

METOPROLOL				
Concentração (ng/mL)	**Precisão (DPR - %)**		**Exatidão (%)**	
	Intracorrida (n=6)	**Intercorrida (n=12)**	**Intracorrida (n=6)**	**Intercorrida (n=12)**
200	0,13	1,09	99,85	100,85
400	0,10	0,33	99,49	99,59
2000	1,43	1,41	100,57	100,13
2500	0,99	1,30	100,73	101,74
5250	0,01	0,11	100,00	99,90

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 7 – Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para a hidroclorotiazida.

HIDROCLOROTIAZIDA				
Concentração (ng/mL)	**Precisão (DPR - %)**		**Exatidão (%)**	
	Intracorrida (n=6)	**Intercorrida (n=12)**	**Intracorrida (n=6)**	**Intercorrida (n=12)**
25	1,65	1,40	98,03	98,29
50	0,51	0,84	100,66	100,23
500	0,46	0,81	98,59	99,54
800	0,36	0,56	100,25	100,10
1050	0,12	0,78	100,10	92,99

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 8 – Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para a nifuroxazida.

NIFUROXAZIDA				
Concentração (ng/mL)	**Precisão (DPR - %)**		**Exatidão (%)**	
	Intracorrida (n=6)	**Intercorrida (n=12)**	**Intracorrida (n=6)**	**Intercorrida (n=12)**
25	1,86	2,00	98,13	97,32
50	0,77	0,81	98,44	98,21
500	0,11	4,04	101,91	104,98
800	0,18	1,93	99,88	100,08
1050	0,38	2,89	100,40	101,62

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 9 – Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para o composto 22.

COMPOSTO 22				
Concentração (ng/mL)	**Precisão (DPR - %)**		**Exatidão (%)**	
	Intracorrida (n=6)	**Intercorrida (n=12)**	**Intracorrida (n=6)**	**Intercorrida (n=12)**
25	0,31	1,18	99,81	100,87
50	0,30	1,14	98,98	97,87
500	0,57	2,04	99,12	97,45
800	0,08	0,10	99,65	99,76
1050	0,09	0,13	99,60	99,75

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 10 – Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo dia (intra) e em dias consecutivos (inter) para o composto 23.

COMPOSTO 23				
Concentração (ng/mL)	**Precisão (DPR - %)**		**Exatidão (%)**	
	Intracorrida (n=6)	**Intercorrida (n=12)**	**Intracorrida (n=6)**	**Intercorrida (n=12)**
25	1,14	1,43	85,65	84,87
50	3,74	3,91	86,23	87,14
500	0,56	1,14	99,04	99,58
800	0,11	2,66	99,12	101,16
1050	0,10	0,25	100,10	99,94

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 11 – Precisão e exatidão determinados em cinco concentrações diferentes em um mesmo da (intra) e em dias consecutivos (inter) para o composto 24.

COMPOSTO 24				
Concentração (ng/mL)	**Precisão (DPR - %)**		**Exatidão (%)**	
	Intracorrida (n=6)	**Intercorrida (n=12)**	**Intracorrida (n=6)**	**Intercorrida (n=12)**
25	3,46	3,73	97,50	97,63
50	2,14	5,09	98,15	95,57
500	0,03	2,09	100,57	98,35
800	0,18	2,65	100,71	97,99
1050	0,29	2,30	100,40	97,97

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

5.3.4 Limite Inferior de Quantificação

Esse parâmetro, juntamente com a precisão e exatidão dos valores obtidos para cada composto, pode ser avaliado nas Tabelas 6 a 11. Para metoprolol, o valor de LIQ corresponde à 200 ng/mL, enquanto que para a hidroclorotiazida, a nifuroxazida e os compostos 22, 23 e 24, corresponde à 25 ng/mL.

5.3.5 Estabilidade

Foram realizados os estudos de estabilidade de curta duração (6 horas em temperatura ambiente), estabilidade em um ciclo de congelamento e descongelamento (-20ºC por 24h e descongelamento) e de estabilidade de ensaio (2 horas em temperatura de 37ºC), em sextuplicatas. Os resultados representados pela média dos valores obtidos referentes às amostras de controle de qualidade (CQB e CQA) em tampão Hank's pertinentes ao metoprolol, hidroclorotiazida, nifuroxazida e os nitrocompostos em estudo encontram-se descritos nas Tabelas 13 a 18.

Tabela 12 – Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento do metoprolol.

	CQB (200 ng/mL)			**CQA (2500 ng/mL)**				
AMOSTRAS (n=6)	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	***Desvio CQB**	**CQA**
Recém-preparadas	201,4	1,8	100,7	2498,3	0,4	99,9	*Em relação às amostras recém-preparadas	
Temperatura ambiente (6 horas)	203,1	2,7	101,6	2499,0	1,2	100,0	0,9	0,1
Temperatura 37ºC (2 horas)	197,3	1,4	98,7	2498,7	4,0	99,9	-1,3	0,0
Temperatura -20ºC (24 horas)	196,3	3,6	98,2	2495,5	2,3	99,8	-2,5	-0,1

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 13 – Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento da hidroclorotiazida.

	CQB (25 ng/mL)			CQA (800 ng/mL)				
AMOSTRAS (n=6)	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	***Desvio CQB**	**CQA**
Recém-preparadas	26,4	1,1	105,6	799,2	0,5	99,9	*Em relação às amostras recém-preparadas	
Temperatura ambiente (6 horas)	24,8	1,9	99,2	801,1	0,9	100,1	-6,4	0,2
Temperatura 37ºC (2 horas)	25,3	2,3	101,2	797,6	0,2	99,7	-4,4	-0,2
Temperatura -20ºC (24 horas)	25,6	3,5	102,4	803,2	1,0	100,4	-3,2	0,5

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 14 – Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento da nifuroxazida.

	CQB (25 ng/mL)			CQA (800ng/mL)				
AMOSTRAS (n=6)	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	***Desvio CQB**	**CQA**
Recém-preparadas	25,1	0,4	100,4	802,4	0,2	100,3	*Em relação às amostras recém-preparadas	
Temperatura ambiente (6 horas)	24,7	2,7	98,8	800,0	1,0	100,0	-1,6	-0,3
Temperatura 37ºC (2 horas)	26,2	1,3	104,8	798,5	2,1	99,8	4,4	-0,5
Temperatura -20ºC (24 horas)	24,5	1,6	98,0	797,8	0,7	99,7	-2,4	-0,6

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 15 – Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento do composto 22.

	CQB (25 ng/mL)			CQA (800ng/mL)				
AMOSTRAS (n=6)	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	***Desvio CQB**	**CQA**
Recém-preparadas	24,8	2,1	99,2	795,7	1,1	99,5	*Em relação às amostras recém-preparadas	
Temperatura ambiente (6 horas)	25,0	2,5	100,0	801,7	0,2	100,2	0,8	0,7
Temperatura 37ºC (2 horas)	24,1	1,6	96,4	793,2	0,8	99,2	-2,8	-0,3
Temperatura -20ºC (24 horas)	25,2	1,9	100,8	798,9	0,7	99,9	1,6	0,4

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 16 – Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento do composto 23.

	CQB (25 ng/mL)			CQA (800ng/mL)				
AMOSTRAS (n=6)	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	***Desvio CQB**	**CQA**
Recém-preparadas	25,9	2,3	103,6	799,5	0,5	99,9	*Em relação às amostras recém-preparadas	
Temperatura ambiente (6 horas)	26,2	0,6	104,8	800,5	1,5	100,1	1,2	0,2
Temperatura 37ºC (2 horas)	24,5	2,1	98,0	797,3	0,2	99,5	-5,6	-2,7
Temperatura -20ºC (24 horas)	26,0	1,2	104,0	796,8	0,9	99,6	0,4	-0,3

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Tabela 17 – Estudos de estabilidade de curta duração, estabilidade de ensaio, e estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento do composto 24.

	CQB (25 ng/mL)			CQA (800ng/mL)				
AMOSTRAS (n=6)	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	**Concen. média deter.**	**Precisão (DPR-%)**	**Exatidão (%)**	***Desvio CQB**	**CQA**
Recém-preparadas	24,3	0,4	97,2	803,6	0,6	100,5	*Em relação às amostras recém-preparadas	
Temperatura ambiente (6 horas)	24,8	1,2	99,2	805,5	1,0	100,7	2,0	0,2
Temperatura 37ºC (2 horas)	23,2	2,2	92,8	796,8	0,3	99,6	-4,4	-0,9
Temperatura -20ºC (24 horas)	25,1	0,7	100,4	801,7	2,9	100,2	3,2	-0,5

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

A validação dos métodos bioanalíticos é fundamental para o adequado desenvolvimento e o sucesso da aplicação da técnica *in vitro* empregando células Caco-2 na triagem de candidatos a fármacos.

Para isso, é imprescindível que o método contemple os parâmetros de validação abordados pela Resolução RDC 27/2012, em especial a seletividade que, tratando-se de um ensaio com matriz composta por sais e suplementos, são vários os possíveis interferentes que podem implicar na identificação e quantificação dos analitos. Vale, também, destacar a sensibilidade do método, que em virtude das baixas concentrações, geralmente permeadas, torna o processo mais desafiador.

Foram adotados como compostos padrão de permeabilidade aqueles cujos comportamentos já houvesse relatos na literatura da permeabilidade em membranas de células Caco-2 e que se enquadrassem nas técnicas analíticas mais acessíveis. De acordo com Benet e colaboradores (2008), que utilizaram o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (Biopharmaceutics Classification System-BCS), o metoprolol e a hidroclorotiazida são fármacos de alta e baixa permeabilidade, respectivamente.

A possível fotossensibilidade dos 5-nitroheterocíclicos foi observada na manipulação destes na ausência e presença de luz. Notou-se que a utilização de balões volumétricos e vials âmbar é suficiente para não permitir fotólise e garantir a estabilidade das moléculas (BELAL, 2018). Outra dificuldade encontrada foi a baixa

solubilidade desses compostos que precisou ser contornada através do emprego do DMSO como co-solvente, que já teve sua citotoxicidade avaliada e discutida anteriormente. Em virtude dessa característica, as concentrações utilizadas no desenvolvimento analítico foram limitadas, evitando a precipitação dos cristais das moléculas no tampão Hank's.

A estabilidade das soluções nas concentrações da faixa de trabalho à 37ºC mantiveram-se estáveis pelo período de 2 horas, limitando o ensaio a esse tempo máximo.

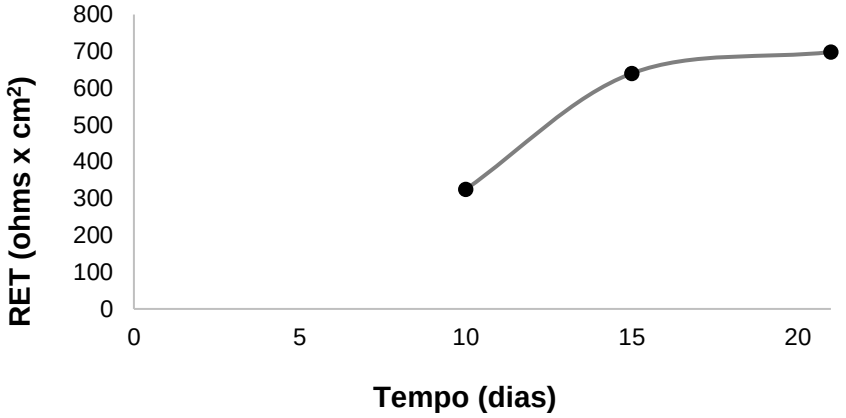
A baixa resposta do metoprolol ao ultravioleta, mesmo que em comprimento de onda com maior absorbância para o mesmo, necessitou ser corrigida pelo aumento das concentrações de trabalho buscando respostas mais altas. Apesar de todas as dificuldades encontradas em relação aos compostos, técnicas empregadas e recursos disponíveis, o método desenvolvido foi validado respeitando os critérios da Resolução vigente sobre o tema, anteriormente referida, e é apto para a finalidade pretendida.

A condução de forma errônea de testes *in vitro* em qualquer estágio do desenvolvimento de medicamentos pode interferir totalmente no processo (OLIVEIRA, 2019). No caso, o perfil farmacocinético da molécula direciona as possíveis vias de administração e o comportamento que essa poderá apresentar *in vivo*, contribuindo para futuras formulações farmacotécnicas mais assertivas.

5.3.6 Avaliação *in vitro* da permeabilidade - Monitoramento da integridade da membrana de células Caco-2 através da resistência elétrica transepitelial (RET)

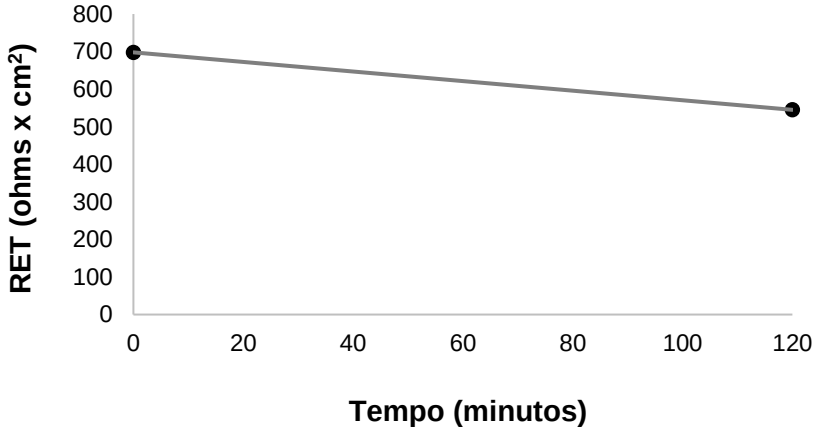
A determinação da RET para o monitoramento das membranas formadas por células Caco-2 ocorre por meio da inserção simultânea de eletrodos nos compartimentos apical e basolateral das câmaras das placas Transwell™. Os gráficos 6 e 7 a seguir apresentam os resultados obtidos durante os dias de diferenciação das células e no dia do experimento.

Figura 24 – Valores médios de resistência elétrica transepitelial (RET) das membranas de células Caco-2 determinados ao 10º, 15º e 21º dias de cultivo nas placas Transwell™.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 25 – Valores médios de resistência elétrica transepitelial (RET) das membranas de células Caco-2 nas placas Transwell™, determinados nas condições do experimento de permeabilidade do metoprolol, hidroclorotiazida e dos compostos 5-nitroheterocíclicos no tempo inicial e final (120 minutos).



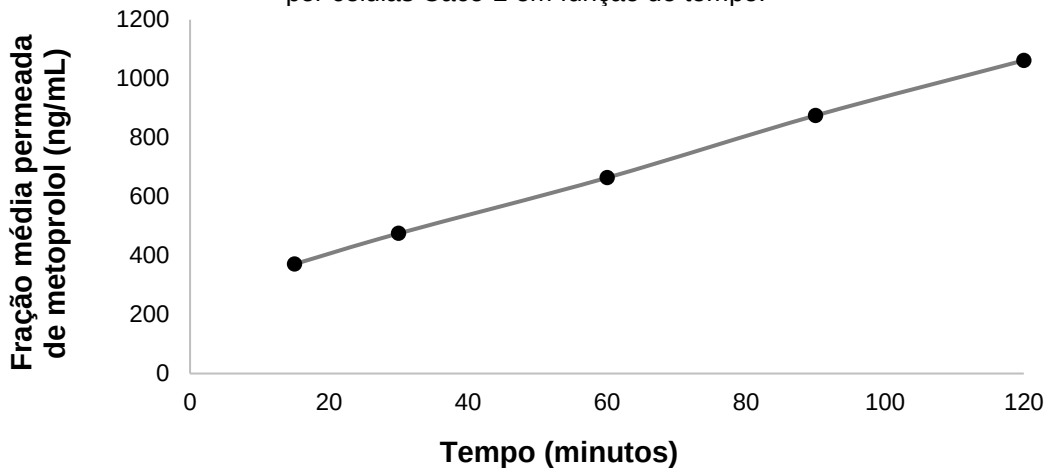
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Ao fim do experimento, os valores de RET obtidos estavam acima de 350 ohms x cm^2, o que demonstra viabilidade e integridade das membranas e valida esse parâmetro do estudo.

5.3.7 Avaliação *in vitro* da permeabilidade – Determinação da Permeabilidade aparente (*Papp*) do metoprolol (padrão de alta permeabilidade), da hidroclorotiazida (padrão de baixa permeabilidade) e dos 5-nitroheterocíclicos

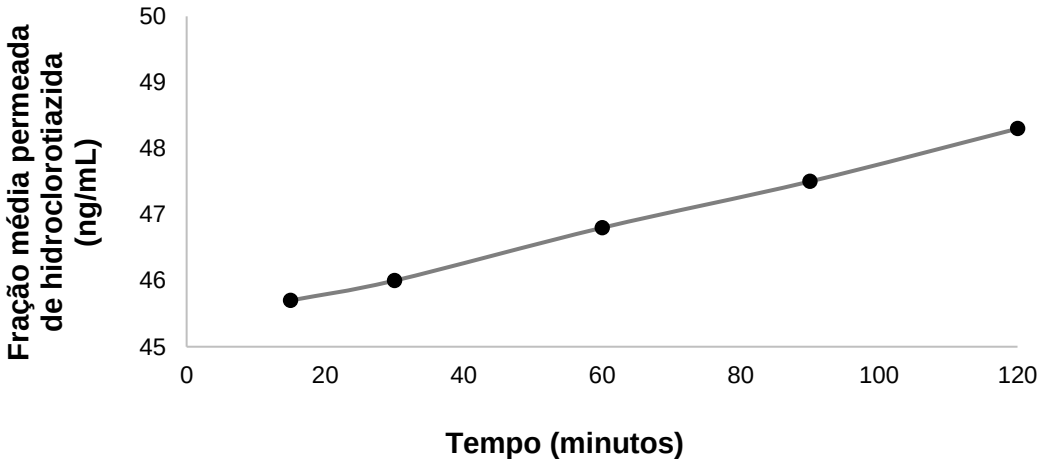
As imagens 26 a 31 representam a fração permeada de metoprolol, de hidroclorotiazida e dos 5-nitroheterocíclicos através das membranas de células Caco-2 no sentido apical-basolateral em função do tempo.

Figura 26 – Fração média (n=6) permeada de metoprolol (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.



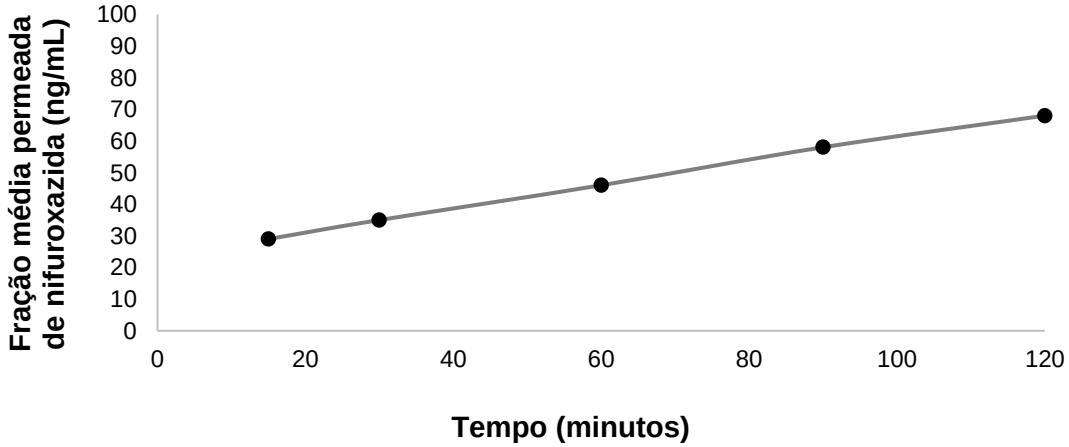
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 27 – Fração média (n=6) permeada de hidroclorotiazida (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.



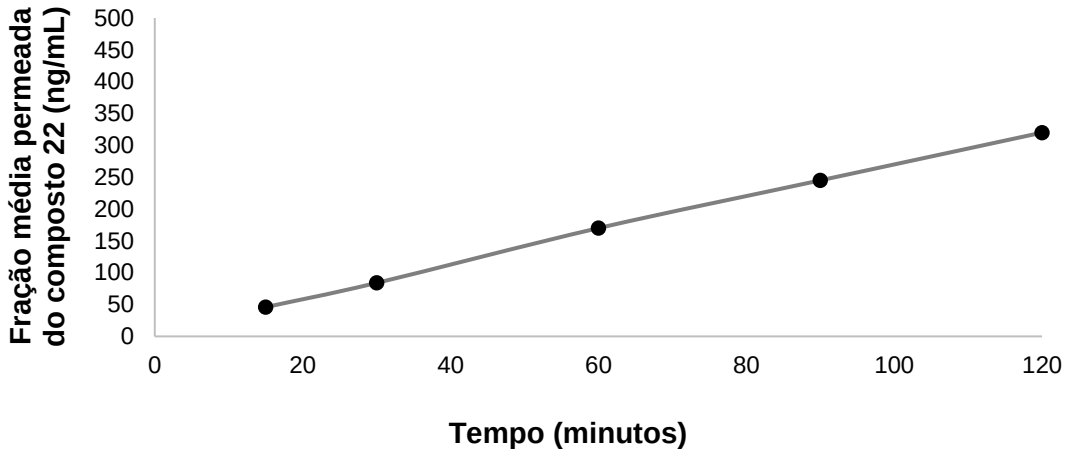
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 28 – Fração média (n=6) permeada de nifuroxazida (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.



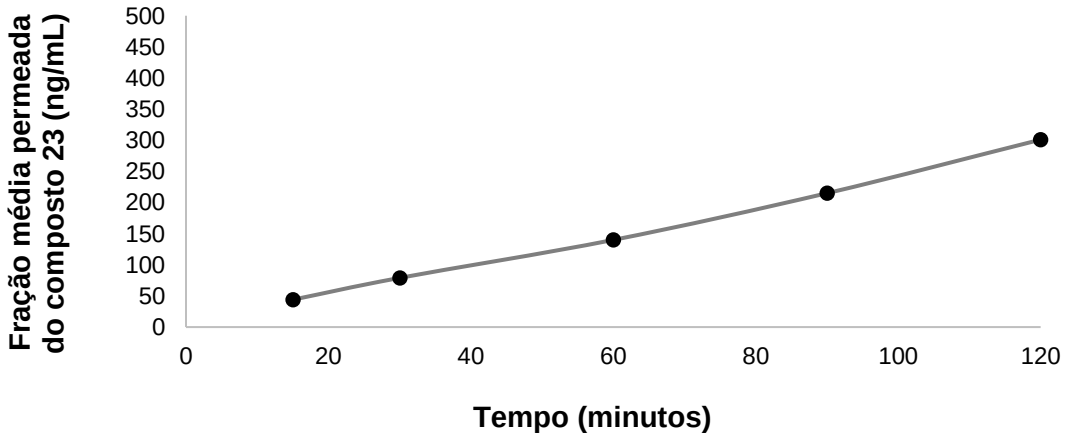
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 29 – Fração média (n=6) permeada do composto 22 (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.



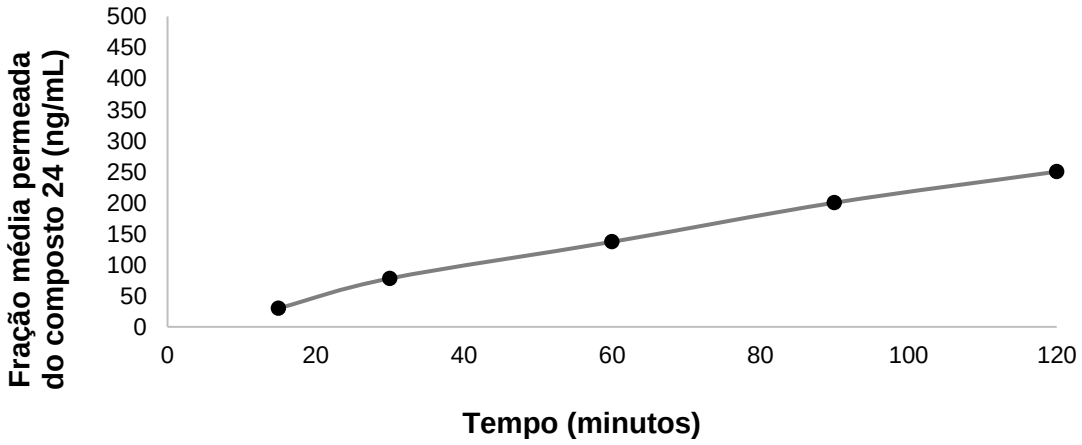
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 30 – Fração média (n=6) permeada do composto 23 (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 31– Fração média (n=6) permeada do composto 24 (ng/mL) através das membranas formadas por células Caco-2 em função do tempo.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Na Tabela 19 estão apresentados os valores de permeabilidade aparente (*Papp*), que representa a velocidade em que ocorre o transporte dos compostos através de membranas durante experimentos de permeabilidade.

Tabela 18 – Valores de Permeabilidade aparente (*Papp* x10^{-6} cm/s) de metoprolol, hidroclorotiazida e dos 5-nitroheterocíclicos por meio da fração permeada através das membranas formadas por células Caco-2.

COMPOSTO	***Papp* (10^{-6} cm/s)**
MTL	29,44
HCTZ	0,54
NFZ	8,30
C22	58,52
C23	53,97
C24	46,07

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Entre o 15º e 21º dia de cultivo, encontraram-se valores médios de RET por volta de 325 a 698 ohms x cm^2, respectivamente, similares aos encontrados na literatura (FERNANDES; STORPIRTIS; TAVARES, 2012b; GONÇALVES et al., 2012; SCHMIDT; KELLY; VAN DER WALLE, 2010; BIGANZOLI; CAVENAGHY; ROSSI; BRUNATI; NOLLI, 1999). Ao longo do experimento, os valores médios de RET decaíram. Porém, ao final (2 horas), tais valores mantiveram-se superiores a 350 ohms x cm^2. Apenas membranas com valores superiores a 350 ohms x cm^2 foram selecionadas para o experimento, sabendo-se que no decorrer do ensaio os valores sofreriam declínio.

A determinação da permeabilidade de compostos já conhecidos e descritos na literatura é um outro modo de avaliar não somente a integridade das membranas de células Caco-2, mas a execução de todo o experimento de permeabilidade tornando válido e garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos para os compostos 22, 23 e 24, pois se tratam de moléculas inovadoras que nunca tiveram esse parâmetro avaliado até o presente momento. A *Papp* calculada para o metoprolol (29,44 x 10^{-6} cm/s) encontra-se de acordo com os valores determinados por Corazza e colaboradores (2018): 24 x 10^{-6} cm/s e Fernandes e colaboradores (2012b): 27,27 x 10^{-6} cm/s. Mesmo empregando outro modelo, Souza e colaboradores (2014) obtiveram valores elevados para a *Papp* do metoprolol (32 x 10^{-6} cm/s), utilizando membrana intestinal de rã-touro.

Mendes e colaboradores (2013) encontraram valor semelhante (0,44 x 10^{-6}

cm/s) ao obtido nesse estudo para a hidroclorotiazida (0,54 x 10^{-6} cm/s). Sun e colaboradores (2002) obtiveram valores que convergem com os encontrados no presente estudo, tanto para a hidroclorotiazida como para o metoprolol (TEKSIN; SEO; POLLI, 2010).

O metoprolol, diferentemente da hidroclorotiazida, é completamente absorvido pelo organismo e metabolizado no fígado, enquanto a segunda tem apenas 60-80% de sua fração absorvida *in vivo* (BENFIELD; CLISSOLD; BROGDEN, 1986). Apesar da avaliação *in vitro* da permeabilidade empregando Caco-2 classificar a hidroclorotiazida como composto de baixa permeação, em humanos esta apresenta uma fração absorvida superior à 50% (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Possivelmente em virtude de sua baixa absorção pela via oral (PASSIFURIL, 2014; CEDILLO-RIVERA; MUNOZ, 1992) e atividade biológica, entre elas a antimicrobiana (TAVARES; PENNA; AMARAL, 1997), a nifuroxazida pode ser utilizada como antisséptico intestinal no tratamento e combate de infecções do trato gastrintestinal (PASSIFURIL, 2007).

A literatura sugere que o valor de *Papp* (8,30 x 10^{-6} cm/s) obtido para esse fármaco é justificada pela via de metabolização (hepática) do mesmo, no qual não está presente no então estudo empregando células intestinais (Caco-2) (FERNANDES; STORPIRTIS; TAVARES, 2012b). Essa hipótese é fortificada quando pesquisas relatam baixas concentrações desse composto em plasma humano após administração oral (CEDILLO-RIVERA; MUNOZ, 1992).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 20, considerando os valores de permeabilidade aparente (*Papp*), todos os compostos em estudo (22, 23 e 24) podem ser classificados como de alta permeabilidade. Dessa forma, os candidatos a fármacos têm grande possibilidade de apresentar elevada permeação *in vivo*.

Tabela 19 – Correlação dos valores de *Papp* (x10^{-6} cm/s) do metoprolol, hidroclorotiazida e dos 5-nitroheterocíclicos com a classificação da fração possivelmente absorvida *in vivo* segundo a literatura.

CORRELAÇÃO *PAPP* X FRAÇÃO ABSORVIDA									
COMPOSTO	(YEE, 1997)			(BIGANZOLI, 1999)			(LIN, 2011)		
	Baixa (<1x10^{-6})	Média (1-10x10^{-6})	Alta (>10x10^{-6})	Baixa (<0,2x10^{-6})	Média (0,2-2x10^{-6})	Alta (>2x10^{-6})	Baixa (<1,8x10^{-6})	Média (≥1,8x10^{-6})	Alta (≥5x10^{-6})
	0-20%	20-70%	70-100%	<1%	1-90%	>90%	<50%	50-100%	75-100%
METOPROLOL		Alta			Alta			Alta	
HIDROCLOROTIAZIDA		Baixa			Média			Baixa	
NIFUROXAZIDA		Média			Alta			Alta	
COMPOSTO 22		Alta			Alta			Alta	
COMPOSTO 23		Alta			Alta			Alta	
COMPOSTO 24		Alta			Alta			Alta	

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

A lipofilicidade dos análogos à nifuroxazida, já mencionada anteriormente, pode justificar a elevada permeabilidade *in vitro* dos mesmos, levando em conta que moléculas portadoras dessa propriedade físico-química conseguem transpor membranas biológicas (bicamada lipídica) mais facilmente por difusão passiva (LYRA et al., 2012).

Outro fato que contribui com essa hipótese é a própria citotoxicidade dos compostos em relação às outras moléculas mais hidrofílicas. A mesma afinidade que favorece a permeabilidade expõe as células ao potencial tóxico do composto (LYRA et al., 2012), podendo ser depositado em sítios específicos pela baixa solubilidade e favorecer a formação de agregados que elevam seus efeitos tóxicos (LIPINSKI, 2002).

De acordo com o BCS, proposto por Amidon e colaboradores (1995), os fármacos podem ser classificados em 4 grupos: os de classe 1 com alta solubilidade e permeabilidade, de classe 2 com baixa solubilidade e alta permeabilidade, de classe 3 com alta solubilidade e baixa permeabilidade e os de classe 4 com baixa solubilidade e permeabilidade. Além dos fatores de permeabilidade e solubilidade, a dissolução também é um terceiro fator que pode influenciar a extensão e velocidade de absorção de formas farmacêuticas sólidas de administração oral (AMIDON et al., 1995).

Levando em conta os resultados obtidos no presente estudo, os compostos 22, 23 e 24 podem ser classificados previamente como candidatos a fármacos pertencentes a classe 2 pela baixa solubilidade e alta permeabilidade, que são características clássicas de moléculas lipossolúveis (AMIDON et al., 1995). Neste sentido, a dissolução seria o fator que poderia corrigir esse problema de solubilidade desses compostos através do emprego de excipientes que modulem seus perfis de dissolução em futuras formulações farmacêuticas garantindo uma adequada liberação no trato gastrintestinal e consequentemente considerável biodisponibilidade (TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012).

Assim sendo, são válidas as pesquisas com estratégias farmacotécnicas que contornem esse problema de solubilidade, seja no emprego de dispersões sólidas, micronização, sistema nano-estruturados, formação de complexos com ciclodextrina, emprego de pró-fármacos ou outra técnica pertinente para não descartar os pontos positivos e potenciais atividades farmacêuticas dos compostos em questão (SERAJUDDIN, 1999; BIKIARIS, 2011; TAKAHASHI; VEIGA; FERRAZ, 2012).

6 CONCLUSÕES

Todos os resultados do presente estudo são muito esclarecedores quanto ao comportamento dos compostos, em se tratando de citotoxicidade e permeabilidade.

Os nitrocompostos, além serem considerados promissores e de amplo uso com diversas atividades biológicas, apresentam certas implicações que dificultam sua aplicação, principalmente os análogos com baixa hidrossolubilidade, o que pode influenciar na farmacocinética de candidatos a fármacos e implicar negativamente nos testes não clínicos.

No caso, a lipofilicidade dos compostos foi um obstáculo no processo de desenvolvimento do método, porém, essa característica favorece a interação de moléculas com membrana biológicas, o que, por consequência, confere a elas, em geral, maior toxicidade e elevada absorção.

Os ensaios de citotoxicidade realizados foram de grande valia para auxiliar a compreensão do comportamento dos compostos em estudo e direcionar as corretas mensurações das concentrações dos mesmos nas etapas de desenvolvimento e validação do método bioanalítico que foi empregado nos ensaios permeabilidade.

O composto 22 apresenta-se como o menos tóxico dentre os três análogos, sendo que o 24 foi o mais tóxico. Essa diferença de toxicidade está relacionada, possivelmente, com a capacidade individual de cada composto em gerar radicais livres a partir da redução dos grupos nitro, hidroxila e amina, formando nitroradicais e derivados hidroxilaminas que interagem negativamente com os ácidos nucléicos das células, provocando o efeito tóxico.

Ao apresentar citotoxicidade inferior ao C23 e C24; o C22 pode ser o mais promissor dentre eles, porém, todos precisam ter suas características melhor estudas.

Os valores de *Papp* dos compostos 22, 23 e 24 encontrados no presente estudo são encorajadores, uma vez que, de acordo a literatura, em sua totalidade, foram classificados como de alta permeabilidade.

Vale lembrar que a condução de forma errônea de testes *in vitro* em qualquer estágio do desenvolvimento de medicamentos poderá interferir totalmente no processo. No caso, o perfil farmacocinético da molécula direciona as possíveis vias de administração e o comportamento que essa poderá apresentar *in vivo*, contribuindo para futuras formulações farmacotécnicas mais assertivas.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, N.; FLINT, M. B.; MATSON, W. R.; BOGDANOV, M. B. Increased oxidative damage to DNA in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. **Free Radical Research,** v.39, p. 383-388, 2005.

ALBERCA, L. N.; SBARAGLINI, M. L.; BALCAZAR, D.; FRACCAROLI, L.; CARRILLO, C.; MEDEIROS, A.; TALEVI, A. Discovery of novel polyamine analogs with anti-protozoal activity by computer guided drug repositioning. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 30, n. 4, p. 305-321, 2016.

ALLEN, L. V. JR.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 9. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 716p., 2013.

AMIDON, G. L.; LENNERNÃS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theorical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical research**, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

ARAUJO-JORGE, T. C.; PIRMEZ, C., Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas, Normas de segurança para o trabalho com *Trypanosoma cruzi*. In: ARAUJO-JORGE, T. C.; de CASTRO, S. L. (eds), Doença de Chagas: manual para experimentação animal, **Fiocruz**, Rio de Janeiro, cap. 8, p. 134-138, 1999.

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.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theorical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 22, n. 1-2, p. 67-84, 1996.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 280-289, 2012.

BENET, L.; AMIDON, G. L.; BARENDS, D.; LENNERNÃS, H.; POLLI, J.; SHAH, V. P.; STAVICHANSKY, S.; YU, L. The use of BDDCSin classifying the permeability of marketed drugs. **Pharmaceutical research**, v.52, p.483-488, 2008.

BENFIELD, P.; CLISSOLD, S.P.; BROGDEN, R.N. Metoprolol. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokynetic properties, and therapeutic efficacy, in hypertension, ischaemic heart disease and related cardiovascular disorders. **Drugs**, New York, v.31, n.5, p. 376-429, 1986.

BIGANZOLI, E.; CAVENAGHY, 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. **Il Farmaco**, v. 54, n. 9, p. 594-599, 1999.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. **Drug. Discov. Today**, v. 10, p. 335 – 343, 2005.

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.

BELAL, T. S. A simple and sensitive spectrofluorimetric method for analysis of some nitrofuran drugs in pharmaceutical preparations. **Journal of fluorescence**, v. 18, n. 5, p. 771-780, 2008.

BEZERRA, *et. al.* A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. **Saúde** (Santa Maria), v.38, n.1, p. 9-20, 2012.

BIKIARIS, D.N. Solid dispersions, part II: new strategies in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. **Expert Opin. Drug Deliv**., v. 8, p. 1663-80, 2011.

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 α-conotoxin MII. **Journal of Medicinal Chemistry**, 46 (7), 1266-1272, 2003.

BLUMENSTIEL, K.; SCHONECK, R.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Nitrofuran drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. **Biochemical pharmacology**, v. 58, n. 11, p. 1791-1799, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RE n° 27, 29 de maio de 2012. Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, 02 de junho de 2012.

BUENO, M. M.; RECH, N. Insumos Farmacêuticos – Aspectos Técnicos, Científicos e Regulatórios. In: STORPIRTIS et al. Biofarmacotécnica – Série Ciências Farmacêuticas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1ª ed, cap. 2, p. 12-20, 2009.

CAMANDAROBA, E. L., LIMA, C. M. P., ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of Tripanossoma cruzi biodeme in the intragastric infection. **Rev. Inst. Med. Trop**. *São Paulo*, São Paulo, vol. 44, p. 97-103, 2002.

CEDILLO-RIVERA, R.; MUNOZ, O. Susceptibilidade in vitro de Giardia lamblia ao albendazol, mebendazol e outros agentes quimioterápicos. **Journal of medical microbiology**, v. 37, n. 3, pág. 221-224, 1992.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, *American Trypanosomiasis*. DPDx - **Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern**. 19.12.2017.

CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZALEZ, M., RISSO, M., SAGRERA, G., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, G., QUIJANO, C., STOPPANI, A. O. M., PAULINO, M., OLEA-AZAR, C., BASOMBRIO, M. A. Synthesis and antitrypano somal evaluation of E-isomers of 5-nitro-2-furalde hyde and 5- nitrothiophene-2-carboxaldehyde semi carbazone derivatives. Structure-activity relationships. **Eur. J. Med. Chem**. v.35, p.343–350, 2000.

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., Norwell**, v.13, p.120-123, 1996.

CHUNG, M. C.; BOSQUESI, P. L.; DOS SANTOS, J. L. A prodrug approach to improve the physico-chemical properties and decrease the genotoxicity of nitro compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 3515-3526, 2011.

CORAZZA, F. G.; LOPES, P. S.; FILHO, N. A. Avaliação da permeabilidade da papaína em formulações orais para tratamento de patologias intestinais utilizando tripla co-cultura de células Caco-2, HT29-MTX e Raji como modelo in vitro. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – **Universidade Federal de São Paulo**, *Campus* Diadema, SP, 2018.

COSTA, M. et al. Doença De Chagas: Uma Revisão Bibliográfica. REFACER - **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 2, n.1, 2013. Disponível em: http://periodicos.unievangelica.edu.br/refacer Acesso: novembro 2018.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COURA, J. R. CANÇADO, J. R. A história da terapêutica da doença de Chagas. **Portal doença de Chagas da Fiocruz**, 2007. Disponível em: http://www.fiocruz.br/chagas/cgi /cgilua.exe/. Acesso em Julho de 2017.

COURA, J. R.; CASTRO; SOLANGE, L. A critical review on Chagas disease chemiotheapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, vol. 97, n.1, p. 3-24, 2002.

COUTINHO, M. DIAS, J. C. P. A descoberta da doença de Chagas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 2, 1999.

CRUCIANE, G. Molecular Interaction Fields. **Weinheim**: *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA*. v. 27, p. 303, 2006.

DA CUNHA FILHO, M. S. S.; DE SÁ-BARRETO, L. C. l.; LEONARDI, D.; LAMAS, M. C.; SALOMON, C. J.; Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas; Associação Médica de Brasília; **Brasília Medica**, v. 49, n. 4, p. 1-7, 2013.

DAVANÇO, M. G.; de CAMPOS M.L.; PECCININI R.G; et al. Benznidazole extended-release tablets for improved treatment of Chagas disease: preclinical pharmacokinetic study. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2492-2498, 2016.

DECLERCK, P. J.; DE RANTER, C. J. In vitro reductive activation of nitroimidazoles. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, p. 59-61, 1986.

DELUCIA, R.; PLANETA, C. DA S.; GALLACCI M.; DE AVELLAR, M. C. W.; FILHO, R. M. DE O.Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos – São Paulo: **Clube de Autores** – 2 v.: il. 2014.

DIAS J. C. P.; RAMOS JÚNIOR A.N.; GONTIJO E.D.; LUQUETTI A.; SHIKANAI-YASUDA M.A.; COURA J.R.; et al. II Consenso brasileiro em doença de chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. SciELO-Editora **FIOCRUZ**, 1997.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, 2009. Disponível em: em:http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/23/2018-025.pdf

FEE, R. The cost of clinical trials. **Drug Discovery & Development**, v. 10, n. 3, p. 32, 2007.

FERNANDES, M. B.; GONÇALVES, J. E.; SCOTTI, M. T.; OLIVEIRA, A. A.; TAVARES, L. C.; STORPIRTIS, S. Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 535-540, 2012a.

FERNANDES, M. B.; STORPIRTIS, S; TAVARES, L. C. Permeabilidade *in vitro* e *in silico* de análogos à nifuroxazida com atividade potencial frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. 2012. Tese (Doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2012b.

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., cap. 19, p. 143-154, 2011.

FERREIRA, A. R. L.; FIGUEIRAS, A. R. Terapêuticas alternativas para a quimioterapia por via oral. **Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbr**a, 2015.

FOGH, J.; WRIGHT, W. C.; LOVELESS, J. D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 58, n. 2, p. 209-214, 1977.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – **FDA**. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System Guidance for Industry (2015). Disponível em: < https://www.fip.org/files/fip/BPS/BCS/Biowaiver_guidance_revision_2015.pdf>.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Manual para elaboração de projeto de melhoria habitacional para o controle da doença de Chagas. 1ª reimpressão — **Brasília**, 54 p. 2006.

GARCIA, S. B. Doença de Chagas: os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 4, p. 249-251, 2009.

GONÇALVES, J. E.; FERNANDES, M. B.; CHIANN, C.; GAI, M. N.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Effect of pH, mucin and bovine serum on rifampicin permeability through Caco-2 cells. **Biopharm. & Drug Disp**., v. 33, p. 316-323, 2012.

GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. In: STORPIRTIS *et al, Biofarmacotecnica - Série Ciências Farmacêuticas*. **Guanabara Koogan**, 1ª Ed, Rio de Janeiro, 2009.

GONÇALVES, J. E.; STORPIRTIS, S. O Sistema de Classificação Biofarmacêutica: Conceitos, Determinação da Solubilidade e Permeabilidade e Aplicações na Área Farmacêutica. In: VIEIRA, N. R.; CAMPOS, D. R.; editores. Manual de Bioequivalência - série Pesquisa Clínica. 2nd ed. São Paulo: **Dendrix**; v.1, p. 137-170, 2011.

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.

GURGEL, C. B. M. F.; MAGDALENA, C. V.; PRIOLI, L. F. Carlos Chagas e o enigma do prêmio nobel. **Cad. Saúde Colet**, v. 17, n. 4, p. 799-809, 2009.

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

IRIBARNE, F.; GONZÁLES, M.; CERECETTO, H.; AGUILERA, S.; TAPIA, S.; PAULINO, M. et al. Interaction energies of nitrofurans with trypanothione reductase and glutathione reductase studied by molecular docking. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, Amsterdan, v. 818, n. 1-3, p. 7-22, 2007.

ISHII, M.; JORGE, M. D.; OLIVEIRA, A. A.; PALACE-BERL, F.; CECHINEL, C. A.; SONEHARA, I. Y.; PASQUALOTO, K. F. M.; TAVARES, L. C. Sinthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of novel 3- acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines as potential antibacterial, anti-T. cruzi, antifungal agents. **Bioorg. Med. Chem**. v.19, p. 6292-6301, 2011.

ISO – International Organization for Standardization. ISO 10993-5 – Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: **Test for *in vitro* cytotoxicity**, 3ª Ed, ISO, 2009.

JORGE, S. D. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de derivados benzofuroxânicos com atividade frente ao S. aureus e T. cruzi. São Paulo, 2011. 328p. (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo**).

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***,* v. 17, p. 3028–3036, 2009.

KATZUNG, B. G., Farmacologia Básica e Clínica, cap. 52, 8° ed., **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p. 757, 2001.

KHARE, S.; NAGLE, A. S.; BIGGART, A.; LAI, Y. H.; LIANG, F.; DAVIS, L. C.; GILLESPIE, J. R. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, v. 537, n. 7619, p. 229-233, 2016.

KOBAYASHI, M.; SADA, N.; SUGAWARA, M.; ISEK, 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,** 2001.

KRATZ, J. M. Implementação e aplicação do modelo in vitro com células Caco-2 para estudo da permeabilidade intestinal de fármacos [tese]. **Universidade Federal de Santa Catarina**, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Florianópolis, SC, 2011.

KROPF, S. P. Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação, 1909-1962. Scielo-**Editora fiocruz**, 2009.

LANA, M.; TAFURI W. L., Inc. Parasitologia Humana*,* in: NEVES, D. P.; MELO A. L.; LUNARDI P. M. 10 ed., **Ed. Atheneu**, São Paulo, p. 73-96, 2004.

LA-SCALEA, M. A. Comportamento voltamétrico e mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 59-75, 1998.

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**., Amsterdam, v. 200, p. 41-51, 2000.

LENTZ, K. A.; POLLI, J.W.; WRING, S.A.; HUMPHREYS J. E.; POLLI, J.E. Influence of passive permeability on effective P-glycoprotein kinetics. **Pharm Res**. v.17, p.1456 –1460, 2000.

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

LIESE, B., ROSENBERG, M., SCHRATZ, A. Neglected Tropical Diseases 1: Programmes, partnships, governance for elimination and controlo f neglected tropical diseases. **Lancet**. v. 375, p. 67-76, 2010.

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. **Metabolismo e disposição de drogas** , v. 39, n. 2, pág. 265-274, 2011.

LIPINSKI, C. Poor aqueous solubility - an industry wide problem in drug delivery. **Am. Pharm. Rev.**, v. 5, p. 82-5, 2002.

LYRA, M.A.M., SOARES-SOBRINHO, J.L., FIGUEIREDO, R.C.B.Q., SANDES, J.M., LIMA, A.A.M., TENÓRIO, R.P., FONTES, D.A.F., SANTOS, F.L.A., ROLIM, L.A., ROLIM-NETO, P.J. Study of benznidazole–cyclodextrin inclusion complexes, cytotoxicity and trypanocidal activity, **Journal of inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 73, p.397-404, 2012.

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.

LUO, C., SUN, J., DU, Y., e HE, Z., Emerging integrated nanohybrid drug delivery systems to facilitate the intravenous-to-oral switch in cancer chemotherapy. **J Control Release**, 176. 94-103, 2014.

MANARIN, R.; LAMAS, M. C.; BOTTASSO, E.; SERRA, E.; REVELLI, S., & SALOMÓN, C. J. Efficacy of novel benznidazole solutions during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi.* **Parasitology international**, v. 62, n. 1, p. 79-81, 2013.

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.

MENDES, C.; SILVA, M. A S.; OLIVEIRA P. R. Emprego de estratégias para a melhoria das propriedades biofarmacêuticas da hidroclorotiazida e norfloxacino: formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – **Universidade Federal de Santa Catarina**, Centro de Ciências da Saúde. Florianópolis, SC, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomídeos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim Epidemiológico** [Internet] v. 50, 1-10, 2019.

MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **J. Immunol. Methods**. v. 65, p.55-63, 1983.

NETO, J. T.; SILVA, A. L. L.; MENDES, D. N.; NUNES, D. S. G. Validação de métodos bioanalíticos. In: VIEIRA, F. P.; REDIGUIERI, C. F.; REDIGUIERI, C. F. A regulação de medicamentos no Brasil. Porto Alegre: **Artmed**, cap. 25, p. 456-485, 2013.

NEUHOFF, S.; UNGEL, A. L.; ZAMORA, I. ARTURSSON, P. pH dependente passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 monolayers. **Eur. J. Pharm. Sci**. v. 25, n 2-3, p. 211-220, 2005.

OLIVEIRA, C. de L. Teste de dissolução: conceitos, aplicações e relevãncia no desenvolvimento e controle de qualidade de medicamentos, 2019. (Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública), **Instituto Adolfo Lutz,** Secretaria de Estado de Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças. São Paulo, SP, 2019.

PALACE-BERL, F. et al. Designing and exploring active N'-[(5-nitrofuran-2-yl) methylene] substituted hydrazides against three Trypanosoma cruzi strains more prevalent in Chagas disease patients. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 96, p. 330–339, 2015.

PALACE-BERL, F. et al. Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofuran-2-yl) methylene] substituted hydrazides against Trypanosoma cruzi to design novel active compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 144, p. 29–40, 2018.

PASSIFURIL: nifuroxazida. Millet Roux, 2014. Bula de medicamento. Acessado em 21 de janeiro de 2021. Endereço: https://www.bulas.med.br/p/bulas-de-medicamentos/bula/3288/passifuril.htm.

PINTO, M. Enterocite-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. **Biol. Cell**, v. 47, p. 323-330, 1983.

PITTELLA, J. E. H. O processo de avaliação em ciência e a indicação de Carlos Chagas ao prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 1, p. 67-72, 2009.

POLLI, J. W.; WRING, S. A.; HUMPHREYS, J. E.; HUANG, L.; MORGAN, J. B.; WEBSTER, L. O., SERABJIT-SINGH, CS. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. **J Pharmacol Exp Ther**. v.299, p.620 – 628, 2001.

RAETHER, W.; HANEL, H.; Nitroheterociclic drugs with broad spectrum activity. Parasitolol. **Res. New York**, vol. 90 (S.1), S 19-39, 2003.

RANDO, D. C.; SATO, D. N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C. Q. F.; AMARAL, A. T.; FERREIRA, E. I.; TAVARES, L. C.; Potential Tuberculostatic Agents. Topliss Aplication on Benzoic acid {(5-Nitro-thiophen-2-yl)-methyne}-hidrazine series. ***Bioorg. Med. Chem***., Oxford, v. 10, p. 557- 560, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 4ª ed., Guanabara Koogan, 2004.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. **Guanabara Koogan**, 2008.

RIBEIRO, V. A. O. Tratamento farmacológico da Doença de Chagas e suas perspectivas, [Monografia]. **Universidade de Brasília**, (DF), 59p. 2017.

ROJAS, A.; VINHÃES, M.; RODRIGUÉZ, M.; MONROY, J.; PERSAUD, N.; AZNAR, C.; NÁQUIRA, C.; HIWAT, H.; BENITEZ, J., Reunião internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia. Implementação da iniciativa Intergovernamental da Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia, **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, São Paulo, vol. 38, p. 82-89, 2005.

SCHMIDT, E.; KELLY, SM; VAN DER WALLE, CF Modulação de junção rígida e caracterização bioquímica dos terminais C e N da toxina de zônula oclusiva. **Cartas FEBS**, v. 581, n. 16, p. 2974-2980, 2007.

SERAJUDDIN, A.T. Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. **J. Pharm. Sci.**, v. 88, p. 1058-66, 1999.

SILVA, et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.

SILVA NETO, A. L. da. Compostos 5-nitro-2-furfurilidênicos com atividade frente à micro-organismos multirresistentes Planejamento, síntese, e avaliação da atividade antimicrobiana. 2016. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2017.

SOBRINHO, J. L. S.; FONTES, D. A. F.; DE LYRA, M. A. M.; SOARES, M. F. D. L. R.; NETO, P. J. R. Doença de Chagas: 100 anos de descoberta. **Rev. Bras. Farm**, v. 90, n. 4, p. 283-289, 2009.

SOBRINHO, José Lamartine Soares et al. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

SONG, C. M.; LIMAND, S. J.; TONG, J. C. Recent advances in computeraided drug design. **Brienfings in Bioinformatics**. v. 10, n. 5, p. 579-591, 2009.

SOUZA, J. DE; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. Modelos *in vitro* para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. RBCF, ***Rev. Bras. Cienc. Farm**. (**Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**),* [online], v.43, n.4, p.515-527. ISSN 1516-9332, 2007.

SOUZA, M. I. F. de. Síntese de novos derivados da Nitrofurantoína e avaliação de suas atividades biológicas. **Universidade Federal de Pernambuco**. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas 2011.

SOUZA, P. C. T. De; CONSIGLIERI, V. O. Padronização de novo método ex vivo para avaliação da permeabilidade intestinal de fármacos utilizando epitélio intestinal de rã-touro (Rana catesbeiana): comparação com células Caco-2. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2014.

STORPIRTIS, S., et al. "Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos." **RBCF**. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. v. 35, n. 1, p. 1-16, 1999.

Sun, D., Lennernas, H., Welage, L.S. *et al.* Comparison of Human Duodenum and Caco-2 Gene Expression Profiles for 12,000 Gene Sequences Tags and Correlation with Permeability of 26 Drugs. *Pharm Res* **19,** 1400–1416 (2002).

SWEETMAN, S. C. Ed. *Martindale*. The complete drug reference. 33. ed. **Chicago: Pharmaceutical Press**, p. 2768, 2002.

TAKAHASHI, A.I., VEIGA, F.B., FERRAZ, H.G. A literature review of cyclodextrins inclusion complexes characterization - Part I: phase solubility diagram, dissolution and scanning electron microscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.12, n.1, p.1-6, 2012.

TAVARES, L. C. Relações Quantitativas entre Estrutura Química e Atividade Antimicrobiana de Análogos à Nifuroxazida. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da **Universidade de São Paulo**, São Paulo, p. 89-90, 1993.

TAVARES, L. C.; CHISTÉ, J. J.; SANTOS, M. G. B.; PENNA, T. C. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. II, ***Boll. Chim. Farm***. **Milano**, v. 138, n. 8, p. 432-436, 1999.

TAVARES, L. C.; PENNA, T. V. C.; AMARAL, A. T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. **Boll. Chim. Farm. Milano**, v. 136, n.3, p.244-249, 1997.

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. 238-241, 2010.

THANKI, K., GANGWAL, R.P., SANGAMWAR, A.T., e JAIN, S., Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities. **J. Control. Release**, v.170, p.15-40, 2013.

TOCHER, J. H., Reductive activation of Nitriheterociclic Compounds, **Gen. *Pharmac.*** *Oxford*, vol. 28 (4), p. 485-487, 1997.

UCHÔA, F.D.T.; COSTA, T. D. Farmacocinética aplicada aos ensaios pré-clínicos. In: STORPIRTIS, S. et al. Farmacocinética básica e aplicada. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1ª ed. cap. 12, p. 85-93, 2011.

VERHOECKX, K., COTTER**,** P., LÓPEZ-EXPÓSITO, I., KLEIVELAND, C., LEA, T., MACKIE, A., REQUENA, T., SWIATECKA, D., WICHERS, H. (Ed.) The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. **Springer**, 2015.

WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modeling: towards prediction paradise? **Nature**, v. 2, p. 192-204, 2003.

WESTERHUIS, J. A.; KOURTI, T.; MACGREGOR J. F. Analysis of multiblock and hierarchical pca and pl models. **J. Chemometrics**, v.12, p. 301-321, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (**WHO**), Chagas Disease. 2021. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis).Acesso em abril de 2021.

YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. In silico Aproaches for Predicting ADME Properties of Drugs. **Drug Metab. Pharmacokin**., v. 10, n. 5, p. 327-338, 2004.

YEE, S. *In vitro* Permeability Across Caco-2 Cell (Colonic) Can Predict *In Vivo* (Small Intestinal) Absorption in Man – Fact or Myth. **Pharmaceutical Research** , v. 14, n. 6, p. 763-766, 1997.