

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ISABELLA CAMPOLINA PIEROTTE**

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE DERIVADOS  
TIAZOLILHIDRAZONA E TIAZOLILHIDRAZINA COM ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA**

Belo Horizonte

2022

ISABELLA CAMPOLINA PIEROTTE

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE DERIVADOS  
TIAZOLILHIDRAZONA E TIAZOLILHIDRAZINA COM ATIVIDADE  
ANTIFÚNGICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Isabela da Costa César - UFMG

Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves

Coorientadora: Profa. Dr. Renata Barbosa de Oliveira

Belo Horizonte

2022

P619a Pierotte, Isabella Campolina.  
Avaliação da permeabilidade intestinal de derivados tiazolilhidrazona e tiazolilhidrazina com atividade antifúngica [recurso eletrônico] / Isabella Campolina Pierotte. – 2022.  
1 recurso eletrônico (105 f. : il.) : pdf

Orientadora: Isabela da Costa César.  
Coorientador: José Eduardo Gonçalves.  
Coorientadora: Renata Barbosa de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Antifúngicos – Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 3. Permeabilidade – Teses. 4. Células CACO-2 – Teses. I. César, Isabela da Costa. II. Gonçalves, José Eduardo. III. Oliveira, Renata Barbosa de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

## FOLHA DE APROVAÇÃO

“AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE DERIVADOS TIAZOLILHIDRAZONA E TIAZOLILHIDRAZINA COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA”

**ISABELLA CAMPOLINA PIEROTTE**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Comissão

Dr. Luan Farinelli Diniz  
Eurofarma Laboratórios S/A

Prof. Dr. Christian Fernandes  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Isabela da Costa César - Orientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira - Coorientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves - Coorientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Barbosa de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luan Farinelli Diniz, Usuário Externo**, em



20/12/2022, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Isabela da Costa Cesar, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Jose Eduardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2022, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1957364** e o código CRC **6E0DD00C**.

---

## AGRADECIMENTOS

Sempre pensei bastante sobre o que escreveria para agradecer a cada um que, à sua maneira, me ajudou a chegar até aqui. Queria ser poética, escrever de maneira impactante, mas não tenho essa característica. De toda forma, espero que esta mensagem atinja de forma bem especial às pessoas que fizeram parte de tudo isso.

Agradeço aos meus pais, Marilda e Peu, por serem meu alicerce desde que eu me entendo por gente. Por dedicarem a vida à educação dos filhos. Por serem pessoas honestas, justas, divertidas e amorosas (dentre tantos outros adjetivos que poderia encher essa página inteira). Por serem o meu maior e melhor exemplo do que quero ser quando eu crescer (hahaha). Obrigada, meus amados pais, por absolutamente tudo. Amo vocês com todo meu coração.

Aos meus irmãos, Daniel e Mariana, por serem meu segundo maior exemplo de vida. Por serem pessoas íntegras, maravilhosas, queridas e bondosas. Quanta alegria eu sinto em ter vocês como irmãos. Mariana, te agradeço especialmente pelas palavras que me disse em um momento muito difícil para mim (você sabe qual rsrs). Obrigada, obrigada e obrigada mais uma vez.

Ao Felipe, meu companheiro de longa data, te agradeço por tanta coisa que acho que você nem imagina. Obrigada por enfrentar os obstáculos dessa vida ao meu lado, me apoiando, me erguendo e me sustentando em tantos momentos. Obrigada por fazer tanto por mim. Amo você.

À minha querida orientadora, professora Isabela, agradeço por tanto empenho em tudo o que faz, você é inspiração não só de profissional, mas acho que principalmente de ser humano. Obrigada pela orientação, pelo apoio, pela compreensão, pela paciência e pela oportunidade. De coração.

Aos meus co-orientadores, professora Renata e professor José Eduardo, agradeço muito por terem aceitado participar de tudo isso também. À Renata, obrigada por ter me recebido tão bem no Laboratório de Química Farmacêutica quando precisei, por ter me apresentado alunos queridos, e por ter contribuído de maneira enriquecedora neste trabalho. Ao José Eduardo, agradeço por

nunca ter medido esforços para fazer este trabalho acontecer, por ter me ajudado tanto (mesmo), por ter aceitado me ajudar nos ensaios com as células até aos sábados e por ser inspiração quando o assunto é paixão pelo que faz.

Agradeço aos alunos que conheci ao longo deste projeto; Valtair, que tem participação especial com os estudos *in silico*, muito obrigada por tudo mesmo. Rafael, por ter me confortado em alguns momentos e me ajudado no início do projeto com as células. Aos alunos de iniciação científica, Pedro e Gabriel, pela ajuda com o cultivo de células, que é uma parte muito trabalhosa deste projeto.

Obrigada a todos os professores que tive até hoje nesta vida. Vocês são inspirações, pois sei que não é muito fácil diante do contexto do nosso país. Agradeço especialmente aos professores da Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, tive a oportunidade de fazer matérias muito incríveis e tenho muita admiração por vocês.

Aos professores e colaboradores do Laboratório de Controle de Qualidade, meu muito obrigada também. Especialmente à Naialy e ao Mateus que já me socorreram com os cromatógrafos e à professora Cristina que em um dia especialmente difícil, apareceu no laboratório à noite com um lanchinho para mim, um gesto que me tocou bastante.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo da vida. Aos que estão presentes desde criança, aos que conheci ao longo da graduação, por quem tenho um carinho imenso e muito especial, aos que me ajudaram a passar por esta fase conturbada com mais serenidade e mais leveza... Aqui cito o Felipe e a Yamara, amigos da graduação e que seguiram comigo no mestrado também. Obrigada, amigos queridos, pelos desabafos, pelo apoio, pelos conselhos. Vocês são pessoas muito especiais. Foi um pouco mais fácil lidar com tudo isso com vocês ao meu lado.

Tenho muito mais agradecimento a fazer, mas esse texto ficaria enorme. Esses últimos anos não foram muito fáceis, conciliar mestrado com o trabalho foi especialmente difícil. Por fim, agradeço então à Deus, por ter me sustentado e não deixado eu desistir mesmo quando tudo pareceu difícil demais.

*“Eu me lembrava de que o mundo real era vasto, e que uma quantidade enorme de esperanças e medos, de sensações e emoções, estava à espera daqueles que ousassem sair por ele afora, buscando, em meio a seus perigos, o verdadeiro conhecimento do que é a vida.”*

Jane Eyre

*“Quem elegeu a busca não pode recusar a travessia.”*

João Guimarães Rosa



## RESUMO

Infecções fúngicas são graves problemas de saúde pública mundial devido às altas taxas de morbidade e mortalidade. O arsenal de medicamentos antifúngicos é pequeno e apresenta diversas limitações, como alta toxicidade, baixa biodisponibilidade oral e espectro antifúngico limitado. Além disso, o surgimento de resistência fúngica e de espécies altamente patogênicas torna a situação ainda mais crítica e aumenta a demanda pela descoberta de novos fármacos. Diante desse cenário, o grupo de pesquisa do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais sintetizou uma série de derivados tiazolilhidrazonas e tiazolilhidrazinas, sendo que, dentre eles, duas substâncias se destacaram por apresentarem elevada atividade antifúngica contra diversos fungos, incluindo a espécie multirresistente *Candida auris*. Diante disso, este trabalho teve como objetivo a avaliação da permeabilidade intestinal da tiazolilhidrazina PD76 e da tiazolilhidrazona RJ44, por meio de método *in silico*, que correlaciona propriedades físico-químicas das moléculas com suas características farmacocinéticas e toxicológicas, e ensaios *in vitro*, utilizando a linhagem de células Caco-2. A quantificação das substâncias foi realizada por cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), com métodos validados conforme RDC nº 27/2012 da ANVISA. A citotoxicidade das substâncias foi analisada empregando-se o método de MTT e os resultados indicam viabilidade celular acima de 70% nas concentrações estudadas. PD76 apresentou coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) de  $5,25 \times 10^{-6}$  cm/s, enquanto RJ44 apresentou  $P_{app}$  de  $1,48 \times 10^{-6}$  cm/s, ambos os resultados indicando que as substâncias possuem permeabilidade intestinal moderada. Além disso, a avaliação da permeabilidade intestinal utilizando verapamil, um inibidor da glicoproteína-P, indicou que o mecanismo de efluxo mediado por esse transportador é significativo no processo de permeação do RJ44 e do PD76. Os resultados são promissores e encorajam a continuidade dos estudos com estes potenciais candidatos a fármacos antifúngicos.

Palavras-chave: tiazolilhidrazonas; tiazolilhidrazinas; cromatografia a líquido de alta eficiência; antifúngico; permeabilidade *in vitro*; permeabilidade *in silico*; células Caco-2.

## ABSTRACT

Fungal infections are serious public health problem worldwide due to the high rates of morbidity and mortality. The arsenal of antifungal drugs is small and has several limitations, such as high toxicity, low oral bioavailability and limited antifungal spectrum. In addition, the emergence of fungal resistance and highly pathogenic species makes the situation even more critical and increases the demand for the discovery of new drugs. Given this scenario, the research group of *Laboratório de Química Farmacêutica* from *Universidade Federal de Minas Gerais* synthesized a series of thiazolyldrazone and thiazolyldrazine derivatives, and among them, two substances stood out for presenting high antifungal activity against several fungi, including the multidrug resistant species *Candida auris*. Therefore, this work aimed to evaluate the intestinal permeability of the thiazolyldrazine PD76 and thiazolyldrazone RJ44, by means of an *in silico* method, which correlates physicochemical properties of the molecules with their pharmacokinetic and toxicological characteristics, and *in vitro* assays, using the Caco-2 cell line. The quantification of the substances was performed by high performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD), with methods validated according to RDC nº 27/2012 from ANVISA. The cytotoxicity of the substances was analyzed using the MTT method and the results indicate cell viability above 70% at the studied concentrations. PD76 showed an apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) of  $5.25 \times 10^{-6}$  cm/s, while RJ44 showed a  $P_{app}$  of  $1.48 \times 10^{-6}$  cm/s, both results indicating that the substances have moderate intestinal permeability. Furthermore, the evaluation of intestinal permeability using verapamil, a P-glycoprotein inhibitor, indicated that the efflux mechanism mediated by this transporter is significant in the RJ44 and PD76 permeation process. The results are promising and encourage the continuity of studies with these potential candidates for antifungal drugs.

Keywords: thiazolyldrazones; thiazolyldrazines; high performance liquid chromatography; antifungal; *in vitro* permeability; *in silico* permeability; Caco-2 cells.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução dos medicamentos antifúngicos.....	24
Figura 2 – Estrutura dos principais agentes antifúngicos com ação sistêmica utilizados na clínica.....	27
Figura 3 – Estrutura do candidato a fármaco RI76.....	28
Figura 4 – Esquema representativo da síntese do candidato a fármaco RI76.....	30
Figura 5 – Estrutura do produto de degradação obtido nos estudos de degradação forçada.....	31
Figura 6 – Mecanismo proposto para formação da substância PD76.....	32
Figura 7 – Estrutura do derivado tiazolilhidrazona RJ44.....	34
Figura 8 – Esquema de síntese do RJ44.....	35
Figura 9 – Principais mecanismos de transporte celular por meio do epitélio intestinal.	37
Figura 10 – Representação do esquema do suporte de cultivo de células Caco-2.....	40
Figura 11 – Esquema da reação de redução do composto MTT (amarelo) em Formazan (púrpura).....	43
Figura 12 – Espectro de absorção na região do infravermelho para RI76.....	65
Figura 13 – Espectro de absorção na região do infravermelho para PD76.....	66
Figura 14 – Espectro de absorção na região do infravermelho para RJ44.....	67
Figura 15 – Cromatograma do RI76.....	69
Figura 16 – Cromatograma do PD76.....	70
Figura 17 – Cromatograma do RJ44 .....	70
Figura 18 – Cromatogramas sobrepostos de RI76 obtidos em estudo de estabilidade nas condições do estudo de permeabilidade.....	72
Figura 19 – Cromatograma da solução branco (Hanks, etanol e DMSO) analisada pelo método desenvolvido para PD76.....	74
Figura 20 – Cromatograma do PD76 no LIQ analisada pelo método desenvolvido.....	74
Figura 21 – Cromatograma da solução branco (Hanks, etanol e DMSO) analisada pelo método desenvolvido para RJ44.....	75
Figura 22 – Cromatograma do RJ44 no LIQ analisada pelo método desenvolvido.....	75
Figura 23 – Cromatograma da solução branco antes da injeção do LSQ de PD76.....	76
Figura 24 – Cromatograma da solução branco após a injeção do LSQ de PD76.....	76
Figura 25 – Cromatograma da solução branco antes da injeção do LSQ de RJ44.....	77
Figura 26 – Cromatograma da solução branco após a injeção do LSQ de RJ44.....	77
Figura 27 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto PD76 em tampão Hanks.....	78

Figura 28 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto RJ44 em tampão Hanks.....	78
Figura 29 – Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após exposição a diferentes concentrações de PD76 durante 12 horas.....	83
Figura 30 – Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após exposição a diferentes concentrações de RJ44 durante 12 horas.....	83
Figura 31 – Fração média (n = 3) permeada de PD76 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido apical-basolateral.....	85
Figura 32 – Fração média (n = 3) permeada de PD76 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido basolateral-apical.....	85
Figura 33 – Fração média (n = 3) permeada de RJ44 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido apical-basolateral.....	86
Figura 34 – Fração média (n = 3) permeada de RJ44 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido basolateral-apical.....	86
Figura 35 – Fração média (n = 3) permeada de PD76 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido apical-basolateral na presença de verapamil.....	88
Figura 36 – Fração média (n = 3) permeada de PD76 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido basolateral-apical na presença de verapamil.....	88
Figura 37 – Fração média (n = 3) permeada de RJ44 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido apical-basolateral na presença de verapamil.....	89
Figura 38 – Fração média (n = 3) permeada de RJ44 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido basolateral-apical na presença de verapamil.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{M}$ do RI76 em comparação ao fluconazol.....	29
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{M}$ do PD76 em comparação ao RI76 e aos fármacos utilizados como controles positivos.....	33
Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{M}$ da tiazolilhidrazona RJ44 contra espécies de fungos.....	34
Tabela 4 – Parâmetros cromatográficos do método de partida para o desenvolvimento de método bioanalítico por CLAE para quantificar RI76, PD76 e RJ44 em tampão Hanks.....	51
Tabela 5 – Preparo da curva de calibração e concentrações finais de PD76.....	55
Tabela 6 – Preparo da curva de calibração e concentrações finais de RJ44.....	56
Tabela 7 – Preparo das soluções para avaliação da precisão do método bioanalítico para quantificação de PD76.....	58
Tabela 8 – Preparo das soluções para avaliação da precisão do método bioanalítico para quantificação de RJ44.....	58
Tabela 9 – Correspondências estruturais das bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho do RI76.....	65
Tabela 10 – Correspondências estruturais das bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho do PD76.....	66
Tabela 11 – Correspondências estruturais das bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho do RJ44.....	67
Tabela 12 – Parâmetros cromatográficos do método bioanalítico por CLAE desenvolvido para quantificar RI76, PD76 e RJ44 em tampão Hanks.....	69
Tabela 13 - Estudo de estabilidade de ensaio de PD76.....	73
Tabela 14 - Estudo de estabilidade de ensaio de RJ44.....	73
Tabela 15 – Dados obtidos durante a construção das curvas de calibração para avaliação da linearidade do método desenvolvido para PD76.....	79
Tabela 16 – Dados obtidos durante a construção das curvas de calibração para avaliação da linearidade do método desenvolvido para RJ44.....	79
Tabela 17 – Valores de DPR obtidos para a precisão intracorrída ( $n=5$ para cada nível de concentração) e intercorrída ( $n=15$ para cada nível de concentração) para PD76.....	80
Tabela 18 – Valores de DPR obtidos para a precisão intracorrída ( $n=5$ para cada nível de concentração) e intercorrídas ( $n=15$ para cada nível de concentração) para RJ44....	81
Tabela 19 – Valores de EPR obtidos para a exatidão intracorrída ( $n=5$ para cada nível de concentração) e intercorrída ( $n=15$ para cada nível de concentração) para PD76.....	81
Tabela 20 - Valores de EPR obtidos para a exatidão intracorrída ( $n=5$ para cada nível de concentração) e intercorrída ( $n=15$ para cada nível de concentração) para RJ44.....	82

Tabela 21 – Valores médios de <i>P<sub>app</sub></i> de PD76 e RJ44 obtidos no experimento de permeabilidade em células Caco-2.....	<b>87</b>
Tabela 22 – Valores médios de <i>P<sub>app</sub></i> de PD76 e RJ44 obtidos no experimento de permeabilidade em células Caco-2 na presença de verapamil.....	<b>90</b>
Tabela 23 – Valores de razão <i>P<sub>app</sub></i> B-A/A-B de PD76 e RJ44 obtidos no experimento de permeabilidade em células Caco-2.....	<b>90</b>
Tabela 24 – Parâmetros preditos pelos servidores ADMETlab e AdmetSAR para os compostos estudados.....	<b>92</b>

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Desvio Padrão Relativo.....	<b>59</b>
Equação 2 – Erro Padrão Relativo.....	<b>59</b>
Equação 3 – Permeabilidade aparente.....	<b>63</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitros
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetros
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American type culture collection</i>
C18	Sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano
CAM	Solução de molibdato cérico de amônio 3
CCD	Cromatografia em camada delgada
$\text{cel/cm}^2$	Células por centímetro quadrado
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
Cm	Centímetro
$\text{cm}^2$	Centímetro quadrado
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio Padrão Relativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FDA	<i>Food and drug administration</i>
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>



LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
Mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
PAMPA	<i>Parallel artificial membrane permeability</i>
Papp	Permeabilidade aparente
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de acidez
$r^2$	Coeficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rpm	Rotação por minuto
SQR	Substância Química de Referência
TR	Tempo de retenção
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV-Vis	Ultravioleta-visível
WHO	<i>World Health Organization</i>
$\Omega$	Ômega
°C	Grau <i>celsius</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
2.1 Infecções fúngicas.....	20
2.2 Agentes antifúngicos.....	23
2.3 Derivados tiazolilhidrazonas e tiazolilhidrazinas com atividade antifúngica.....	28
2.4 Estudos de permeabilidade intestinal.....	35
2.5 Células Caco-2 em ensaios de permeabilidade <i>in vitro</i> .....	38
2.6 Ensaio para determinação da viabilidade das células Caco-2 pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).....	41
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>44</b>
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Materiais.....	45
4.1.1 Substâncias Químicas de Referência (SQR).....	45
4.1.2 Amostras, reagentes e solventes.....	45
4.1.3 Coluna cromatográfica.....	46
4.1.4 Acessórios e vidrarias.....	46
4.1.5 Equipamentos.....	46
4.2 Métodos.....	47
4.2.1 Síntese e caracterização de RI76.....	47
4.2.2 Síntese e caracterização de PD76.....	49
4.2.3 Síntese e caracterização de RJ44.....	49
4.2.4 Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos por	

<b>CLAE-DAD para quantificação de RI76, PD76 e RJ44 em matriz proveniente de cultivo celular.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.5 Validação dos métodos bioanalíticos.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.5.1 Estabilidade dos analitos em matriz biológica.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.5.2 Seletividade.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.5.3 Efeito residual.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.5.4 Curva de calibração.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.5.5 Limite de quantificação.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.5.6 Precisão.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.5.7 Exatidão.....</b>	<b>59</b>
<b>4.2.6 Cultivo da linhagem de células Caco-2.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.7 Ensaio para determinação da viabilidade celular.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.8 Estudo de permeabilidade <i>in vitro</i> de PD76 e RJ44.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2.9 Estudo de permeabilidade <i>in silico</i> de PD76 e RJ44.....</b>	<b>64</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Síntese de RI76, PD76 e RJ44.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2 Desenvolvimento de métodos bioanalíticos por CLAE-DAD para quantificação de RI76, PD76 e RJ44 em matriz proveniente de cultivo celular.....</b>	<b>68</b>
<b>5.3 Validação dos métodos bioanalíticos.....</b>	<b>70</b>
<b>5.3.1 Estabilidade dos analitos em matriz biológica.....</b>	<b>70</b>
<b>5.3.2 Seletividade.....</b>	<b>74</b>
<b>5.3.3 Efeito residual.....</b>	<b>75</b>
<b>5.3.4 Curva de calibração.....</b>	<b>77</b>
<b>5.3.5 Limite de quantificação.....</b>	<b>80</b>
<b>5.3.6 Precisão.....</b>	<b>80</b>
<b>5.3.7 Exatidão.....</b>	<b>81</b>
<b>5.4 Ensaio para determinação da viabilidade celular.....</b>	<b>82</b>

<b>5.5 Estudo de permeabilidade <i>in vitro</i> de PD76 e RJ44.....</b>	<b>84</b>
<b>5.6 Estudo de permeabilidade <i>in silico</i> de PD76 e RJ44.....</b>	<b>91</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas se constituem de grave problema de saúde pública, acometendo milhões de pessoas por ano e possuindo elevada taxa de mortalidade. Estima-se que pelo menos 1,5 milhão de pessoas vão a óbito anualmente devido às infecções fúngicas invasivas. Pacientes imunocomprometidos, como os portadores do vírus HIV, idosos ou os portadores de outras doenças imunossupressoras, como o câncer, são os mais afetados por essas infecções e também estão entre a maior proporção de óbitos (BROWN *et al.*, 2012; CASADEVALL, 2018).

Essas infecções podem ser de dois tipos: as superficiais, que possuem alta incidência na população e normalmente acometem pele, unha e cabelo, além de serem mais facilmente diagnosticadas e tratadas com medicamentos já disponíveis na prática clínica; ou as invasivas, que são causadas por espécies com maior patogenicidade, além de possuírem dificuldade de diagnóstico e um tratamento demorado, que muitas vezes não é completamente eficaz (BONGOMIN *et al.*, 2017; BROWN *et al.*, 2012).

Dentre as infecções fúngicas invasivas mais comuns, pode-se destacar a criptococose, que acomete aproximadamente 1 milhão de pessoas por ano e possui uma taxa de mortalidade que pode chegar a 70% dentre os infectados, e a aspergilose, doença que atinge mais de 300 mil pessoas por ano, com uma taxa de mortalidade de até 95% dentre os infectados (BONGOMIN *et al.*, 2017; BROWN *et al.*, 2012).

Somado às altas taxas de morbidade e mortalidade referentes às infecções fúngicas, outros graves fatores, cada vez mais recorrentes dentro deste cenário, é a resistência fúngica e o surgimento de espécies ainda mais patogênicas. A ocorrência de surtos de infecções causados pelo fungo *Candida auris* em unidades de terapia intensiva é um exemplo de resistência fúngica, uma vez que esse microrganismo apresenta alta resistência aos agentes antifúngicos disponíveis na clínica (LAMOTH; KONTOYIANNIS, 2018).

Além disso, outra questão que trouxe à tona a criticidade das infecções fúngicas recentemente foram as infecções fúngicas invasivas associadas à

COVID-19, que se tornaram uma complicação grave em pacientes hospitalizados em estado crítico portadores da doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 (HOENIGL *et al.*, 2022).

Os tratamentos com fármacos antifúngicos também enfrentam diversas limitações. A falta de investimento em pesquisas na área e a negligência com que as infecções fúngicas são tratadas por alguns órgãos de saúde são alguns fatores responsáveis pela demora na descoberta de novos tratamentos e diagnósticos.

As principais classes de fármacos antifúngicos utilizadas na clínica são as equinocandinas, os azóis e os polienos. Algumas desvantagens observadas para diversos fármacos dessas classes são a alta toxicidade, a baixa biodisponibilidade oral, o restrito espectro antifúngico e, como consequência, a baixa eficácia no tratamento que pode favorecer o surgimento de espécies multirresistentes (ODDS *et al.*, 2003).

Diante do exposto, torna-se cada vez mais relevante o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos que apresentem melhores propriedades farmacocinéticas, com baixa toxicidade e que sejam mais eficazes. Nesse contexto, o grupo de pesquisa do Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sintetizou uma série de derivados tiazolilhidrazonas e tiazolilhidrazinas que foram testados quanto às suas atividades antifúngicas e citotoxicidade. Os resultados demonstraram que os derivados denominados RI76 e RJ44 são potenciais candidatos a fármacos, pois apresentaram atividade contra as principais espécies fúngicas causadoras de infecções, sendo que RJ44 apresentou atividade contra a espécie multirresistente *Candida auris*. Além disso, estes derivados apresentaram baixa toxicidade, podendo-se inferir que possuem bons perfis de segurança e eficácia (LINO, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Em um estudo prévio com o RI76, realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da UFMG, foi realizado um estudo de degradação forçada, e, como resultado, observou-se a formação de um produto de degradação comum na maioria das condições de estresse avaliadas, denominado PD76. Sua estrutura foi

elucidada e sua síntese realizada. Além disso, esta substância foi avaliada quanto à sua atividade antifúngica frente a sete diferentes espécies fúngicas, e os resultados indicaram significativo potencial terapêutico desta substância, maior do que a sua precursora, a RI76 (FRANCO, 2020).

A pesquisa por novas substâncias candidatas a fármacos demanda diversos estudos. Dentre eles, destacam-se o estudo de permeabilidade intestinal, realizado com a finalidade de predição da biodisponibilidade das substâncias administrados por via oral e, conseqüentemente, da sua atividade biológica.

Neste cenário, dentre as diversas possibilidades de estudos da permeabilidade intestinal, podem-se destacar os estudos *in silico*, que preveem a permeabilidade intestinal da molécula com base em suas características físico-químicas; os modelos *in vitro*, que utilizam cultivo celular, e são muito utilizados, principalmente com a linhagem de células Caco-2; os modelos *in situ*, que envolvem ensaios de perfusão em animais e em humanos e os modelos animais *in vivo*, que possuem custo elevado e esbarram em considerações éticas (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Os estudos *in silico* tornam mais eficaz a seleção de substâncias nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que fornecem importantes dados sobre a atividade biológica de substâncias com base em relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR, do inglês *Quantitative Structure - Activity Relationships*). Quando aliados aos estudos de permeabilidade *in vitro*, reduzem a probabilidade de sintetizar substâncias que não sejam absorvidas pelo organismo, favorecendo uma triagem mais eficaz (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Para a realização de ensaios de permeabilidade *in vitro*, são utilizadas membranas celulares que mimetizam de maneira bem similar os enterócitos presentes no intestino humano. A avaliação da citotoxicidade das substâncias frente a estas células é de fundamental importância para garantir a confiabilidade dos resultados. Dentre as aplicações destes estudos, pode-se destacar o fornecimento de informações sobre possíveis efeitos tóxicos das moléculas estudadas, reduzindo as chances de obtenção de resultados equivocados em estudos de permeabilidade, tendo em vista que possíveis

danos celulares e/ou morte celular podem acarretar em elevados valores de permeabilidade (BAHUGUNA *et al.*, 2017; BLANCHFIELD *et al.*, 2003; HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

Diante do exposto, torna-se relevante a avaliação da permeabilidade intestinal dos dois derivados PD76 e RJ44, que são potenciais candidatos a fármacos antifúngicos, bem como da sua citotoxicidade, a fim de contribuir com o desenvolvimento de novos antifúngicos mais eficazes e seguros.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Infecções fúngicas

A partir da década de 1950, quando a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) começaram a surgir, as taxas de incidência das infecções fúngicas tornaram-se muito elevadas na população de todo o mundo, devido à imunidade debilitada dos pacientes acometidos por essa infecção viral. Além disso, outras causas responsáveis pela baixa imunidade em pacientes, como os tratamentos oncológicos, as doenças autoimunes, os transplantes de órgãos e outras condições que são passíveis de uso de medicamentos imunossupressores, também favorecem a alta incidência e prevalência das infecções causadas por fungos (CASADEVALL, 2018; GARBER, 2001).

Há dois principais tipos de infecções fúngicas em humanos: as superficiais e as invasivas (BROWN *et al.*, 2012). Os dois tipos são causados principalmente por fungos denominados oportunistas, pois se instalam no organismo dos hospedeiros quando estes se encontram imunologicamente debilitados (D'ENFERT, 2009).

As infecções fúngicas superficiais possuem alta incidência na população mundial, embora normalmente sejam menos críticas e tratadas de maneira efetiva com medicamentos já disponíveis na prática clínica. Dentre as mais comuns, estão as infecções de pele, cabelo e unha, que afetam aproximadamente um bilhão de pessoas atualmente (BONGOMIN *et al.*, 2017; BROWN *et al.*, 2012; TYAGI, 2016; HAVLICKOVA; CZAIIKA; FRIEDRICH, 2008).

As infecções fúngicas superficiais das mucosas gastrintestinais e genitais também são comumente diagnosticadas. Fungos do gênero *Candida* spp. são responsáveis por causar a infecção fúngica genital mais incidente em mulheres, a candidíase, que pode chegar a acometer 75% das mulheres em pelo menos um episódio durante seus anos de vida (GARBER, 2001; SOBEL, 2007).

Já as infecções fúngicas invasivas são de difícil diagnóstico e tratamento, e, por esta razão, são responsáveis por uma elevada taxa de mortalidade, tendo em vista que aproximadamente 1,5 milhão de pessoas vão à óbito anualmente devido a essas infecções. Dentre as mais comuns, pode-se destacar a criptococose, uma infecção fúngica sistêmica, causada principalmente pela espécie *Cryptococcus neoformans*, que acomete mais de 1 milhão de pessoas por ano, e, dentre os infectados, a taxa de mortalidade é de 20 a 70% (BROWN *et al.*, 2012). Essa doença afeta de maneira majoritária as pessoas com HIV positivo e indivíduos com o sistema imunológico debilitado, além de ser a infecção do sistema nervoso central mais incidente em todo o mundo (GÓRALSKA; BLASZKOWSKA; DZIKOWIEC, 2018; MOLLOY *et al.*, 2017). Dentre as mortes relacionadas a AIDS, cerca de 20% são devido a criptococose (MOLLOY *et al.*, 2017).

Outras infecções fúngicas invasivas de grande impacto mundial são a aspergilose e a candidíase. A aspergilose é causada mais comumente pela espécie *Aspergillus fumigatus*, responsável por mais de 300 mil infecções por ano, sendo que, dentre os infectados, a taxa de mortalidade pode chegar a 95%. A candidíase, por sua vez, é causada majoritariamente pela espécie *Candida albicans*, e pode chegar a atingir aproximadamente 750 mil pessoas por ano (BONGOMIN *et al.*, 2017; BROWN *et al.*, 2012).

Atualmente, as doenças fúngicas apresentam uma taxa de mortalidade maior do que a malária e a tuberculose juntas. Somado a isso, um grande fator limitante dos tratamentos contra esses microrganismos e que piora ainda mais este cenário, é o surgimento da resistência fúngica e, conseqüentemente, o aparecimento de fungos altamente patogênicos (DELARZE; SANGULARD, 2015). Dentre os fatores que podem justificar o aparecimento cada vez mais frequente desses casos, destacam-se o elevado tempo de tratamento dessas infecções até a cura, podendo durar vários meses, e a falta de medicamentos antifúngicos realmente eficazes, com formulações adequadas e alta biodisponibilidade nos tecidos-alvo (BROWN *et al.*, 2012).

A ocorrência de surtos de infecções causadas pelo fungo *Candida auris* em unidades de terapia intensiva é um exemplo do problema acerca do surgimento

de resistência fúngica, uma vez que esse microrganismo apresenta alta resistência aos agentes antifúngicos disponíveis na clínica (LAMOTH; KONTOYIANNIS, 2018). A *Candida auris* foi relatada pela primeira vez no Japão em 2009 e já foi identificada em mais de 45 países, incluindo mais de 1700 casos clínicos confirmados (RYBAK; CUOMO; ROGERS, 2022). Este fungo representa uma ameaça à saúde global, uma vez que pode ocasionar graves infecções invasivas resistentes às três principais classes de fármacos antifúngicos e, conseqüentemente, apresentar uma alta taxa de mortalidade. O combate à *Candida auris* é dificultado, uma vez que há carência de métodos rápidos e eficazes para a detecção precoce dessas infecções, favorecendo, desse modo, a transmissão da doença (ANVISA, 2017).

Outra questão que trouxe à tona a criticidade das infecções fúngicas recentemente foram as infecções fúngicas invasivas associadas à COVID-19, que se tornaram uma complicação grave em pacientes hospitalizados em estado crítico acometidos pelo vírus SARS-CoV-2. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* spp., *Mucorales* spp. e *Candida* spp. são os principais patógenos responsáveis por estas coinfeções da COVID-19, sendo elas a aspergilose, mucormicose e candidíase, respectivamente. Fatores de risco comuns em pacientes hospitalizados com COVID-19 incluem o uso de cateteres venosos, antimicrobianos e corticosteroides, que favorecem o surgimento destas coinfeções (HOENIGL *et al.*, 2022).

A aspergilose pulmonar associada à forma grave da COVID-19 foi relatada pela primeira vez em 2021 e, desde então, diversos estudos destacaram que essa infecção secundária é potencialmente fatal, estimando taxas de mortalidade de mais de 40%. Já a mucormicose associada à COVID-19 ganhou atenção mundial durante a segunda onda da pandemia na Índia, no início de 2021. Entre maio e agosto deste mesmo ano, 47.500 casos desta doença foram relatados pelo governo indiano. Esta infecção é uma doença necrosante e ocorre frequentemente na região dos olhos e nariz, requerendo, em muitos casos, cirurgias agressivas que resultam em desfiguração. Por fim, a candidíase invasiva em pacientes com COVID-19 internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) foi relatada logo após o surgimento do SARS-CoV-2.

Esta doença torna-se ainda mais preocupante quando causada pela *Candida auris*, devido aos motivos supracitados (HOENIGL *et al.*, 2022).

Dessa forma, diante de todo o exposto sobre infecções fúngicas, outro fator preocupante relacionado a esse grave problema de saúde pública que afeta milhões de indivíduos em todo mundo é que, muitas vezes, ele é extremamente negligenciado pelos órgãos de saúde mundiais. Os recursos destinados para pesquisa nessa área são reduzidos em comparação com o investimento em pesquisas sobre outras doenças infecciosas, como as causadas por bactérias, o que torna o quadro ainda mais crítico (RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018).

## 2.2 Agentes antifúngicos

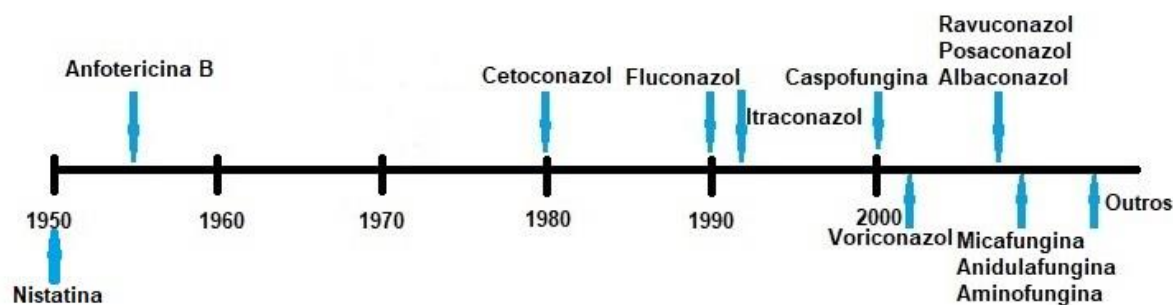
Os fungos são organismos eucarióticos que possuem um grau de similaridade elevado com os humanos. Esse fato é um dos motivos que levam a uma dificuldade em desenvolver medicamentos antifúngicos com baixa toxicidade, uma vez que há poucos alvos diferenciais entre esses dois organismos (DENNING; HOPE, 2010).

Normalmente, a maior parte dos fármacos presentes nos medicamentos antifúngicos utilizados na clínica possui como alvo de ação o esterol presente na membrana plasmática dos fungos, chamado de ergosterol. A grande diferença entre o ergosterol, presente na membrana dos fungos, para o colesterol, que é o esterol presente nas células dos mamíferos, consiste na estrutura da molécula. O ergosterol possui conformação cilíndrica, enquanto o colesterol apresenta-se sob forma sigmoide (ODDS *et al.*, 2003).

Como se pode observar na **Figura 1**, na qual está representada a linha do tempo referente ao desenvolvimento de agentes antifúngicos, o primeiro fármaco descoberto foi a nistatina, com aplicação tópica, no início da década de 1950. Na mesma década, foi desenvolvida a anfotericina B. Ambas fazem parte da classe dos polienos e possuem ação fungicida, uma vez que se ligam ao ergosterol da membrana fúngica, causando uma desestabilização e

posterior vazamento do conteúdo intracelular, levando a morte do fungo (DENNING; HOPE, 2010; ODDS *et al.*, 2003).

**Figura 1 – Evolução dos medicamentos antifúngicos**



Fonte: adaptado de Moreira, 2010.

Embora a anfotericina B tenha um amplo espectro de ação contra fungos, fato que justifica o seu uso comum na clínica, um ponto negativo sobre esse fármaco é a sua alta toxicidade, observada principalmente nos rins. Essa toxicidade pode ser explicada pela baixa seletividade do fármaco em se ligar apenas ao esterol presente nas células fúngicas, uma vez que ele também se liga ao colesterol das células de mamíferos, promovendo sua lise. Na década de 90, foram desenvolvidas formulações lipídicas da anfotericina B, que reduziram a nefrotoxicidade do fármaco (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2012; ODDS *et al.*, 2003).

Atualmente, a anfotericina B ainda é utilizada como primeira opção em algumas patologias causadas por fungos. Entretanto, diante de um cenário crescente de casos de infecções fúngicas oportunistas, proporcionado pela epidemia da infecção pelo HIV, e considerando a toxicidade apresentada pela anfotericina B, na década de 1990 foram desenvolvidos e lançados no mercado os azóis de primeira geração com ação sistêmica, como o fluconazol e o itraconazol (ARNOLD *et al.*, 2010).

Os azóis possuem como sítio de ação o bloqueio da biossíntese do ergosterol presente na membrana celular dos fungos. Esse bloqueio causa a ausência desse esterol nas células fúngicas e, portanto, o acúmulo de outras substâncias lipídicas, como os 14- $\alpha$ -metilesteróis, que é responsável por formar uma membrana fúngica com propriedades alteradas e com fluidez reduzida. Tal mecanismo impede que o microrganismo se replique e realize atividades essenciais para sua sobrevivência, acarretando sua morte (ARNOLD *et al.*, 2010; ODDS *et al.*, 2003; WHITE *et al.*, 1998).

Normalmente, os azóis são bem tolerados pelos pacientes, embora apresentem alguns efeitos adversos, como distúrbios gastrintestinais e hepatotoxicidade. São comumente relatadas interações medicamentosas com o uso dos azóis, uma vez que estes são metabolizados pelas enzimas do citocromo P450 (CYP450), responsável pela metabolização da maioria dos xenobióticos (ARNOLD *et al.*, 2010).

Após os anos 2000, foram lançados comercialmente os azóis de segunda geração e as equinocandinas. Em comparação com os primeiros fármacos azólicos, os azóis de segunda geração, como o posaconazol, o voriconazol e o ravuconazol, são substâncias com maior espectro antifúngico e ação contra fungos que são resistentes aos primeiros fármacos da classe (MAERTENS, 2004; SKIEST *et al.*, 2007).

Já as equinocandinas, que incluem os fármacos anidulafungina, caspofungina e micafungina, são uma nova classe de agentes antifúngicos que agem inibindo a formação da enzima  $\beta$ -1,3-D-glucana, uma das responsáveis pela produção de glucano, importante componente da parede celular de diversos fungos, uma vez que auxiliam na formação das células e garantem sua rigidez. Dessa forma, sua ausência é capaz de causar lise celular. Um ponto positivo dessa classe de fármacos é a presença de pouco ou nenhum efeito adverso em humanos, uma vez que o glucano não está presente nas células dos mamíferos. No entanto, as equinocandinas estão disponíveis comercialmente apenas para administração intravenosa, pois apresentam biodisponibilidade oral muito limitada, além de que apresentam um espectro de ação restrito

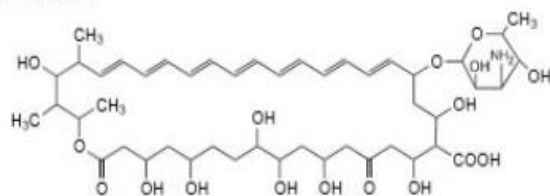
(ARNOLD *et al.*, 2010; BUTTS; KRYSAN, 2012; DENNING; HOPE, 2010; MARTINEZ, 2006; ODDS *et al.*, 2003).

Na **Figura 2** estão apresentadas as estruturas químicas dos fármacos antifúngicos com ação sistêmica mais utilizados na clínica atualmente.

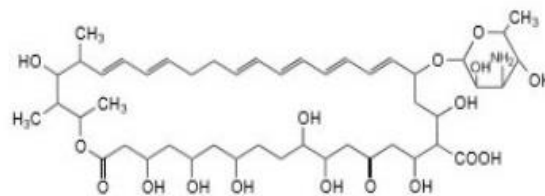
Diante deste cenário crescente de infecções fúngicas, mortes atreladas a essas infecções e de resistência fúngica, torna-se cada vez maior a demanda pela descoberta de novos agentes antifúngicos mais eficazes, com um maior espectro de ação, de menor custo e mais toleráveis pelos pacientes. Além disso, o desenvolvimento de formulações mais adequadas dos fármacos já existentes, que sejam capazes de melhorar sua biodisponibilidade nos tecidos alvo, também é almejado (CASADEVALL, 2018; RODRIGUES; ALBUQUERQUE, 2018).

**Figura 2 – Estrutura dos principais agentes antifúngicos com ação sistêmica utilizados na clínica**

**Polienos**

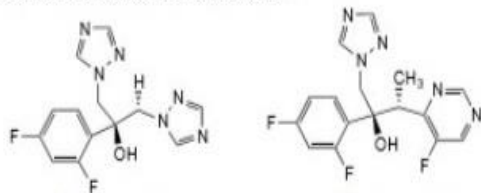


**Anfotericina B**



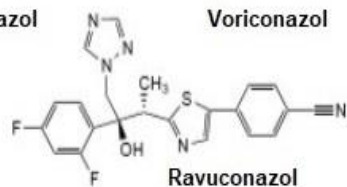
**Nistatina**

**Azois ativos sistemicamente**

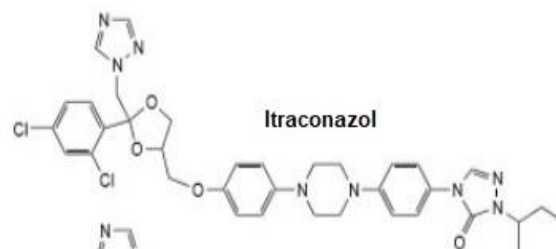


**Fluconazol**

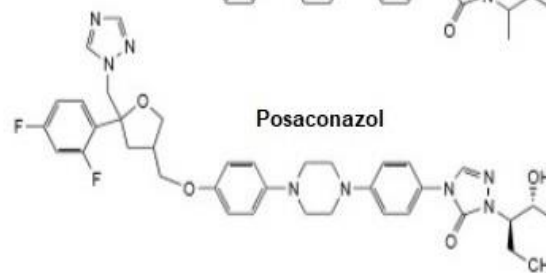
**Voriconazol**



**Ravuconazol**

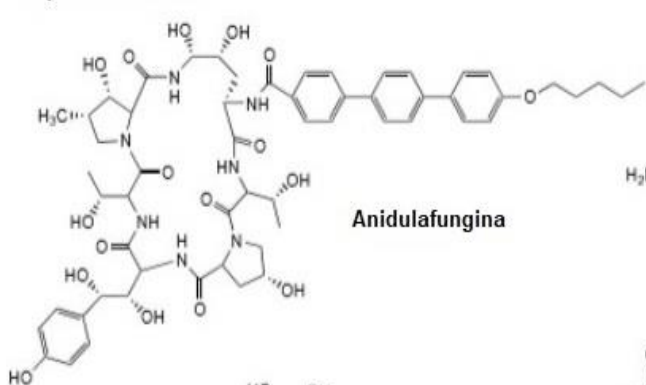


**Itraconazol**

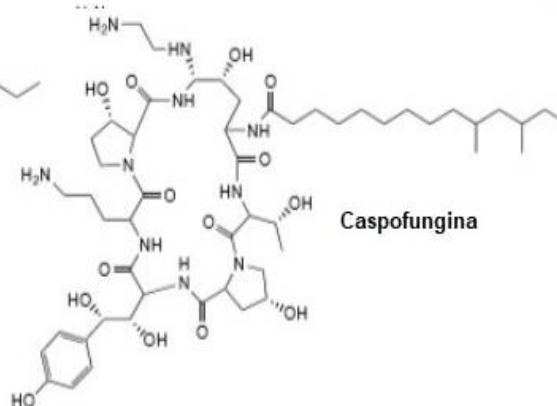


**Posaconazol**

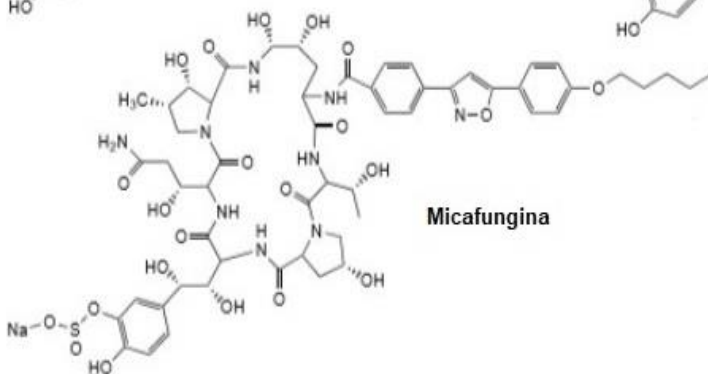
**Equinocandinas**



**Anidulafungina**



**Caspofungina**



**Micafungina**

Fonte: adaptado de Odds *et al.*, 2003.

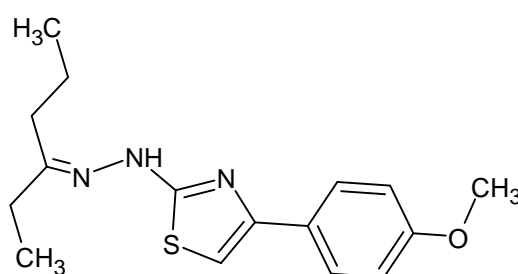


### 2.3 Derivados tiazolilhidrazonas e tiazolilhidrazinas com atividade antifúngica

Em um estudo do grupo de pesquisa do Laboratório de Química Farmacêutica (LQF) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), foram sintetizados 15 derivados tiazolilhidrazonas, substâncias promissoras no quesito farmacológico, devido à versatilidade de substituintes, além de possuírem baixo custo e facilidade de síntese (LINO, 2015; LINO *et al.*, 2018).

Essas substâncias foram avaliadas quanto ao efeito como agente antifúngico, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente às seguintes espécies fúngicas: *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Paracoccidioides brasiliensis*. O composto RI76 (2-[2-(hexan-3-ilideno)hidrazinil]-4-(4-metoxifenil)tiazol) (**Figura 3**) apresentou valores de CIM próximos, ou até mesmo inferiores àqueles obtidos com o fluconazol para algumas das espécies fúngicas testadas, como se pode observar na **Tabela 1** (LINO *et al.*, 2018).

**Figura 3 – Estrutura do candidato a fármaco RI76**



**Fonte:** adaptado de Lino *et al.*, 2018.

**Tabela 1** – Concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{M}$  do RI76 em comparação ao fluconazol

Espécie fúngica	CIM ( $\mu\text{M}$ )	
	RI76	Fluconazol
<i>Candida albicans</i>	3,9	1,6
<i>Candida krusei</i>	7,8	104,4
<i>Candida parapsilosis</i>	15,6	3,2
<i>Candida tropicalis</i>	7,8	6,5
<i>Cryptococcus gatti</i>	1,9	12,7
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,9	6,2
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	62,5	ND

ND = não determinado

**Fonte:** adaptado de Lino *et al.*, 2018.

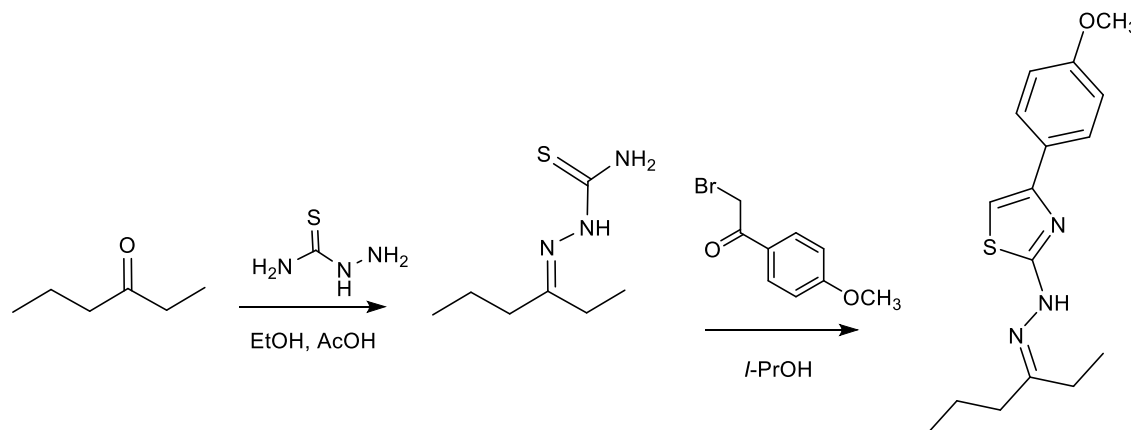
Além disso, neste estudo foi avaliada a segurança do RI76 por meio de estudos de citotoxicidade *in vitro* em células renais embrionárias humanas, chamadas HEK-293, utilizadas em avaliações toxicológicas *in vitro*. Os resultados obtidos indicam que esta substância é pouco tóxica a este tipo celular, tornando o RI76 um promissor candidato a fármaco antifúngico (LINO *et al.*, 2018).

O estudo concluiu ainda, por meio de estudos de relação estrutura atividade quantitativa (QSAR), que são capazes de prever propriedades físico-químicas e biológicas das substâncias, que a cadeia alifática hidrofóbica presente na estrutura dos derivados sintetizados, bem como a porção tiazolilhidrazonas e o anel aromático *para*-substituído são essenciais para a atividade antifúngica das substâncias. O composto RI76 apresenta três hidrogênios ionizáveis, dois aceptores de ligação de hidrogênio e um doador (LINO *et al.*, 2018).

A síntese do RI76 inicia-se pela reação de 3-hexanona e tiossemicarbazida, sob agitação e refluxo e em presença de ácido acético e etanol, para formação de um intermediário com rendimento de 60%. Após essa etapa, purifica-se a tiossemicarbazona obtida por meio de cromatografia em coluna de sílica (CCS), para, em seguida, submetê-la a reação com 2-bromo-4'-metoxiacetofenona em presença de isopropanol, obtendo-se o derivado RI76,

um pó marrom, com rendimento de 97%. O esquema da síntese está representado na **Figura 4** (LINO, 2015).

**Figura 4 – Esquema representativo da síntese do candidato a fármaco RI76**



EtOH = etanol; AcOH = ácido acético; *i*-PrOH = isopropanol.

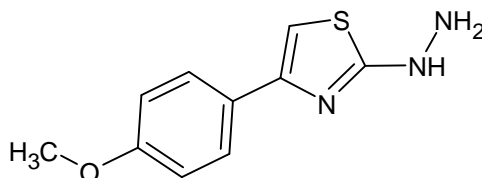
**Fonte:** adaptado de Lino, 2015.

Um estudo seguinte foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos (LCQ) da Faculdade de Farmácia da UFMG, com a finalidade de avaliar a estabilidade do derivado RI76, por meio de um estudo de degradação forçada e desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade. Esta etapa é de suma importância no desenvolvimento de novos fármacos, tendo em vista que o conhecimento das impurezas de degradação ou de síntese das substâncias é necessário para garantir sua eficácia, segurança e qualidade. A formação de produtos de degradação, por exemplo, pode acarretar em efeitos farmacológicos tóxicos e diminuição do teor do fármaco no produto acabado (FRANCO, 2020).

Como resultado do estudo de degradação forçada, observou-se a formação proeminente de um produto de degradação comum na maioria das condições de estresse avaliadas, sendo elas a termólise, umidade, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação, fotólise e oxidação por íons metálicos. Este produto de degradação teve sua estrutura caracterizada por meio de análises de varredura em CLAE acoplada a espectrometria de massas (EM), a fim de se

determinar sua massa molecular. Sua estrutura foi então proposta com base nos resultados obtidos e está demonstrada na **Figura 5** (FRANCO, 2020).

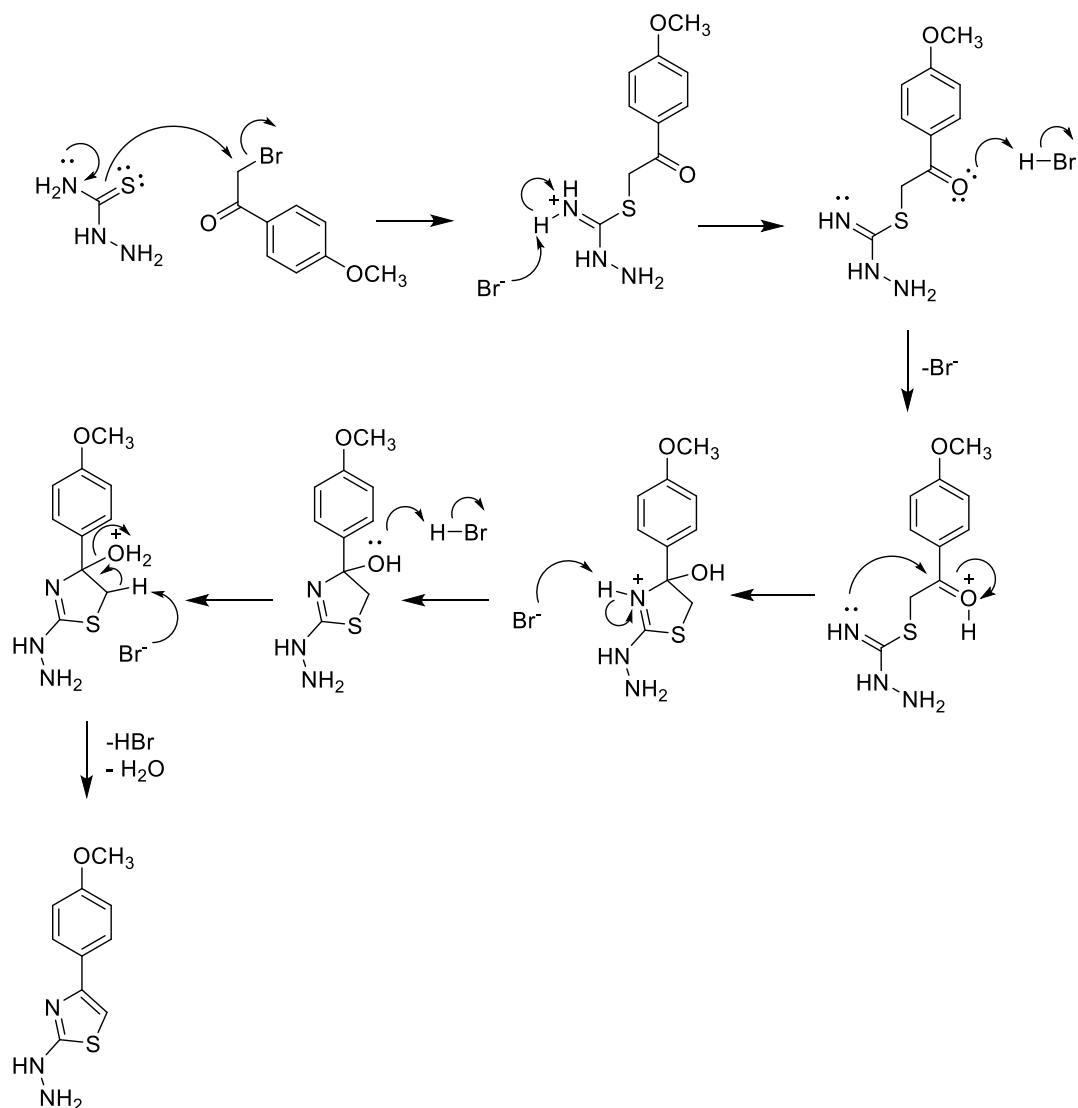
**Figura 5 – Estrutura do produto de degradação obtido nos estudos de degradação forçada de RI76**



**Fonte:** adaptado de Franco, 2020.

Dessa forma, foram realizadas a identificação e a caracterização desse produto, denominado PD76. Descobriu-se que sua formação ocorre por meio da hidrólise do grupo hidrazona presente no derivado RI76, que libera a cadeia alifática na forma de 3-hexanona. Sua síntese foi realizada por meio da reação entre tiossemicarbazida e 2-bromo-4'-metoxiacetofenona, obtendo-se um pó marrom com cerca de 70% de rendimento, conforme representado na **Figura 6** (FRANCO, 2020).

**Figura 6 – Mecanismo proposto para formação da substância PD76**



Fonte: Autora.

Por fim, avaliou-se a atividade antifúngica do derivado PD76 frente às espécies *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. Os resultados estão dispostos na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{M}$  do PD76 em comparação ao RI76 e aos fármacos utilizados como controles positivos

Espécie fúngica	CIM ( $\mu\text{M}$ )				
	PD76	RI76	Fluconazol	Anfotericina	Itraconazol
<i>Candida albicans</i>	0,24	3,9	0,5	0,25	0,5
<i>Candida glabrata</i>	125	ND	4	0,5	0,25
<i>Candida krusei</i>	250	7,8	32	0,5	2
<i>Candida parapsilosis</i>	1,95	15,6	1	1	0,25
<i>Candida tropicalis</i>	3,9	7,8	0,25	0,5	0,12
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,24	1,9	8	0,5	1
<i>Cryptococcus gatti</i>	0,24	3,9	16	1	2

ND = não determinado

**Fonte:** adaptado de Franco, 2020.

Verificou-se que PD76 apresentou maior atividade antifúngica contra a maioria das cepas testadas em comparação com RI76, com exceção apenas de *Candida krusei*. Além disso, PD76 apresentou uma atividade maior do que o fluconazol, a anfotericina B e o itraconazol, fármacos já bem estabelecidos na clínica, contra as cepas de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*. Estes resultados indicam significativo potencial terapêutico deste derivado.

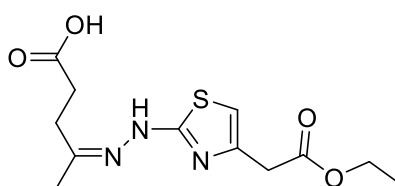
É interessante ressaltar que, embora o estudo QSAR, realizado por Lino e colaboradores (2018), tenha chegado à conclusão de que a cadeia alifática presente nos derivados tiazolilhidrazonas é importante para a atividade antifúngica, o derivado PD76 perde essa cadeia e, ainda assim, possui uma atividade antifúngica maior quando comparado ao RI76.

Em um terceiro estudo também realizado no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG em 2021, foram sintetizadas 11 novas moléculas da classe das tiazolilhidrazonas, que apresentaram amplo espectro de inibição frente a diferentes espécies fúngicas, incluindo a espécie resistente *Candida auris* (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Os ensaios de determinação da atividade antifúngica destes novas substâncias foram realizados por meio da determinação da CIM contra as espécies *Candida*

*albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida auris*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*. O fármaco fluconazol foi utilizado como controle positivo. Dos 11 derivados, o denominado RJ44 (**Figura 7**) apresentou valores de CIM muito inferiores àqueles obtidos para o fluconazol contra todas as cepas testadas (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Os resultados estão apresentados na **Tabela 3** a seguir.

**Figura 7 – Estrutura do derivado tiazolilhidrazona RJ44**



**Fonte:** adaptado de Oliveira *et al.*, 2021.

**Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) em  $\mu\text{M}$  da tiazolilhidrazona RJ44 contra espécies de fungos**

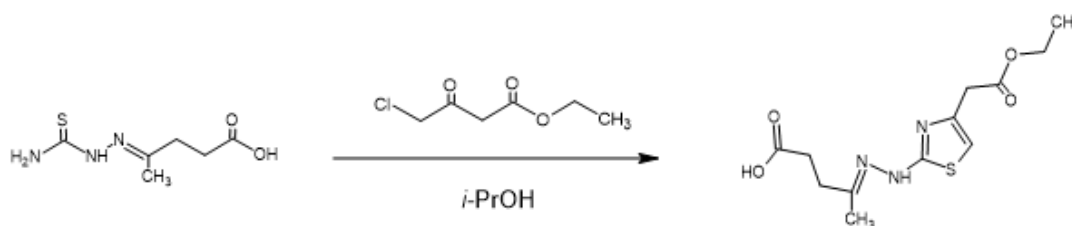
Espécie fúngica	CIM ( $\mu\text{M}$ )	
	RJ44	Fluconazol
<i>Candida albicans</i>	0,20	1,6
<i>Candida parapsilosis</i>	0,20	3,3
<i>Candida glabrata</i>	0,40	13,1
<i>Candida tropicalis</i>	0,40	0,8
<i>Candida krusei</i>	0,40	104,5
<i>Candida auris</i>	0,20	209
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,60	26,1
<i>Cryptococcus gatti</i>	1,60	52,2

**Fonte:** adaptado de Oliveira *et al.*, 2021.

A síntese do RJ44 inicia-se pela reação de tiossemicarbazona correspondente, o ácido 4-(2-carbamotioilhidrazineilideno)pentanóico, e 4-cloroacetoacetato, sob agitação, aquecimento e refluxo e em presença de álcool isopropílico até a formação do produto, por cerca de duas horas. Após essa etapa, elimina-se o

solvente sob pressão reduzida, e a substância RJ44 é isolada após extração com solução de bicarbonato de sódio e acetato de etila, na forma de um pó amarelo claro, com rendimento de 82%. O esquema da síntese está representado na **Figura 8** (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

**Figura 8 – Esquema de síntese do RJ44**



*i*-PrOH = álcool isopropílico.

Fonte: adaptado de Oliveira *et al.*, 2021.

## 2.4 Estudos de permeabilidade intestinal

A absorção de uma substância administrada por via oral é um fator determinante para a avaliação da sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, da sua atividade biológica, sendo este estudo crucial para o desenvolvimento de novos fármacos. A permeabilidade intestinal é um processo biológico complexo e é o principal parâmetro que determina a absorção. Ela pode ocorrer de três maneiras principais: por difusão passiva, por intermédio de carreadores ou por transporte vesicular (BREEMEN; LI, 2005).

A difusão passiva ocorre sem gasto energético e pode ser dividida de duas formas; transporte paracelular, que ocorre por meio dos espaços intercelulares, e o transporte transcelular, que ocorre através da membrana celular. O transporte passivo paracelular é decorrente, principalmente, dos gradientes criados pelas diferenças na concentração do fármaco e da pressão hidrostática entre os lados luminal e sanguíneo do epitélio intestinal. Este tipo de transporte é dificultado pelas junções oclusivas entre as células e, por este motivo, fármacos com massas moleculares menores e com características mais

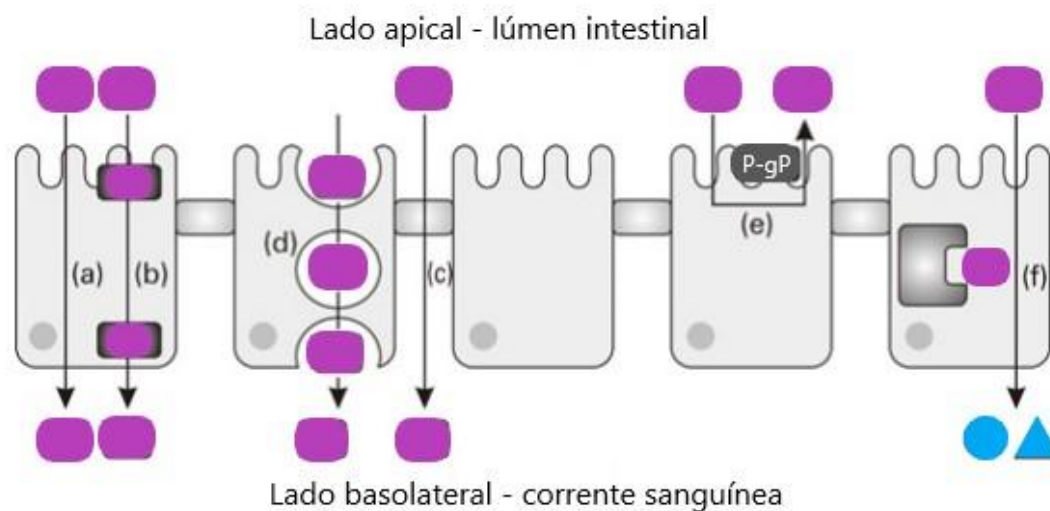


hidrofílicas são mais passíveis de sofrerem este tipo de transporte. Já o transporte passivo transcelular é conduzido pelos gradientes eletroquímicos e, uma vez que as membranas celulares são formadas por uma bicamada lipídica, compostos que apresentam natureza lipofílica são mais suscetíveis a este tipo de transporte (BREEMEN; LI, 2005; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

Já nos casos de transporte transcelular mediado por carreadores, há gasto energético ao longo do processo, tendo em vista que, neste caso, os fármacos atravessam a membrana celular com auxílio de proteínas carreadoras. Por fim, fármacos que não são passíveis de permear as células por difusão passiva ou pela via mediada por carreadores, como as macromoléculas, atravessam o epitélio intestinal por meio do transporte vesicular, no qual ocorre a interação da molécula com a membrana ou com os receptores da membrana, que formam vesículas que englobam as moléculas e as levam ao lado basolateral dos enterócitos, em um processo chamado transcitose (BREEMEN; LI, 2005; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; STORPIRTIS *et al.*, 2009). Além disso, diversos são os fatores que interferem na permeabilidade intestinal de um fármaco, podendo-se destacar a solubilidade deste em meios fisiológicos, sua capacidade de ionização, pKa e lipofilicidade (BREEMEN; LI, 2005; LI *et al.*, 2023).

Na **Figura 9**, podemos observar a representação de todos os tipos de transporte supracitados.

**Figura 9 – Principais mecanismos de transporte celular por meio do epitélio intestinal**



O transporte representado por (a) é o transporte passivo transcelular; (b) representa o transporte mediado por carreadores de membrana; (c) indica o transporte passivo paracelular; (d) representa o transporte vesicular (transcitose); (e) o transporte mediado por carreadores de excreção, como a glicoproteína-P (P-gP), que é responsável por levar a substância de volta ao lúmen intestinal (efluxo) e, por fim, (f) ilustra a atividade de enzimas metabolizadoras.

**Fonte:** adaptado de Storpirts *et al.*, 2009.

Nos últimos anos, a síntese de substâncias com a finalidade de descoberta de novos fármacos evoluiu consideravelmente com o advento dos ensaios *in silico*, que são capazes de agrupar moléculas com maior probabilidade de sucesso em termos físico-químicos, reduzindo custos e tempo com a síntese de moléculas não promissoras. Entretanto, sabe-se que grande parte das substâncias que emergem destes modelos computacionais falham nos estudos *in vitro* e *in vivo*, tendo em vista que os programas utilizados normalmente não levam em consideração seus perfis metabólicos. Diante disso, é importante avaliar, logo na fase inicial da descoberta de novos fármacos, a farmacocinética e a toxicidade destes compostos frente a modelos *in vitro* e posteriormente *in vivo*, que representam uma aproximação mais fidedigna do comportamento humano (BREEMEN; LI, 2005).

Neste cenário, dentre as diversas possibilidades de estudos da permeabilidade intestinal, pode-se destacar a modelagem computacional *in silico*, os modelos

animais *in vivo*, modelos *in vitro*, que utilizam cultivo celular e os modelos *in situ*, que envolvem ensaios de perfusão em animais e em humanos.

Os modelos *in silico* são métodos computacionais que predizem a permeabilidade intestinal da molécula com base em suas características físico-químicas. É um modelo limitado, uma vez que é eficiente apenas para prever a permeabilidade de uma molécula que atravessa a membrana dos enterócitos por difusão passiva, não considerando os demais tipos de transporte. O modelo *in vivo* envolve estudos mais completos, pois engloba todos os possíveis efeitos fisiológicos. Entretanto, esses estudos demandam grande número de animais, fator que esbarra nas considerações éticas, além de possuírem alto custo. Já os modelos *in situ* simulam condições reais de absorção de um fármaco por meio da avaliação da perfusão intestinal em animais vivos. Entretanto, a limitação deste método é que a avaliação baseia-se apenas no desaparecimento do fármaco no lúmen intestinal, sem considerar que ele possa ter ficado retido na membrana celular do enterócito (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Por fim, os testes *in vitro* têm sido bastante adotados nesta área, pois embora não consigam reproduzir todas as condições existentes no intestino humano, como a taxa de esvaziamento gástrico, eles apresentam uma alta concordância entre os resultados de permeabilidade intestinal em animais e seres humanos. Além disso, apresentam menor custo e evitam o uso de animais quando comparado aos métodos *in vivo*. Dentre as possibilidades referentes aos métodos *in vitro*, pode-se destacar os estudos de permeação usando fragmentos de tecidos intestinais de animais, os estudos de permeação por monocamada formada por cultura de células, como Caco-2, e o ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela, como a PAMPA. Este último método é baseado na formação de uma bicamada lipídica artificial com tamanho de poro e espessura determinados, por meio do revestimento de um filtro hidrofóbico com solvente orgânico inerte, modelo muito utilizado para avaliar a permeabilidade transcelular passiva (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

## **2.5 Células Caco-2 em ensaios de permeabilidade *in vitro***

As células Caco-2 são oriundas de um adenocarcinoma de cólon humano e foram isoladas pela primeira vez em 1977. Desde então, este tipo celular tem sido muito utilizado como modelo de absorção intestinal humana de fármacos, uma vez que apresentam características muito favoráveis quando cultivadas em condições de crescimento adequadas, dentre elas a sua capacidade de diferenciação de maneira espontânea em células que mimetizam os enterócitos, células presentes no intestino delgado humano. A aplicabilidade dos estudos com as células Caco-2 no desenvolvimento de novos fármacos se deve, principalmente, à possibilidade de identificação de possíveis problemas de permeabilidade de novas moléculas, bem como à predição da absorção oral e dos mecanismos de absorção que possam estar envolvidos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BREEMEN & LI, 2005; FOGH; WRIGHT; LOVELESS, 1977).

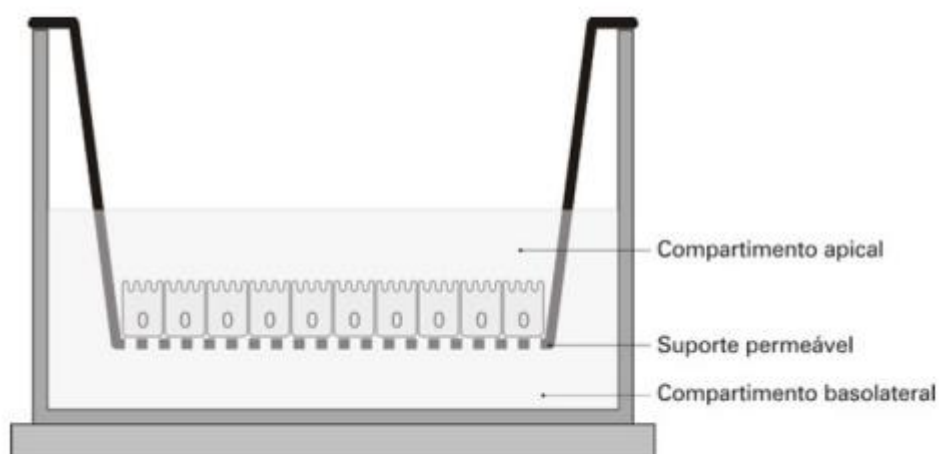
Em condições de cultivo favoráveis para o desenvolvimento destas células, que envolvem temperatura, umidade, atmosfera e superfície para desenvolvimento adequada, as células Caco-2 formam uma monocamada de células cilíndricas. Ao crescerem, estas células apresentam microvilosidades na borda apical, além de junções estreitas entre as células, que servem como um modelo de transporte paracelular, e expressão de proteínas transportadoras, enzimas e proteínas de efluxo. Além do transporte paracelular, essas células podem ser utilizadas para avaliação do transporte transcelular de fármacos, por meio do citoplasma, e transporte ativo mediado por carreadores, embora elas não expressem todos os possíveis transportadores de membrana (BALIMANE; CHONG, 2005; BREEMEN; LI, 2005, CHONG *et al.*, 1996; ENGLUND *et al.*, 2006; SEITHEL *et al.*, 2006).

É importante ressaltar alguns fatores que podem limitar o uso das células Caco-2 são: (1) o reduzido número de transportadores de membrana, que podem explicar o motivo de antimicrobianos betalactâmicos serem totalmente absorvidos *in vivo* e possuírem baixa permeabilidade no modelo de células Caco-2; (2) a permeabilidade reduzida de compostos hidrofílicos com baixo peso molecular na monocamada de células Caco-2, embora em humanos a absorção seja superior a 50%; (3) a possibilidade de causar danos às

membranas das células quando utiliza-se determinados co-solventes, como metanol, etanol, propilenoglicol e polietilenoglicol em concentrações superiores a 2% (v/v), fator que pode se tornar um empecilho quando o composto estudado não possui uma boa solubilidade em meio aquoso; (4) aderência do fármaco ao filtro de policarbonato, reduzindo a permeação principalmente daqueles que apresentam alta lipofilicidade; (5) crescimento lento das células, que necessitam de 21 dias e condições adequadas até que as células atinjam a maturidade necessária para a realização do experimento (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BREEMEN; LI, 2005, CHONG *et al.*, 1996).

Para a realização dos estudos de permeabilidade, as monocamadas de células Caco-2 são normalmente cultivadas em suportes que contém membrana semipermeável, permitindo o livre acesso de nutrientes e íons oriundos do meio de cultivo adicionado tanto na porção superior (compartimento apical), quanto na porção inferior (compartimento basolateral). Na **Figura 10** está demonstrado o cultivo de células Caco-2 em suportes para estudos de permeabilidade (BREEMEN; LI, 2005).

**Figura 10 – Representação do esquema do suporte de cultivo de células Caco-2**



Fonte: STORPIRTIS *et al.*, 2009.

Após o tempo necessário para o desenvolvimento das células Caco-2 e a garantia de que a monocamada está íntegra, por meio da medida da resistência elétrica transepitelial (TEER), o estudo de permeabilidade é iniciado

com a adição, na porção apical ou na basolateral, de solução contendo a substância estudada em meio de cultivo específico que contenha os nutrientes necessários para a sobrevivência das células. A permeabilidade é então determinada por meio do cálculo do coeficiente de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) (BREEMEN; LI, 2005; YEE, 1997).

Outro parâmetro possível de ser avaliado por meio do estudo de permeabilidade intestinal empregando as células Caco-2 é a ocorrência de efluxo de fármacos para o lúmen intestinal, tendo em vista que estas células expressam alguns transportadores de efluxo presentes também no epitélio intestinal, como a glicoproteína-P (P-gP). Este fator pode ser responsável pela absorção reduzida de alguns fármacos no trato gastrointestinal. Portanto, pode-se utilizar inibidores de P-gP, como o verapamil, com a finalidade de avaliar se os fármacos estudados são possíveis substratos deste transportador de efluxo (BENET; CUMMINS; WU, 2004).

Para que um fármaco seja considerado de alta permeabilidade (70 a 100%), este deve possuir valores de  $P_{app}$  superiores a  $10 \times 10^{-6}$  cm/s, ao passo que fármacos que apresentam valores de  $P_{app}$  entre 1 e  $10 \times 10^{-6}$  cm/s são considerados de permeabilidade moderada (20% a 70%) e aqueles que apresentam valores de  $P_{app}$  menores que  $1 \times 10^{-6}$  cm/s são considerados de baixa permeabilidade (0 a 20%) (YEE, 1997).

Portanto, percebe-se que os estudos de permeabilidade intestinal *in vitro* que empregam a monocamada de células Caco-2 são de suma importância para o desenvolvimento de novos fármacos, tendo em vista que são capazes de fornecer informações sobre potenciais problemas de absorção dos novos candidatos a fármacos e de quais são os prováveis mecanismos de absorção dos compostos em estudo.

## **2.6 Ensaio para determinação da viabilidade das células Caco-2 pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)**

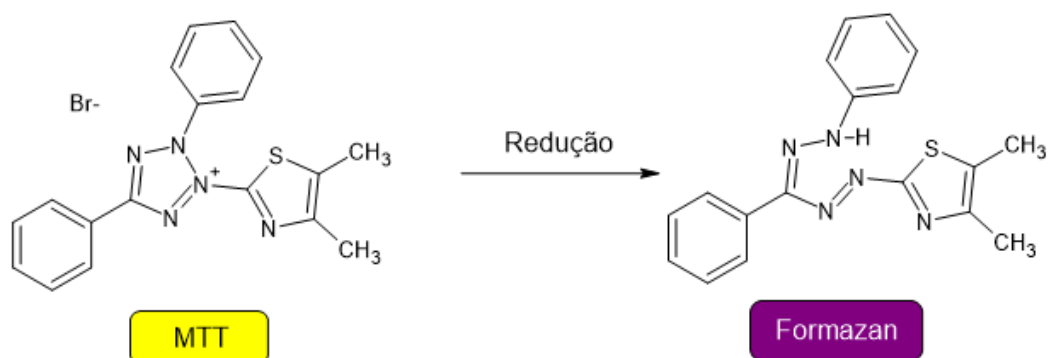
Para a realização de ensaios de permeabilidade *in vitro* com membranas celulares, a avaliação da citotoxicidade é de fundamental importância para garantir a confiabilidade dos resultados. Dentre as aplicações destes estudos, eles fornecem informações sobre possíveis efeitos tóxicos das moléculas estudadas, reduzindo as chances de obtenção de resultados equivocados em estudos de permeabilidade, tendo em vista que possíveis danos celulares e/ou morte celular podem acarretar em elevados valores de permeabilidade (BAHUGUNA *et al.*, 2017; BLANCHFIELD *et al.*, 2003; HANSEN *et al.*, 1989).

Dentre as técnicas que requerem pouco tempo e permitem avaliar a viabilidade celular com base em funções celulares, como a permeabilidade da membrana celular, a atividade enzimática e a produção de ATP, destaca-se o ensaio colorimétrico de um sal tetrazólico, o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (BAHUGUNA *et al.*, 2017).

Este ensaio se baseia na conversão do sal de MTT, reagente de coloração amarela e dependente das atividades metabólicas celulares, em formazan, produto de coloração púrpura, por meio da atividade da enzima succinato desidrogenase, presente em células saudáveis. Uma vez que esta reação é dependente das atividades metabólicas celulares, em células danificadas ou mortas ela não ocorre. Dessa maneira, a maior intensidade da cor púrpura denota maior viabilidade celular. Em contrapartida, a diminuição da intensidade dessa cor indica maior citotoxicidade da molécula analisada (BAHUGUNA *et al.*, 2017).

A quantificação de formazan neste ensaio é realizada por meio de espectrofotometria na região do visível. A reação química do ensaio está esquematizada na **Figura 11** (HANSEN *et al.*, 1989).

**Figura 11 – Esquema da reação de redução do composto MTT (amarelo) em Formazan (púrpura)**





### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a permeabilidade intestinal e a citotoxicidade de dois derivados tiazolilhidrazona e tiazolilhidrazina com potencial atividade antifúngica, PD76 e RJ44 respectivamente, por meio do emprego de ensaios *in silico* e *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar os derivados tiazolilhidrazina PD76 e tiazolilhidrazona RJ44;
- desenvolver e validar dois métodos bioanalíticos por CLAE-DAD para quantificar os compostos no meio utilizado em estudos de permeabilidade *in vitro* (tampão Hanks);
- avaliar a permeabilidade intestinal dos compostos em estudos *in silico*;
- avaliar a citotoxicidade dos compostos perante o modelo de células Caco-2, por meio do método de MTT;
- realizar o estudo de permeabilidade intestinal *in vitro* de PD76 e RJ44, utilizando o modelo de células Caco-2, na presença e ausência de inibidor da glicoproteína-P.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.2 Substâncias Químicas de Referência (SQR)

- Cloridrato de verapamil – substância química de referência (Ariston Ltda-Brasil), pureza 100%, lote 5216.

#### 4.1.2 Amostras, reagentes e solventes

- Amostras de RI76, PD76 e RJ44 sintetizadas *in loco* conforme procedimento descrito nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3;
- 2-bromo-4'-metoxiacetofenona, intermediário de síntese, 97% de pureza, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote STBD4623V;
- tiossemicarbazida, material de partida de síntese, 99% de pureza, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote WXBC0057V;
- 3-hexanona, material de partida de síntese, 98% de pureza, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), lote BCBJ8237V;
- bicarbonato sódico PA;
- acetato de amônio PA;
- ácido fórmico PA;
- água ultrapura;
- acetonitrila grau cromatográfico;
- álcool etílico P.A.;
- álcool etílico 70% v/v;
- dimetilsulfóxido P.A.;
- isopropanol grau cromatográfico;
- metanol grau cromatográfico;
- tampão HBSS Hanks;
- meio Dulbecco MEM (DMEM), GIBCO;
- solução de aminoácidos não essenciais, Sigma Aldrich;
- solução de glutamina 200 mM, Sigma Aldrich;

- soro fetal bovino, GIBCO;
- tampão HEPES, Sigma Aldrich;
- solução tampão Hanks (HBSS) , GIBCO;
- solução de tripsina 0,25% e EDTA 1 mM, GIBCO.

#### **4.1.3 Coluna cromatográfica**

- ZORBAX Eclipse XDB (Agilent), C18 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m).

#### **4.1.4 Acessórios e vidrarias**

- balões volumétricos calibrados de 5, 10, 25, 50, 100, 1000 e 2000 mL;
- bastões de vidro;
- béqueres;
- erlenmeyer de 250 mL;
- frascos de vidro para soluções;
- garrafas de cultivo celular 25 e 75 cm<sup>2</sup>;
- kit para filtração de soluções a vácuo;
- membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,45  $\mu$ m, SARTORIUS;
- filtros de seringa de celulose regenerada (CR) de 25 mm de diâmetro e poros de 0,45  $\mu$ m Chromafil® Xtra, MACHEREY-NAGEL;
- pipetas descartáveis estéreis 5 e 10 mL;
- pipetas graduadas;
- pipetas volumétricas;
- placas TRANSWELL® Corning de 12 poços de 12 mm de diâmetro, com inserts de policarbonato de porosidade 0,4  $\mu$ m;
- ponteiros de 200 e 1000  $\mu$ L para uso em micropipetas;
- ponteiros e pipeta de Pasteur estéreis.
- provetas;
- tubos de fundo cônico tipo Falcon de 15 e 50 mL.

#### **4.1.5 Equipamentos**

- Balança analítica com precisão de 0,01 mg, modelo BP211D, SARTORIUS;
- banho de ultrassom 1400, UNIQUE;
- bomba de vácuo KNF N842, LABOPORT;
- capela de fluxo laminar VLFS-12M, VECO;
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters Alliance, equipado com módulo de separação, forno de colunas, injetor automático, detector de ultravioleta (UV) e um detector de fluorescência (FLU) multicanais, software Empower versão 3.0;
- espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum One FT-IR.
- estufa TR 60, NABERTHERM;
- incubadora CO<sub>2</sub> Series II Water Jacket, THERMO SCIENTIFIC;
- incubadora com plataforma de agitação orbital KS 4000i control, IKA;
- kits esterilizantes de meios de cultura;
- micropipeta 20 a 200 µL FINNPIPETTE® F3, Thermo SCIENTIFIC;
- micropipeta 100 a 1000 µL FINNPIPETTE® F3, Thermo SCIENTIFIC;
- microscópio Invertido, OLIMPUS CXX41;
- microscópio SM-LUX, LEITZ;
- minivoltímetro Milicell ERS®, Milipore;
- purificador de água (Milli-Q-Plus, Millipore, Bedford, MA, USA);
- potenciômetro 827 pH Lab, METROHM;
- refrigerador 240, CONSUL;
- sistema de purificação de água Direct-Q, MILLIPORE.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Síntese e caracterização de RI76

A síntese de RI76 foi realizada em duas etapas; na primeira, 147 mg de tiossemicarbazida (1,62 mmol) (MM = 91,13 g/mol) e 200 µL de 3-hexanona (1,62 mmol) (MM = 100,16 g/mol, d = 0,81 g/mL) foram adicionadas a um balão de fundo redondo. Para dissolvê-las, utilizaram-se 5 mL de etanol e ácido

acético glacial em quantidade suficiente para alterar o pH até uma faixa de 4-4,5. O balão foi então colocado sob refluxo e agitação magnética, por aproximadamente duas horas (LINO, 2015).

O monitoramento da reação foi realizado por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se como eluente hexano:acetato de etila (6:4) e, como revelador, uma solução de molibdato cérico de amônio 3 (CAM) seguida de aquecimento. A solução de CAM foi preparada dissolvendo-se, sob banho de gelo e agitação, 5 g de sulfato de cério IV em uma solução contendo 25 g de molibdato de amônio em 450 mL de água, e adicionando-se lentamente 50 mL ácido sulfúrico. Após esta etapa, removeu-se o solvente em evaporador rotatório. Adicionaram-se 20 mL de água ao resíduo obtido e extraiu-se com três frações de 30 mL de diclorometano (LINO, 2015).

Para a segunda etapa da reação, a tiossemicarbazona obtida na etapa anterior foi colocada para reagir com 296,87 mg de 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (1,296 mmol; MM = 229,07 g/mol), na presença de 2 mL de isopropanol, sob refluxo e agitação magnética. O monitoramento desta reação também foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se hexano:acetato de etila (8:2) como eluente e vapor de iodo como revelador (LINO, 2015).

Após o término da reação, a mistura foi colocada em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente, e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O precipitado formado, um sólido marrom, foi filtrado a vácuo e lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio em água destilada gelada e mantido em dessecador. O rendimento da reação foi de 89%.

Para a confirmação da estrutura da substância, utilizou-se espectroscopia na região do infravermelho. Além disso, a confirmação também se deu pelo tempo de retenção na cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando o método desenvolvido no item 4.2.4.

Os experimentos de IV foram realizados em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum One FT-IR. O espectro obtido com a substância sintetizada foi comparado ao espectro descrito por Lino (2015).

#### 4.2.2 Síntese e caracterização de PD76

A síntese de PD76 foi iniciada reagindo-se cerca de 1 mmol de 2-bromo-4'-metoxiacetofenona (MM = 229,07 g/mol) e 1 mmol de tiossemicarbazida (MM = 91,13 g/mol), que foram adicionadas a um balão de fundo redondo e dissolvidas em 5 mL metanol. A reação foi conduzida sob refluxo e agitação magnética e o monitoramento se deu por CCD em sílica-gel, utilizando hexano e acetato de etila (1:1) como eluente e vapor de iodo como agente revelador.

Ao término da reação, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório. O material obtido foi então disperso em 15 mL de água e extraído com três volumes de 10 mL de diclorometano. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, e o solvente foi filtrado e evaporada em rotavapor. O rendimento da reação foi de aproximadamente 70%.

Para a confirmação da estrutura da substância, utilizou-se a determinação da faixa de fusão e espectroscopia na região do infravermelho. Além disso, a confirmação também se deu pelo tempo de retenção na cromatografia a líquido de alta eficiência, utilizando o método desenvolvido em 4.2.4.

Os experimentos de IV foram realizados em espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum One FT-IR. O espectro obtido com a substância sintetizada foi comparado ao espectro descrito por Franco (2020).

#### 4.2.3 Síntese e caracterização de RJ44

Para síntese de RJ44, aproximadamente 0,52 mmol da tiossemicarbazona TSC2 previamente sintetizada por Oliveira (2021) foi adicionada em um balão de fundo redondo de 50 mL, e solubilizada em 10 mL de álcool isopropílico e 0,52 mmol de 4-cloroacetoacetato. A mistura foi mantida sob agitação magnética e temperatura de 80 °C. O balão foi acoplado ao condensador e o refluxo fechado com tubo de cloreto de cálcio, sendo o monitoramento da reação realizado por CCD, utilizando-se acetato de etila:hexano (8:2) como eluente e vapor de iodo como revelador.

Após duas horas de reação, o solvente foi eliminado sob pressão reduzida, e foram adicionados 10 mL de água destilada ao produto intermediário, que foi extraído com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Foram obtidos 130 mg do produto (aproximadamente 82% de rendimento), na forma de um sólido amarelo claro.

Para a confirmação da estrutura da substância, comparou-se o ponto de fusão da substância obtida com o valor descrito por Oliveira e colaboradores (2021).

#### **4.2.4 Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos por CLAE-DAD para quantificação de RI76, PD76 e RJ44 em matriz proveniente de cultivo celular**

Para a realização dos estudos de permeabilidade, foi necessário o desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos com detectabilidade suficiente para a quantificação dos analitos, que podem apresentar concentrações significativamente reduzidas.

Os métodos bioanalíticos utilizados para a quantificação dos derivados tiazolilhidrazonas RI76, PD76 e RJ44 em estudos de permeabilidade foram desenvolvidos e validados no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFMG. Inicialmente, foi realizada a otimização das condições cromatográficas do método previamente desenvolvido por Franco (2020), com a finalidade de torná-lo mais adequado à quantificação dos analitos em questão. Os parâmetros cromatográficos do método de partida estão descritos na **Tabela 4** a seguir.

**Tabela 4** – Parâmetros cromatográficos do método de partida para o desenvolvimento de método bioanalítico por CLAE para quantificar RI76, PD76 e RJ44 em tampão Hanks

Parâmetros	Condições
Coluna cromatográfica	ZORBAX Eclipse XDB C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Fase móvel	Tampão acetato de amônio 2 mM com 0,1% de ácido fórmico, pH 2,5, e acetonitrila
Eluição	Gradiente 0 minutos: ACN:Tampão (30:70) 6 minutos: ACN:Tampão (88:12) 12 minutos: ACN:Tampão (88:12) 13 minutos: ACN:Tampão (30:70) 15 minutos: ACN:Tampão (30:70)
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	5 µL
Comprimento de onda do detector	260 nm
Temperatura do forno da coluna	40 °C
Temperatura do amostrador	Temperatura ambiente

**Fonte:** adaptado de Franco, 2020.

Para a otimização do método cromatográfico, foram preparadas soluções padrões dos compostos a cada dia de análise. No caso do RI76 e PD76, para o preparo das soluções estoque, pesaram-se separadamente 2,5 mg de cada composto e transferiu-se para balões volumétricos de 5 mL. A fim de solubilizá-los, foram adicionados 1,25 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 2,8 mL de etanol aos balões, que foram levados ao ultrassom por cinco minutos. Após esta etapa, os volumes dos balões foram completados com água purificada e as soluções foram homogeneizadas, obtendo-se soluções com concentração final de 0,5 mg/mL de PD76 e RI76.

Já as soluções amostra foram preparadas pipetando-se 0,2 mL das soluções estoque para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com tampão Hanks, as soluções foram homogeneizadas e filtradas para vial. As concentrações finais obtidas foram de 10 µg/mL de RI76 e de PD76, 0,5% de DMSO e 1,1% de etanol.



Tendo em vista que RJ44 apresenta melhor solubilidade em meio aquoso, a solução estoque deste composto foi preparada pesando-se 2,5 mg da substância e transferindo-se para balão volumétrico de 5 mL. Foram adicionados 0,6 mL de DMSO e 1,5 mL de etanol ao balão, que foi levado ao ultrassom por cinco minutos para facilitar a solubilização. Posteriormente, o volume foi completado com água purificada e a solução foi homogeneizada. A concentração final da solução estoque foi de 0,5 mg/mL de RJ44. Já a solução amostra foi preparada pipetando-se 0,2 mL da solução estoque para balão volumétrico de 5 mL. O volume foi completado com tampão Hanks, a solução foi homogeneizada e filtrada para vial. A concentração final obtida foi de 20 µg/mL de RJ44, 0,5% de DMSO e 1,2% de etanol.

Com o intuito de determinar as condições mais adequadas para a análise cromatográfica, testaram-se diferentes volumes de injeção (10 a 50 µL), proporções de solventes para o preparo da amostra e comprimentos de onda de detecção. Em cada condição cromatográfica testada, foram avaliados os parâmetros tempo de retenção (Tr), resolução (R), fator de cauda (T) e pureza do pico referente aos analitos.

#### **4.2.5 Validação dos métodos bioanalíticos**

A validação dos métodos bioanalíticos para quantificação de PD76 e RJ44 por CLAE-DAD em matriz proveniente de cultivo celular foi realizada conforme parâmetros e especificações recomendados pela RDC n° 27 de 17 de maio de 2012 da Anvisa, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, e pelos guias de validação de métodos bioanalíticos da *European Medicines Agency* (EMA), de 2011, e do *Food and Drug Administration* (FDA), de 2018. Dessa forma, os requisitos avaliados foram: estabilidade da amostra, seletividade, efeito residual (*carryover*), curva de calibração, limite de quantificação, precisão e exatidão. Os cálculos e avaliações estatísticas dos dados foram realizados com auxílio dos softwares Empower 3.0 e Microsoft Excel 2013. O processo de validação foi realizado individualmente para os compostos PD76 e RJ44, uma vez que se trabalhou com métodos distintos para quantificação de cada analito.

#### 4.2.5.1 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

A estabilidade é o ensaio que visa determinar se a concentração de um analito se mantém dentro de limites estabelecidos, numa dada matriz, sob condições específicas. Para cada um dos analitos, foram empregadas três amostras de controle de qualidade de baixa concentração (CQB) e três amostras de controle de qualidade de alta concentração (CQA), cujas concentrações são 0,1 µg/mL e 10,0 µg/mL, respectivamente, para PD76 e RI76, e 0,1 µg/mL e 20,0 µg/mL, respectivamente, para RJ44. Essas soluções foram analisadas imediatamente após sua preparação e foram submetidas às condições do ensaio de permeabilidade, mantidas em incubadora com agitação orbital a 50 rpm e 37 °C. Foram coletadas alíquotas nos tempos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o preparo das soluções, que foram imediatamente transferidas para vials e analisadas.

A concentração das amostras foi determinada por meio de uma curva de calibração recém preparada. A estabilidade é demonstrada quando não se observa desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal.

#### 4.2.5.2 Seletividade

Seletividade é a capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da matriz. Para este estudo de permeabilidade intestinal *in vitro*, foram avaliados possíveis interferentes da matriz empregada nos ensaios de permeabilidade, sendo eles o tampão Hanks e os co-solventes etanol e DMSO, empregados na solubilização de PD76 e RJ44.

Portanto, foram injetadas as soluções amostras e uma solução branco, preparadas nas mesmas condições do ensaio de permeabilidade, com a finalidade de demonstrar a inexistência de picos de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos. Para a comprovação de que o método é seletivo aos compostos, as respostas de picos interferentes próximos aos

tempos de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos nas amostras do LIQ.

#### **4.2.5.3 Efeito residual**

Efeito residual (*carryover*) é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Para verificar sua presença, três injeções da mesma amostra branco foram injetadas no sistema cromatográfico, uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra no limite superior de quantificação (LSQ), que é a maior concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz: 12 µg/mL para PD76 e 24 µg/mL para RJ44. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ), que é de 0,05 µg/mL para todos os compostos.

Para garantir a ausência de efeito residual, as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção dos analitos devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos nas amostras do LIQ.

#### **4.2.5.4 Curva de calibração**

A curva de calibração avalia a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Essa determinação é importante para avaliar se os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações dos analitos. Para isso, foram construídas três curvas de calibração para cada composto, que incluíram a análise da amostra branco e de oito amostras de diferentes concentrações dos analitos.

A curva de calibração foi construída utilizando a mesma matriz proposta para o estudo. As equações das retas foram determinadas e foi estabelecida correlação linear entre os valores de concentração, considerados variáveis independentes (x), e as áreas dos sinais cromatográficos das amostras, consideradas variáveis dependentes (y).

O preparo da solução estoque do PD76 foi iniciado pesando-se 1,0 mg do composto e transferindo-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 2,5 mL de DMSO ao balão, que foi levado ao ultrassom por 5 minutos. Após esta etapa, o volume do balão foi completado com etanol e a solução foi homogeneizada, obtendo-se uma solução com concentração final de 100 µg/mL de PD76.

Para o preparo da curva, foram pipetados volumes da solução estoque conforme apresentado na **Tabela 5** para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com tampão Hanks, as soluções foram homogeneizadas e filtradas para vial.

**Tabela 5** – Preparo da curva de calibração e concentrações finais de PD76

Volume pipetado	Balão volumétrico (mL)	Concentrações finais (µg/mL)
1200 µL da solução estoque	10	12,0 (LSQ)
900 µL da solução estoque	10	9,0
600 µL da solução estoque	10	6,0
300 µL da solução estoque	10	3,0
100 µL da solução estoque	10	1,0
1000 µL da solução com concentração de 3,0 µg/mL	10	0,3
1000 µL da solução com concentração de 1,0 µg/mL	10	0,1
500 µL da solução com concentração de 1,0 µg/mL	10	0,05 (LIQ)

Já para o preparo da solução estoque de RJ44, pesaram-se 2,0 mg da substância e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 2,5 mL de DMSO ao balão, que foi levado ao ultrassom por cinco minutos para facilitar a solubilização. Posteriormente, o volume foi completado com etanol e a solução foi homogeneizada. A concentração final da solução estoque foi de 200 µg/mL de RJ44.

A curva de calibração de RJ44 foi então preparada pipetando-se volumes da solução estoque conforme apresentado na **Tabela 6** para balões volumétricos

de 10 mL. O volume dos balões foi completado com tampão Hanks e as soluções foram homogeneizadas e filtradas para vial.

**Tabela 6** – Preparo da curva de calibração e concentrações finais de RJ44

<b>Volume pipetado</b>	<b>Balão volumétrico (mL)</b>	<b>Concentrações finais (µg/mL)</b>
1200 µL da solução estoque	10	24,0 (LSQ)
900 µL da solução estoque	10	18,0
600 µL da solução estoque	10	12,0
300 µL da solução estoque	10	6,0
100 µL da solução estoque	10	2,0
20 µL da solução estoque	10	0,4
500 µL da solução com concentração de 2,0 µg/mL	10	0,1
250 µL da solução com concentração de 2,0 µg/mL	10	0,05 (LIQ)

Os padrões de calibração são considerados aprovados quando o desvio for menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ e, para os demais padrões de calibração, o desvio deve ser menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal. A aprovação da curva de calibração ocorre quando ao menos 75% dos padrões de calibração são aprovados conforme os critérios citados acima, sendo que a curva deve contemplar no mínimo seis padrões com diferentes concentrações.

#### **4.2.5.5 Limite de quantificação**

O limite de quantificação é a menor quantidade de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis em uma amostra e, para tal, avalia-se a relação sinal/ruído, que deve ser superior a 10. Além disso, foram avaliados também os parâmetros precisão e exatidão do LIQ proposto.

#### **4.2.5.6 Precisão**

A precisão de um método analítico se baseia na proximidade dos resultados obtidos por repetidas injeções de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz. É determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída) e em três corridas diferentes (precisão intercorridas). Em cada corrida foram injetadas cinco replicatas em cinco diferentes concentrações: limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD).

O preparo das soluções estoques de PD76 e RJ44 foi realizado de maneira idêntica às soluções estoques da curva de calibração, descritas em **4.2.5.4**, com concentrações finais de 100 µg/mL de PD76 e 200 µg/mL de RJ44.

Para o preparo das soluções de PD76 utilizadas para avaliação da precisão, foram pipetados volumes da solução estoque conforme apresentado na **Tabela 7** para balões volumétricos de 10 mL. Os volumes foram completados com tampão Hanks, as soluções foram homogeneizadas e filtradas para vial.

**Tabela 7** – Preparo das soluções para avaliação da precisão do método bioanalítico para quantificação de PD76

Volume pipetado	Balão volumétrico (mL)	Concentrações finais (µg/mL)
2000 µL da solução estoque	10	20,0 (CQD)*
1000 µL da solução estoque	10	10,0 (CQA)
500 µL da solução estoque	10	5,0 (CQM)
100 µL da solução com concentração de 10,0 µg/mL	10	0,1 (CQB)
50 µL da solução com concentração de 10,0 µg/mL	10	0,05 (LIQ)

\*CQD foi diluído na concentração 1:4 antes da injeção. Pipetou-se 2,5 mL do CQD para balão volumétrico de 10 mL (concentração final: 5 µg/mL de PD76).

Já para o RJ44, as soluções utilizadas na precisão foram preparadas pipetando-se volumes da solução estoque conforme apresentado na **Tabela 8**

para balões volumétricos de 10 mL. O volume dos balões foi completado com tampão Hanks e as soluções foram homogeneizadas e filtradas para vial.

**Tabela 8** – Preparo das soluções para avaliação da precisão do método bioanalítico para quantificação de RJ44

Volume pipetado	Balão volumétrico (mL)	Concentrações finais (µg/mL)
1400 µL da solução estoque	10	28,0 (CQD)*
1000 µL da solução estoque	10	20,0 (CQA)
500 µL da solução estoque	10	10,0 (CQM)
50 µL da solução com concentração de 20,0 µg/mL	10	0,1 (CQB)
25 µL da solução com concentração de 20,0 µg/mL	10	0,05 (LIQ)

\*CQD foi diluído na concentração 1:4 antes da injeção. Pipetou-se 2,5 mL do CQD para balão volumétrico de 10 mL (concentração final: 7 µg/mL de RJ44).

A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. O cálculo de DPR é realizado conforme **Equação (1)**.

#### Equação 1 – Desvio Padrão Relativo

$$DPR (\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

DP = Desvio padrão;

CMD = Concentração média determinada.

#### 4.2.5.7 Exatidão

A exatidão determina a concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência. Deve ser determinada em uma mesma corrida (exatidão

intracorrída) e em três corridas diferentes (exatidão intercorridas). Em cada corrida foram injetadas cinco replicatas em cinco concentrações: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Estas soluções foram preparadas de maneira idêntica ao experimento da precisão.

É expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa de  $\pm 15\%$  do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal. O cálculo do DPR é realizado conforme **Equação (2)**.

#### **Equação 2 – Erro Padrão Relativo**

$$EPR (\%) = \frac{CT - CME}{CT} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

CME = Concentração média experimental;

CT = Concentração teórica.

#### **4.2.6 Cultivo da linhagem de células Caco-2**

As células Caco-2, provenientes do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP, Brasil), foram rapidamente descongeladas e transferidas para garrafas de cultivo. Elas foram cultivadas em meio DMEM completo, contendo 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 e 2,2 g/L de bicarbonato de sódio. Este meio foi substituído a cada 48 horas e a garrafa foi armazenada em incubadora a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade relativa.

O subcultivo foi realizado quando a cultura atingiu pelo menos 80% de cobertura da garrafa. O procedimento para realização do subcultivo se iniciou com a aspiração e descarte do meio, seguido de lavagens da membrana celular formada na parede da garrafa com 1,5 mL de solução de tripsina (0,25%) com EDTA (1 mM). Para o deslocamento das células, utilizou-se mais



0,5 mL desta mesma solução, seguido de incubação da garrafa a 37 °C por 2 minutos. As células foram, então, ressuspensas em 3,5 mL de meio DMEM, permitindo uma passagem celular de 1:4, por meio da transferência de 1 mL da suspensão celular para nova garrafa e adição de 13 mL de meio DMEM suplementado.

#### **4.2.7 Ensaio para determinação da viabilidade celular**

As células Caco-2 foram cultivadas na densidade de  $3 \times 10^4$  células/poço em microplacas com 96 poços em meio DMEM sem fenol, e foram incubadas ao longo de 24 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade, para que fosse possível o crescimento e a aderência celular no tapete dos poços.

Finalizado o período de incubação, realizou-se a aspiração do meio cuidadosamente, de forma a evitar o contato da pipeta de Pasteur com as células para não inibir o crescimento celular e para não favorecer a contaminação. Após esta etapa, foram adicionados 100 µL de soluções contendo PD76 e RJ44, individualmente, nas concentrações de 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL, solubilizadas em meio DMEM sem fenol, utilizando-se oito poços para cada concentração.

A fim de comparação, também foram adicionados na placa as soluções do controle positivo, que representa a morte celular, e do controle negativo, que garante a sobrevivência das células. Uma solução DMEM:DMSO 1:1 foi utilizada como controle positivo, tendo em vista que a alta concentração de DMSO nesta solução garante a morte celular. Já nos poços de controle negativo, foram adicionados apenas o meio DMEM sem fenol.

A placa foi incubada por 12 horas nas mesmas condições supracitadas. Findado este período, as soluções com os compostos foram aspiradas e adicionaram-se, em cada poço, 30 µL de uma solução contendo MTT a 5 mg/mL, diluída em DMEM sem fenol, e preparada imediatamente antes da adição e com proteção à luz, uma vez que o MTT é uma substância

fotossensível. A placa foi protegida da luz com papel alumínio, a fim de garantir que o MTT não degradasse, e levada novamente à incubação por duas horas.

Após incubação, 70 µL de solução de solubilização (HCl 0,1 M em isopropanol anidro) foram adicionados em cada poço. Com a finalidade de favorecer a solubilização dos cristais de formazan que foram formados, a placa foi levada a uma estufa com agitação orbital a 100 rpm durante 15 minutos.

Por fim, realizou-se a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 nm e 690 nm. Os cálculos foram realizados utilizando Excel 2013. Os resultados do ensaio foram expressos em % de viabilidade celular em relação ao controle negativo.

#### **4.2.8 Estudo de permeabilidade *in vitro* de PD76 e RJ44**

A realização do estudo de permeabilidade celular com células Caco-2 se iniciou com a transferência de uma alíquota de suspensão destas células contendo a densidade de aproximadamente  $5 \times 10^4$  cel/cm<sup>2</sup>, em fase lag de crescimento, para duas placas Transwell® compostas por doze poços com suporte de policarbonato, área de 1,12 cm<sup>2</sup> e 0,4 µm de porosidade.

Para o cultivo celular, adicionou-se 1,5 mL de meio DMEM completo na porção basolateral de cada poço e 0,5 mL deste meio na porção apical da membrana celular. Estas placas foram mantidas em incubadora a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade relativa, ao longo de 21 dias. As trocas do meio foram realizadas a cada 48 horas. Decorrido esse tempo, que é necessário para que ocorra a diferenciação celular e formação de uma monocamada que mimetiza o epitélio do intestino, verificou-se se as células estavam aptas para a realização do experimento, por meio da medição da resistência elétrica transepitelial. A garantia da integridade das membranas se dá quando os valores medidos estão acima de 200 Ω x cm<sup>2</sup>.

Antes do experimento, as células foram lavadas com solução de tampão Hanks. Prepararam-se soluções estoque contendo separadamente os compostos RJ44 e PD76 na concentração de 0,5 mg/mL em 25% de DMSO, 56% de etanol e 19% de água purificada para PD76 e 12% de DMSO, 30% de

etanol e 58% de água purificada para RJ44. Da solução estoque de PD76, foram pipetados 0,2 mL para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com tampão Hanks estéril, de forma a obter solução a 10 µg/mL de PD76 com 0,5% de DMSO e 1,1% de etanol. Já para o RJ44, foram pipetados 0,2 mL da solução estoque para balão volumétrico de 5 mL, obtendo-se solução a 20 µg/mL de RJ44 com 0,5% de DMSO e 1,2% de etanol. Além disso, foi preparada uma solução de verapamil a 20 µg/mL em tampão Hanks.

Ao início do estudo de permeabilidade, após aspiração total do meio de cultura presente nos poços das placas, foram adicionados 0,5 mL da solução de PD76 na porção apical de seis poços da placa e 1,5 mL da solução de PD76 nos demais poços desta mesma placa. Na segunda placa, foi realizado o mesmo procedimento para o composto RJ44. Após adição das soluções na porção apical e basolateral, foi realizada a quantificação dos analitos por meio da injeção das amostras em sistema CLAE-UV, usando o método desenvolvido e validado. Foram coletados 200 µL de solução nos compartimentos contrários àqueles nos quais foram adicionadas as soluções dos analitos, no tempo inicial e nos intervalos de 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o início do estudo, em triplicata. Dessa forma, quando as soluções foram adicionadas na porção apical, foram retiradas, a cada intervalo, 200 µL na porção basolateral. As amostras coletadas foram imediatamente avaliadas por CLAE-UV. Durante todo o estudo, as placas foram mantidas em incubadora com agitação orbital a 50 rpm e 37 °C.

A reposição do tampão retirado a cada intervalo foi realizada adicionando-se 200 µL de tampão Hanks, mantido a 37 °C. Na porção apical, o pH do tampão Hanks repostado era 6,8 e na porção basolateral era 7,4, para que fossem mimetizadas as soluções fisiológicas. A fim de verificar o possível mecanismo de efluxo celular dos compostos, foi utilizado verapamil, um inibidor da P-gP. Em substituição à solução do tampão Hanks para reposição do meio, em seis dos doze poços foram adicionados soluções contendo verapamil em tampão Hanks.

Por fim, foi realizado o cálculo de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) de acordo com a velocidade (cm/s) de transporte dos analitos, medida pelo fluxo destes através da membrana celular, conforme **Equação (3)**.

### Equação 3 – Permeabilidade aparente

$$P_{app} = \frac{VR}{A \times C_0} \times \frac{dC}{dt} \quad (3)$$

Em que:

$P_{app}$  = Permeabilidade aparente;

VR = Volume do compartimento receptor (basolateral) em cm<sup>3</sup>;

A = Área do suporte permeável de cultivo celular;

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

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

#### 4.2.9 Estudo de permeabilidade *in silico* de PD76 e RJ44

Neste trabalho foram utilizados dois modelos computacionais para a realização da predição teórica da permeabilidade intestinal de PD76 e RJ44 em modelos de células Caco-2, sendo eles as plataformas ADMETlab (XIONG *et al.*, 2021, <https://admetmesh.scbdd.com/>) e admetSAR (YANG *et al.*, 2018, <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>), modelos matemáticos que correlacionam a estrutura química dos compostos ao parâmetro estudado.

Estas plataformas fornecem informações químicas, biológicas e previsões para diversos parâmetros farmacocinéticos, que englobam a absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET) de um composto. Estas informações podem ser acessadas apenas com o CAS da substância, ou com seu nome comum ou até mesmo com sua estrutura química.

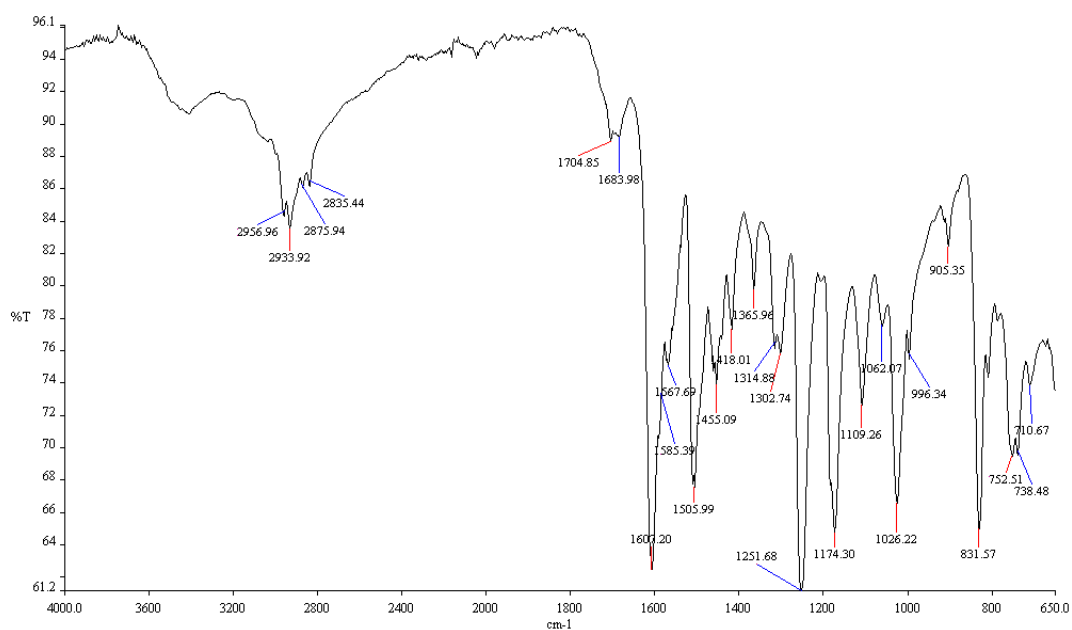
Para o estudo de permeabilidade *in silico* de PD76 e RJ44, suas estruturas químicas foram fornecidas às plataformas, que calcularam diversas propriedades farmacocinéticas, dentre elas a probabilidade dos compostos serem permeáveis em células Caco-2 e a probabilidade de serem substratos da Pg-P. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo estudo de permeabilidade *in vitro*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese de RI76, PD76 e RJ44

Após a síntese do RI76, avaliou-se o seu espectro no infravermelho. Os resultados foram comparados com aqueles de referência obtidos por Lino (2015) e Franco (2020). O espectro de absorção no infravermelho obtido está demonstrado na **Figura 12**, e foi compatível aos espectros obtidos nos trabalhos supracitados. Na **Tabela 9** são correlacionadas as principais bandas de absorção relativas aos grupos funcionais responsáveis pela absorção.

**Figura 12 – Espectro de absorção na região do infravermelho para RI76**

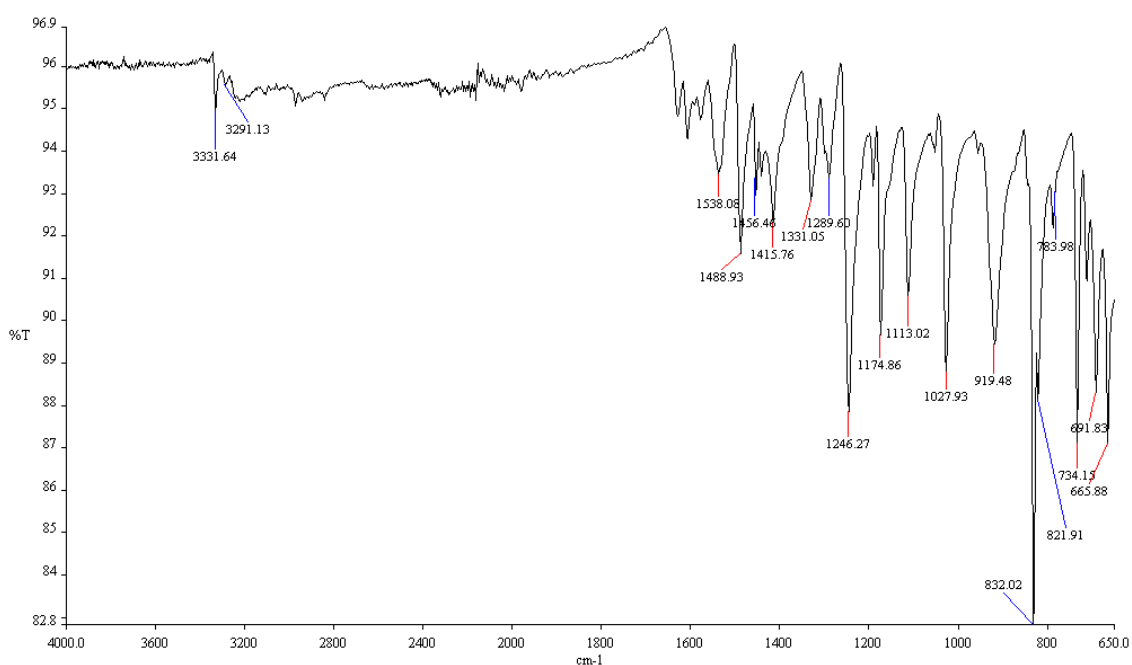


**Tabela 9 – Correspondências estruturais das bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho do RI76**

Banda característica	Correspondência estrutural
2956, 2933 $\text{cm}^{-1}$	Estiramentos de ligação C-H $\text{sp}^3$
1607 $\text{cm}^{-1}$	Estiramento de ligação C=N
1585, 1505, 1455 $\text{cm}^{-1}$	Estiramentos de ligação C=C anel aromático
1251, 1026 $\text{cm}^{-1}$	Estiramentos de ligação C-O de éter fenilalquílico
831 $\text{cm}^{-1}$	Vibrações fora do plano de anel aromático parassubstituído

O PD76 foi sintetizado e o ponto de fusão do produto obtido foi 164,7 °C, corroborando a faixa de fusão obtida para este composto no estudo de Franco (2020). Além disso, também se avaliou o seu espectro no infravermelho, que foi comparado com o espectro de referência obtido por Franco (2020). Na **Figura 13** está demonstrado o espectro de absorção no infravermelho obtido para PD76, que foi compatível com o espectro de referência. Na **Tabela 10** são correlacionadas as principais bandas de absorção relativas aos grupos funcionais responsáveis pela absorção.

**Figura 13 – Espectro de absorção na região do infravermelho para PD76**

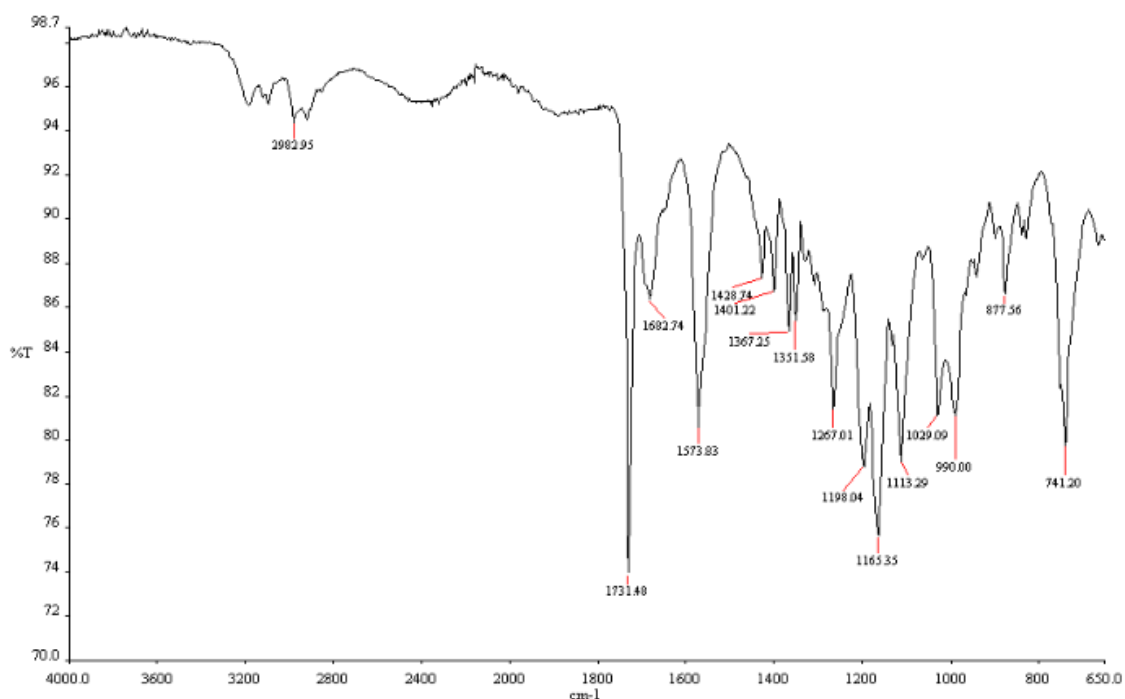


**Tabela 10 – Correspondências estruturais das bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho do PD76**

Banda característica	Correspondência estrutural
3331 cm <sup>-1</sup>	Estiramento de ligação N-H secundária
1246, 1027 cm <sup>-1</sup>	Estiramentos de ligação C-O de éter fenilalquílico
821 cm <sup>-1</sup>	Vibrações fora do plano de anel aromático parassubstituído

Por fim, RJ44 foi sintetizado e o ponto de fusão obtido foi de 155,4 °C, o que corrobora o estudo de Oliveira (2021). Na **Figura 14** está demonstrado o espectro de absorção no infravermelho obtido para RJ44 e na **Tabela 11** são correlacionadas as principais bandas de absorção relativas aos grupos funcionais responsáveis pela absorção.

**Figura 14 – Espectro de absorção na região do infravermelho para RJ44**



**Tabela 11 – Correspondências estruturais das bandas observadas no espectro de absorção no infravermelho do RJ44**

Banda característica	Correspondência estrutural
1731 cm <sup>-1</sup>	Estiramento de ligação C=O de ácido carboxílico
1573 cm <sup>-1</sup>	Estiramento de ligação N-H secundária
1165 cm <sup>-1</sup>	Estiramento de ligação C-N de alifáticos



## 5.2 Desenvolvimento de métodos bioanalíticos por CLAE-DAD para quantificação de RI76, PD76 e RJ44 em matriz proveniente de cultivo celular

Para iniciar o desenvolvimento dos métodos bioanalíticos, primeiramente avaliou-se a solubilidade das substâncias em tampão Hanks, diluente que deve ser utilizado no estudo de permeabilidade *in vitro*. Conforme estudo prévio de solubilidade, realizado por Franco e colaboradores (2020), RI76 e PD76 são substâncias praticamente insolúveis em água e facilmente solúveis em DMSO. Corroborando o estudo supracitado, RI76 e PD76 não foram solúveis em 100% de tampão Hanks, uma vez que este tampão é preparado em meio aquoso.

O outro derivado tiazolilhidrazona (RJ44) também não apresentou solubilidade adequada em 100% de tampão Hanks, entretanto foi observado menos material insolúvel em relação a RI76 e PD76, sugerindo que esse composto apresenta maior solubilidade em meios aquosos. Além disso, RJ44 também foi facilmente solúvel em DMSO.

Dessa forma, foi necessário solubilizar todos os compostos em DMSO, solvente frequentemente utilizado quando compostos com baixa solubilidade em água são avaliados em ensaios de permeabilidade. A fim de garantir a completa solubilização dos compostos na concentração utilizada para o estudo, também se utilizou etanol para preparo da solução estoque. Em seguida, as soluções de trabalho foram preparadas utilizando-se tampão Hanks como diluente, de modo que as concentrações desses dois solventes não fossem prejudiciais para as células.

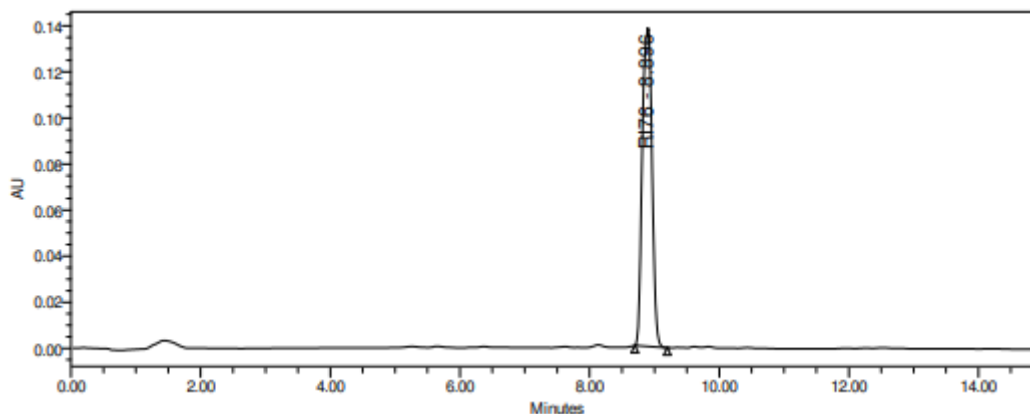
Após essa etapa, foram desenvolvidos dois métodos cromatográficos, sendo um deles para a quantificação de PD76 e RI76 simultaneamente e o outro para quantificação de RJ44. Ambos foram baseados no método analítico desenvolvido por Franco e colaboradores (2021) para quantificação de PD76 e RI76. As condições finais estão descritas na **Tabela 12**. As condições cromatográficas foram semelhantes para quantificação dos compostos, com exceção do comprimento de onda de detecção: 260 nm para RI76 e PD76, e 282 nm para RJ44.

**Tabela 12** – Parâmetros cromatográficos do método bioanalítico por CLAE desenvolvido para quantificar RI76, PD76 e RJ44 em tampão Hanks

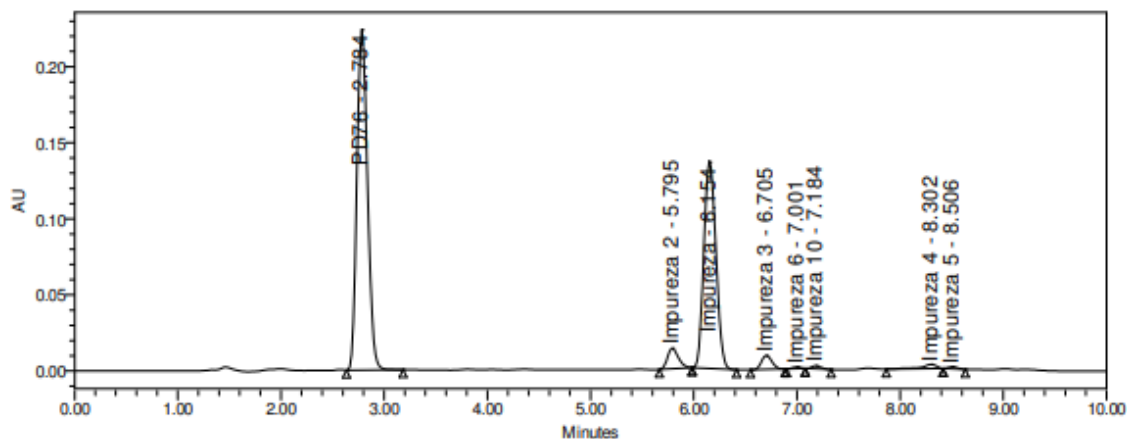
Parâmetros	Condições
Coluna cromatográfica	ZORBAX Eclipse XDB C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Fase móvel	Tampão acetato de amônio 2 mM com 0,1% de ácido fórmico, pH 2,5, e acetonitrila
Eluição	Gradiente 0 minutos: ACN:Tampão (30:70) 6 minutos: ACN:Tampão (88:12) 12 minutos: ACN:Tampão (88:12) 13 minutos: ACN:Tampão (30:70) 15 minutos: ACN:Tampão (30:70)
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	50 µL
Temperatura do forno da coluna	25 °C
Temperatura do amostrador	5 °C

Os cromatogramas obtidos para os derivados RI76, PD76 e RJ44 estão apresentados nas **Figuras 15 a 17**. O tempo de retenção obtido para RI76 foi 8,99 minutos, para PD76, 2,79 minutos e para RJ44 3,11 minutos. Todos os picos foram bem separados dos picos das impurezas e apresentaram simetria adequada.

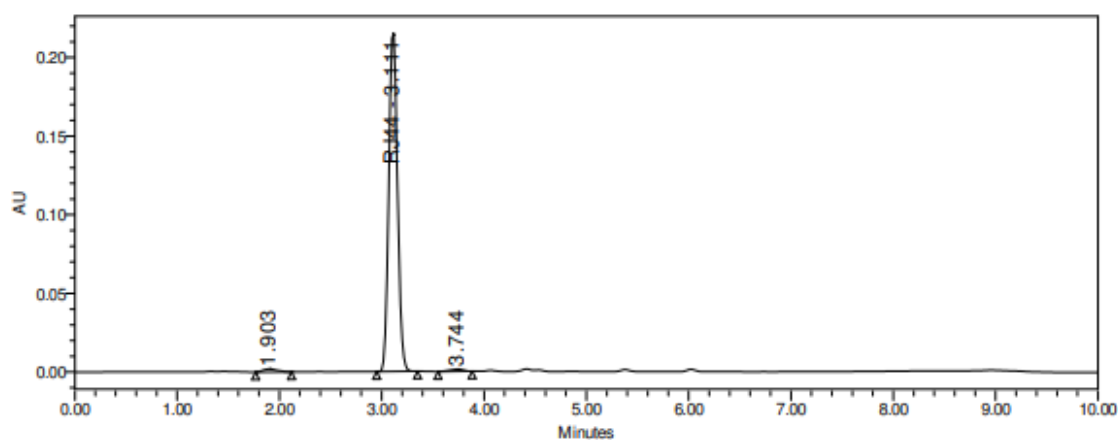
**Figura 15** – Cromatograma obtido para RI76 a 10 µg/mL nas condições otimizadas do método cromatográfico



**Figura 16 – Cromatograma obtido para PD76 a 10 µg/mL nas condições otimizadas do método cromatográfico**



**Figura 17 – Cromatograma obtido para RJ44 a 10 µg/mL nas condições otimizadas do método cromatográfico**



Os métodos descritos foram validados conforme critérios da RDC 27 n° 27 de 17 de maio de 2012, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos, e pelos guias de validação de métodos bioanalíticos do EMA, de 2011, e do FDA, de 2018.

### 5.3 Validação dos métodos bioanalíticos

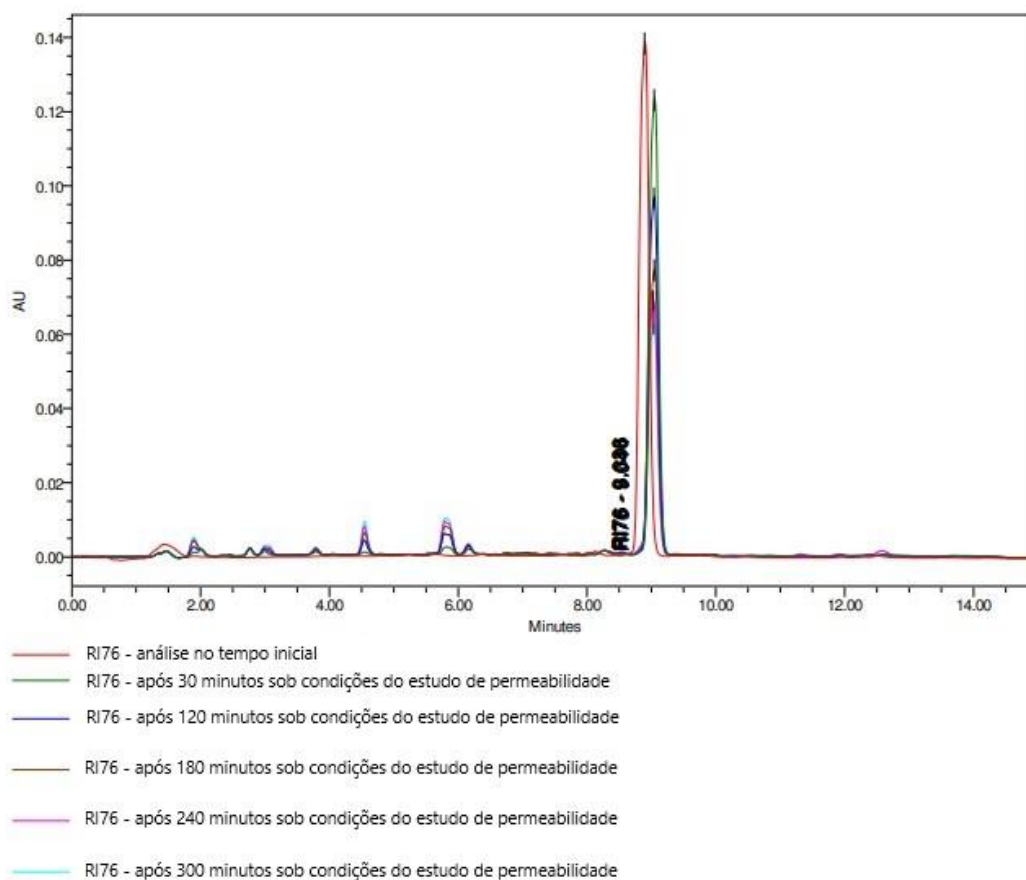
#### 5.3.1 Estabilidade dos analitos em matriz biológica

Franco (2020) realizou um estudo de degradação forçada de RI76, que apontou susceptibilidade deste composto a hidrólise, formando o produto de degradação PD76. O trabalho apontou ainda uma elevada instabilidade de RI76 e sugeriu a possibilidade deste composto se converter em PD76 em meios aquosos utilizados nos testes *in vitro*, agindo como um pró-fármaco de PD76. Desta forma, no mesmo trabalho, o composto PD76 foi sintetizado e demonstrou atividade antifúngica superior àquela previamente determinada para RI76, além de estabilidade adequada em diferentes condições.

Assim, antes da realização do estudo de permeabilidade de RI76, sua estabilidade foi avaliada por meio da análise de uma solução deste composto em tampão Hanks mantida durante 5 horas nas mesmas condições do estudo (temperatura de 37 °C e agitação orbital a 50 rpm). Esta solução foi analisada no tempo inicial e após 30, 120, 180, 240 e 300 minutos pelo método cromatográfico desenvolvido. Considerando que em meio aquoso RI76 apresenta elevada instabilidade, as amostras foram mantidas a uma temperatura de 5 °C no amostrador do equipamento, com a finalidade de cessar a hidrólise.

O resultado obtido neste estudo apontou uma degradação de 54,3% do RI76 quando preparado em tampão Hanks e mantido sob as condições do estudo de permeabilidade ao longo de 5 horas. A **Figura 18** apresenta um cromatograma com todas as injeções sobrepostas e facilita a visualização da degradação de RI76 nas condições do estudo.

**Figura 18 – Cromatogramas sobrepostos de RI76 obtidos em estudo de estabilidade nas condições do estudo de permeabilidade**



Observou-se que seria inviável proceder os estudos de permeabilidade intestinal em modelo de células Caco-2 com RI76, devido à sua elevada instabilidade em tampão Hanks. Diante disso, o trabalho prosseguiu apenas com os compostos PD76 e RJ44, que apresentam estabilidade adequada em meios aquosos. Para PD76 e RJ44, foi realizado o estudo de estabilidade em tampão Hanks (4 horas, temperatura a 37 °C, agitação orbital a 50 rpm), analisando-se triplicatas de soluções nos níveis CQB e CQA.

As médias e desvio padrão relativo dos resultados obtidos em cada coleta estão descritos nas **Tabelas 13 e 14**.

**Tabela 13 - Estudo de estabilidade de ensaio de PD76**

Tempo	Amostra	Concentração média (µg/mL)	EPR (%)
Inicial	CQB	0,096	3,78
	CQA	9,899	1,00
30 minutos	CQB	0,095	4,42
	CQA	9,753	2,46
60 minutos	CQB	0,095	4,54
	CQA	9,578	4,22
120 minutos	CQB	0,095	4,81
	CQA	9,358	6,42
180 minutos	CQB	0,095	4,94
	CQA	9,134	8,66
240 minutos	CQB	0,094	5,48
	CQA	9,034	9,66

**Tabela 14 - Estudo de estabilidade de ensaio de RJ44**

Tempo	Amostra	Concentração média (µg/mL)	EPR (%)
Inicial	CQB	0,097	2,98
	CQA	19,797	1,01
30 minutos	CQB	0,096	3,57
	CQA	19,504	2,48
60 minutos	CQB	0,094	5,06
	CQA	19,153	4,24
120 minutos	CQB	0,094	6,06
	CQA	18,711	6,44
180 minutos	CQB	0,093	7,50
	CQA	18,261	8,70
240 minutos	CQB	0,091	8,76
	CQA	18,061	9,70

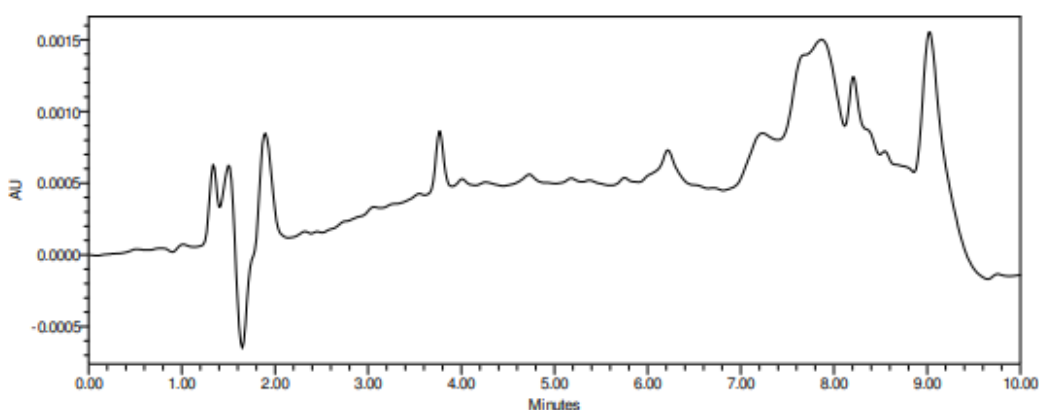
Apesar de um pequeno decréscimo nas concentrações dos analitos ter sido observado ao longo do tempo, os resultados demonstraram que as amostras contendo PD76 e RJ44 em tampão Hanks, quando mantidas nas condições do estudo de permeabilidade *in vitro*, podem ser consideradas estáveis, tendo em vista que os valores de desvio em relação ao valor nominal (EPR%) foram

menores do que 15% em todos os tempos e para todas as concentrações avaliadas.

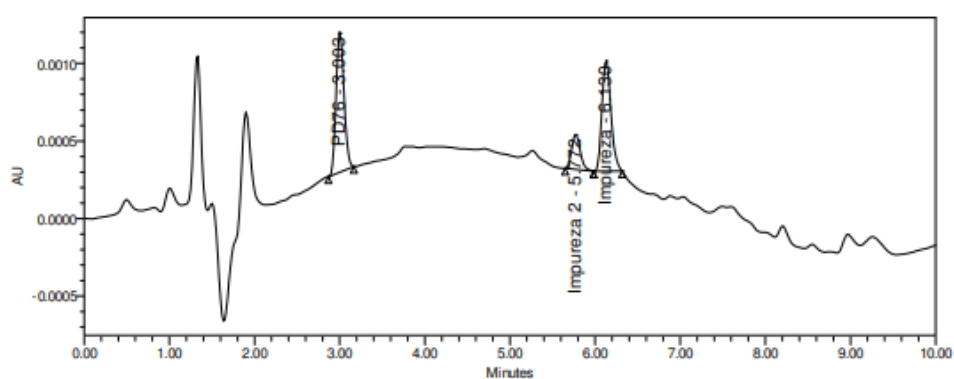
### 5.3.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada com base na injeção de amostras da solução branco, contendo o tampão Hanks, etanol e dimetilsulfóxido, e das amostras de PD76 e RJ44 no LIQ do estudo de permeabilidade intestinal. Em todas as análises, não foram observados picos cromatográficos interferentes com mesmo tempo de retenção dos analitos, como pode-se observar nas Figuras 19 a 22.

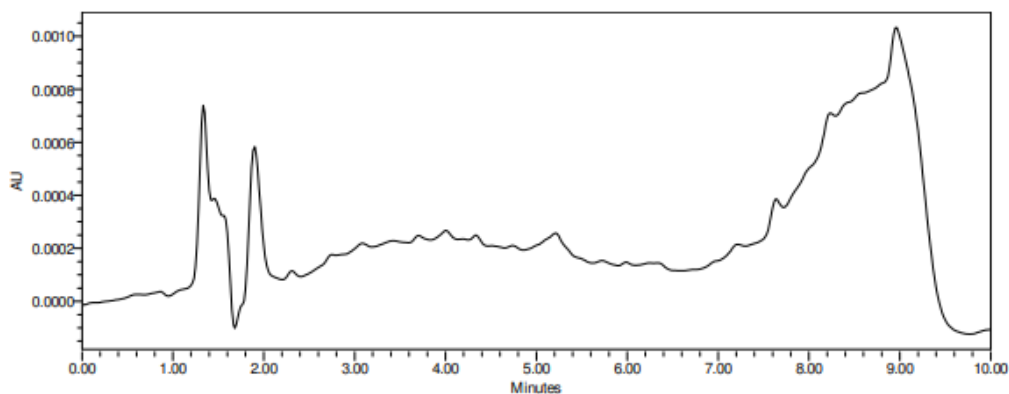
**Figura 19 – Cromatograma da solução branco (Hanks, etanol e DMSO) analisada pelo método desenvolvido para PD76**



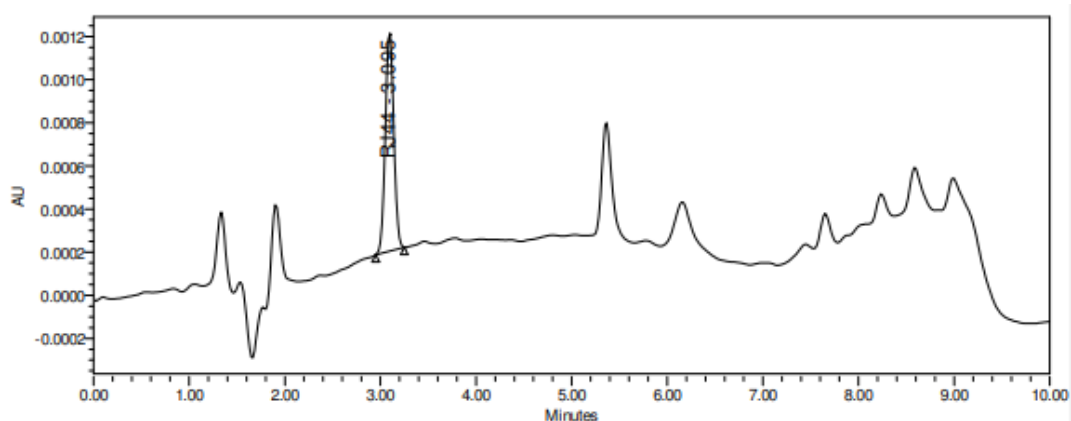
**Figura 20 – Cromatograma obtido para solução de PD76 no LIQ analisada pelo método desenvolvido**



**Figura 21 – Cromatograma da solução branco (Hanks, etanol e DMSO) analisada pelo método desenvolvido para RJ44**



**Figura 22 – Cromatograma obtido para solução de RJ44 no LIQ analisada pelo método desenvolvido**



A partir destes resultados, é possível afirmar que os métodos desenvolvidos são seletivos para quantificar PD76 e RJ44 em tampão Hanks.

### 5.3.3 Efeito residual

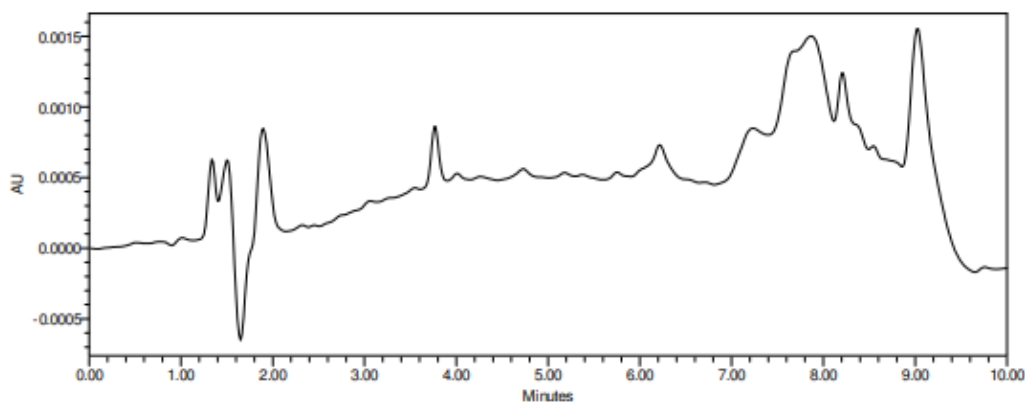
A presença de efeito residual (*carryover*) foi avaliada nas análises cromatográficas, por meio da injeção de solução branco contendo apenas tampão Hanks, etanol e dimetilsulfóxido, nas concentrações utilizadas no



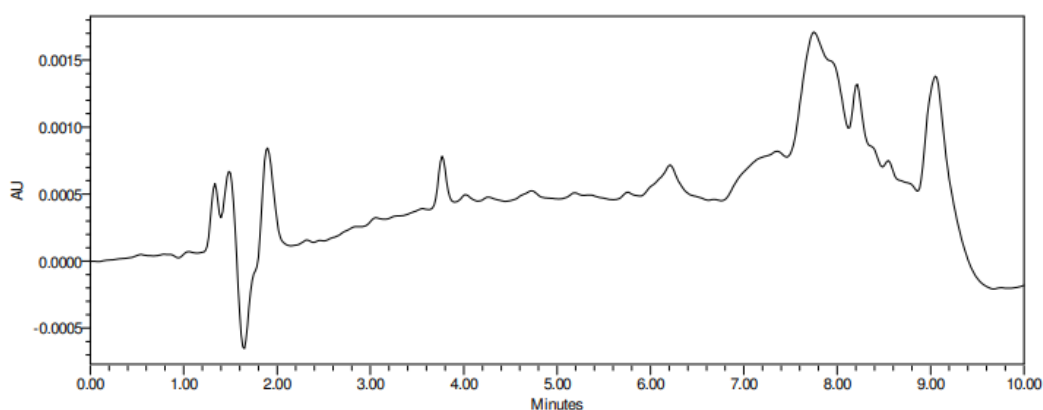
preparo das amostras do estudo de permeabilidade, antes e logo após a injeção do LSQ de cada composto.

Após as sequências de injeções realizadas, não foi observado a presença de picos nos cromatogramas das soluções branco, indicativo da ausência do efeito residual nas análises. Os cromatogramas estão apresentados nas **Figuras 23 a 26**.

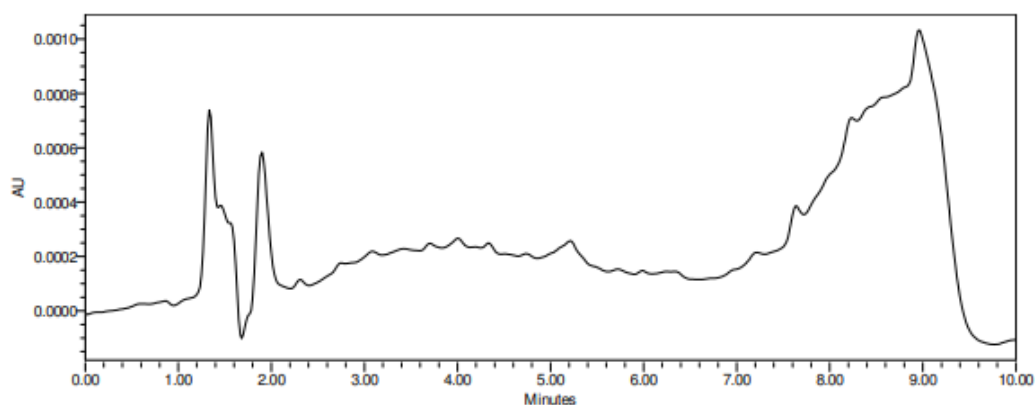
**Figura 23 – Cromatograma da solução branco antes da injeção do LSQ de PD76**



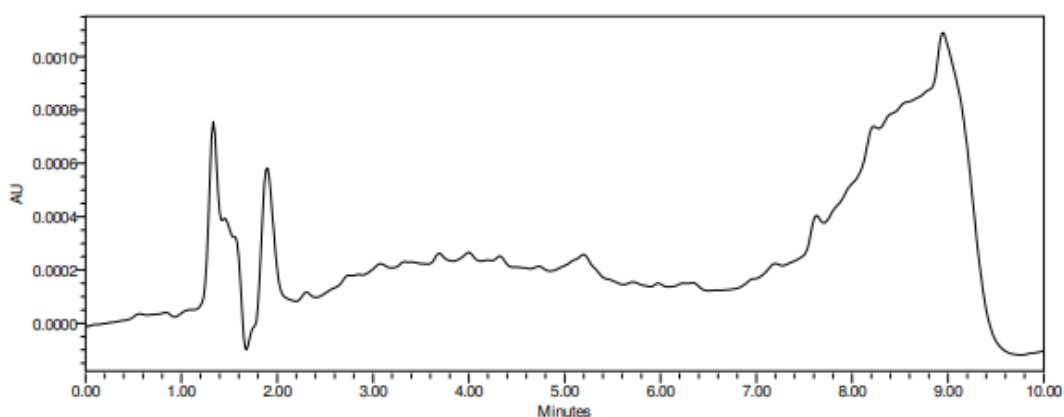
**Figura 24 – Cromatograma da solução branco após a injeção do LSQ de PD76**



**Figura 25 – Cromatograma da solução branco antes da injeção do LSQ de RJ44**



**Figura 26 – Cromatograma da solução branco após a injeção do LSQ de RJ44**



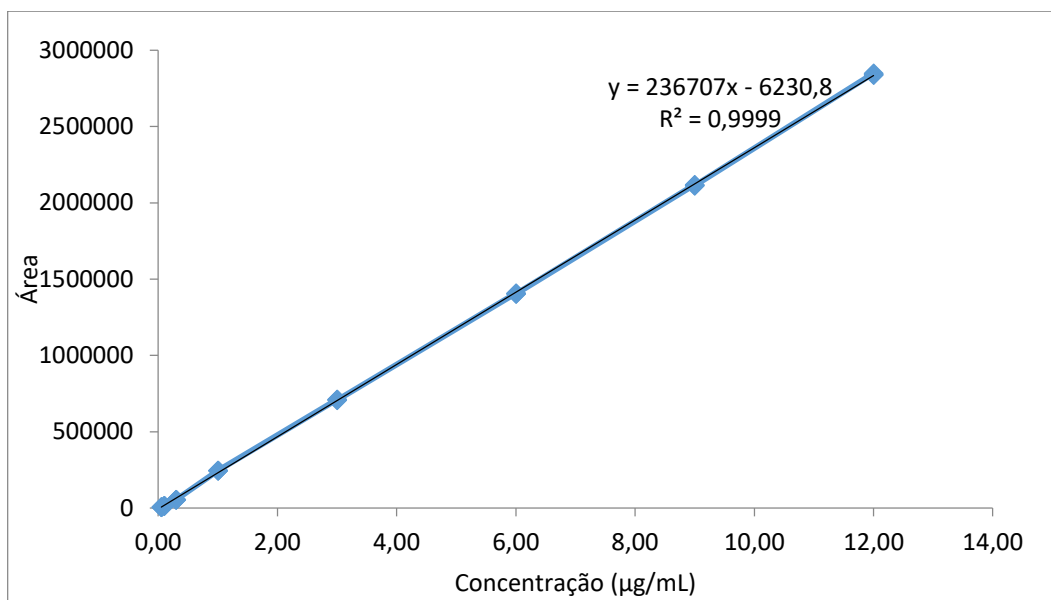
#### 5.3.4 Curva de calibração

Este parâmetro foi avaliado por meio de análises em triplicata de soluções padrão de PD76 e RJ44, nas concentrações descritas na **Tabela 5**. O modelo de regressão utilizado foi  $y = ax + b$ , sendo  $y$  a área sob os picos dos analitos,  $a$  o coeficiente angular,  $x$  a concentração nominal dos analitos e  $b$  o coeficiente linear.

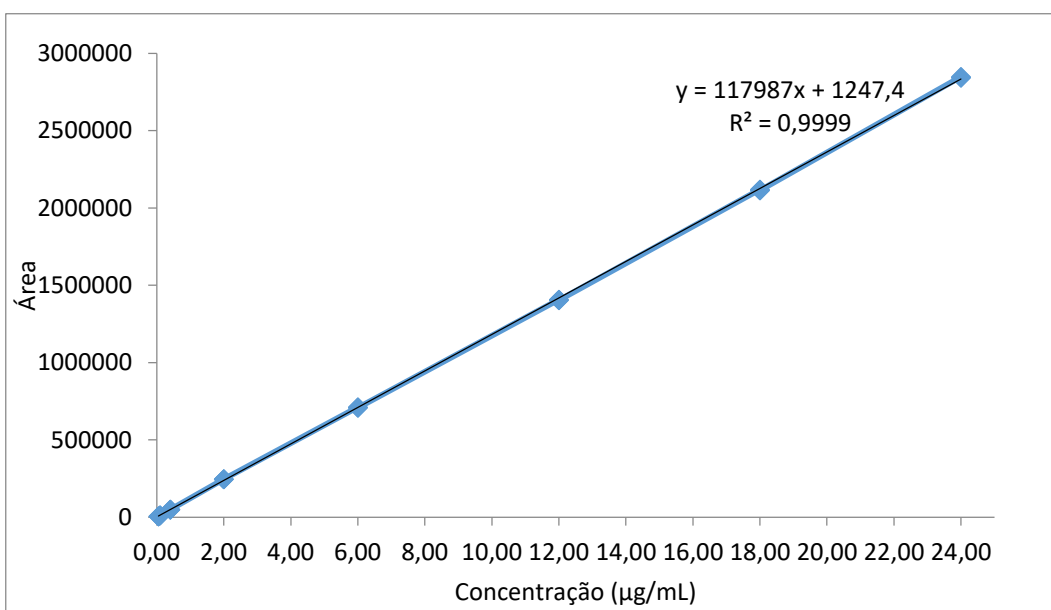
Conforme recomendado pelos guias de validação de métodos bioanalíticos, foram construídas três curvas de calibração para avaliação da relação entre a resposta instrumental e a concentração do analito. Nas **Figuras 27 e 28** estão

representadas as curvas de calibração para os métodos validados, bem como os parâmetros gráficos.

**Figura 27 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto PD76 em tampão Hanks**



**Figura 28 – Parâmetros da curva analítica obtidos na aplicação do método desenvolvido para quantificação do composto RJ44 em tampão Hanks**



As curvas de calibração foram aprovadas para ambos os métodos, uma vez que os desvios encontrados foram menores que 20% para os LIQs e menores que 15% para os demais pontos da curva, conforme demonstrado nas **Tabelas 15 e 16**.

**Tabela 15** – Dados obtidos durante a construção das curvas de calibração para avaliação da linearidade do método desenvolvido para PD76

Concentração teórica (µg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Concentração experimental (µg/mL)	EPR (%)	Concentração experimental (µg/mL)	EPR (%)	Concentração experimental (µg/mL)	EPR (%)
0,05	0,05	5,51	0,05	6,64	0,05	2,88
0,1	0,08	-11,59	0,09	-9,90	0,10	-3,47
0,3	0,26	-14,29	0,26	-13,41	0,30	0,28
1,0	1,06	6,40	0,94	-5,82	1,05	5,26
3,0	3,03	0,82	3,03	0,95	2,90	-3,35
6,0	5,97	-0,59	6,11	1,78	6,02	0,25
9,0	8,96	-0,40	9,07	0,79	9,08	0,84
12,0	12,03	0,29	11,89	-0,90	11,96	-0,36

**Tabela 16** – Dados obtidos durante a construção das curvas de calibração para avaliação da linearidade do método desenvolvido para RJ44

Concentração teórica (µg/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Concentração experimental (µg/mL)	EPR (%)	Concentração experimental (µg/mL)	EPR (%)	Concentração experimental (µg/mL)	EPR (%)
0,05	0,04	-15,08	0,05	-4,26	0,05	-2,36
0,1	0,10	-2,96	0,10	-3,27	0,09	-4,04
0,4	0,41	2,53	0,45	12,50	0,44	9,95
2,0	2,07	3,57	1,93	-3,55	1,96	-2,19
6,0	6,00	0,08	5,99	-0,02	5,98	-0,29
12,0	11,90	-0,81	11,99	-0,01	11,99	-0,02
18,0	17,92	-0,44	18,07	0,37	18,06	0,35
24,0	24,10	0,42	23,95	-0,19	23,96	-0,16

### 5.3.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação dos métodos foi avaliado com base na razão sinal/ruído, fornecida pelo software Empower 3.0. O valor de LIQ obtido para PD76 e RJ44 foram iguais, sendo 0,05 µg/mL. A razão sinal/ruído obtida para ambos os compostos nessa concentração foi superior a 10 e os resultados foram confirmados pelo cálculo de precisão e exatidão de LIQ, apresentados nas **Tabelas 17 a 20**.

### 5.3.6 Precisão

A precisão dos métodos desenvolvidos foi avaliada por meio da análise da precisão intracorrída, avaliada em uma mesma corrida, e da precisão intercorridas, avaliada em três corridas diferentes. Foram analisados 5 níveis de concentração (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), em quintuplicata (**Tabelas 17 e 18**)

Os métodos bioanalíticos foram considerados precisos, uma vez que o desvio padrão relativo foi inferior a 15% para todos os níveis avaliados, tanto para a precisão intracorrída quanto para a precisão intercorridas.

**Tabela 17** – Valores de DPR obtidos para a precisão intracorrída (n=5 para cada nível de concentração) e intercorrida (n=15 para cada nível de concentração) para PD76

Concentração teórica (µg/mL)	DPR% Intracorrída	DPR% Intercorrída
0,05 (LIQ)	1,71	2,00
0,1 (CQB)	1,88	4,49
5,0 (CQM)	0,28	0,59
10,0 (CQA)	1,00	2,03
20,0 (CQD)	0,26	0,25

**Tabela 18** – Valores de DPR obtidos para a precisão intracorrida (n=5 para cada nível de concentração) e intercorridas (n=15 para cada nível de concentração) para RJ44

Concentração teórica (µg/mL)	DPR% Intracorrida	DPR% Intercorrida
0,05 (LIQ)	1,29	13,36
0,1 (CQB)	3,75	7,21
10,0 (CQM)	0,05	0,65
20,0 (CQA)	0,02	0,05
28,0 (CQD)	0,58	0,56

### 5.3.7 Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada por meio da análise da exatidão intracorrida e intercorrida em cinco níveis de concentração (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), em quintuplicata.

Os métodos bioanalíticos foram considerados exatos, uma vez que foi observado um erro padrão relativo inferior a  $\pm 15\%$  para todos os níveis de concentração analisados. Os resultados para os compostos PD76 e RJ44 estão apresentados nas **Tabelas 19** e **20**, respectivamente.

**Tabela 19** – Valores de EPR obtidos para a exatidão intracorrida (n=5 para cada nível de concentração) e intercorrida (n=15 para cada nível de concentração) para PD76

Concentração teórica (µg/mL)	EPR % Intracorrida	EPR % Intercorrida
0,05 (LIQ)	-2,40	-1,20
0,1 (CQB)	9,20	9,47
5,0 (CQM)	0,66	0,75
10,0 (CQA)	3,12	1,35
20,0 (CQD)	0,64	0,53

**Tabela 20** - Valores de EPR obtidos para a exatidão intracorrída (n=5 para cada nível de concentração) e intercorrída (n=15 para cada nível de concentração) para RJ44

Concentração teórica (µg/mL)	EPR % Intracorrída	EPR % Intercorrída
0,05 (LIQ)	-15,20	2,93
0,1 (CQB)	-4,60	4,93
10,0 (CQM)	9,84	9,67
20,0 (CQA)	3,10	3,17
28,0 (CQD)	4,54	4,73

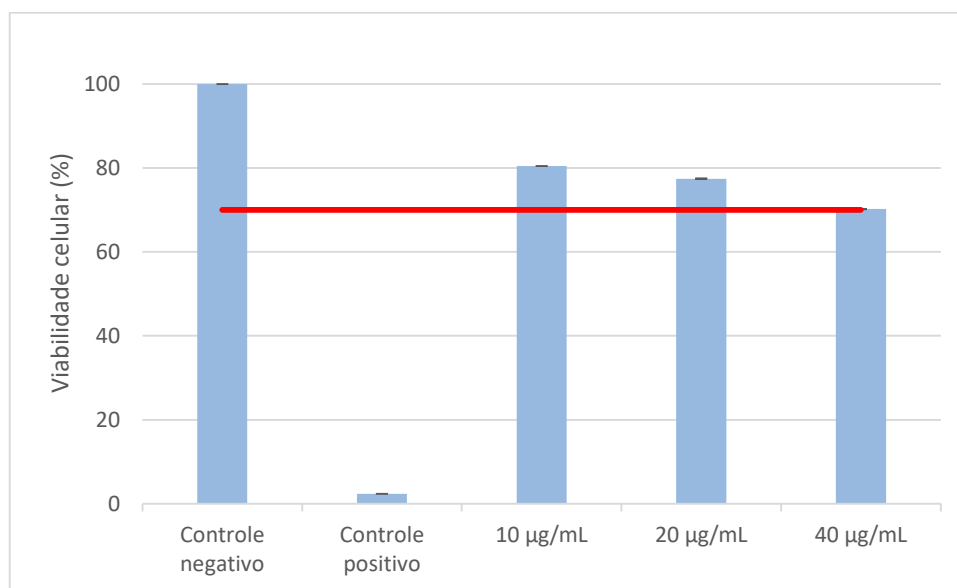
#### 5.4 Ensaio para determinação da viabilidade celular

Os valores de viabilidade celular foram calculados a partir da exposição das células Caco-2 às soluções dos compostos em diferentes concentrações (10 µg/mL a 40 µg/mL), durante 12 horas. A demonstração dos resultados foi expressa em relação à média das absorbâncias das células do grupo controle negativo, tratado apenas com tampão Hanks, e que apresentou 100% de sobrevivência das células, demonstrando completa viabilidade celular.

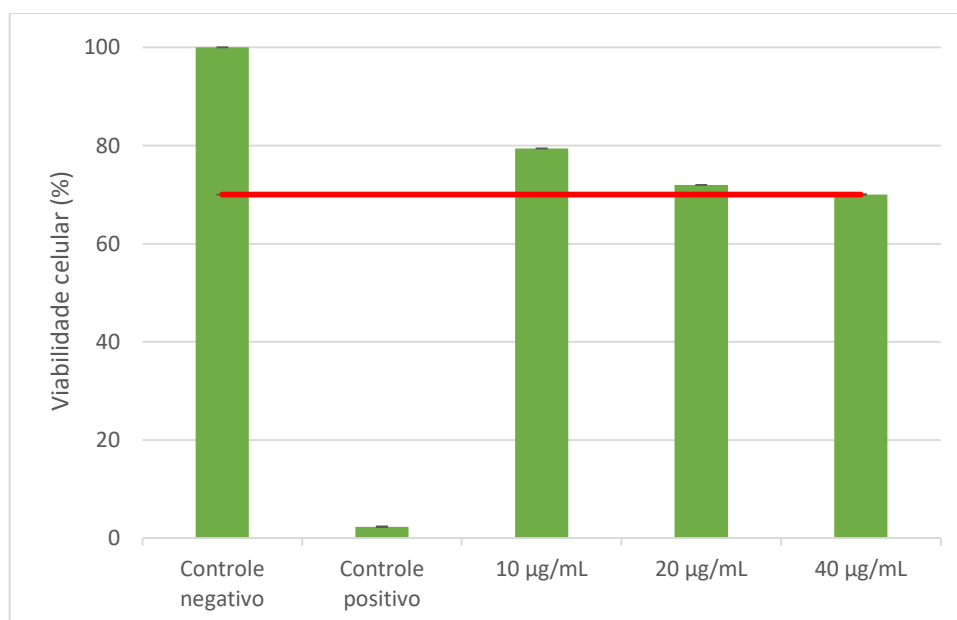
A citotoxicidade dos compostos foi avaliada conforme a norma internacional ISO 10993-5, que preconiza que um composto é considerado citotóxico quando causa uma redução na viabilidade celular de pelo menos 30%. (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

As **Figuras 29** e **30** apresentam os resultados da viabilidade celular das células Caco-2 que foram incubadas com soluções de PD76 e RJ44, nas concentrações de 10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL, em comparação ao controle negativo. Calculou-se o desvio padrão para as oito replicatas de cada concentração, a fim de determinar a variabilidade na citotoxicidade de cada composto. Os valores de viabilidade celular acima e abaixo de 70% são separados pela linha vermelha.

**Figura 29 – Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após exposição a diferentes concentrações de PD76 durante 12 horas**



**Figura 30 – Viabilidade celular (%) das células Caco-2 após exposição a diferentes concentrações de RJ44 durante 12 horas**



De acordo com os resultados de viabilidade celular apresentados nas Figuras 29 e 30 nota-se que as citotoxicidades frente às células Caco-2 das duas substâncias são bem semelhantes, embora PD76 tenha apresentado



viabilidade celular um pouco maior do que RJ44. Após 12 horas de exposição das células às soluções dos derivados, a viabilidade celular foi igual ou maior que 70% para ambos em todas as concentrações avaliadas. Observou-se também que a viabilidade celular diminuiu com o aumento da concentração das soluções avaliadas.

Tendo em vista que a concentração da solução utilizada nos experimentos de permeabilidade foi 10 µg/mL e que o ensaio tem duração máxima de 4 horas, os resultados obtidos conferem confiabilidade em relação ao experimento de permeabilidade, visto que a viabilidade celular na concentração utilizada no experimento com as células Caco-2 ficou acima de 70% quando expostas a ambas substâncias. Além disso, o experimento de viabilidade celular foi realizado em 12 horas de exposição das células a estas soluções, garantindo maior segurança na exposição das células aos derivados tiazolilhidrazonas.

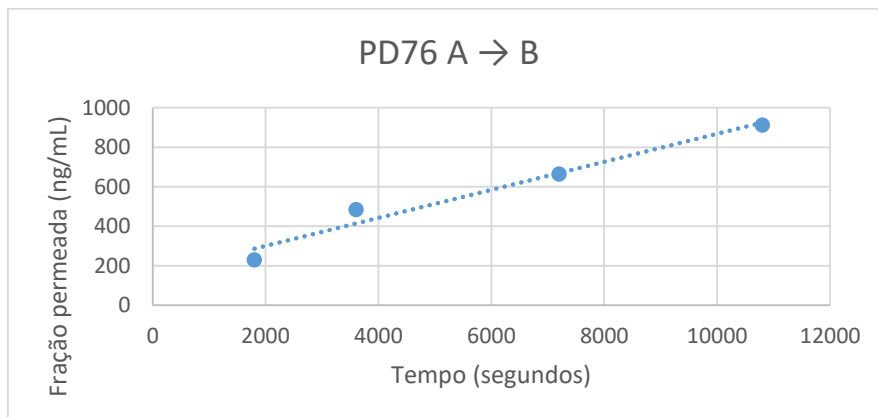
Dessa forma, entende-se que a toxicidade dos derivados é influenciada por alguns fatores, tais como a concentração das soluções utilizadas e a estrutura química dos derivados. A viabilidade celular durante os ensaios de permeabilidade é um quesito fundamental para a confiabilidade dos resultados obtidos, uma vez que a morte celular pode comprometer as funções de transporte da membrana formada, principalmente o transporte mediado por carreadores, que depende de gasto energético.

### **5.5 Estudo de permeabilidade *in vitro* de PD76 e RJ44**

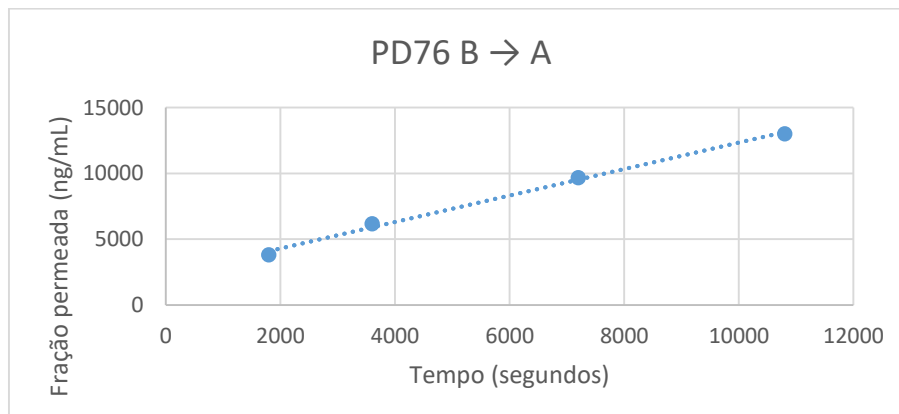
O estudo de permeabilidade foi realizado em placas Transwell® contendo 12 poços, em triplicata. O experimento cumpriu as premissas necessárias, como controle de temperatura, rotação, e garantia da integridade da membrana por meio da medida da resistência transepitelial, que apresentou valores superiores a 500 Ω x cm<sup>2</sup> para os inserts das placas avaliadas.

As **Figuras 31 a 34** representam a evolução da concentração na solução receptora de PD76 e RJ44 através das membranas das células Caco-2 tanto no sentido apical-basolateral quanto no sentido basolateral-apical, em função do tempo.

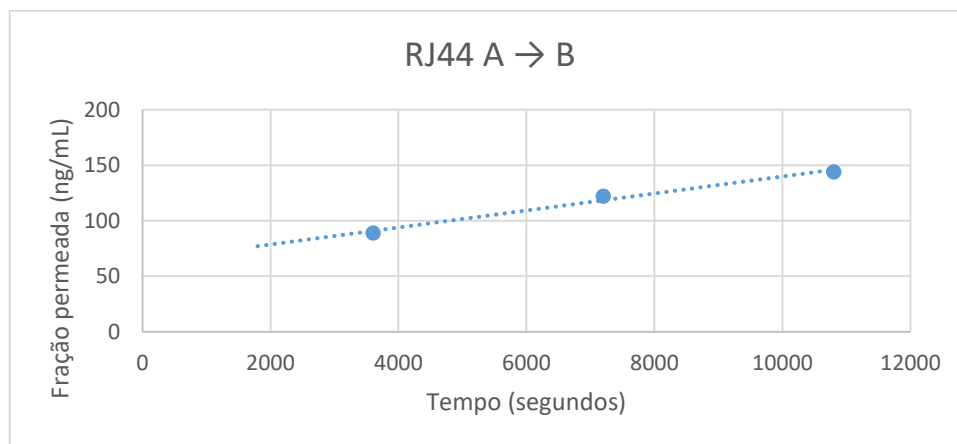
**Figura 31 – Fração média (n = 3) permeada de PD76 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido apical-basolateral**



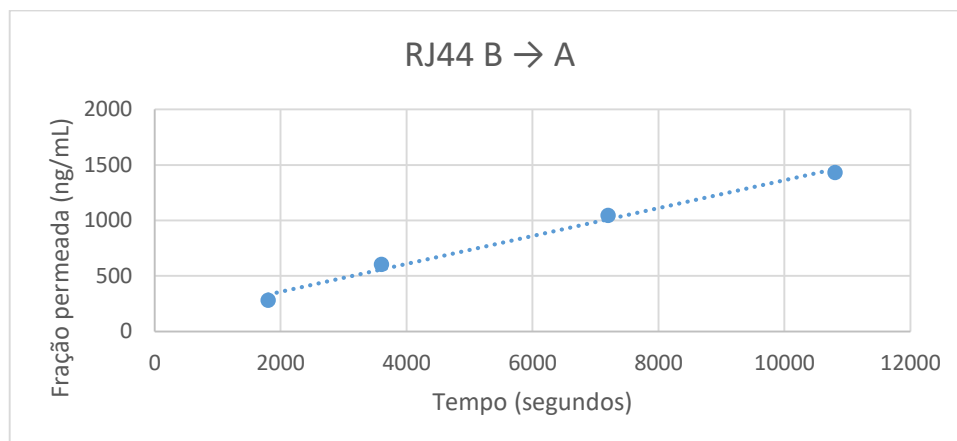
**Figura 32 – Fração média (n = 3) permeada de PD76 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido basolateral-apical**



**Figura 33 – Fração média (n = 3) permeada de RJ44 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido apical-basolateral**



**Figura 34 – Fração média (n = 3) permeada de RJ44 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido basolateral-apical**



Os resultados demonstraram uma relação linear, indicando um aumento das frações permeadas dos dois derivados tiazolilhidrazonas (ng/mL) por tempo (segundos).

Os valores de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) foram calculados através das frações permeadas dos compostos e dos coeficientes angulares das retas demonstradas nas **Figuras 31 a 34**. Os resultados dos dois compostos estão descritos na **Tabela 21**.

**Tabela 21** – Valores médios de *Papp* de PD76 e RJ44 obtidos no experimento de permeabilidade em células Caco-2

Substância	Sentido	<i>Papp</i> ± DP x 10 <sup>-6</sup> (cm/s)
PD76	Apical → basolateral	5,25 ± 3,06
PD76	Basolateral → apical	23,28 ± 1,36
RJ44	Apical → basolateral	1,47 ± 1,16
RJ44	Basolateral → apical	5,26 ± 1,43

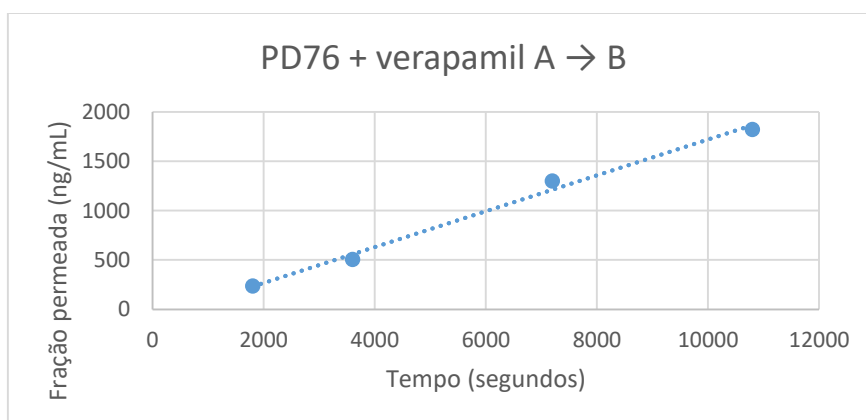
De acordo com Yee (1997), em estudos de permeabilidade empregando células Caco-2, considera-se fármacos de baixa permeabilidade aqueles que apresentam *Papp* menor do que  $1 \times 10^{-6}$ , que apresentam taxa de absorção intestinal de até 20%. Fármacos com valores de *Papp* entre 1 e  $10 \times 10^{-6}$  são classificados como de permeabilidade moderada, e apresentam absorção intestinal de 20 até 70%. Enquanto os fármacos com *Papp* acima de  $10 \times 10^{-6}$ , são considerados de alta permeabilidade, com taxa de absorção intestinal entre 70 a 100%.

Diante disso, os resultados apresentados na **Tabela 21**, no sentido apical para basolateral, demonstram que PD76 e RJ44 podem ser classificados como compostos de permeabilidade moderada, embora a permeabilidade de PD76 tenha sido superior a de RJ44. Entretanto, quando se observa os valores obtidos no sentido basolateral para apical, ambas as substâncias apresentam uma fração permeada maior do que aquela apresentada por esses mesmos derivados no sentido apical para basolateral, resultado sugestivo de ocorrência de efluxo.

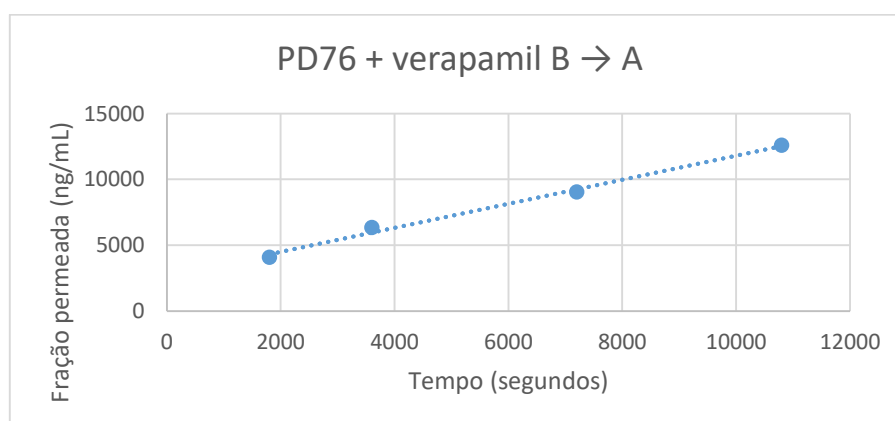
Sabe-se que muitos fármacos são permeados pelo epitélio intestinal por transporte passivo, sendo este paracelular ou transcelular. Entretanto, alguns fármacos podem ser transportados com auxílio ou exclusivamente por carreadores (COLLETT *et al.*, 2004). Dessa maneira, outro parâmetro avaliado no estudo foi a possível ocorrência de transporte por efluxo. Alguns xenobióticos são pouco absorvidos no trato gastrointestinal devido à presença de efluxo ativo e dentre as proteínas envolvidas nesse mecanismo, destaca-se

a glicoproteína-P (Pg-P) (BENET; CUMMINS; WU, 2004). Para avaliação de efluxo, os mesmos experimentos foram realizados na presença de verapamil, um fármaco inibidor da Pg-P. Os resultados obtidos estão demonstrados nas **Figura 35 a 38**.

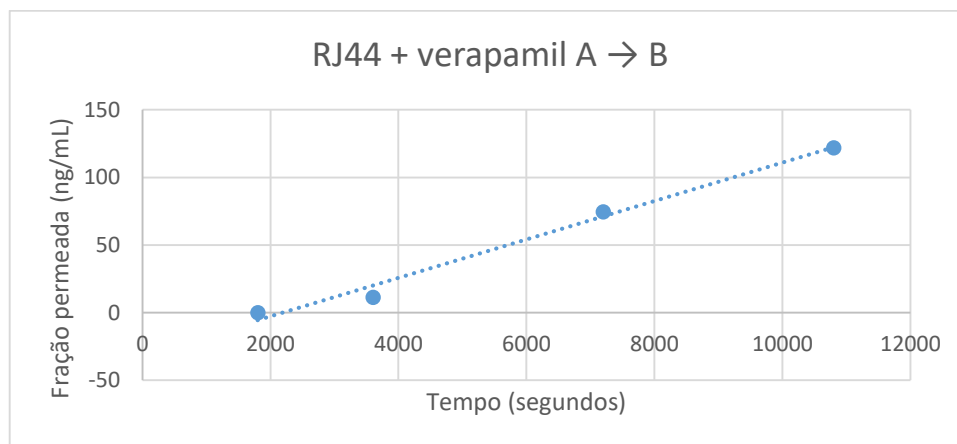
**Figura 35 – Fração média (n = 3) permeada de PD76 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido apical-basolateral na presença de verapamil**



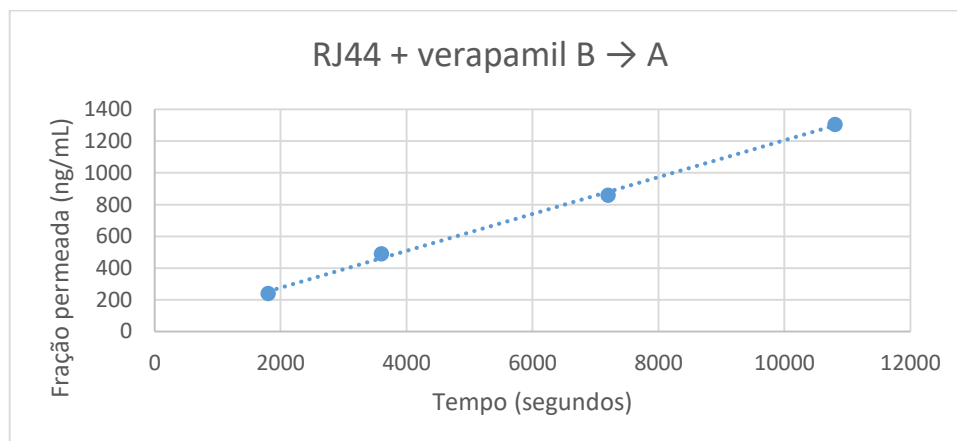
**Figura 36 – Fração média (n = 3) permeada de PD76 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido basolateral-apical na presença de verapamil**



**Figura 37 – Fração média (n = 3) permeada de RJ44 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido apical-basolateral na presença de verapamil**



**Figura 38 – Fração média (n = 3) permeada de RJ44 (ng/mL) através das membranas de células Caco-2 em função do tempo (segundos) no sentido basolateral-apical na presença de verapamil**



Os resultados da *Papp* das duas substâncias na presença do verapamil estão descritos na **Tabela 22**.

**Tabela 22** – Valores médios de *Papp* de PD76 e RJ44 obtidos no experimento de permeabilidade em células Caco-2 na presença de verapamil

Substância	Sentido	<i>Papp</i> ± DP x 10 <sup>-6</sup> (cm/s)
PD76 + verapamil	Apical → basolateral	12,05 ± 5,61
PD76 + verapamil	Basolateral → apical	20,12 ± 3,48
RJ44 + verapamil	Apical → basolateral	1,90 ± 5,15
RJ44 + verapamil	Basolateral → apical	4,99 ± 2,13

Em comparação com os resultados apresentados na **Tabela 19**, os valores de *Papp* dos derivados apresentaram algumas diferenças; no sentido apical para basolateral, PD76 apresentou aumento de *Papp* na presença de verapamil, de  $5,25 \times 10^{-6}$  para  $12,05 \times 10^{-6}$ , enquanto que no sentido basolateral para apical, ocorreu uma diminuição no valor de *Papp* na presença de verapamil, sugerindo que este derivado é um possível substrato para a Pg-P.

Já em relação ao RJ44, observou-se que no sentido basolateral para apical houve redução da *Papp* de  $5,26 \times 10^{-6}$  para  $4,99 \times 10^{-6}$  na presença do verapamil, sugerindo que este derivado é um possível substrato para a Pg-P. Como forma de confirmar esta hipótese, calculou-se a razão *Papp* B-A/*Papp* A-B. Os resultados estão descritos na **Tabela 23**.

**Tabela 23** – Valores de razão *Papp* B-A/A-B de PD76 e RJ44 obtidos no experimento de permeabilidade em células Caco-2

Substância	Razão <i>Papp</i> B-A/A-B
PD76	4,43
PD76 + verapamil	1,67
RJ44	3,55
RJ44 + verapamil	2,63

Os resultados indicam que, na ausência do verapamil, ambos os derivados poderiam ser substratos para Pg-P, tendo em vista que os resultados da razão *Papp* demonstram valores superiores a 2, o que indica que a quantidade da substância que retorna ao lúmen intestinal por mecanismo de efluxo é maior que o dobro da quantidade que chega à corrente sanguínea (GIACOMINI *et al.*,

2010). Já na presença de verapamil, observou-se redução da razão *Papp* para os dois compostos, resultado indicativo de que o efluxo mediado pela Pg-P é realmente um mecanismo significativo no processo de absorção de PD76 e RJ44.

No caso do RJ44, uma vez que sua razão *Papp* indicou efluxo mediado por Pg-P significativo, uma provável explicação para sua razão *Papp* superior a 2 na presença de verapamil é a ocorrência de efluxo mediado por outros transportadores que não são totalmente inibidos pelo verapamil.

É importante ressaltar que o uso das células Caco-2 possui algumas limitações, como o reduzido número de transportadores de membrana expressos por este tipo de células (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; BREEMEN; LI, 2005, CHONG *et al.*, 1996).

## **5.6 Estudo de permeabilidade *in silico* de PD76 e RJ44**

Atualmente, muitas são as dificuldades enfrentadas na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Embora se encontre milhões de substâncias ativas, não ocorre o aumento proporcional de novos medicamentos no mercado. Essas dificuldades se devem, principalmente, à baixa eficácia e à alta toxicidade dessas candidatas, além de, em muitos casos, eles apresentarem farmacocinética e biodisponibilidade inadequadas (CHENG *et al.*, 2012).

Neste sentido, as propriedades denominadas ADMET (absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade) possuem papel muito importante nos estágios iniciais de desenvolvimento. Estes cinco parâmetros abrangem toda a farmacocinética de um fármaco, determinando sua biodisponibilidade, atividade biológica e o grau de toxicidade que ele pode apresentar. A estimativa desses parâmetros na fase de descoberta de novos fármacos reduz drasticamente as falhas relacionadas à farmacocinética nos estudos clínicos. Dessa forma, os estudos *in silico* tem grande importância para a previsão de ADMET, por meio de modelos computacionais que correlacionam as estruturas moleculares com



estes parâmetros farmacocinéticos (PATRICK, 2005; RUIZ-GARCIA *et al.*, 2008; WERMUTH, 2008).

Neste trabalho, realizou-se o estudo *in silico* de permeabilidade para os compostos PD76 e RJ44, com a finalidade de comparar os resultados obtidos pelos modelos preditivos com os resultados de permeabilidade obtidos *in vitro*. Para isso, utilizou-se os servidores admetSAR e ADMETlab, que fizeram a predição dos parâmetros permeabilidade em Caco-2 e da probabilidade dos dois derivados tiazolilhidrazonas serem substrato para Pg-P, de forma qualitativa, além do valor de log P. Os dados obtidos se encontram na **Tabela 24**.

**Tabela 24** – Parâmetros preditos pelos servidores ADMETlab e AdmetSAR para os compostos estudados

Plataforma	Propriedade	PD76	RJ44
ADMETlab	Log P	2,82	1,04
	Permeabilidade em Caco-2	+	-
	Substrato Pg-P	+	+
AdmetSAR	Log P	2,10	1,90
	Permeabilidade em Caco-2	+	-
	Substrato Pg-P	-	-

Conforme os resultados apresentados, o servidor ADMETlab inferiu que o composto PD76 apresenta permeabilidade em células Caco-2 e é um possível substrato da Pg-P. Os resultados obtidos com experimentos *in vitro* corroboram estas previsões, pois indicaram que PD76 apresenta permeabilidade moderada em células Caco-2 e que ele provavelmente é substrato para Pg-P, uma vez que os resultados de permeabilidade utilizando verapamil, fármaco inibidor da Pg-P, apresentaram diferenças significativas em relação ao ensaio na ausência de verapamil.

ADMETlab previu ainda que RJ44 não é permeável em células Caco-2, enquanto no estudo *in vitro* este composto apresentou permeabilidade moderada e inferior a PD76 nestas células. Além disso, o estudo *in silico* apontou RJ44 como um provável substrato para Pg-P, fato que condiz com os resultados obtidos *in vitro*, tendo em vista que a razão *Papp* B-A/A-B apresentou resultado superior a 2 e, na presença de verapamil, esta razão *Papp* B-A/A-B diminuiu.

Já o AdmetSAR inferiu PD76 permeável em células Caco-2, enquanto RJ44 não apresentaria permeabilidade frente a esta linhagem celular. Nos estudos *in vitro*, realmente a permeabilidade de RJ44 foi inferior àquela observada para PD76. Além disso, inferiu que ambos as substâncias não seriam prováveis substratos para Pg-P, resultado que contraria os ensaios *in vitro*.

As variações observadas entre as predições teóricas e experimentais realizadas para os dois derivados podem ser justificadas por algumas limitações inerentes aos estudos *in silico*, como a previsão da permeabilidade intestinal da molécula com base apenas em suas características físico-químicas, além de que considera permeável apenas a molécula que atravessa a membrana dos enterócitos pela difusão passiva, não levando em consideração os demais tipos de transporte (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Sabe-se que algumas propriedades físico-químicas das substâncias, como o tamanho molecular, número de ligações rotacionáveis, coeficiente de partição octanol/água (log P) são responsáveis por direcionar por qual via a substância atravessará o epitélio intestinal (HORTER e DRESSMAN, 2001). Além disso, propriedades como lipofilicidade e potencial eletrostático são capazes de influenciar as afinidades aos transportadores e enzimas (KERNS, 2001).

Como se pode observar nas estruturas químicas de PD76 e RJ44 (**Figuras 5 e 7**, respectivamente), PD76 possui menor número de ligações rotacionáveis quando comparado a RJ44, fator que facilita a passagem de uma substância pela membrana celular (VEBER *et al.*, 2002). Além disso, pode-se citar dois outros fatores que podem justificar a predição do ADMETlab e do admetSAR de que RJ44 não seria permeável em células Caco-2. O primeiro está

relacionado ao fato da molécula de RJ44 ser maior do que aquela de PD76, o que dificultaria o transporte passivo através da membrana celular. Além disso, conforme o servidor ADMETlab, o log P do RJ44 é 1,045, enquanto o de PD76 é 2,818, sendo que valores mais baixos de log P podem dificultar a permeação passiva da substância nas membranas celulares.

## CONCLUSÕES

Os métodos bioanalíticos desenvolvidos permitiram análises rápidas e simples para a quantificação de PD76 e RJ44. Estes métodos foram validados e demonstraram ser seletivos, exatos e precisos, além de apresentarem adequada linearidade nas curvas de calibração com desvios inferiores a 15%.

O ensaio de citotoxicidade realizado para PD76 e RJ44 foi de suma importância para avaliar os seus comportamentos frente às células Caco-2 e direcionar as corretas concentrações a serem utilizadas nos ensaios de permeabilidade. A citotoxicidade dos dois derivados foi semelhante, embora PD76 tenha apresentado viabilidade celular ligeiramente maior do que RJ44.

O ensaio de permeabilidade intestinal em modelo de células Caco-2 indicou que ambos os derivados apresentam permeabilidade intestinal moderada, sendo que a permeabilidade de PD76 foi superior àquela observada para RJ44.

Além disso, a avaliação da permeabilidade intestinal utilizando verapamil, um inibidor da glicoproteína-P, indicou que o mecanismo de efluxo mediado por esse transportador é significativo no processo de permeação do PD76 e do RJ44.

Sendo assim, pode-se concluir que estas características biofarmacêuticas de ambas as substâncias são promissoras, com potencial para aplicação clínica com administração pela via oral e encorajam a continuidade dos estudos com estes potenciais candidatos a fármacos antifúngicos.

## REFERÊNCIAS

ARNOLD, T. M.; DOTSON, E.; SAROSI, G. A.; HAGE, C. A. Traditional and emerging antifungal therapies. *Proceedings of the American Thoracic Society*, v. 7, p. 222–228, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, mai. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comunicado de risco nº 01/2017, de 14 de março de 2017. Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina. Brasília, DF, mar. 2017.

BAHUGUNA, A.; KHAN, I.; BAJPAI, V. K.; KANG, S. C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal Pharmacology*, v. 12, p. 115-118, 2017.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 5, p. 335–343, 2005.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BENET, L. Z.; CUMMINS, C. L.; WU, C. Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 277, n. 1–2, p. 3–9, 2004.

BLANCHFIELD, J.T.; DUTTON, J. L.; HOGG, R. C.; GALLAGHER, O. P.;

CRAIK, D. J.; JONES, A.; ADAMS, D. J.; LEWIS, R. J.; ALEWOOD, P. F.; TOTH, I. Synthesis, Structure Elucidation, *in vitro* Biological Activity, Toxicity, and Caco-2 Cell Permeability of Lipophilic Analogues of r-Conotoxin MII. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 1266-1272, 2003.

BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R. O.; DENNING, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases – Estimate Precision. *Journal of Fungi*, v. 3, p. 1-29, 2017.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: Human Fungal Infections. *Science Translational Medicine*, v. 4, p. 165, 2012.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12. ed. Mc Graw Hill, 2012.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Discovery: Something Old and Something New. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 9, p. 1–3, 2012.

CASADEVALL, A. Fungal Diseases in the 21st Century: The Near and Far Horizons. *Pathogens and Immunity*, v. 3, n. 2, p. 183-196, 2018.

CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; LEE, P. W.; TANG, Y. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 52, p. 3099-3105, 2012.

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. *Pharmaceutical research*, v. 13, p. 120-123, 1996.

D'ENFERT, C. Hidden killers: persistence of opportunistic fungal pathogens in the human host. *Current Opinion in Microbiology*, v. 12, p. 358-364, 2009.

DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resistance Updates*, v. 23, p. 12–19, 2015.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends in Microbiology*, v. 18, p. 195-204, 2010.

ENGLUND, G.; RORSMAN, F.; RONNBLOM, A.; KARLBOM, U.; LAZOROVA, L.; GRASJO, J.; KINDMARK, A.; ARTURSSON, P. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 29, p. 269-277, 2006.

EUROPEAN Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, London, United Kingdom, 2011.

FDA, Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, 2018.

FRANCO, P. H. C. Avaliação do perfil de degradação e da farmacocinética de um novo derivado tiazolil-hidrazona candidato a fármaco antifúngico. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 178 p., 2020.

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, p. 209-214, 1977.

GARBER, G. An Overview of Fungal Infections. *Drugs*, v. 61, n. 1, p. 1-12, 2001.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. *Nature*

*Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GÓRALSKA, K.; BLASZKOWSKA, J.; DZIKOWIEC, M. Neuroinfections caused by fungi. *Infection*, v. 46, n. 4, p. 443–459, 2018.

GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. *Biofarmacotécnica – Série Ciências Farmacêuticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1ª edição, cap. 19, p. 204-211, 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. *Biopharmaceutics & drug disposition*, v. 33, p. 316-323, 2012.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, v. 119, n. 2, p. 203–210, 1989.

HAVLICKOVA, B.; CZAIIKA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. v. 51, p. 2-15, 2008.

HOENIGL, M.; SEIDEL, D.; SPRUTE, R.; CUNHA, C.; OLIVERIO, M.; GOLDMAN, G. H.; IBRAHIM, A. S.; CARVALHO, A. COVID-19-associated fungal infections. *Nature Microbiology*, v. 7, p. 1127-1140, 2022.

HÖRTER, D.; DRESSMAN, J.B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced drug delivery reviews*, v.46, n.1-3, p. 75-87, 2001.

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



KERNS, E. H. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 1838-44, 2001.

LI, Y.; PARK, H. J.; XIU, H.; AKOH, C. C.; KONG, F. Predicting intestinal effective permeability of different transport mechanisms: Comparing *ex vivo* porcine and *in vitro* dialysis models. *Journal of Food Engineering*, v. 338, p. 1-9, 2023.

LAMOTH, F.; KONTOYIANNIS, D. P. The *Candida Auris* Alert: Facts and Perspectives. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 217, p. 516-520, 2018.

LINO, C. I. Síntese e avaliação das atividades antioxidante e citotóxica de análogos da curcumina e heterociclos tiazólicos. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 168 p., 2015.

LINO, C. I.; SOUZA, I. G.; BORELLI, B. M.; MATOS, T. T. S.; TEIXEIRA, I. N. S.; RAMOS, J. P.; FAGUNDES, E. M. S.; FERNANDES, P. O.; MALTAROLLO, V. G.; JOHANN, S.; OLIVEIRA, R. B. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 151, p. 248-260, 2018.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2004.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MOLLOY, S. F.; CHILLER, T.; GREENE, G. S.; BURRY, J.; GOVENDER, N. P.; KANYAMA, C.; MFINANGA, S.; LESIKARI, S.; MAPOURE, Y. N.; KOUANFACK, C.; SINI, V.; TEMFACK, E.; BOULWARE, D. R.; DROMER, F.;

DENNING, D. W.; DAY, J.; STONE, N. R. H.; BICANIC, T.; JARVIS, J. N.; LORTHOLARY, O.; HARRISON, T. S.; JAFFAR, S.; LOYSE, A. Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 6, p. 55-75, 2017.

MOREIRA, M. I. M. C. G. Azóis: farmacologia e interações medicamentosas. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal, 2010.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal Agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

OLIVEIRA, N. J. C. Síntese, estudos computacionais e avaliação da atividade antifúngica de novos heterociclos tiazóis, tiadiazóis e tiadiazolínicos. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 226 p., 2021.

OLIVEIRA, R. B.; OLIVEIRA, N. J. C.; MALTAROLLO, V. G.; CARVALHO, L. N. P.; JOHANN, S. **TIAZOLILHIDRAZONAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS E USOS**. Depositante: Universidade Federal de Minas Gerais; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. PI: 870210119346. Depósito: 13 dez. 2021. Concessão: 22 dez. 2021.

PATRICK, G. L. An introduction to Medicinal Chemistry. 3 ed. Nova York: Oxford University Press, 2005.

RODRIGUES, M. L.; ALBUQUERQUE, P. C. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 6, p. 64-79, 2018.

RUIZ-GARCIA, A. et al. Pharmacokinetics in Drug Discovery. *Journal Of*

*Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 2, p. 654-690, 2008.

RYBAK, J. M.; CUOMO, C. A.; ROGERS, P. D. The molecular and genetic basis of antifungal resistance in the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 70, p. 1-8, 2022.

SEITHEL, A.; KARLSSON, J.; HILGENDORF, C.; BJORQUIST, A.; UNGELL, A. L. Variability in Mrna expression of ABC- and SLC- transporters in human intestinal cells: comparison between human segments and Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 28, p. 291-299, 2006.

SKIEST, D.J.; VAZQUEZ, J.A.; ANSTEAD, G.M.; GRAYBILL, J. R.; REYNES, J.; WARD, D.; HARE, R.; BOPARAI, N.; ISAACS, R. Posaconazole for the treatment of azole-refractory oropharyngeal and esophageal candidiasis in subjects with HIV infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, p. 607–614, 2007.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. *The Lancet*, v. 369, p. 1961-1971, 2007.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321 p.

TYAGI, S. Fungal pathogenicity and diseases in human – A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 5, n. 6, p. 192-193, 2016.

VAN BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, v. 1, n. 2, p.175–185, 2005.

VEBER, D. F. et al. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal Of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, cellular, and molecular

factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 2, p. 382–402, 1998.

WERMUTH, C. G. *The practice of medicinal chemistry*. 3 ed. Londres: Elsevier, 2008.

XIONG, G.; WU, Z.; YI, J.; FU, L.; YANG, Z.; HSIEH, C.; YIN, M.; ZENG, Z.; WU, C.; LU, A.; CHEN, X.; HOU, T.; CAO, D. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*, v. 49, p. 5-14, 2021.

YANG, H.; LOU, C.; SUN, L.; LI, J.; CAI, Y.; WANG, Z.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. AdmetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*, v. 35, n. 6, p. 1067-1069, 2018.

YEE, S. *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *In vivo* (small intestine) absorption in man: fact or myth. *Pharmaceutical research*, v. 14, n. 6, p. 763-766, 1977.