

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Screening** farmacocinético e avaliação das propriedades físico-químicas de uma série de 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas

FERNANDA RODRIGUES GALVES

PORTO ALEGRE, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Screening farmacocinético e avaliação das propriedades físico-químicas de uma série de 4-aryl-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas**

Dissertação apresentada por **Fernanda Rodrigues Galves** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Coorientadora: Dra. Carolina de Miranda Silva

**PORTO ALEGRE, 2014**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Bibiana Verlindo Araújo  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dra. Nádia Maria Volpato  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

#### CIP - Catalogação na Publicação

Galves, Fernanda R.  
Screening farmacocinético e avaliação das propriedades físico-químicas de uma série de 4-aryl-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas / Fernanda R. Galves. -- UFRGS, 2014.  
127 f.

Orientadora: Teresa Cristina Dalla Costa.  
Coorientadora: Carolina De Miranda Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, UFRGS, 2014.

1. Farmacocinética pré-clínica. 2. Propriedades físico-químicas. 3. Antitumoral. 4. Espectrometria de massas. I. Dalla Costa, Teresa Cristina, orient. II. De Miranda Silva, Carolina, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos, no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO/RS), na cidade de Porto Alegre, com financiamento do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-*if*) e do PNPd/CAPES. O autor recebeu bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



**Dedico esta dissertação às minhas eternas paixões: ao meu querido pai, Aylson, à minha amorosa mãe, Táquia, à minha irmã, Vanessa, e ao meu eterno companheiro, Antônio.**





## AGRADECIMENTOS

Aos meus maravilhosos pais, Aylson e Táquia, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e me auxiliando nas difíceis decisões que a vida nos aplica. Obrigada pelo carinho, amizade e abraços acolhedores que sempre me deram força na vida.

À minha querida irmã e amiga, Vanessa, por ser uma mana divertida e carinhosa, proporcionando momentos de muita risada e reflexão.

Ao meu amado, Antônio, pela paciência, carinho, amor, ajuda, companheirismo, amizade e momentos maravilhosos que compartilhamos diariamente juntos.

À Padu pela cumplicidade e companheirismo diários durante a fase final deste projeto.

À minha orientadora, Profa. Dra. Teresa Dalla Costa, pela orientação exemplar durante estes dois anos de Mestrado, tendo me proporcionado um crescimento pessoal e profissional inigualáveis.

Aos queridos colegas e amigos de bancada: Andressa Braga, Bruna Torres, Carolina de Miranda Silva, Estevan Zimmermann, Felipe Kellermann, Fernando Carreño, Graziela Lock, Jaqueline Izolan, João Victor Laureano, Maiara Pigatto e Priscila Bernardi, pelos divertidos e inesquecíveis momentos que passamos no laboratório e fora da nossa segunda casa. Obrigada pela amizade, ajuda em experimentos, palavras de conforto e motivação durante este tempo juntos.

Ao colega Fernando Carreño pela ajuda sempre imediata e de boa vontade.

Um agradecimento especial à minha coorientadora, Dra. Carolina de Miranda Silva, pela dedicação incansável no desenvolvimento deste projeto e pela amizade construída no decorrer destes anos.

Ao colega Fabiano Barreto pelas ajudas, reflexões e disponibilização do equipamento, ajudando na concretização deste projeto.

À Profa. Dra. Vera Lima e ao Prof. Dr. Daniel Kawano pelas colaborações e discussões proporcionadas durante o desenvolvimento deste projeto.

Às minhas queridas amigas farmacêuticas Danielle Santana, Gabriella Sampaio, Mariana Tramontina, Melaine Terra e Sabrina Nascimento, pela amizade única e momentos de muita descontração e alegria juntas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, professores e funcionários da Faculdade de Farmácia que contribuíram na minha formação desde a graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

## RESUMO

**Objetivo:** Séries tio e oxo de 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas (DHPMs), derivadas do monastrol, apresentaram atividade anti-glioma *in vitro* em estudo prévio. Esse trabalho objetivou determinar logP e pka dessas moléculas, validar método bioanalítico por CLAE-EM/EM para quantificação simultânea de três DHPMs e realizar o *screening* farmacocinético das mesmas utilizando as estratégias de *rapid PK* e *cassette analysis*. **Metodologia:** LogP e pka foram determinados por CLAE/UV. A influência na ionização das DHPMs quando analisadas simultaneamente por CLAE-EM/EM foi investigada. No *screening* farmacocinético, administrou-se os LaSOM 60, 70 e 65, pelas vias i.v. *bolus* (1 mg/kg) e v.o. (10 mg/kg), a três animais/molécula/via. Procedeu-se o *pool* de amostras do mesmo tempo de coleta/mesma via/três compostos para a análise. A distribuição cerebral foi avaliada pela relação concentração no homogeneizado tecido/concentração plasma 1 h após dose i.v. *bolus* (1 mg/kg).

**Resultados e Discussão:** As DHPMs apresentaram um logP moderado, na faixa de 1,23 a 2,26, sendo o monastrol a molécula menos lipofílica. No estudo de determinação de pka, a metodologia utilizada permitiu determinar apenas o pka do LaSOM 63, cujo valor encontrado foi de 4,0. Os dados de coeluição indicaram que os LaSOM 60, 70, 65, 63,115 e monastrol podem ser analisados simultaneamente sem sofrer interferências na ionização. Um método bioanalítico em CLAE-EM/EM foi desenvolvido e validado para quantificação dos LaSOM 60, 70 e 65 e aplicado em estudo de *screening* farmacocinético destas DHPMs. As DHPMs apresentaram meia-vida curta (~ 2 h), *clearance* elevado (1,7 a 9,8 L/h/kg), e volume de distribuição moderado (4,8 L/kg - LaSOM 65) e alto (> 8 L/kg - LaSOM 60 e LaSOM 70). Os parâmetros determinados para LaSOM 65 foram semelhantes aos obtidos previamente por abordagem farmacocinética convencional. LaSOM 70 apresentou a maior penetração cerebral ( $0,37 \pm 0,06$ ) dentre as DHPMs investigadas. **Conclusões:** As estratégias de *screening* farmacocinético mostraram-se adequadas e exatas para avaliar as DHPMs após dose oral. Nenhuma das DHPMs apresentou distribuição tecidual compatível para tratamento do glioma.

**Palavras-chave:** diidropirimidinonas; propriedades físico-químicas; CLAE-EM/EM; validação; *screening* farmacocinético; distribuição cerebral.



## ABSTRACT

### ***Pharmacokinetic screening and physico-chemical properties evaluation of a series of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones***

**Objectives:** A series of tio and oxo of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones (DHPMs), monastrol derivatives, previously presented activity against glioma *in vitro*. The objectives of the this study were to determine these molecules' logP and pka, to validate a bioanalytical method by LC-MS/MS to quantify three DHPMs simultaneously and to screen their pharmacokinetics using rapid PK and cassette analysis strategies. **Methods:** LogP and pka were determined by HPLC/UV. The influence of DHPMs co-elution in their ionization following LC-MS/MS analysis was investigated. The pharmacokinetic screening of LaSOM 60, LaSOM 70, and LaSOM 65 was conducted after i.v. *bolus* (1 mg/kg) and p.o. (10 mg/kg) dosing to three animals/molecule/via. For drug quantification, pooled sample from each sampling time/via/three compounds was carry out. Brain penetration was investigated for these DHPM by the ratio of brain/plasma concentration 1 h after i.v. *bolus* dosing (1 mg/kg). **Results and Discussion:** DHPMs presented moderate logP, ranging from 1.23 to 2.26. Monastrol was the least lipophilic compound. The methodology used for the pka study allowed only the determination of LaSOM 63 pka, which was found to be 4.0. Co-elution data indicated that LaSOM 60, 70, 65, 63, 115, and monastrol can be simultaneously analyzed without ionization interferences. A bioanalytic LC-MS/MS method was developed and validated for quantification of LaSOM 60, 70, and 65 and applied to these DHPMs pharmacokinetic screening. The DHPMs presented short half-lives (~ 2 h), high clearance (1.7 to 9.8 L/h/kg), and moderate (4.8 L/kg - LaSOM 65) to high (> 8 L/kg - LaSOM 60 and LaSOM 70) volume of distribution. The pharmacokinetic parameters determined for LaSOM 65 were in good agreement with those previously determined using conventional pharmacokinetics approach. LaSOM 70 showed the highest brain penetration (0.37 ± 0.06). **Conclusions:** The pharmacokinetic screening strategies employed showed to be adequate and accurate to investigate the DHPMs after oral dosing. None of the DHPMs showed adequate brain penetration for glioma. **Key words:** dihydropyrimidinones; physico-chemical properties; LC-MS/MS; validation, pharmacokinetics screening; brain distribution.



**LISTA DE FIGURAS**  
**REVISÃO DA LITERATURA**

Figura 1. Etapas da descoberta e seleção de novos candidatos a fármacos. .....	33
Figura 2. Estrutura química geral das DHPMs.....	44

**CAPÍTULO 1**

Figura 1. Estrutura química geral das 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas investigadas.....	55
Figura 2. Correlação dos valores de logP das DHPMs obtidos experimentalmente, por CLAE/UV, e estimados pelo programa computacional <i>ChemDraw</i> <sup>®</sup> .....	64
Figura 3. Determinação do pka por CLAE/UV..	66
Figura 4. Área do sinal espectrométrico de massas do LaSOM 65, LaSOM 67, LaSOM 70, LaSOM 60 em solução .....	68
Figura 4. Continuação ...Área do sinal espectrométrico de massas do monastrol (LaSOM 61), LaSOM 62 e LaSOM 63 em solução .....	69
Figura 5. Área do sinal espectrométrico de massas do Lasom 61 sozinho em solução e em associação com LaSOM 60, LaSOM 115, LaSOM 65 e LaSOM 63 .....	70
Figura 6. Área do sinal espectrométrico de massas do LaSOM 65, LaSOM 60, LaSOM 63 e LaSOM 115 sozinhos em solução e em associação com LaSOM 61 .....	70

**CAPÍTULO 2**

Figura 1. Estruturas moleculares do Monastrol, LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65. ....	80
Figura 2. Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM no modo MRM das DHPMs e PI.....	89
Figura 3. Perfis plasmáticos médios de LaSOM 60 e LaSOM 65 após dose i.v. de 1 mg/kg .....	94
Figura 4. Perfis plasmáticos médios de LaSOM 70, LaSOM 60 e LaSOM 65 após dose oral de 10 mg/kg.....	96





## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Características estruturais das DHPMs - séries tio e oxo - sintetizadas pelo LaSOM. Esquema das estruturas relacionadas com a Figura 1 .....	45
--	----

### CAPÍTULO 1

Tabela 1. Características estruturais das DHPMs sintetizadas pelo LaSOM .....	56
Tabela 2. Valores de coeficiente de partição das substâncias referência e das DHPMs investigadas, de acordo com o guia da OECD/2004 e estimados pelo programa computacional ChemDraw, respectivamente.....	62
Tabela 3. Valores dos fatores de capacidade e logk calculados a partir dos dados de tempo de retenção médio das substâncias .....	62
Tabela 4. Valores de logP determinados experimentalmente por CLAE/UV .....	63
Tabela 5. Características dos parâmetros de ionização e de cromatografia das DHPMs e padrão interno analisados por CLAE-EM/EM. ....	67

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Precisão e exatidão intradia e interdia para as DHPMs investigadas.....	91
Tabela 2. Estabilidade do LaSOM 60 .....	92
Tabela 3. Estabilidade do LaSOM 70 .....	92
Tabela 4. Estabilidade do LaSOM 65 .....	92
Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 60 e LaSOM 65 determinados por abordagem não-compartimental após administração i.v. de 1 mg/kg a ratos Wistar. ....	95
Tabela 6. Parâmetros farmacocinéticos dos LaSOM 70, LaSOM 60 e LaSOM 65 determinados por abordagem não-compartimental após administração oral de 10 mg/kg a ratos Wistar.....	97
Tabela 7. Penetração cerebral das DHPMs 1 h após administração i.v. de 1 mg/kg .....	99



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	30
1. Descoberta de Fármacos .....	33
2. Avaliação da Farmacocinética Pré-Clínica de Candidatos a Fármacos..	35
3. Estratégias de <i>Screening</i> Farmacocinético de Novas Moléculas .....	36
3.1. <i>Cassette dosing</i> .....	36
3.2. <i>Cassette-accelerated rapid rat PK (CARRS)</i> .....	37
3.3. <i>Snapshot PK</i> .....	38
3.4. <i>Rapid PK</i> .....	38
3.5. <i>Cassette analysis</i> .....	39
4. Propriedades Físico-Químicas na Descoberta de Fármacos .....	40
4.1. Lipofilicidade .....	42
4.2. Grau de ionização .....	42
5. Série 4-aryl-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas .....	43
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	49
Determinação das propriedades físico-químicas e avaliação da coeluição das 4-aryl-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas analisadas simultaneamente por CLAE-EM/EM	
Resumo .....	52
1. Introdução .....	53
2. Materiais e Métodos .....	56
2.1. Reagentes e Solventes .....	56
2.2. Determinação do Coeficiente de Partição (logP) das DHPMs por CLAE/UV .....	56
2.2.1. Princípio do Método .....	56
2.2.2. Preparação das Amostras .....	57
2.2.3. Condições Cromatográficas .....	58
2.3. Determinação da Constante de Ionização (pka) por CLAE/UV .....	58
2.3.1. Princípio do Método .....	58
2.3.2. Preparação das Amostras .....	59
2.3.3. Condições Cromatográficas .....	59
2.4. Avaliação da Influência da Coeluição no Sinal das DHPMs Analisadas por CLAE-EM/EM .....	60
2.4.1. Caracterização das DHPMs por CLAE-EM/EM .....	60
2.4.2. Preparação das Amostras .....	60
2.4.3. Condições Cromatográficas .....	60
2.4.4. Avaliação da Supressão Iônica ou Ampliação do Sinal Espectrométrico .....	61
3. Resultados e Discussão .....	61
3.1. Determinação do logP .....	61
3.2. Determinação do pka .....	64
3.3. Avaliação dos Efeitos de Supressão Iônica ou Aumento de Sinal das DHPMs Analisadas por CLAE-EM/EM .....	66
3.3.1. Caracterização das DHPMs e PI .....	66
3.3.2. Avaliação da Influência da Coeluição no Sinal da Ionização .....	67
4. Conclusões .....	71

5. Referências .....	72
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	74
Validação de Método Bioanalítico em CLAE-EM/EM para Quantificação de 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas e <i>Screening</i> Farmacocinético Pré-Clinico	
Resumo .....	78
1. Introdução.....	79
2. Materiais e Métodos.....	81
2.1. Reagentes e Solventes .....	81
2.2. Condições Cromatográficas em CLAE-EM/EM .....	81
2.3. Preparação das Amostras em Solução.....	82
2.4. Preparação e Processamento das Amostras de Plasma.....	82
2.5. Validação do Método Bioanalítico .....	83
2.5.1. Seletividade .....	83
2.5.2. Linearidade .....	84
2.5.3. Precisão e Exatidão .....	84
2.5.4. Recuperação.....	84
2.5.5. Efeito de Matriz.....	85
2.5.6. Estabilidade .....	85
2.5.6.1. Estabilidade Pós-Processamento .....	85
2.5.6.2. Estabilidade Após Ciclos de Congelamento/Descongelamento.....	85
2.5.6.3. Estabilidade de Curta Duração.....	86
2.5.6.4. Estabilidade de Longa duração .....	86
2.6. Avaliação Farmacocinética .....	86
2.7. Distribuição Cerebral .....	87
3. Resultados e Discussão.....	88
3.1. Condições Cromatográficas e Otimização das Condições da CLAE-EM/EM.....	88
3.2. Validação do Método Bioanalítico .....	89
3.2.1. Seletividade .....	89
3.2.2. Linearidade .....	89
3.2.3. Precisão e Exatidão .....	90
3.2.4. Recuperação.....	90
3.2.5. Efeito de Matriz.....	90
3.2.6. Estabilidade .....	92
3.3. Avaliação Farmacocinética .....	93
3.3.1. Administração Intravenosa .....	93
3.3.2. Administração Oral.....	95
3.4. Distribuição Cerebral .....	98
4. Conclusões .....	100
5. Referências .....	100
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	103
<b>CONCLUSÕES</b> .....	109
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	112
<b>ANEXOS</b> .....	121

## INTRODUÇÃO

---



A etapa de descoberta de novos candidatos a fármacos é composta pela investigação e validação de alvos terapêuticos, descoberta de moléculas *hits* e *leads*, otimização dos *leads* e avaliação pré-clínica dos compostos selecionados (KERNS & LI, 2003; HUGHES *et al.*, 2011). Técnicas robustas, automatizadas e rápidas, como o *high throughput screening*, são implementadas a fim de identificar simultaneamente milhares de moléculas *hits* em ensaios celulares e bioquímicos de atividade biológica (WU & DOBERSTEIN, 2006; KESERÚ & MAKARA, 2006). Na etapa de descoberta, também são realizados estudos de relação estrutura-atividade (REA), determinação das propriedades físico-químicas e informações sobre absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) em ensaios *in vitro* (HUGHES *et al.*, 2011; NETTEKOVENA *et al.*, 2013).

A etapa de avaliação farmacocinética pré-clínica, realizada inicialmente em roedores, objetiva determinar os perfis de concentração *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos entre outras aplicações (KERNS & DI, 2008). Na farmacocinética pré-clínica convencional *in vivo*, para caracterização de uma molécula, estuda-se no mínimo duas vias de administração e diferentes doses, utiliza-se grupos de aproximadamente 6 animais, com coletas de sangue em sete tempos distintos após administração (normalmente até 24h). Os perfis plasmáticos obtidos são avaliados por abordagem não-compartimental e compartimental para determinação dos parâmetros farmacocinéticos (JANG *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2008), além de estudos de distribuição tecidual a fim de determinar em quais órgãos a molécula pode se acumular e penetrar.

Estratégias de *screening* farmacocinético *in vivo* têm sido propostas e utilizadas a fim de acelerar esta etapa de investigação, a partir da obtenção de alto rendimento, rapidez e redução de custos e amostras. Estas estratégias utilizam menor quantidade de animais, entre dois a três por composto; pode-se aplicar a técnica de *sample pooling*, através das misturas de plasmas de animais do mesmo tempo e do mesmo composto ou de diferentes compostos, assim, reduzindo o número de amostras para análise; além de utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM), que permite alta sensibilidade e especificidade nas análises (LIU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013).

A determinação das propriedades físico-químicas como logP e pka, que indicam a lipofilia e a capacidade de ionização da molécula, respectivamente, são determinantes para permeabilidade, solubilidade e estabilidade química de compostos, sendo de grande importância o seu conhecimento na fase de descoberta (KERNS & DI, 2008). Podem ser utilizados programas computacionais para se calcular rapidamente estes parâmetros, entretanto, dependendo das características estruturais e *softwares* empregados, os resultados obtidos não são exatos (MANNHOLD *et al.*, 2009). É possível determinar experimentalmente o logP e pka por CLAE em fase reversa, o qual é um método rápido e reprodutível. O logP pode ser calculado pela correlação do fator de capacidade da molécula no sistema cromatográfico em função do logP de substâncias conhecidas (OECD, 2004). Para determinação do pka também se utiliza o fator de capacidade da molécula, porém a correlação é feita em relação ao pH da fase móvel (BARTOLINI *et al.*, 2002).

As diidropirimidinonas (DHPMs) são moléculas de grande interesse por apresentarem atividades farmacológicas promissoras como antitumorais, antibacterianas e anti-hipertensivas (ATWAL *et al.*, 1991; KAPPE, 1993; WANG *et al.*, 2013). O monastrol foi a primeira molécula dessa classe a ser descoberta, apresentando atividade antitumoral diferenciada contra diferentes linhagens celulares (MAYER *et al.*, 1999; LEIZERMAN *et al.*, 2004; RUSSOWSKY *et al.*, 2006). No Brasil, o Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM), situado na Faculdade de Farmácia da UFRGS, publicou uma pequena biblioteca de DHPMs com duas séries - tio e oxo - as quais foram avaliadas em relação à citotoxicidade contra linhagem celular de glioma humano (U138-MG) e murino (C6). Os ensaios *in vitro* indicaram atividade biológica da maioria das moléculas da série contra essas linhagens celulares (CANTO, 2009; CANTO *et al.*, 2011).

O composto etil 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato, LaSOM 65, foi a DHPM escolhida, a partir dos resultados dos estudos *in vitro*, para se aprofundar nas investigações de avaliação da farmacodinâmica e farmacocinética *in vivo*. Na avaliação farmacocinética pré-clínica foram investigadas duas vias (intravenosa e oral) e três doses, além da distribuição tecidual e toxicidade. O ensaio de distribuição tecidual indicou baixa penetração no cérebro ( $ASC_{0-t} \text{ tecido} / ASC_{0-t} \text{ plasma} = 0,4$ ) do composto



(TORRES *et al.*, 2014). A avaliação farmacodinâmica *in vivo* do LaSOM 65 em modelo de glioma em roedores não apresentou redução significativa no tumor após 10 dias de tratamento com o composto (STUEPP, 2011). Portanto, mesmo com a avaliação farmacocinética pré-clínica do LaSOM 65 realizada, provavelmente este composto não seguirá adiante em investigações para o tratamento de glioma, pois, como demonstrado nos estudos anteriores, o LaSOM 65 não apresentou atividade biológica *in vivo* e nem uma boa penetração cerebral.

Com base nesses resultados, a proposta deste trabalho foi aplicar a estratégia de *screening* farmacocinético e *sample pooling* na avaliação da farmacocinética pré-clínica das DHPMs e determinar experimentalmente as propriedades físico-químicas destes compostos.



## **OBJETIVOS**

---



## Objetivos Específicos

O presente trabalho objetivou realizar o *screening* farmacocinético pré-clínico em ratos e determinar as propriedades físico-químicas de uma série de 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas (DHPMs)

## Objetivos Específicos

- Determinar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os coeficientes de partição (logP) e de ionização (pka) das DHPMs;
- Investigar as interações de supressão ou aumento da ionização das DHPMs quando coeluídas e quantificadas por CLAE-EM/EM;
- Desenvolver e validar metodologia bioanalítica por CLAE-EM/EM, utilizando a técnica de *pool* de amostras para quantificação simultânea dos LaSOM 65, LaSOM 60 e LaSOM 70 em plasma e tecido cerebral de ratos *Wistar*;
- Avaliar os perfis de concentração plasmática *versus* tempo obtidos por abordagem de *screening* farmacocinético dos LaSOM 65, LaSOM 60 e LaSOM 70 após administração a ratos *Wistar* de dose intravenosa *bolus* e dose oral e determinar os parâmetros farmacocinéticos por abordagem não-compartmental;
- Avaliar a penetração cerebral dos LaSOM 65, LaSOM 60 e LaSOM 70 após 1 h da administração de dose única intravenosa *bolus* a ratos *Wistar*;
- Comparar os parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 65 obtidos por *screening* farmacocinético e por avaliação farmacocinética convencional, sendo este último determinados em estudo prévio.



# **REVISÃO DA LITERATURA**

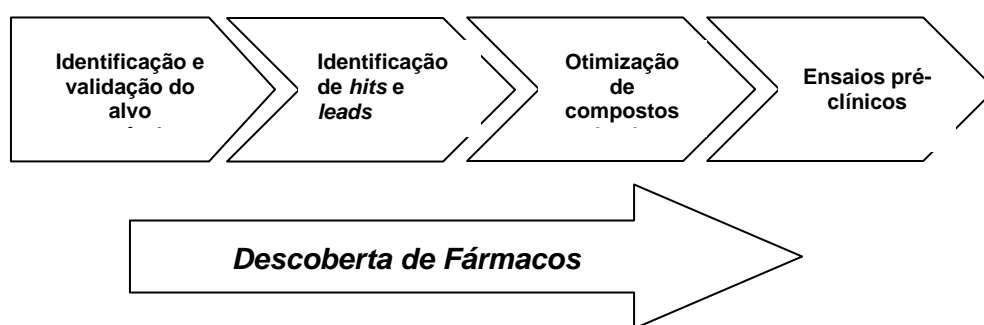
---





## 1. Descoberta de Fármacos

A pesquisa de novos fármacos envolve duas fases básicas: descoberta e desenvolvimento. A fase de descoberta é composta por diferentes etapas de investigação que se encerram com os ensaios pré-clínicos e que precedem a avaliação em humanos (fase clínica) e a liberação do produto no mercado para comercialização (Figura 1). Nesse cenário, os estudos pré-clínicos são a interface entre as fases de descoberta e desenvolvimento.



**Figura 1.** Etapas da descoberta e seleção de novos candidatos a fármacos.

As etapas que compõem a fase de descoberta de novos fármacos são: identificação e validação dos alvos terapêuticos a serem pesquisados, descoberta de moléculas *hits* e *leads*, otimização dos *leads* e avaliação pré-clínica dos compostos selecionados (KERNS & LI, 2003; HUGHES *et al.*, 2011). De acordo com a literatura, uma molécula é considerada um *hit* quando apresenta atividade biológica em ensaios de interação com alvos terapêuticos específicos selecionados. Por outro lado, uma molécula *lead*, que foi precedida pelo *hit*, é identificada quando demonstra segurança e eficácia em ensaios celulares (HUGHES *et al.*, 2011).

Uma das etapas mais importantes da descoberta é a identificação e validação de alvos terapêuticos, pois a pesquisa com alvos mal validados pode determinar que a molécula falhe na etapa clínica. Além disso, a identificação de alvos é o ponto de partida do projeto investigacional de novas entidades químicas (NEQ), pois estabelece a futura utilização da molécula como um fármaco para o tratamento de uma doença específica (TITOV & LIU, 2012). Um

bom alvo terapêutico - proteína, gene ou ácidos nucleicos - precisa atender às necessidades clínicas e comerciais, além de ser eficaz e seguro, garantindo direta relação com o tratamento da doença. Diz-se que um bom alvo deve ser “*druggable*”, ou seja, ser acessível à ligação da molécula bioativa e, após a ligação, gerar uma resposta que seja passível de mensurar tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (HURKO, 2010; HUGHES *et al.*, 2011). A validação do alvo é um processo crucial para assegurar a confiabilidade da relação entre alvo terapêutico e doença e, também, garantir que os ensaios realizados *in vitro* e em modelos animais forneçam resultados seguros de modulação, afinidade e interação dos novos candidatos testados com o sítio de ação alvo, tentando simular o que ocorre em humanos no decorrer da doença (DOAN *et al.*, 2004; CHEN & DU, 2007).

Devido às técnicas de química combinatória, milhares de novos candidatos a fármacos são sintetizados e devem ser analisados e selecionados durante a fase de descoberta. Nesse contexto, técnicas robustas e rápidas como o *high throughput screening* (HTS) são utilizadas para possibilitar a identificação de moléculas *hits*. O HTS utiliza sistemas automatizados para os ensaios celulares e bioquímicos de atividade biológica, permitindo a avaliação simultânea de milhares de compostos por utilizar microplacas contendo de 96 a 1536 poços (WU & DOBERSTEIN, 2006; KESERÚ & MAKARA, 2006). Os *hits* falso-positivos são descartados a partir da análise de curvas dose-resposta e bioensaios de resposta funcional. Na investigação de séries de *hits*, estudos preliminares de relação estrutura-atividade (REA), para identificação de fragmentos e grupos funcionais da molécula que são importantes na atividade e na obtenção de diferentes potências, e informações sobre absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) em ensaios *in vitro* são avaliados (HUGHES *et al.*, 2011; NETTEKOVENA *et al.*, 2013).

As moléculas *leads* surgem com o aperfeiçoamento das moléculas *hits*, sendo mais potentes e seletivas e com características estruturais e físico-químicas adequadas para apresentar boas propriedades farmacocinéticas (KESERÚ & MAKARA, 2006). Estudos e ensaios mais detalhados de REA, ADME e propriedades físico-químicas, além de informações sobre toxicidade, são obtidos nesta etapa (KESERÚ & MAKARA, 2006; GOODNOW JR, 2006; HUGHES *et al.*, 2011). A otimização das moléculas consideradas realmente

promissoras segue através de modificações estruturais, para manutenção das propriedades desejadas e melhora de possíveis deficiências que os *leads* ainda possam apresentar (RAVULA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012)

Os ensaios em animais, primeiramente em roedores, são realizados após a identificação e otimização de moléculas *leads*. Estudos de toxicidade, permeabilidade, metabolismo e comportamento do novo candidato a fármaco no organismo, bem como a investigação farmacocinética são realizados na fase final do processo de descoberta (HUGHES *et al.*, 2011). A aplicação de metodologias de avaliação farmacocinética *in silico*, *in vitro* e *in vivo* nos estudos iniciais de descoberta contribuiu para a redução de falhas, custos e tempo com moléculas que não apresentavam atributos desejados de ADME (EDDERSHAW *et al.*, 2000; WATERBEEMD & GIFFORD, 2003; ZHANG *et al.*, 2012).

## 2. Avaliação da Farmacocinética Pré-Clínica de Candidatos a Fármacos

A avaliação da farmacocinética pré-clínica de novas moléculas é realizada inicialmente em roedores, principalmente ratos e camundongos. O objetivo desta etapa é determinar os perfis de concentração *versus* tempo e os parâmetros farmacocinéticos, estabelecer uma relação entre a farmacocinética e a farmacodinâmica, extrapolar os parâmetros obtidos em animais para humanos entre outras aplicações (KERNS & DI, 2008).

Os principais parâmetros farmacocinéticos determinados nessa fase são: área sob a curva de concentração plasmática por tempo (ASC), que indica a exposição sistêmica total do organismo; meia-vida ( $t_{1/2}$ ), que é o tempo necessário para a concentração plasmática da molécula reduzir à metade; volume de distribuição (Vd), que reflete a afinidade da molécula pelos tecidos; *clearance* (CL), que indica a taxa de eliminação do organismo e biodisponibilidade (F), que representa a fração da dose inalterada que alcança a circulação sistêmica (TOZER & ROWLAND, 2009).

Os estudos de avaliação do comportamento de novas moléculas *in vivo* requerem tempo, envolvem altos custos e empregam grande quantidade de animais. Na avaliação farmacocinética convencional, para cada molécula sob

investigação estuda-se no mínimo duas vias de administração, normalmente intravenosa e oral, diferentes doses para investigação da linearidade farmacocinética, utilizando-se grupos de aproximadamente 6 animais, com coletas de sangue em sete tempos distintos após administração (normalmente até 24h). Os perfis plasmáticos obtidos são avaliados por abordagem não-compartimental e compartimental para determinação dos parâmetros farmacocinéticos (JANG *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2008). Estudos de distribuição tecidual também são realizados nessa etapa, utilizando homogeneizado de tecido, visando determinar em que órgãos a molécula penetra e pode se acumular. Todo esse conjunto de estudos torna a investigação farmacocinética pré-clínica uma das etapas mais morosas e dispendiosas da fase de descoberta de novos fármacos.

Apesar da avaliação farmacocinética convencional fornecer informações completas que permitem a compreensão da ADME de novas moléculas, investe-se tempo e recursos em investigações de NEQ que poderão não seguir adiante nos estudos de avaliação clínica. Para acelerar essa etapa, estratégias de *screening* farmacocinético *in vivo* têm sido propostas na literatura e utilizadas pelas empresas farmacêuticas para reverter este cenário.

### 3. Estratégias de *Screening* Farmacocinético de Novas Moléculas

As estratégias de *screening* farmacocinético visam obter alto rendimento, rapidez e redução de custos e amostras na determinação de parâmetros farmacocinéticos de novas moléculas. Dentre as estratégias indicadas na literatura, pode-se citar: *cassette dosing*, *cassette-accelerated rapid rat PK* (CARRS), *snapshot*, *rapid PK* e *cassette analysis*.

#### 3.1. *Cassette dosing*

Na estratégia de *cassette dosing*, também conhecida como “*N-in-One*” *dosing*, mais de um composto é administrado simultaneamente a um mesmo animal, sendo “*N*” considerado o número de moléculas coadministradas. Esta técnica possibilita o estudo da farmacocinética de vários compostos sob

idênticas condições, minimizando o número de amostras a serem processadas, tempo de análise e número de animais utilizados (BERMAN *et al.*, 1997; SHAFFER *et al.*, 1999; WHITE & MANITPISITKUL, 2001). Entretanto, apesar do *cassette dosing* apresentar algumas vantagens como utilizar menor quantidade de animais ( $n = 3/\text{grupo}$ ) e possibilitar o cálculo concomitante dos parâmetros farmacocinéticos de várias moléculas, existem controvérsias em relação à confiabilidade dos resultados obtidos com esta estratégia em comparação à farmacocinética convencional, na qual cada composto é administrado separadamente (BERMAN *et al.*, 1997; WHITE & MANITPISITKUL, 2001; NAGILLA *et al.*, 2011). Dentre as desvantagens citadas estão a possibilidade de interação farmacocinética entre os compostos, que assim poderiam apresentar características farmacocinéticas diferentes quando administradas separadamente; demora no desenvolvimento do método analítico, já que há mais de um composto a ser analisado na mesma amostra biológica e dificuldade na preparação da formulação para administração, devido à diferença nas características de solubilidade das moléculas (MANITPISITKUL & WHITE, 2004).

### 3.2. *Cassette-accelerated rapid rat PK (CARRS)*

Na estratégia CARRS, a farmacocinética de novos candidatos é investigada separadamente, utilizam-se apenas dois ratos para analisar cada molécula e avalia-se apenas a via oral. Esta técnica gera menor quantidade de amostras para análise, quando comparada com a farmacocinética convencional, pois se coleta amostras de sangue (100  $\mu\text{L}$ ) até 6 h após administração da formulação (0,5, 1, 3, 4 e 6 h). As amostras de plasma com a mesma molécula, dos dois animais experimentais, para o mesmo tempo de coleta são misturadas. Com isso, analisa-se apenas uma amostra por tempo de coleta para cada molécula (KORFMACHER *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2008). Aplicando-se esta estratégia, pode-se reduzir o número de animais necessários na investigação e, como cada molécula é administrada separadamente, não há interferência de interação farmacocinética entre elas. Como desvantagens, têm-se a falta de informações sobre a variabilidade farmacocinética de cada composto, o uso

apenas de ratos nos estudos, pois permitem amostras seriadas no mesmo animal, e a determinação de apenas alguns dos parâmetros farmacocinéticos importantes, uma vez que as coletas de sangue são limitadas a 6 h após a administração da dose (KORFMACHER *et al.*, 2001; MEI *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008).

### 3.3. *Snapshot* PK

Esta estratégia utiliza dois animais por molécula, avalia apenas a via de administração oral e pode ser conduzida tanto em camundongos quanto em ratos. Igualmente à estratégia CARRS, a mistura de amostras de plasma de dois animais para o mesmo tempo de coleta e mesma molécula é empregada. Diferentemente da técnica descrita anteriormente, no *snapshot* são feitas coletas de sangue (50 µL) até 5 h (0,5, 1, 3 e 5 h) após administração da formulação. Neste estudo de *screening* PK obtêm-se, por molécula, quatro amostras de plasma para análise (4 tempos de coleta x 1 *pool* de animais). As vantagens e desvantagens do *snapshot* são semelhantes ao CARRS, com a diferença que essa estratégia possibilita a utilização também de camundongos (LIU *et al.*, 2008).

### 3.4. *Rapid* PK

Dentre as técnicas de *screening* rápido apresentadas, o *rapid* PK é a que mais se assemelha à avaliação convencional de novas moléculas. Nesta técnica duas vias de administração, intravenosa e oral, são avaliadas, são utilizados três animais por grupo experimental e seis coletas de sangue são feitas até 24 h após a administração. Diferentemente da farmacocinética convencional, que se obtém no mínimo 36 amostras por estudo para um composto (2 vias de administração x 3 ratos x 6 tempos de coleta), no *rapid* PK as amostras de plasma do mesmo tempo de coleta dos três animais que receberam a mesma molécula são misturadas, totalizando 12 amostras (2 vias de administração x 6 tempos de coleta) para análise de cada molécula. Além de reduzir o número de amostras, esta técnica fornece todos os parâmetros

farmacocinéticos (CL, Vd,  $t_{1/2}$  e  $F_{abs}$ ). Entretanto, como é feita a mistura de amostras, informações sobre variabilidade inter-individual são perdidas (LI *et al.*, 2013).

### 3.5. *Cassette analysis*

A estratégia de *cassette analysis* utiliza a tática de *sample pooling*, na qual amostras de mesmo tempo de coleta de diferentes animais, mas de moléculas diferentes são misturadas. A obtenção de dados de variabilidade inter-individual torna esta metodologia vantajosa, quando comparada com as estratégias do CARRS, *snapshot* e *rapid PK*, que também aplicam a estratégia de *sample pooling*, porém em estudos de apenas uma molécula (LIU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013). Parâmetros farmacocinéticos completos, dependendo dos tempos de coletas, e caracterização de perfis de concentração *versus* tempo podem ser calculados e determinados simultaneamente para vários compostos, tornando esta técnica rápida para *screening* de novos candidatos a fármacos (KUO *et al.*, 1998; HAN *et al.*, 2006; BUETERS *et al.*, 2011). A complexidade no desenvolvimento do método bioanalítico e a necessidade de baixos limites de quantificação para cada molécula analisada simultaneamente, devido à diluição das amostras causadas pelo *pooling*, estão entre as desvantagens da técnica (LIU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013).

Para todas as estratégias de avaliação da farmacocinética rápida descritas acima, há necessidade de métodos analíticos com sensibilidade e especificidade adequados. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) permite a aplicação de estratégias de *screening* rápido em estudos de farmacocinética, devido à possibilidade de análises com alta sensibilidade, especificidade e tempos de corrida curtos. O CLAE-EM/EM é amplamente utilizado nas fases de descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para identificação e determinação de pureza das moléculas e, principalmente, para quantificação simultânea ou separada em amostras biológicas (OLAH *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2000; ESPADA *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; MACAROV *et al.*, 2012). Em todas as estratégias para acelerar os estudos farmacocinéticos pré-clínicos *in*

*vivo*, citadas anteriormente, essa ferramenta é imprescindível devido a sua sensibilidade, já que volumes pequenos de amostra são utilizados; especificidade, pois permite o monitoramento de transições *m/z* dos íons precursor e produto de cada molécula no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), evitando potenciais interferentes presentes em matrizes biológicas; e da possibilidade de avaliação de efeitos de supressão ou aumento no sinal de ionização devido à coeluição de várias moléculas (TONG *et al.*, 1999; LAGERWERF *et al.*, 2000; KORFMACHER, 2005; LI *et al.*, 2013).

#### 4. Propriedades Físico-Químicas na Descoberta de Fármacos

Na fase de descoberta de fármacos ocorrem estudos de *pharmaceutical profiling*, que tem por objetivo prever, a partir das características estruturais e propriedades físico-químicas, o comportamento dos novos candidatos a fármaco em sistemas biológicos, sendo tais informações importantes para compreensão da absorção, permeabilidade, distribuição e metabolismo das moléculas (KERNS & DI, 2003; WATERBEEND & GIFFORD, 2003; ESPADA *et al.*, 2008). A expressão *drug-like* é utilizada para definir as moléculas que apresentam propriedades de ADME e toxicidade suficientemente aceitáveis para alcançar estudos clínicos de Fase I, no qual a dose-resposta é avaliada em um grupo pequeno de voluntários sadios (LIPINSKI, 2000).

Tendo como fatores determinantes as características estruturais e os parâmetros físico-químicos das moléculas, regras para definir a probabilidade de um composto ser *drug-like* foram criadas como guia para auxiliar na decisão sobre seguir-em-frente ou não (*go/no-go*) na investigação de novas moléculas (KERNS & DI, 2008).

A “Regra dos 5”, criada por Lipinski e colaboradores (1997), foi o primeiro guia proposto para seleção de novas moléculas na fase de descoberta. Esses autores avaliaram, na base de dados *World Drug Index* (WDI), 2.245 fármacos administrados oralmente que seguiram adiante em estudos clínicos de Fase II, através da análise de parâmetros físico-químicos que estão diretamente relacionados com a permeabilidade e absorção. Esse estudo demonstrou que há maior probabilidade de baixa absorção e permeabilidade quando a molécula



apresenta no mínimo duas das condições: peso molecular > 500; coeficiente de partição n-octanol/água ( $\log P$ ) > 5; ligações doadoras de H > 5 (total de OHs e NHs); e ligações aceptoras de H > 10 (total de Ns e Os).

Sabe-se que quanto maior o  $\log P$  da molécula, menor será a solubilidade em água e, com isso, uma redução na absorção deve ser esperada. O alto peso molecular também dificulta a solubilidade em água e impede a difusão passiva através de membranas biológicas. As ligações de hidrogênio também foram observadas na regra de Lipinski, porque estão diretamente relacionadas com a solubilidade em água. Quanto maior o número de ligações de hidrogênio, maior a dificuldade de rompimento dessas ligações e, conseqüentemente, uma redução da partição da molécula para a barreira biológica é prevista (KERNS & DI, 2008).

A “Regra dos 5” ou “Regra de *Lipinski*”, reimpressa em 2001 e 2012, no entanto, somente pode ser aplicada em moléculas que não sofrem ação de transportadores, ou seja, apenas servem para aquelas que atravessam as membranas biológicas por difusão passiva. Essa Regra também não fornece informações sobre distribuição e metabolismo das moléculas. Apesar dessas restrições, a Regra de Lipinski ainda é utilizada na descoberta de novas moléculas, porém com algumas modificações e adaptações (HUGHES *et al.*, 2011; PETIT *et al.*, 2012).

Apesar de regras rígidas não serem adequadas para a tomada de decisão sobre a capacidade de uma molécula de se tornar um fármaco, o conhecimento de algumas de suas propriedades físico-químicas é muito importante na fase de descoberta. A lipofilicidade, indicada pelo  $\log P$ , expressa a tendência de distribuição da molécula em sistemas aquosos e não-aquosos e o coeficiente de ionização ( $pK_a$ ), expressa a capacidade de ionização da molécula, indicando o grau de partição relativa das espécies ionizadas e não-ionizadas em um determinado pH. Essas duas propriedades físico-químicas são determinantes para permeabilidade, solubilidade e estabilidade química das moléculas e seu conhecimento é fundamental na fase de descoberta.

#### 4.1. Lipofilicidade

A lipofilicidade da molécula é a propriedade físico-química que causa o maior impacto nos parâmetros de ADME, toxicidade e atividade farmacológica, tendo papel importante na capacidade dos compostos de permear as membranas biológicas (WATERBEEMD *et al.*, 2001; KERNS & DI, 2004; KERNS & DI, 2008). Quando o processo de partição é realizado entre uma fase orgânica (n-octanol) e uma fase aquosa (tampão) em um pH no qual o composto está totalmente em sua forma neutra, o coeficiente de partição é denominado de logP. Programas computacionais podem ser utilizados para se calcular rapidamente o valor do coeficiente de partição de compostos. Entretanto, dependendo das características estruturais e *softwares* empregados, os resultados obtidos não são exatos (MANNHOLD *et al.*, 2009).

Guias da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) indicam duas maneiras, que são amplamente utilizadas e adaptadas por pesquisadores, para determinação experimental do logP (KISHI & HASHIMOTO, 1989; KROP *et al.*, 1997; KERNS *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2012; PALLICER *et al.*, 2012). O *shake-flask* é um método real e apurado que avalia a partição do composto em diferentes proporções da mistura n-octanol/água após agitação de 24 h. Essa técnica pode ser aplicada para determinar logP na faixa de -2 a 4. Entretanto, este procedimento é demorado e requer grande quantidade de amostra de alta pureza (OECD, 2004). A determinação do logP por CLAE em fase reversa é um método rápido e reprodutível que utiliza o fator de capacidade da molécula no sistema cromatográfico em função do logP de substâncias conhecidas, que são recomendadas pelo guia para cálculo do parâmetro (OECD, 2004).

#### 4.2. Grau de ionização

As formas ionizadas e neutras de moléculas apresentam aspectos diferentes em relação à solubilidade, permeabilidade pelas membranas e interação com macromoléculas. Formas ionizadas são mais solúveis em meio aquosos, devido à alta polaridade, do que a formas não-ionizadas, que são

mais lipofílicas. Alterações no grau de ionização podem ser feitas através de modificações no pH do meio aquoso, obtendo-se concentrações equivalentes das duas formas quando há igualdade entre o pH e o pka da molécula (KERNES & DI, 2008). A equação de Handerson-Hasselbach (Eq. 1 e 2) permite calcular a porcentagem das espécies neutras e ionizadas em determinado pH, desde que seja conhecido o pka do composto:

$$pH = pka + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \quad \text{Eq. 1}$$

$$pH = pka + \log\left(\frac{[B]}{[HB^+]}\right) \quad \text{Eq. 2}$$

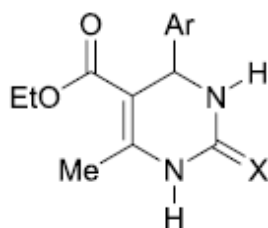
onde  $[A^-]$  e  $[HA]$  indicam espécies aniônicas e neutras das moléculas ácidas, respectivamente, e  $[B]$  e  $[HB^+]$  indicam espécies catiônicas e neutras das moléculas básicas, respectivamente.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para a mensuração do pka: potenciometria, espectrofotometria e cromatografia. Dentre estas a mais aplicada é o CLAE em fase reversa, a qual correlaciona o tempo de retenção da molécula com a alteração do pH na fase móvel, devido à variação nas frações ionizada e não-ionizada (GONZALEZ *et al.*, 1992; SANZ-NEBOT *et al.*, 2001; BARTOLINI *et al.*, 2002; JANOS, 2004). Essa técnica pode ser aplicada para determinação do pka de compostos com diferentes graus de lipofilia, diferentemente da técnica potenciométrica, a qual é indicada para moléculas que apresentam uma boa solubilidade em água, já que meios com solventes orgânicos são evitados para não causar instabilidade durante o processo de titulação (GONZALEZ *et al.*, 1992; BARTOLINI *et al.*, 2002). A determinação por espectrofotometria no ultravioleta/visível requer que o composto apresente em sua estrutura química grupamentos que possibilitem sua absorção ou apresente uma boa absorção na faixa de comprimento de onda aplicada (GONZALEZ *et al.*, 1992).

## 5. Série 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas

As diidropirimidinonas (DHPMs) (Figura 2) foram sintetizadas pela primeira vez em 1893 por Pietro Biginelli (BIGINELLI, 1893). Tais moléculas foram

formadas a partir de uma reação simples de condensação, a qual é denominada de reação de Biginelli, entre um aldeído aromático, uréia e acetoacetato de etila em solução etanólica. Nas últimas décadas as DHPMs foram alvo de grande interesse por apresentarem atividades farmacológicas promissoras como antitumorais, antibacterianas e anti-hipertensivas (ATWAL *et al.*, 1991; KAPPE, 1993; WANG *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Estrutura química geral das DHPMs.

O monastrol foi a primeira molécula dessa classe a ser descoberta, apresentando atividade antitumoral diferenciada, tendo como mecanismo de ação a inibição da motilidade mitótica da proteína cinesina Eg5, sendo este um alvo terapêutico de grande interesse no tratamento do câncer (MAYER *et al.*, 1999; YAN *et al.*, 2004). A atividade do monastrol foi avaliada em diferentes linhagens celulares *in vitro*, sendo observados valores de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) entre 14 µM e superiores a 340 µM, dependendo do tipo de cultura celular empregada (MAYER *et al.*, 1999; PETERS *et al.*, 2006; RUSSOWSKY *et al.*, 2006). O monastrol apresentou sensibilidade diferenciada em culturas de células de carcinoma gástrico (AGS) e de cólon (HT29) humano, quando comparado ao taxol (LEIZERMAN *et al.*, 2004). Peters e colaboradores (2006) avaliaram *in vitro* a afinidade dessa molécula frente ao transportador de efluxo glicoproteína-P (P-gp) e observaram atividade inibitória 100 vezes maior que a observada para inibidores clássicos, como verapamil e quinidina. Este estudo também demonstrou atividades indutoras do monastrol, porém 10 vezes menor que o indutor clássico rifampicina. O estudo concluiu que o monastrol não é substrato da P-gp, pois não se observou diferença na atividade antiproliferativa do composto quando esse foi adicionado a culturas de células que apresentavam a expressão aumentada para esse transportador de efluxo.

O Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM), da UFRGS, publicou em 2011 uma pequena biblioteca de DHPMs com duas séries - tio e oxo (Tabela 1), derivadas do monastrol, as quais foram avaliadas em relação à citotoxicidade contra linhagem celular de glioma humano (U138-MG) e murino (C6), tendo a maioria das moléculas apresentado atividade biológica, em ensaios *in vitro*, contra essas linhagens celulares. O monastrol (grupo controle) apresentou um efeito de inibição em ambas linhagens celulares, na faixa de 35-44%, enquanto que o LaSOM 75 demonstrou um efeito antiproliferativo contra C6 de 64,9%. Nas linhagens U138-MG e C6, os LaSOM 65, LaSOM 63 e LaSOM 67 foram significativamente mais ativos que o monastrol na inibição da proliferação celular, sendo o LaSOM 67 o mais efetivo dentre todas as DHPMs investigadas, seguido do LaSOM 65, que também apresentou resultados promissores nestes tipos de linhagens celulares de glioma (CANTO, 2009; CANTO *et al.*, 2011).

**Tabela 1.** Características estruturais das DHPMs - séries tio e oxo - sintetizadas pelo LaSOM. Esquema das estruturas relacionadas com a Figura 1.\*

DHPMs	Ar	X
Monastrol	3-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 60	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	S
LaSOM 64	3,4(-OCH <sub>2</sub> O-)C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	S
LaSOM 75	4-NC-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 115	3-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 62	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 63	4-(Me) <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 65	3-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 67	3-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
LaSOM 70	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	O
LaSOM 99	2-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
LaSOM 66	3-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
LaSOM 69	4-(Me) <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
LaSOM 90	4-NC-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
LaSOM 68	3,4(-OCH <sub>2</sub> O-)C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	O

\*Adaptado de CANTO *et al.*, 2011.

A partir destes resultados de citotoxicidade *in vitro*, investigou-se mais detalhadamente o composto etil 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato, codificado como LaSOM 65, o qual apresentou o mesmo mecanismo de ação que seu precursor, o monastrol. Assim estudos de avaliação da atividade antitumoral em modelo animal de glioma e investigação farmacocinética pré-clínica foram conduzidos em paralelo.

Torres e colaboradores (2014) avaliaram a farmacocinética pré-clínica do LaSOM 65 em ratos *Wistar*, administrado pelas vias intravenosa (1 mg/kg) e oral (10 e 30 mg/kg). Essa DHPM apresentou um  $t_{1/2}$  curto ( $1,75 \pm 0,71$  h), um *clearance* de  $0,85 \pm 0,18$  L/h/kg e um *Vd* de  $1,76 \pm 0,24$  L/kg após administração intravenosa (i.v.). O composto apresentou uma biodisponibilidade de ~ 55% e farmacocinética linear na faixa de doses orais. Os resultados de penetração tecidual demonstraram alta penetração nos pulmões (2,7) e tecido adiposo (1,4), tendo apresentado baixa penetração nos outros tecidos (cérebro, rins, fígado e coração). A toxicidade do LaSOM 65 foi avaliada após doses i.v. (1, 2,5 e 5 mg/kg) e oral (50, 100 e 150 mg/kg). Foram observados sintomas adversos como piloereção, dispneia, letargia e diarreia somente após administração pela via intravenosa.

A avaliação farmacodinâmica *in vivo* do LaSOM 65 foi conduzida em modelo de glioma em ratos *Wistar*, visando investigar o potencial terapêutico dessa DHPM. Os animais foram tratados com doses de 30 e 90 mg/kg após administração intraperitoneal, 12 dias após o implante do tumor cerebral, sendo acompanhado o volume do tumor. Após 10 dias de tratamento com o LaSOM 65 não se observou redução significativa no tamanho do tumor, em relação ao grupo controle (solução salina), para as duas doses avaliadas (STUEPP, 2011).

Os resultados dos estudos com LaSOM 65 exemplificam a importância da utilização de estratégias de *screening* farmacocinético pré-clínico para avaliação de novas séries de entidades químicas (NEQ), impedindo que seja realizada a avaliação farmacocinética convencional de compostos que não apresentam características de ADME adequadas em modelos *in vivo*, evitando desperdício de tempo e recursos na fase de descoberta de novos fármacos. Nesse contexto situa-se o presente trabalho, que visa utilizar dessas

estratégias na avaliação de uma série de novas DHPMs derivadas do monastrol sintetizadas pelos pesquisadores do LaSOM.





# **CAPÍTULO 1**

Determinação das propriedades físico-químicas e avaliação da coeluição das 4-aryl-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas analisadas simultaneamente por CLAE-EM/EM

---



**Determinação das Propriedades Físico-Químicas e Avaliação da  
Coeluição das 4-amil-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas Analisadas  
Simultaneamente por CLAE-EM/EM**

Fernanda R. Galves<sup>1</sup>, Carolina de Miranda Silva<sup>2</sup>,  
Maiara Cássia Pigatto<sup>1,2</sup>, Patrícia Frasson Corbelini<sup>1,3</sup>  
Vera Eifler-Lima<sup>1,3</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Centro Bioanalítico de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, RS

<sup>3</sup>Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, Faculdade de Farmácia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

## Resumo

Na fase de descoberta de novos fármacos, a determinação das propriedades físico-químicas é importante para entender e prever as características farmacocinéticas em relação à absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Do mesmo modo, o desenvolvimento de estratégias de *screening* farmacocinético, como o *pool* de amostras, surgiu a fim de acelerar os estudos farmacocinéticos dessa fase. Para o emprego dessas estratégias é importante determinar quais compostos podem ser analisados simultaneamente na mesma corrida analítica. As séries tio e oxo das 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas (DHPMs), sintetizadas pelo Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM) da UFRGS, são moléculas promissoras que apresentaram atividade antitumoral em ensaios *in vitro*, contra linhagem celular de glioma, e *in vivo*, em modelo de Sarcoma-180. Neste trabalho, determinou-se experimentalmente por CLAE/UV o logP e o pKa de oito DHPMs sintetizadas a partir do monastrol, caracterizou-se as mesmas por CLAE-EM/EM e avaliou-se possíveis efeitos de supressão iônica ou aumento no sinal devido à análise simultânea das mesmas empregando essa técnica analítica. As DHPMs apresentaram um logP na faixa de 1,23 a 2,26, sendo o monastrol a molécula menos lipofílica dentre as DHPMs investigadas. Foi possível determinar o pKa apenas de uma das moléculas (LaSOM 63), o qual foi 4,0. As demais DHPMs não apresentaram uma curva sigmóide característica de alteração na ionização em função da modificação do pH na fase móvel, não sendo possível determinar seus pKas. Os estudos em CLAE-EM/EM indicaram que seis DHPMs das oito investigadas (LaSOM 70, 60, 63, 65, 115 e 61) podem ser analisadas simultaneamente utilizando fase móvel metanol:água (80:20, v/v), com 0,1% de ácido acético, coluna Gemini<sup>®</sup> NX C18 e CLAE-EM/EM no modo MRM em ESI+, sem interferência nos sinais espectrométricos devido à coeluição. Esses resultados irão auxiliar no desenvolvimento de métodos bioanalíticos para aplicação em estudos de *screening* farmacocinético pré-clínico dessas DHPMs.

**Palavras-chave:** 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas; monastrol; logP, pKa, CLAE/UV; CLAE-EM/EM; Coeluição.

## 1. Introdução

Com o avanço da química combinatória e a utilização do *high throughput screening* (HTS) na fase de desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, pode-se sintetizar milhares de novas entidades químicas (NEQ) com diferentes grupamentos funcionais e estruturas químicas e, também, realizar o *screening* biológico para receptores e atividades específicas em larga escala. Na etapa de descoberta de novos fármacos, no entanto, o sucesso é alcançado quando compostos com atributos desejados de seletividade, potência, especificidade e biodisponibilidade, são identificados (WALTERS *et al.*, 1998; OHLSTEIN *et al.*, 2000).

O grande número de NEQ disponível para avaliação em fase pré-clínica, gerado pelas novas metodologias de síntese, pode ter o *screening* farmacodinâmico automatizado por HTS, que é um método rápido, sensível, eficiente e com menores custos (MARTELL *et al.*, 2013). No entanto, a avaliação farmacocinética pré-clínica dessas NEQ, que em geral tem características estruturais semelhantes, não evoluiu na mesma velocidade. Apesar de testes *in vitro* serem executados visando à investigação de possíveis metabólitos e a permeação por monocamada de células, a determinação de parâmetros farmacocinéticos que caracterizam os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) necessita de estudos *in vivo*. Nos experimentos convencionais de farmacocinética utiliza-se um grande número de animais, coletam-se pelo menos sete amostras de sangue após administração da NEQ sob investigação, é desenvolvido e validado um método bioanalítico para análise das amostras biológicas e realiza-se a avaliação não-compartimental e compartimental dos perfis plasmáticos gerados, visando à determinação dos parâmetros farmacocinéticos. Essas etapas requerem um longo tempo de execução e envolvem altos custos para se determinar a NEQ que apresenta características desejáveis de ADME (ZHANG *et al.*, 2012; FAN & LANNON, 2014).

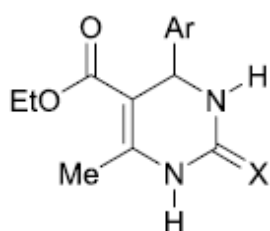
Para acelerar a etapa farmacocinética pré-clínica de desenvolvimento de novos fármacos, estratégias e técnicas têm sido desenvolvidas com a finalidade de aumentar o rendimento no *screening* de NEQ através da redução do número de animais utilizados, número de amostras processadas e tempo de

análise (SHAFFER *et al.*, 1998; HAN *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2013). Dentre estas estratégias pode-se citar a utilização de *sample pooling* de amostras, técnica que analisa simultaneamente vários compostos em uma mesma corrida bioanalítica utilizando métodos rápidos e seletivos de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) (OLAH *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2008; BUETERS *et al.*, 2011). Entretanto, antes de aplicar a técnica de *sample pooling* em experimentos de farmacocinética de NEQ, é de grande importância avaliar a possibilidade de supressão iônica ou aumento de sinal dos compostos analisados simultaneamente por CLAE-EM/EM. Esses efeitos na ionização ocorrem principalmente com moléculas que são estruturalmente semelhantes, apresentando transições dos íons precursor e produto muito próximas, além da possibilidade de coeluição na coluna cromatográfica (TONG *et al.*, 1999).

Na fase inicial de descoberta de candidatos a fármacos, busca-se também conhecer as propriedades físico-químicas para poder identificar as NEQ que apresentam adequadas características de lipofilia, peso molecular e ionização. Estas condições estão diretamente relacionadas com o comportamento da substância nos sistemas biológicos, fornecendo informações sobre solubilidade, permeabilidade e absorção. Os parâmetros físico-químicos de maior relevância para o comportamento farmacocinético são: o coeficiente de partição n-octanol/água (logP), que expressa a tendência de distribuição da molécula em sistemas aquosos e não-aquosos, e o coeficiente de ionização (pKa), que traduz o grau de contribuição relativa das espécies ionizadas e não-ionizadas (KERNS & DI, 2003; WATERBEEMD & GIFFORD, 2003; LIPINSKI *et al.*, 2012). Estas informações também podem auxiliar no desenvolvimento de métodos bioanalíticos, pois orientam a escolha de solventes para preparação das amostras em solução e para extração do analito de matrizes biológicas, além da composição da fase móvel, objetivando reduzir o tempo de retenção das NEQ analisadas na coluna cromatográfica e dos aditivos que auxiliam na ionização (TEIJLINGEN *et al.*, 2012).

As 4-aryl-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas (DHPMs) (Figura 1) são amplamente investigadas por apresentarem diversas atividades biológicas, dentre essas a antitumoral. O monastrol, identificado como NEQ promissora, atua na inibição da motilidade mitótica da proteína Eg5, alvo importante no

tratamento do câncer (MAYER *et al.*, 1999; YAN *et al.*, 2004). Duas séries (tio e oxo) de DHPMs foram sintetizadas pelo Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Faculdade de Farmácia da UFRGS (LaSOM), tendo como molécula referência o monastrol. As atividades antitumorais destas DHPMs foram investigadas *in vitro*, contra linhagem celular de glioma humano e murino, e *in vivo* em modelo de Sarcoma-180 em camundongos. Ambos estudos indicaram resultados promissores para essas NEQ (RUSSOWSKY *et al.*, 2006; CANTO, 2009; CANTO *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Estrutura química geral das 4-aryl-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas investigadas (CANTO *et al.*, 2011).

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi determinar experimentalmente as principais propriedades físico-químicas, logP e pKa, das duas séries de DHPMs sintetizadas pelo LaSOM (Tabela 1). Além disso, avaliar e caracterizar possíveis efeitos de supressão iônica ou aumento no sinal devido à análise simultânea dos compostos em CLAE-EM/EM. Esses estudos poderão ser utilizados no desenvolvimento de métodos bioanalíticos para avaliação simultânea de várias dessas NEQ em estudos farmacocinéticos pré-clínicos que utilizem a estratégia de *pool* de amostras.

**Tabela 1.** Características estruturais das DHPMs sintetizadas pelo LaSOM seguindo o esquema da Figura 1.

DHPMs	Ar	X
Monastrol	3-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 60	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	S
LaSOM 62	4-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 63	4-(Me) <sub>2</sub> N- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 65	3-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
LaSOM 67	3-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
LaSOM 70	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	O
LaSOM 115	3-F-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes e Solventes

As DHPMs investigadas (Tabela 1) foram sintetizadas pelo LaSOM, situado em Porto Alegre-RS. Nifedipino foi comprado na Farmácia Magistral FitonFarma (Porto Alegre-RS). Anilina, acetanilida, fenol, nitrobenzeno, anisol, difenilamina, naftaleno e tiouréia foram procedentes da Merck (KGaA, Alemanha). Tampão fosfato de sódio, tampão carbonato de sódio e tampão acetato foram preparados a partir de reagentes da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Metanol e acetonitrila, ambos grau HPLC, foram adquiridos da Tedia (Farfield, EUA), ácido acético da Merck (KGaA, Alemanha) e ácido fórmico 99-100% da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A água deionizada foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore Corporation).

### 2.2. Determinação do Coeficiente de Partição (logP) das DHPMs por CLAE/UV

#### 2.2.1. Princípio do método

O coeficiente de partição (logP) dos compostos testados foi determinado seguindo o guia da OECD/2004 (*Organisation for Economic Co-operation and*



*Development*). O método correlaciona o fator de capacidade, que representa o tempo em que o composto permanece retido na fase estacionária em relação ao tempo em que migra na fase móvel do sistema, com o logP de substâncias referências recomendadas pelo guia. O fator de capacidade (k) pode ser determinado pela Eq. 1:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{Eq. 1}$$

sendo  $t_r$  o tempo de retenção do composto na coluna e  $t_0$  o tempo morto da coluna, o qual é determinado através da injeção de uma substância altamente polar que não sofre retenção na coluna cromatográfica.

O guia da OECD/2004 indica o uso de colunas de fase reversa, na qual a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar. Assim compostos que eluem rapidamente apresentam características hidrofílicas, por ter maior afinidade pela fase móvel, e compostos lipofílicos eluem por último, por permanecerem mais tempo retidos na coluna.

O logP do analito testado pode ser calculado pela inserção de seu logk na equação da reta, determinada por regressão linear, gerada pelo gráfico logP *versus* logk das substâncias referência, conforme mostrado na Eq. 2:

$$\log P = a + b \times \log K \quad \text{Eq. 2}$$

sendo “a” e “b” os coeficientes de regressão linear.

### 2.2.2. Preparação das amostras

As soluções de DHPMs foram preparadas individualmente em metanol:água (50:50; v/v) na concentração de 500 µg/mL e diluídas à 4 µg/mL para injeção no cromatógrafo. As soluções estoques das substâncias anilina, acetanilida, fenol, nitrobenzeno, anisol, difenilamina, naftaleno e da tiouréia foram preparadas em metanol puro e as diluições em metanol:água (50:50; v/v), na mesma concentração que os compostos investigados.

A fim de escolher a faixa de logP e as substâncias referências para o experimento, os coeficientes de partição das DHPMs foram estimados

utilizando-se o software *ChemDraw*® Ultra 8.0 (*Chemical Structure Drawing Standard*) do ChemOffice 2004 (Cambridge Soft Corporation, EUA).

### 2.2.3. Condições Cromatográficas

A determinação do logP das DHPMs foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu®, equipado com controlador do tipo SCL-10A, auto-injetor SIL-10AD e detector de fotodiodo SPD-M10A. A separação analítica foi realizada em coluna Shimadzu® C18 (150 mm x 4,6 mm i.d., tamanho de partícula de 5 µm) com eluição isocrática da mistura de metanol:água (60:40; v/v), vazão de 0,6 mL/min e volume de injeção de 30 µL. O comprimento de onda de 210 nm foi utilizado na detecção, de acordo com as indicações do guia OECD/2004. A tiouréia foi utilizada para determinação do tempo morto da coluna. Todas as análises foram feitas em duplicata, em dois dias diferentes, pelo mesmo operador.

### 2.3. Determinação da Constante de Ionização (pka) por CLAE/UV

#### 2.3.1. Princípio do método

O método utilizado para determinação do pka correlaciona o fator de capacidade (equação 1) com o pH da fase móvel. A variação do pH no sistema faz com que o composto altere seu tempo de retenção devido a mudança na quantidade média das frações ionizadas e não-ionizadas de grupamentos ácidos e básicos da molécula (JANOS, 2004; ERDEMGIL *et al.*, 2007; GALAON & DAVID, 2012). O gráfico sigmóide, característico de dependência dos fatores, *k* versus pH da fase móvel, possibilita a determinação do pka pela sigmóide de Boltzmann (Eq. 3) gerado por regressão não-linear:

$$Y = A2 + \frac{(A1 - A2)}{1 + \exp\left(\frac{(x - x0)}{dx}\right)} \quad \text{Eq. 3}$$

sendo o ponto de inflexão (x0) da curva sigmóide o valor de pka do composto.

### 2.3.2. Preparação das amostras

As soluções estoques de DHPMs e tiouréia foram preparadas individualmente em acetonitrila pura e metanol puro, respectivamente, na concentração de 100 µg/mL e diluídas a 4 µg/mL em metanol:água (50:50; v/v) para injeção no cromatógrafo.

De modo geral, o sistema tampão é eficiente quando está entre uma unidade de pH acima ou abaixo do pka do composto investigado. Como os compostos foram avaliados em uma ampla faixa de pH, de 1,5 a 11,5, a escolha do tampão foi feita pela análise do pka de cada par conjugado ácido-básico do tampão. Para isso três sistemas tampão, a 10 mmol/L, foram preparados neste experimento: fosfato ( $pka_1 = 2,12$ ,  $pka_2 = 7,21$ ,  $pka_3 = 12,32$ ), carbonato ( $pka_2 = 10,40$ ) e acetato ( $pka = 4,80$ ), cada um abrangendo uma faixa de pH. Os tampões foram preparados em água deionizada e o pH foi ajustado em potenciômetro juntamente com a proporção de metanol da fase móvel.

### 2.3.3. Condições cromatográficas

A determinação do pka foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters<sup>®</sup>, equipado com controlador de bomba do tipo Waters 600, auto-injetor 717 Plus-Waters e detector de fotodiodo Waters 2487. A separação analítica foi obtida em coluna Gemini<sup>®</sup> NX C18 (150 mm x 4,6 mm i.d., tamanho de partícula de 5 µm) com eluição isocrática da mistura de metanol:água (60:40; v/v), vazão de 1 mL/min e volume de injeção de 30 µL. O comprimento de onda de 210 nm foi aplicado quando os tampões utilizados foram fosfato e carbonato. Para o tampão acetato, aplicou-se o comprimento de onda de 303 nm, devido às interferências observadas. A tiouréia foi utilizada para determinação do tempo morto da coluna.

## 2.4. Avaliação da Influência da Coeluição no Sinal das DHPMs Analisadas por CLAE-EM/EM

### 2.4.1. Caracterização das DHPMs por CLAE-EM/EM

As condições de ionização foram otimizadas para melhor monitorar as transições dos fragmentos dos íons precursor e produto de cada DHPM e nifedipino (padrão interno - PI). Os compostos foram preparados individualmente em acetonitrila:água (50:50, v/v), com 1% de ácido fórmico, à concentração de 2 µg/mL, para infusão direta no espectrômetro de massas com o auxílio de uma bomba de seringas (Harvard PHD 2000) na vazão de 10 µL/min. Os seguintes parâmetros de ionização foram ajustados: voltagem do cone e do capilar, energia de colisão e do cone extrator. As temperaturas da fonte e do gás de dessolvatação foram mantidas a 120 °C e 350 °C, respectivamente. As análises foram feitas em *electrospray* no modo positivo (ESI+).

### 2.4.2. Preparação das amostras

As soluções estoques de DHPMs e nifedipino foram preparadas individualmente na concentração de 100 µg/mL em acetonitrila, pesando-se 1 mg de cada composto em um balão volumétrico de 10 mL. Diluições posteriores foram feitas em acetonitrila:água (50:50, v/v). Soluções individuais de 10 ng/mL de cada DHPM e 500 ng/mL do PI foram preparadas a partir de soluções intermediárias provenientes da solução estoque. As DHPMs foram misturadas em solução e ajustadas para que um dos compostos estivesse na concentração de 1 µg/mL e os demais na concentração de 10 ng/mL, além do nifedipino à 500 ng/mL. Os compostos foram misturados e ajustados para estar nas concentrações de 10 ng/mL ou 1 µg/mL e 500 ng/mL (Nifedipino) em solução.

### 2.4.3. Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu® equipado com um sistema controlador SCL-10A, auto-injetor SIL-10AD e acoplado em *tandem* a

espectrômetro de massas (EM) Quattro LC Micromass<sup>®</sup> com software de aquisição de dados Masslynx<sup>™</sup> 3.5 (Global Mass-Informatics). Para separação cromatográfica dos compostos, utilizou-se uma coluna Gemini<sup>®</sup> NX C18 (150 mm x 4.6 mm i.d., tamanho de partícula de 5 µm). Fase móvel constituída de metanol:água (80:20; v/v) e acidificada com 0,1% de ácido acético, vazão de 0,45 mL/min, volume de injeção de 10 µL e temperatura do forno de 30 °C.

#### 2.4.4. Avaliação da supressão iônica ou ampliação do sinal espectrométrico

Para avaliação dos efeitos de aumento ou supressão iônica devido à coeluição das DHPMs e PI, inicialmente os compostos foram preparados em solução, separadamente, nas concentrações de 10 ng/mL e 500 ng/mL (PI) e injetados no CLAE-EM/EM.

Em um segundo momento, foi preparada uma solução contendo a mistura das DHPMs, estando uma delas na concentração de 1 µg/mL e as demais à 10 ng/mL, além do PI à 500 ng/mL. Comparou-se a área do sinal espectrométrico de massas dos compostos sozinhos em solução, na concentração de 10 ng/mL, e na mistura, também a 10 ng/mL e com uma das DHPMs à 1 µg/mL, para determinação de possíveis influências no sinal de ionização. Escolheu-se analisar os compostos em seu limite de quantificação (10 ng/mL), pois quando se utiliza a estratégia de *sample pooling* em um experimento de farmacocinética, nem sempre os compostos combinados irão apresentar as mesmas concentrações plasmáticas em determinado tempo de coleta. O LaSOM 62 e o LaSOM 115 foram analisados em misturas diferentes, por apresentarem a mesma *m/z* do íon precursor e também por coeluirem no mesmo tempo de retenção. As avaliações foram feitas em duplicata.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Determinação do logP

Os coeficientes de partição das substâncias referência escolhidas estão apresentados na Tabela 2, assim como os valores de logP previstos para as

DHPMs utilizando o *software ChemDraw*<sup>®</sup>. Com base nos valores de logP estimado pelo *software*, entre 0,54 e 2,25, foram selecionadas substâncias referência com logP entre 0,9 a 3,6 para a construção da curva padrão logP *versus* logk.

**Tabela 2.** Valores de coeficiente de partição das substâncias referência e das DHPMs investigadas, de acordo com o guia da OECD/2004 e estimados pelo programa computacional ChemDraw, respectivamente.

Substâncias Referência	logP	DHPMs	logP teórico
Anilina	0,9	LaSOM 70	0,54
Acetanilida	1,0	LaSOM 67	1,07
Fenol	1,5	Monastrol	1,57
Nitrobenzeno	1,9	LaSOM 65	1,58
Anisol	2,1	LaSOM 60	1,96
Difenilamina	3,4	LaSOM 62	2,12
Naftaleno	3,6	LaSOM 115	2,12
		LaSOM 63	2,25

O tempo morto médio da coluna foi determinado através da injeção de tiouréia no sistema cromatográfico, sendo de 2,9 min. O fator de capacidade de cada substância referência foi calculado pela equação 1 para construção da curva padrão logP *versus* logk (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores dos fatores de capacidade e logk calculados a partir dos dados de tempo de retenção médio das substâncias.

Substâncias Referência	t <sub>r</sub> médio (min)*	k**	logk
Tiouréia	2,9		
Anilina	4,2	0,470	-0,328
Acetanilida	4,3	0,518	-0,286
Fenol	4,7	0,628	-0,202
Nitrobenzeno	7,5	1,599	0,204
Anisol	10,4	2,616	0,418
Difenilamina	24,8	7,582	0,880
Naftaleno	31,5	9,912	0,996

\*Análises feitas em duplicata; \*\*Calculado utilizando a equação 1 (ver texto).

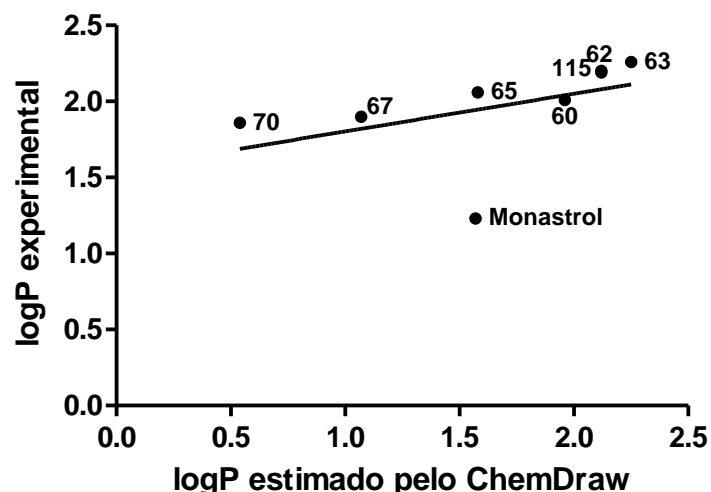
Os valores de logP experimentais das DHPMs, apresentado na Tabela 4, foram calculados através da equação de regressão linear da curva padrão preparada com os dados do logk da Tabela 3. Para garantir a confiabilidade e repetibilidade do método, o logP foi determinado em duplicata e em dias diferentes, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo operador.

**Tabela 4.** Valores de logP determinados experimentalmente por CLAE/UV.

DHPMs	t <sub>r</sub> médio (min)	logP experimental médio Dia 1 <sup>a</sup> (n = 2)	t <sub>r</sub> médio (min)	logP experimental médio Dia 2 <sup>b</sup> (n = 2)
LaSOM 70	6,9	1,87	6,6	1,86
LaSOM 67	7,1	1,92	6,8	1,90
Monastrol	4,8	1,24	4,6	1,22
LaSOM 65	8,0	2,07	7,6	2,06
LaSOM 60	7,7	2,02	7,3	2,00
LaSOM 62	8,7	2,18	8,5	2,20
LaSOM 115	8,8	2,19	8,6	2,22
LaSOM 63	9,2	2,25	9,0	2,27

<sup>a</sup>Equação de regressão linear utilizada para o cálculo logP do dia 1:  $\log P = 1,9343x + 1,5924$  ( $r^2 = 0,9699$ ); <sup>b</sup>Equação de regressão linear utilizada para cálculo logP dia 2:  $\log P = 1,9518x + 1,635$  ( $r^2 = 0,9698$ ); experimentos em duplicata a cada dia.

O método de determinação do logP por CLAE/UV mostrou-se preciso e confiável, apresentando uma variação média de 0,1 unidade para cada molécula entre os dois dias testados. Os resultados experimentais de logP foram semelhantes aos estimados pelo programa *ChemDraw*<sup>®</sup> para os valores de logP mais elevados, como pode ser visualizado na Figura 2. A correlação entre valores de logP estimado e experimental foi 0,447.



**Figura 2.** Correlação dos valores de logP das DHPMs obtidos experimentalmente, por CLAE/UV, e estimados pelo programa computacional ChemDraw®.

As NEQ investigadas apresentaram um logP experimental médio na faixa de 1,23 a 2,26, sendo o monastrol e o LaSOM 63 as DHPMs que apresentaram características menos e mais lipofílicas, respectivamente. Assim, observa-se que alterações nos grupamento X e R (Figura 1), causaram um aumento na lipofilicidade das DHPMs, quando comparado ao precursor monastrol. As alterações inseridas nas séries tio e oxo, no entanto, causaram poucas diferenças na lipofilia dessas moléculas, ficando todas com a classificação de logP moderado (faixa entre logP 0 a 3), de acordo com KERNES & LI (2008). De acordo com a Regra de Lipinski, um logP < 5 é indicado para as moléculas apresentarem uma boa absorção gastrointestinal e atravessar as membranas biológicas por difusão passiva (LIPINSKI *et al.*, 1997), logo, pode-se afirmar que as DHPMs estudadas apresentaram um logP moderado e adequado em relação à absorção pelo epitélio intestinal.

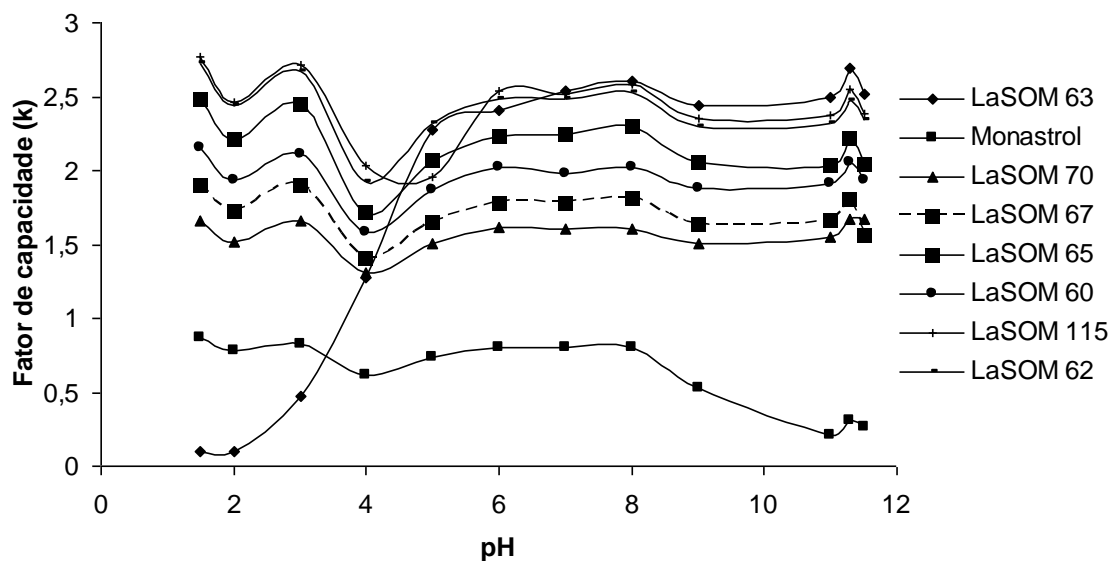
### 3.2. Determinação do pka

A cromatografia em fase reversa foi escolhida para a determinação do pka por ser uma técnica que possibilita a análise de compostos pouco solúveis em água, sendo possível utilizar outro solvente, como acetonitrila, para preparação das amostras, além de requerer pouca quantidade da NEQ a ser



analisada (BARTOLINI *et al.*, 2002). O princípio deste método está baseado em correlacionar o fator de capacidade do composto com o pH da fase móvel, sendo observada uma alteração nas frações ionizada e não-ionizada da molécula através da mudança no tempo de retenção conforme a variação do pH no sistema. Um fator de capacidade elevado indica uma eluição demorada da coluna cromatográfica devido à maior afinidade pela fase estacionária.

Na faixa de pH investigada neste estudo, de 1,5 a 11,5, apenas o LaSOM 63 apresentou uma curva sigmóide que caracteriza a dependência do fator de capacidade do pH da fase móvel. O cálculo do pka, a partir da sigmóide de Boltzmann, foi determinado com o auxílio do programa *GraphPad Prism*<sup>®</sup> versão 5.0. O valor do pka encontrado foi de 4,0, com intervalo de confiança de 95% e coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9974, indicando um bom ajuste dos dados. Todas as demais NEQ apresentaram pequenas alterações no fator de capacidade com a variação do pH (Figura 3). Esse comportamento semelhante a um platô, demonstrado por todas as DHPMs investigadas, exceto LaSOM 63, pode ser devido à faixa de pH testada, que não foi ampla o suficiente para observar o pka dessas moléculas ou indicar que essas NEQ estão com os grupamentos ionizados. Cabe ressaltar que a faixa de pH investigada foi escolhida com base na especificações de estabilidade da coluna cromatográfica utilizada. Uma nova investigação do pka dessas DHPMs, utilizando coluna cromatográfica estável em pHs acima de 11,5, poderá determinar qual dessas hipóteses é verdadeira.



**Figura 3.** Determinação do pKa por CLAE/UV. As curvas mostram a alteração no fator de capacidade das DHPMs investigadas conforme variação no pH na faixa de 1,5 a 11,5, utilizando-se coluna Gemini® NX C18 (150 mm x 4.6 mm i.d., tamanho de partícula de 5 µm) e fase móvel composta de metanol:água (60:40, v/v).

### 3.3. Avaliação dos Efeitos de Supressão Iônica ou Aumento de Sinal das DHPMs Analisadas por CLAE-EM/EM

#### 3.3.1. Caracterização das DHPMs e PI

As razões massa/carga ( $m/z$ ) dos íons precursor e produto das NEQ investigadas (Tabela 5) foram determinadas por infusão direta, utilizando ESI+ e modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Este modo de aquisição dos espectros foi empregado para possibilitar o monitoramento e a quantificação, com alta especificidade e bom sinal/ruído, de compostos que coeluem em uma mesma corrida analítica. O intervalo de varredura (*dwell time*) foi de 0,50 seg. A energia do capilar e cone extrator foram otimizadas em 3,30 Kv e 3 V, respectivamente. A voltagem do cone e a energia de colisão são parâmetros característicos e específicos de cada molécula, portanto foram ajustados individualmente para as DHPMs (Tabela 5). Os espectros de cada uma das DHPMs pode ser vista no Anexo 1.

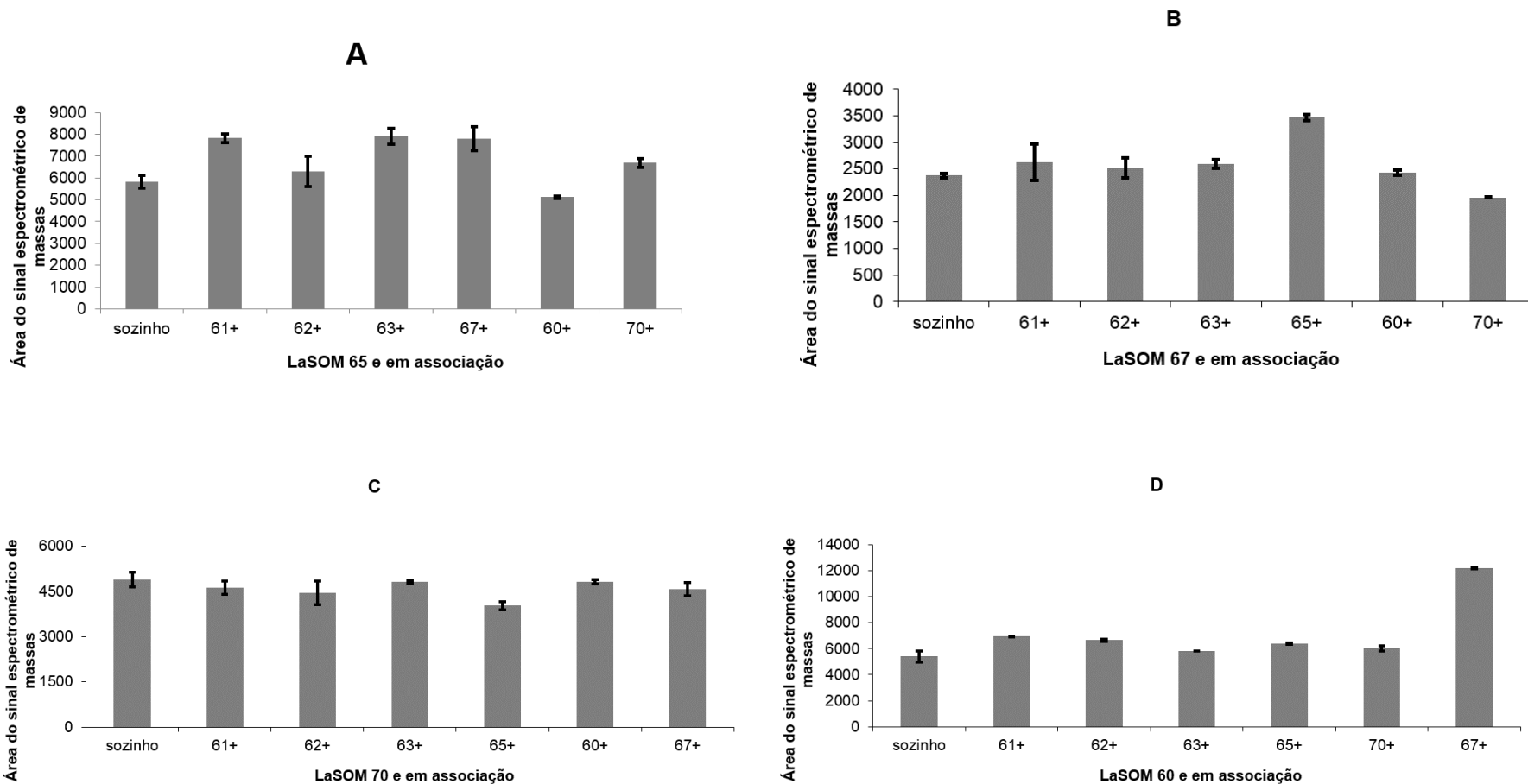
**Tabela 5.** Características dos parâmetros de ionização e de cromatografia das DHPMs e padrão interno analisados por CLAE-EM/EM.

DHPMs	Transição <i>m/z</i>	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	<i>t<sub>r</sub></i> (min)
LaSOM 70	260,69>171,5	30	20	4,43
LaSOM 67	305>216,9	30	20	4,43
Monastrol (LaSOM 61)	292>188	30	20	4,01
LaSOM 65	322>176	35	25	4,52
LaSOM 60	277>171,5	30	20	4,61
LaSOM 62	294>189,6	25	20	4,62
LaSOM 115	294,73>189,7	35	20	4,61
LaSOM 63	319,16>165,29	40	20	4,52
Nifedipino (PI)	346,80>315,07	15	10	4,92

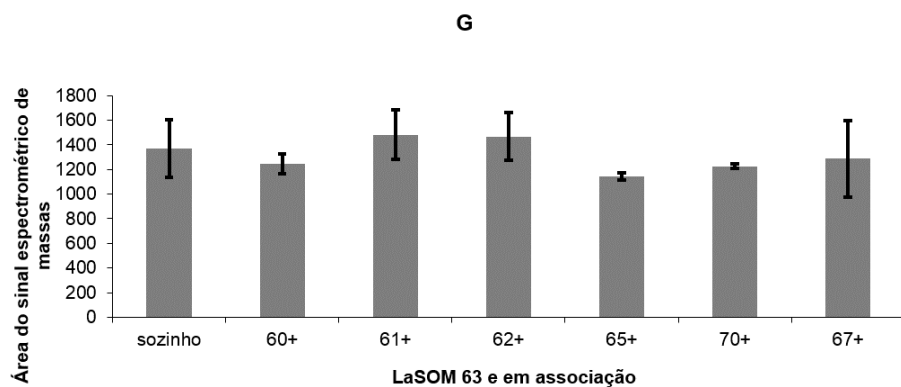
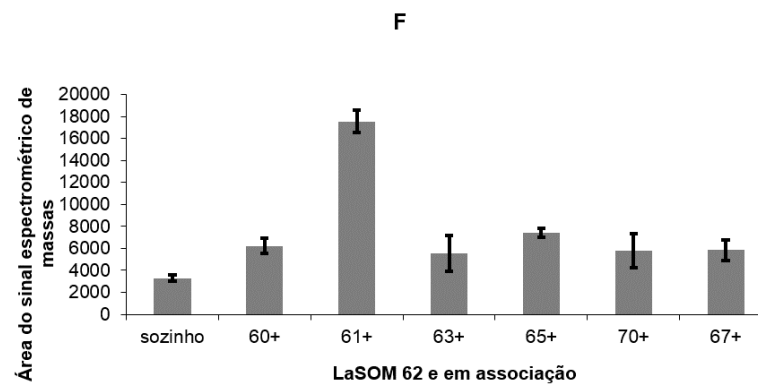
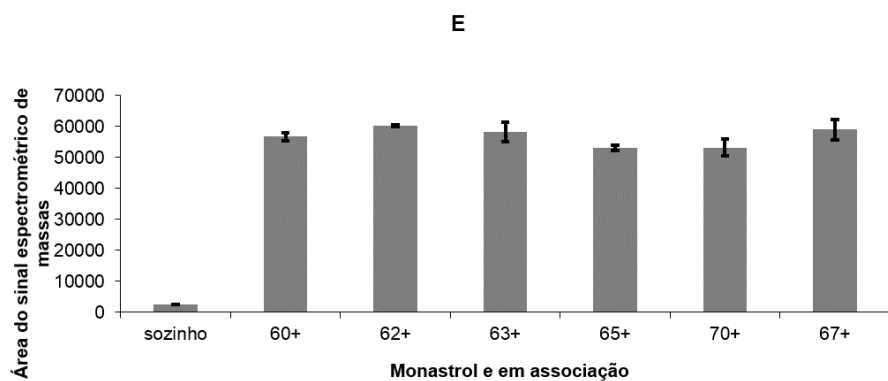
### 3.3.2. Avaliação da Influência da Coeluição no Sinal da Ionização

Os ensaios da avaliação da influência no sinal de ionização, devido à coeluição das DHPMs, foram adaptados com base em estudo publicado por Tong e colaboradores (1999). O monastrol será identificado como LaSOM 61, nesta seção, a fim de facilitar a visualização dos resultados.

O comportamento de cada composto foi avaliado individualmente através da análise da área do sinal espectrométrico de massas, quando analisado sozinho ou em mistura com as demais DHPMs e PI, conforme apresentado na Figura 4. É possível observar que os LaSOM 65 (Fig. 4A), LaSOM 67 (Fig. 4B), LaSOM 70 (Fig. 3C) e LaSOM 63 (Fig. 3G) não sofreram aumento ou diminuição significativos no sinal, quando combinados em solução com as demais DHPMs. No entanto, os LaSOM 60 (Fig. 3D), LaSOM 61 (Fig. 3E) e LaSOM 62 (Fig. 3F) comportaram-se de maneiras diferentes na presença de outras DHPMs que estavam em altas concentrações. O LaSOM 60 aumentou mais de duas vezes a área do sinal na presença do LaSOM 67. Por outro lado, o LaSOM 62 teve um aumento significativo no sinal principalmente na presença de LaSOM 61. O LaSOM 61 sofreu influência significativa na área do sinal na presença de todos os compostos, quando estes estavam em altas concentrações.

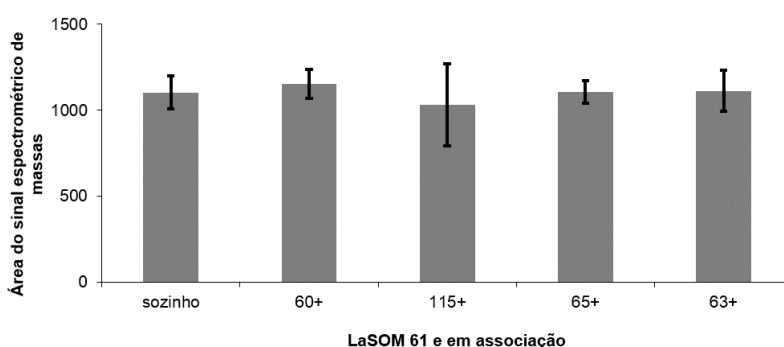


**Figura 4.** Área do sinal espectrométrico de massas do LaSOM 65 (A), LaSOM 67 (B), LaSOM 70 (C), LaSOM 60 (D) em solução, quando injetados isolados na concentração de 10 ng/mL e em mistura com as demais DHPMs. Para análise das misturas, um dos LaSOMs foi mantido em alta concentração (1 µg/mL, indicado pelo símbolo +) e os demais a 10 ng/mL. Valores representados como média ± DP (n = 2/composto).

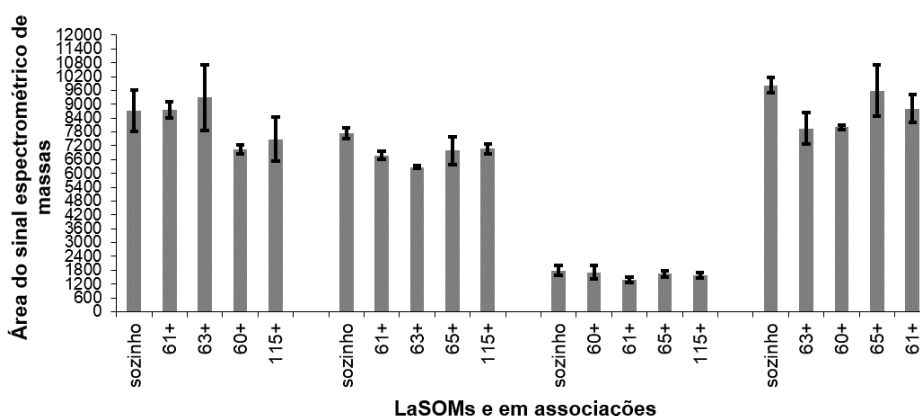


**Figura 4.** Continuação ...Área do sinal espectrométrico de massas do monastrol (LaSOM 61) (E), LaSOM 62 (F) e LaSOM 63 (G) em solução, quando injetados isolados na concentração de 10 ng/mL e em mistura com as demais DHPMs. Para análise das misturas, um dos LaSOMs foi mantido em alta concentração (1 µg/mL, indicado pelo símbolo +) e os demais a 10 ng/mL. Valores representados como média ± DP (n = 2/composto).

Com a finalidade de avaliar, se a causa do aumento na resposta de ionização do LaSOM 61 era devido somente à alta concentração das demais DHPMs em associação ou à presença de muitos compostos em uma mesma solução, procedeu-se à reanálise do LaSOM 61 com um menor número de compostos na mesma amostra. Pode-se observar na Figura 5 que o LaSOM 61 não sofreu alteração na área do sinal quando combinado aos LaSOM 60, LaSOM 115, LaSOM 65 e LaSOM 63. Os compostos LaSOM 65, LaSOM 60, LaSOM 63 e LaSOM 115 também foram avaliados em associação com o Lasom 61 em alta concentração. Pode-se observar que o LaSOM 65 sofreu um aumento na ionização quando os compostos LaSOM 61 e LaSOM 63 estavam presentes na mesma solução (Figura 6).



**Figura 5.** Área do sinal espectrométrico de massas do Lasom 61 sozinho (10 ng/mL) em solução e em associação com LaSOM 60, LaSOM 115, LaSOM 65 e LaSOM 63 na concentração de 1 µg/mL (DHPM nesta concentração indicada pelo símbolo +). Valores representados como média ± DP (n = 2/composto).



**Figura 6.** Área do sinal espectrométrico de massas do LaSOM 65, LaSOM 60, LaSOM 63 e LaSOM 115 sozinhos em solução (10 ng/mL) e em associação com LaSOM 61 (1 µg/mL, indicado pelo símbolo +). Valores representados como média ± DP (n = 2/composto).

O padrão interno não sofreu influência em sua ionização quando combinado com as DHPMs na concentração de 1 µg/mL.

Com base nestes dados, é possível indicar quais DHPMs podem ou não serem analisadas simultaneamente na mesma corrida analítica/bioanalítica. O LaSOM 61 (monastrol) pode ser combinado com todas as DHPMs investigadas, exceto com o LaSOM 62. Ambas NEQ sofreram um aumento em suas ionizações, quando foram analisadas em mistura. O LaSOM 60 não deve ser analisado simultaneamente com o LaSOM 67, pois sofreu um aumento no sinal de ionização quando combinado com esta DHPM. Não se observou, para as outras DHPMs, incluindo LaSOM 115, influência no sinal devido à combinação em uma mesma solução.

#### **4. Conclusões**

O conhecimento das propriedades físico-químicas de NEQ, em fase de descoberta de fármacos, utilizando técnicas experimentais como cromatografia em fase reversa, auxilia na previsão do comportamento desses compostos durante o desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos. As DHPMs investigadas apresentaram um logP experimental médio classificado como moderado, na faixa de 1,23 a 2,26, indicando que em estudos farmacocinéticos pré-clínicos devem apresentar moderada a boa absorção no trato gastrointestinal. O pKa experimental determinado para o LaSOM 63 foi de 4,0. Essa foi a única DHPM passível de ter o pKa calculado, pois as outras NEQ não apresentaram uma curva sigmóide na faixa de pH avaliada. Os dados de coeluição indicaram que o monastrol, LaSOM 70, LaSOM 65, LaSOM 63, LaSOM 115 e LaSOM 60 podem ser quantificados simultaneamente utilizando o mesmo método analítico ou bioanalítico sem que haja interferência no sinal de ionização. Esses resultados irão facilitar o desenvolvimento de métodos bioanalíticos para estudos de farmacocinética pré-clínica utilizando a estratégia de *pool* de amostras.

#### **Agradecimentos**

Agradecemos ao INCT-if e PNPd/CAPES, pelo auxílio financeiro e ao CNPq e CAPES pelas bolsas mestrado e pós-doutorado.

## 5.Referências

BARTOLINI, M. *et al.* Determination of the Dissociation Constants (pka) of Basic Acetylcholinesterase Inhibitors by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 958: 59-67, 2002.

BUETERS, T. *et al.* High-throughput Analysis of Standardized Pharmacokinetics Studies in the Rat Using Sample Pooling and UPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55: 1120-1126, 2011.

CANTO, R. F. S. *et al.* Synthesis of Dihydropyrimidin-2-one/thione Library and Cytotoxic Activity Against the Human U138-MG and Rat C6 Glioma Cell Lines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 22 (7):1379-1388, 2011.

ERDEMGIL, F. G. *et al.* Determination of pka Values of Some Hydroxylates Benzoic Acids in Methanol-Water Binary Mixtures by LC Methodology and Potentiometry. *Talanta*. 72: 489-496, 2007.

FAN, J.; LANNOY, I. A.M. Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*. 87 (1): 93-120, 2014.

GALAON, T.; DAVID, V. The Influence of Mobile Phase pH on the Retention and Selectivity of Related Basic Compounds in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Revue Roumaine de Chimie*. 57 (2): 131-140, 2012.

HAN, H. *et al.* An Efficient Approach for the Rapid Assessment of Oral rat Exposures for New Chemical Entities in Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95 (8): 1684-1692, 2006.

JANOS, P. Determination of Equilibrium Constants from Chromatographic and Electrophoretic Measurements. *Journal of Chromatography A*. 1037: 15-28, 2004.

KERNS, E.; DI, L. Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 8 (7): 316-322, 2003.

LI, C. *et al.* A Modern *in vivo* Pharmacokinetic Paradigm: Combining Snapshot, Rapid and Full PK Approaches to optimize and Expedite Early Drug Discovery. *Drug Discovery Today*. 18 (1/2): 71- 78, 2013.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and Computational Approaches to estimate solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64: 4-17, 2012.

LIU, B. *et al.* Snapshot PK: A Rapid Rodent *in vivo* Preclinical Screening Approach. *Drug Discovery Today*. 13 (7/8): 360-367, 2008.

MARTELL, R. E. *et al.* Discovery of Novel Drugs for Promising Targets. *Clinical Therapeutics*. 35 (9): 1271-1281, 2013.



OECD Guidelines for the testing of chemicals. Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method (2004).

OHLSTEIN, E. H. *et al.* Drug Discovery in the Next Millennium. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 40: 177-191, 2000.

OLAH, T. V. *et al.* The Simultaneous Determination of Mixtures of Drug Candidates by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry as an *in vivo* Drug Screening Procedure. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 11: 17-23, 1997.

RUSSOWSKY, D. *et al.* Synthesis and Differential Antiproliferative Activity of Biginelli Compounds Against Cancer Cell Lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorganic Chemistry*. 34: 173-182, 2006.

SHAFFER, J. E. *et al.* Use of "N-in-One" Dosing to Create an *in vivo* Pharmacokinetics Database for Use in Developing Structure-Pharmacokinetics Relationship. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 88 (3): 313-318, 1999.

TEIJLINGEN, R. *et al.* Development and Validation of LC-MS/MS Methods for the Determination of Mirabegron and its Metabolites in Human Plasma and their Application to a Clinical Pharmacokinetics Study. *Journal of Chromatography B*. 887: 102-111, 2012.

TONG, X. *et al.* Characterization of a Technique for Rapid Pharmacokinetic Studies of Multiple Co-eluting Compounds by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20: 773-784, 1999.

WALTERS, W. P. *et al.* Virtual Screening- An Overview. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 3 (4): 160-178, 1998.

WATERBEEND, H.; GIFFORD, E. ADMET *In Silico* Modelling: Towards Prediction Paradise?. *Nature Reviews/Drug Discovery*. 2:192-203, 2003.

ZHANG, D. *et al.* Preclinical Experimental Models of Drug Metabolism and Disposition in Drug Discovery and Development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2 (6): 549-561, 2012.



## **CAPÍTULO 2**

Validação de Método Bioanalítico em CLAE-EM/EM para  
Quantificação de 4-aryl-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas e  
*Screening* Farmacocinético Pré-Clínico

---



**Validação de Método Bioanalítico em CLAE-EM/EM para Quantificação de 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas e *Screening* Farmacocinético Pré-Clínico**

Fernanda R. Galves<sup>1</sup>, Carolina de Miranda Silva<sup>2</sup>, Fabiano Barreto<sup>1,3</sup>, Patrícia Frasson Corbelini<sup>1,4</sup>, Vera Eifler-Lima<sup>1,4</sup>, Teresa Dalla Costa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Centro Bioanalítico de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, RS

<sup>3</sup>Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (Lanagro/RS), Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, Faculdade de Farmácia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

## Resumo

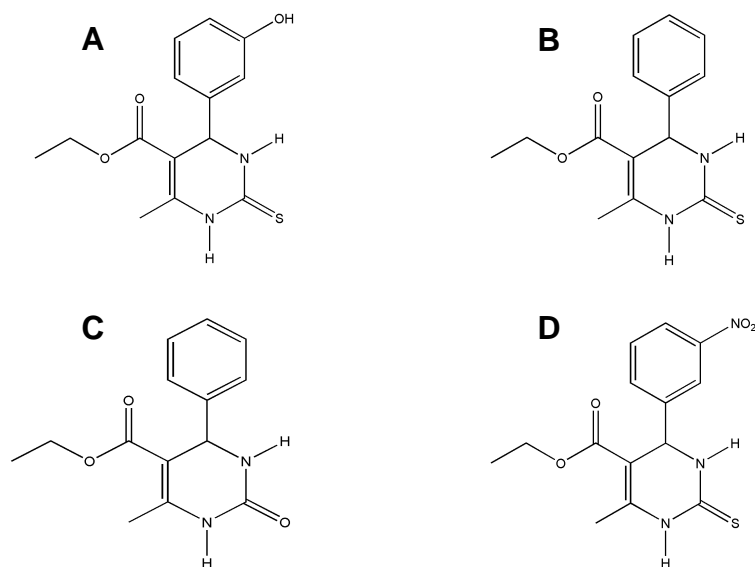
Um método bioanalítico por CLAE-EM/EM foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de três 4-aryl-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas (DHPM), denominadas LaSOM 60, LaSOM 65 e LaSOM 70, compostos derivados do monastrol, que apresentaram atividade promissora contra linhagens celulares de glioma humano e murino. O método desenvolvido foi seletivo para quantificação das DHPMs e do padrão interno (nifedipino), preciso e exato na faixa de 10-1000 ng/mL para cada DHPM. A limpeza das amostras de plasma deu-se por precipitação de proteínas com acetonitrila, obtendo-se alta recuperação para os três compostos. O método bioanalítico foi aplicado no *screening* farmacocinético pré-clínico das DHPMs bem como para avaliação da distribuição cerebral das mesmas. Perfis de concentração plasmática por tempo após dose oral de 10 mg/kg de cada LaSOM (n = 3/grupo), foram avaliados por abordagem não-compartimental para determinação dos parâmetros farmacocinéticos. Os compostos apresentaram uma meia-vida curta, ente 1 e 3 h, *clearance* ( $CL_{tot}/F$ ) (LaSOM 60 =  $9,8 \pm 1,9$  L/h/kg; LaSOM 65 =  $1,7 \pm 1,4$  L/h/kg; LaSOM 70 =  $5,46 \pm 1,86$  L/h/kg) e volume de distribuição ( $Vd/F$ ) variados (LaSOM 60 =  $43,0 \pm 22,0$  L/kg; LaSOM 65 =  $4,8 \pm 3,6$  L/kg; LaSOM 70 =  $8,48 \pm 2,77$  L/kg). Os parâmetros determinados para o LaSOM 65 foram semelhantes aos relatados previamente na literatura em estudo farmacocinético convencional. LaSOM 70 apresentou a maior penetração cerebral, com uma relação concentração tecido/concentração plasma de  $0,37 \pm 0,06$  1 hora após dose i.v. de 1 mg/kg. Os resultados indicam que a estratégia de *rapid PK* e *cassette analysis* empregadas nesse trabalho são adequadas para investigação de séries de novas entidades químicas, tornando os estudos farmacocinéticos pré-clínicos mais rápidos, menos dispendiosos e com utilização de menor número de animais. Os resultados farmacocinéticos sugerem que nenhuma molécula apresenta características de penetração cerebral adequadas para seguir na investigação como agente antitumoral para o tratamento do glioma.

**Palavras-chave:** Diidropirimidinonas; CLAE-EM/EM; *screening* farmacocinético; *pool* de amostras; distribuição cerebral.

## 1. Introdução

As 4-aril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas (DHPMs) são uma classe de compostos sintéticos amplamente investigados, pois apresentam diversas atividades biológicas, dentre estas a antitumoral (MAYER *et al.*, 1999). O monastrol (Figura 1) foi a primeira molécula dessa classe a ser descoberta, apresentando atividade antitumoral promissora por inibição da motilidade mitótica da proteína cinesina Eg5, sendo este um alvo terapêutico de grande interesse no tratamento do câncer (MAYER *et al.*, 1999; YAN *et al.*, 2004).

A partir do monastrol, uma série de DHPMs foi sintetizada no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e atividades contra linhagens celulares de glioma humano (U138-MG) e murino (C6) foram investigadas. Atividades citotóxica e antiproliferativa foram observadas para algumas dessas novas entidades químicas (NEQ), dentre elas os LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65 (Figura 1). O LaSOM 65 apresentou uma inibição mais acentuada no crescimento das linhagens U138-MG e C6, quando comparado ao monastrol. LaSOM 60 e LaSOM 70 inibiram o crescimento em ambas linhagens celulares, com efeito semelhante ao apresentado pelo monastrol, de 35-44 % (CANTO *et al.*, 2011). Em função da melhor atividade *in vitro* do LaSOM 65, o mesmo foi investigado em modelo de glioma de células tumorais ascíticas *in vivo*, não tendo apresentado atividade (STUEPP, 2011). A investigação farmacocinética em ratos dessa NEQ mostrou uma meia-vida de  $1,75 \pm 0,71$  h, um volume de distribuição de  $1,76 \pm 0,24$  L/kg, um *clearance* de  $0,85 \pm 0,18$  L/h/kg e uma baixa penetração cerebral (TORRES *et al.*, 2014), justificando a ausência de atividade no modelo de glioma *in vivo*. No modelo de Sarcoma 180 em camundongos, LaSOM 65 apresentou inibição de  $76,0 \pm 0,13$  % do tumor, 8 dias após a administração de dose única de 90 mg/kg pela via intraperitoneal, sendo essa inibição maior do que a apresentada pelo monastrol ( $53,0 \pm 0,14$  %) (CANTO *et al.*, 2011). LaSOM 60 e LaSOM 70 não foram investigados nesse modelo. A farmacocinética dessas duas NEQ também não é conhecida.



**Figura 1.** Estruturas moleculares do Monastrol (A), LaSOM 60 (B), LaSOM 70 (C) e LaSOM 65 (D).

Visando realizar a investigação farmacocinética pré-clínica de NEQ promissoras em ensaios *in vitro* de maneira mais eficiente, com baixo custo e utilizando menor número de animais, estratégias de *screening* rápido têm sido adotadas pela indústria farmacêutica e descritas na literatura (LIU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013). Essas estratégias objetivam evitar que, ao final da avaliação farmacocinética pré-clínica convencional, que é morosa e dispendiosa, a NEQ sob investigação seja descartada por não apresentar propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) adequadas. Entre as estratégias para *screening* farmacocinético citadas na literatura, têm-se o *rapid PK*, a qual se assemelha à avaliação convencional. Nessa estratégia duas vias de administração, intravenosa e oral, são avaliadas, utiliza-se três animais por grupo experimental e seis coletas de sangue são realizadas até 24 h após a administração. Para quantificação, faz-se um *pool* de amostras de plasma (*sample pooling*) do mesmo tempo de coleta dos três animais que receberam a mesma entidade química visando reduzir o número de amostras para análise. Apesar do *rapid PK* possibilitar a determinação de todos os parâmetros farmacocinéticos, as informações sobre variabilidade inter-individual são perdidas devido ao *pool* de amostras de plasma (LI *et al.*, 2013). Na estratégia de *cassette analysis*, o *pool* de amostras de plasma também é realizado, porém



de amostras do mesmo tempo de coleta e de diferentes animais e NEQ (HAN *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013). A obtenção de dados de variabilidade inter-individual torna a estratégia de *cassette analysis* vantajosa, possibilitando a determinação de parâmetros farmacocinéticos completos na dependência dos tempos de coleta de amostras de sangue.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método bioanalítico em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (CLAE-EM/EM) para quantificação simultânea de três DHPMs: LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65, e avaliar a farmacocinética pré-clínica desses compostos aplicando as estratégias de *rapid PK* e *cassette analysis*. Em função da atividade antiglioma observada *in vitro* para essas moléculas, a distribuição cerebral também foi investigada.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Reagentes e Solventes

As DHPMs investigadas (Figura 1) foram sintetizadas pelo LaSOM (Faculdade de Farmácia da UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil). Nifedipino (padrão interno – PI) foi adquirido na Farmácia Magistral FitonFarma (Porto Alegre - RS). Acetonitrila grau HPLC e ácido acético foram obtidos da Tedia (Farfield, EUA) e J.T.Baker (EUA), respectivamente, e água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore Corporation).

### 2.2. Condições Cromatográficas em CLAE-EM/EM

Utilizou-se sistema de cromatografia líquida Agilent 1260 (Agilent, Alemanha) acoplado a espectrômetro de massas AB Sciex 5500 QTRAP triplo quadrupolo (ABSciex, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 3,0 mm, tamanho de partícula de 2,7 µm) acoplado a pré-coluna Phenomenex. A fase móvel com eluição por gradiente foi constituída de água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1%

de ácido acético, na vazão de 0,6 mL/min com 2 min de tempo de equilíbrio. A eluição por gradiente iniciou com 10% de B aumentando para 90% em 1 min e se mantendo por 2 min. A temperatura do forno da coluna foi ajustada para 40 °C e volume de amostra de 2 µL foram injetados.

No espectrômetro de massas utilizou-se o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) com intervalo de varredura (*dwell time*) de 30 ms e voltagem do capilar de 5,5 kV em modo *electrospray* positivo (ESI+). O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e colisão, sendo a temperatura ajustada para 700 °C. As transições *m/z* monitoradas foram: 277,185 > 172,100 (LaSOM 60), 261,210 > 172,100 (LaSOM 70), 322,201 > 217,100 (LaSOM 65) e 347,103 > 315,100 (nifedipino).

### 2.3. Preparação das Amostras em Solução

Soluções estoque das DHPMs e do PI foram preparadas separadamente na concentração de 100 µg/mL, pesando-se 1 mg em balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com acetonitrila. As soluções estoque foram mantidas à -20 °C. A curva de calibração seriada, contendo os LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65, foi preparada diluindo-se as soluções estoque em acetonitrila:água (50:50; v/v) para obtenção das seguintes concentrações: 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 8 e 10 µg/mL. A solução estoque do PI foi diluída a 10 µg/mL e posteriormente a 1 µg/mL, para obter a concentração final de 250 ng/mL em acetonitrila:água (50:50; v/v). Os controles de qualidade baixo (0,3 µg/mL), médio (3 µg/mL) e alto (7,5 µg/mL) foram preparados a partir das soluções intermediárias provenientes das soluções estoques dos compostos.

### 2.4. Preparação e Processamento das Amostras de Plasma

A curva de calibração bionalítica em plasma foi preparada pipetando-se 10 µL de cada uma das diferentes concentrações, descritas em 2.3, em 90 µL de plasma branco, obtendo-se a seguinte faixa de concentração: 10, 25, 50, 100, 250, 500, 800 e 1000 ng/mL. Após *vortexing* por 60 seg., pipetou-se 50 µL de cada ponto da curva bioanalítica para outro tubo e completou-se com mais

100 µL de plasma branco, totalizando 150 µL de amostra de plasma. Este procedimento simula a técnica de *pool de amostras das DHPMs* que será aplicada nos experimentos de farmacocinética pré-clínica. A solução de nifedipino foi adicionada em todas as amostras, obtendo-se a concentração final de 25 ng/mL.

A precipitação de proteínas foi realizada adicionando-se 450 µL de acetonitrila aos 150 µL de amostra de *pool* de plasma contendo LaSOM 60, LaSOM 70, LaSOM 65 e nifedipino. As amostras foram misturadas em mesa agitadora por 20 min a 180 rpm e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para frascos apropriados para injeção no sistema cromatográfico. Os controles de qualidade baixo (CQB - 30 ng/mL), médio (CQM - 300 ng/mL) e alto (CQA - 750 ng/mL) foram preparados e processados da mesma forma que a curva de calibração bioanalítica.

## 2.5. Validação do Método Bioanalítico

O método foi validado seguindo a normas dos guias *Food and Drug Administration* (FDA, 2001) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012) para validação de métodos bioanalíticos. Os parâmetros determinados na validação foram: seletividade, linearidade, precisão e exatidão, recuperação, efeito matriz e estabilidade. A validação foi realizada em dois dias.

### 2.5.1. Seletividade

Para avaliar se há interferência de componentes endógenos da matriz biológica no sinal de ionização das DHPMs e do PI, amostras de plasma branco obtidas de diferentes animais não-tratados foram utilizadas. Amostras processadas contendo o limite inferior de quantificação (LIQ) e o PI foram comparadas com amostras de plasma branco processadas.

### 2.5.2. Linearidade

A linearidade da curva de calibração bioanalítica foi avaliada preparando-se três curvas por dia de validação, com as DHPMs e PI na faixa de concentração de 10 a 1000 ng/mL, além das análises das amostras de plasma branco e zero, contendo somente PI. Esta faixa de concentração foi escolhida com base no conhecimento prévio da farmacocinética do LaSOM 65. A relação entre a resposta (área do sinal do analito/área do sinal do PI) *versus* concentração nominal do analito foi determinada para cada DHPM utilizando o modelo matemático de regressão linear com peso (1/x). Segundo os guias de validação utilizados, desvios menores ou iguais a 20% (em relação à concentração nominal do LIQ) e 15% (em relação à concentração nominal das outras concentrações da curva de calibração) são aceitáveis.

### 2.5.3. Precisão e Exatidão

Precisão e exatidão intradia e interdia foram avaliados através do processamento de seis replicatas do LIQ (10 ng/mL), CQB (30 ng/mL), CQM (300 ng/mL) e CQA (750 ng/mL), contendo as três DHPMs. A concentração de DHPM de cada amostra foi calculada a partir da curva de calibração média do respectivo dia. A precisão e a exatidão das concentrações médias foram expressas em coeficiente de variação (CV%) e erro padrão relativo (EPR), respectivamente. Desvios menores ou iguais a 20% em relação à concentração nominal do LIQ e 15% em relação ao CQB, CQM e CQA para a precisão e exatidão são considerados aceitáveis.

### 2.5.4. Recuperação

Amostras de CQB, CQM e CQA, processadas e em solução, contendo as três DHPMs, foram preparadas em seis replicatas. A resposta do analito na amostra processada pela resposta do analito em solução foi calculada para determinação da recuperação de cada composto.

#### 2.5.5. Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi avaliado processando-se plasma branco e, posteriormente, adicionando-se as DHPMs e PI nas concentrações de CQB e CQA. As áreas do pico espectrométrico destas amostras foram comparadas com as áreas do pico encontradas em suas soluções correspondentes. O ensaio foi realizado com seis replicatas para cada controle de qualidade. Coeficientes de variação menores que 15% foram considerados aceitáveis.

#### 2.5.6. Estabilidade

A estabilidade das DHPMs foi avaliada em diferentes condições, conforme apresentada abaixo. Para todas as condições, desvios inferiores a 15% da concentração média em relação à concentração nominal foram considerados aceitáveis.

##### 2.5.6.1. Estabilidade Pós-Processamento

Triplicatas de amostras processadas, contendo as três DHPMs, em concentrações equivalentes a CQB e CQA foram mantidas por 8 h em auto-injetor à 8 °C, antes da injeção.

##### 2.5.6.2. Estabilidade Após Ciclos de Congelamento/Descongelamento

Plasmas brancos contaminados com cada uma das DHPMs, separadamente, nas concentrações equivalentes a CQB e CQA foram armazenados por 24 h a  $-80 \pm 2$  °C, em triplicata. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e armazenadas novamente a  $-80 \pm 2$  °C por 24 h. Este ciclo foi realizado por mais duas vezes. Para análise, fez-se o *pool* de amostras das três DHPMs, pipetando-se 50 µL de cada CQ de cada composto, totalizando 150 µL de plasma. A adição do PI e o processamento das amostras foram realizados conforme descrito em 2.4.

#### 2.5.6.3. Estabilidade de Curta Duração

Plasmas brancos contaminados com cada DHPM, separadamente, nas concentrações equivalentes a CQB e CQA foram mantidos à temperatura ambiente por 4 h. Após procedeu-se o *pool* das amostras das três DHPMs, a adição do PI e o processamento, conforme indicado em 2.4. As amostras para cada CQ foram preparadas em triplicatas.

#### 2.5.6.4. Estabilidade de Longa Duração

Triplicatas de plasmas brancos contaminados com cada uma das DHPMs, separadamente, nas concentrações equivalentes a CQB e CQA foram mantidos a  $-80 \pm 2$  °C por 5 semanas. Após *pool* das amostras e processamento, conforme indicado em 2.4, procedeu-se à quantificação das DHPMs.

### 2.6. Avaliação Farmacocinética

Os estudos em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da própria Universidade (Protocolo 24138). A avaliação farmacocinética dos LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65 foi realizada após a administração de cada uma das DHPMs separadamente a diferentes grupos de animais, sendo utilizado três animais por composto.

Ratos *Wistar* machos (300-350 g), receberam por gavagem dose oral (v.o.) de 10 mg/kg de cada DHPM e coletas de sangue foram realizadas pela veia lateral caudal nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h pós-dose. A via intravenosa (i.v.) também foi investigada, administrando-se 1 mg/kg pela veia lateral caudal, sendo realizadas coletas de sangue na veia caudal contra-lateral após 0,25, 0,5, 1, 4, 8, 12 e 24 h.

Para administração, as DHPMs foram preparadas em solução glicosada, contendo 75% de PEG 400 (polietilenoglicol) e 2% de polissorbato 80. Coletas de 100 µL de sangue foram realizadas nos tempos pré-determinados pós-dose, adicionadas em tubos contendo heparina e centrifugadas à 12.000 rpm por 10

min a  $4,0 \pm 1$  °C. Os plasmas obtidos foram armazenados a  $-80 \pm 2$  °C até processamento para análise.

Os perfis individuais de concentração plasmática por tempo, obtidos para cada DHPM em cada via de administração, foram avaliados para determinação dos parâmetros farmacocinéticos por abordagem não-compartimental com o auxílio do programa Excel<sup>®</sup> 2003 (Microsoft<sup>®</sup>). Os seguintes parâmetros foram determinados: constante de velocidade de eliminação ( $\lambda$ ), meia-vida ( $t_{1/2}$ ), área sob a curva do tempo zero ao infinito ( $ASC_{0-inf}$ ), tempo de residência médio (MRT), *clearance* total ( $CL_{tot}$ ) e volume de distribuição (Vd), utilizando equações clássicas da análise não-compartimental (SHARGEL *et al.*, 2005).

## 2.7. Distribuição Cerebral

A avaliação da distribuição cerebral foi realizada separadamente para cada DHPM, após dose única intravenosa de 1 mg/kg em ratos *Wistar* machos (300-350 g). Os animais ( $n = 3$ /composto) foram decapitados uma hora após administração da dose, procedendo-se a remoção do cérebro e a coleta de sangue. Resíduos de sangue do cérebro foram retirados, com auxílio de gaze, e o sangue coletado foi centrifugado para obtenção do plasma. As amostras foram armazenadas no  $-80 \pm 2$  °C até processamento para análise.

No dia da análise, os cérebros foram descongelados à temperatura ambiente, pesados e 2,5 mL de solução salina 0,9% foram adicionados por grama de tecido. As amostras foram mantidas em banho de gelo até homogeneização com auxílio de ultraturrax (Marconi<sup>®</sup>) por 40 seg. Os homogeneizados foram transferidos para tubos Falcon e sonicados por 5 min. Após procedeu-se a preparação das amostras para quantificação. A concentração das DHPMs no cérebro foi calculada pela Eq. 1 (Nix *et al.*, 1991):

$$Ct(ng / g) = \frac{Cs \times Vs}{P(g)} \quad \text{Eq. 1}$$

onde  $C_t$  a concentração tecidual,  $C_s$  a concentração no sobrenadante,  $V_s$  o volume do sobrenadante e  $P$  o peso da amostra.

A curva de calibração tecidual foi preparada na faixa de concentração de 10-1000 ng/mL a partir do homogeneizado de cérebro obtido de um animal não-tratado. As amostras foram processadas da mesma forma que o plasma para extração e quantificação das DHPMs (ver item 2.4). O *pool* de amostras foi aplicado para o homogeneizado de cérebro do mesmo modo que descrito para o plasma.

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Condições Cromatográficas e Otimização das Condições da CLAE-EM/EM**

A eluição por gradiente da fase móvel, constituída de acetonitrila:água, e a coluna cromatográfica de fase reversa de 5 cm possibilitaram o desenvolvimento de um método analítico rápido, com tempo de análise de 5 min. Os LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65 apresentaram tempos de retenção de 3,26, 3,13 e 3,27 min, respectivamente. A eluição por gradiente permitiu a retirada de impurezas polares e apolares que poderiam estar presentes nas soluções ou na matriz biológica testada, sendo este um dos motivos que levaram a utilização no método.

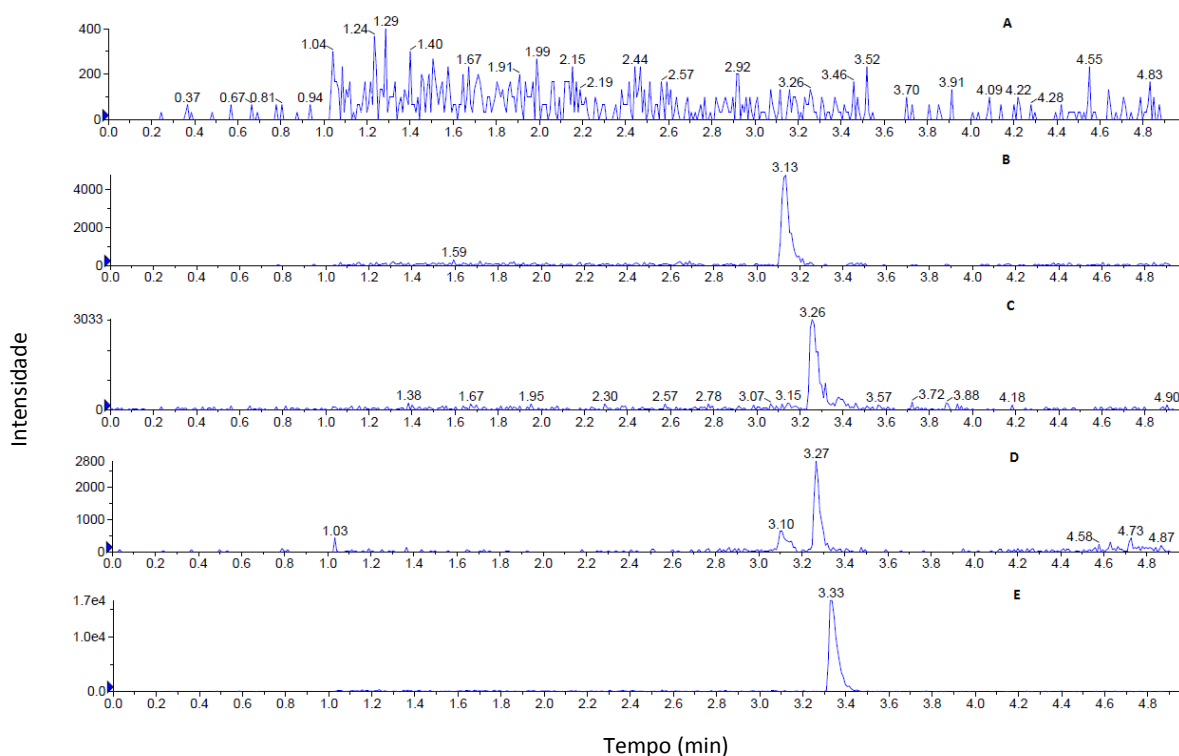
Os resultados obtidos com o ensaio de influência da coeluição das DHPMs indicou que os LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65 podiam ser analisados simultaneamente, por não sofrem interferência no sinal espectrométrico (Capítulo 1). Este estudo auxiliou no desenvolvimento do método bioanalítico em CLAE-EM/EM. No entanto, como algumas condições foram modificadas, como equipamento e coluna cromatográfica, foi necessário otimizar novamente os parâmetros de ionização das DHPMs.



## 3.2. Validação do Método Bioanalítico

### 3.2.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos das amostras processadas de plasma branco e contaminadas com as três DHPMs no LIQ. Nenhum componente endógeno da matriz biológica utilizada interferiu no sinal dos LaSOM 60, LaSOM 70, LaSOM 65 e PI, como pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2.** Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM no modo MRM das DHPMs e PI no LIQ (10 ng/mL) e em 25 ng/mL, respectivamente: plasma branco (A), LaSOM 70 (B), LaSOM 60 (C), LaSOM 65 (D) e nifedipino (E).

### 3.2.2. Linearidade

Todas as curvas preparadas em plasma apresentaram linearidade na faixa de 10 – 1000 ng/mL, aplicando-se peso 1/x no cálculo de regressão linear. Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) de cada DHPM, obtidos para as três curvas nos dois dias de validação foram superiores a 0,99. Coeficiente de

variação (CV%) inferiores a 15% foram encontrados para todas as DHPMs em todas as concentrações, exceto o LIQ que apresentou CV% inferior a 20%, de acordo com os limites de variabilidade estabelecidos pelos guias utilizados.

### 3.2.3. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão são parâmetros da validação que indicam repetibilidade e aproximação de um valor encontrado do analito em relação a um valor referência, respectivamente. Os resultados para o LIQ e para os controles de qualidade para esses dois parâmetros estão apresentados na Tabela 1. Como pode ser observado, o método mostrou-se preciso e exato dentro da faixa de concentrações estudadas.

### 3.2.4. Recuperação

O processamento de limpeza das amostras biológicas através de precipitação de proteínas com acetonitrila mostrou-se eficiente e rápido. As DHPMs e o PI apresentaram uma recuperação média ( $\% \pm DP$ ) de:  $101,05 \pm 5,25$  (LaSOM 60),  $96,46 \pm 3,96$  (LaSOM 70) e  $96,95 \pm 6,49$  (LaSOM 65) e  $100,49 \pm 3,98$  (nifedipino) para os três controles de qualidade (CQB, CQM e CQA) processados.

### 3.2.5. Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi avaliado em seis replicatas de duas concentrações de cada DHPM (CQB e CQA) e em misturas de plasmas de diferentes animais não-tratados. A comparação da área do pico espectrométrico das amostras branco processadas e, posteriormente contaminadas com as DHPMs e PI, em relação à área do pico encontrada em solução, forneceu os seguintes resultados: 13,69 % (LaSOM 60), 14,43 % (LaSOM 70) e 11,30 % (LaSOM 65).

**Tabela 1.** Precisão e exatidão intradia e interdia para as DHPMs investigadas\*.

Amostra	Dia análise	Precisão Intradia e Interdias (CV%)		
		LaSOM 60	LaSOM 70	LaSOM 65
LIQ (10 ng/mL)	Dia 1	10,67	5,94	10,48
	Dia 2	6,37	6,24	3,32
	Interdia	7,24	13,16	12,47
CQB (30 ng/mL)	Dia 1	5,77	5,98	7,75
	Dia 2	6,10	6,98	5,77
	Interdias	6,43	6,64	4,75
CQM (300 ng/mL)	Dia 1	5,76	5,35	4,80
	Dia 2	6,58	7,99	7,26
	Interdias	11,0	11,32	11,48
CQA (750 ng/mL)	Dia 1	5,58	7,05	6,20
	Dia 2	6,07	5,44	3,39
	Interdias	6,09	7,85	7,60
Amostra	Dia análise	Exatidão Intradia e Interdias (EPR%)		
		LaSOM 60	LaSOM 70	LaSOM 65
LIQ (10 ng/mL)	Dia 1	97,22	108,48	120,0
	Dia 2	115,0	105,13	106,83
	Interdia	96,86	118,32	118,04
CQB (30 ng/mL)	Dia 1	103,09	96,17	98,83
	Dia 2	90,67	100,55	98,95
	Interdias	104,19	98,36	98,45
CQM (300 ng/mL)	Dia 1	92,11	93,62	95,5
	Dia 2	106,72	111,50	103,39
	Interdias	99,64	102,55	103,11
CQA (750 ng/mL)	Dia 1	105,55	98,4	106,13
	Dia 2	105,57	108,57	112,53
	Interdias	105,08	103,49	108,79

\*Dados em relação à média dos valores (n = 6/dia).

### 3.2.6. Estabilidade

Os resultados da investigação da estabilidade para as DHPM, expressos como média%  $\pm$  desvio padrão, estão mostrados nas Tabelas 2 a 4 para LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65, respectivamente.

**Tabela 2.** Estabilidade do LaSOM 60\*.

<b>Amostra</b>	<b>Pós-processamento (8 h)</b>	<b>Gelo/Degelo (3 ciclos)</b>	<b>Curta duração (4 h)</b>	<b>Longa Duração (5 sem)</b>
CQB (30 ng/mL)	101,7 $\pm$ 6,2	115, 2 $\pm$ 2,7	93,3 $\pm$ 5,1	88,2 $\pm$ 4,2
CQA (750 ng/mL)	94,9 $\pm$ 4,9	100,5 $\pm$ 13,4	94,6 $\pm$ 17,7	81,3 $\pm$ 1,6

\*Resultados expressos como média%  $\pm$  DP; n = 3/CQ.

**Tabela 3.** Estabilidade do LaSOM 70\*.

<b>Amostra</b>	<b>Pós-processamento (8 h)</b>	<b>Gelo/Degelo (3 ciclos)</b>	<b>Curta duração (4 h)</b>	<b>Longa Duração (5 sem)</b>
CQB (30 ng/mL)	105,6 $\pm$ 5,4	85,7 $\pm$ 7,5	87,11 $\pm$ 8,3	89,3 $\pm$ 9,5
CQA (750 ng/mL)	100,5 $\pm$ 4,4	113,3 $\pm$ 6,3	88,3 $\pm$ 8,0	86,3 $\pm$ 4,6

\*Resultados expressos como média%  $\pm$  DP; n = 3/CQ.

**Tabela 4.** Estabilidade do LaSOM 65\*.

<b>Amostra</b>	<b>Pós-processamento (8 h)</b>	<b>Gelo/Degelo (3 ciclos)</b>	<b>Curta duração (4 h)</b>	<b>Longa Duração (5 sem)</b>
CQB (30 ng/mL)	103,0 $\pm$ 15,3	108,0 $\pm$ 13,3	85,8 $\pm$ 6,1	n.d.
CQA (750 ng/mL)	98,1 $\pm$ 3,9	109,5 $\pm$ 7,7	88,3 $\pm$ 5,9	n.d.

\*Resultados expressos como média%  $\pm$  DP; n = 3/CQ; n.d. = dado não disponível.

Os resultados da validação bioanalítica demonstraram que o método é seletivo, pois não se observou interferentes da matriz biológica no tempo de retenção dos analitos, linear, preciso e exato na faixa de 10-1000 ng/mL para cada DHPM. O processamento das amostras em plasma, utilizando acetonitrila para precipitação de proteínas, demonstrou uma recuperação alta para as três DHPMs. Não se observou interferência de componentes endógenos no sinal de ionização dos compostos, pois o ensaio de efeito de matriz apresentou desvios dentro dos valores permitidos. As DHPMs demonstraram ser estáveis, em plasma, por 4 h à temperatura ambiente, em auto-injetor por 8 h e nos ciclos de congelamento/descongelamento após processamento da amostra. O amostra de CQA do LaSOM 60 apresentou degradação superior a 15% após 5 semanas a -80 °C, indicando a necessidade de processamento das amostras em tempo inferior. A estabilidade de longa duração deverá ser refeita devido à perda das amostras do LaSOM 65.

### 3.3. Avaliação Farmacocinética

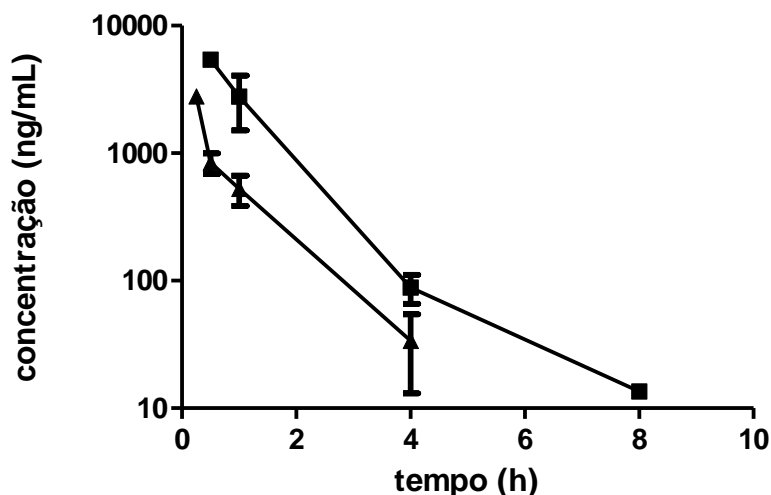
A associação das estratégias de *rapid PK* e *cassete analysis* utilizada neste trabalho objetivou a redução do número de amostras para análise e de animais utilizados. A farmacocinética de cada DHPM foi avaliada separadamente em ratos *Wistar* utilizando-se duas vias de administração.

#### 3.3.1. Administração intravenosa

Na administração i.v. de 1 mg/kg, sete tempos de coleta de sangue foram utilizados para obtenção do perfil de concentração plasmática *versus* tempo das DHPMs. Todos os compostos apresentaram concentrações abaixo do LIQ nos tempos de 12 e 24 h pós-dose, portanto esses tempos não foram utilizados para caracterização dos perfis farmacocinéticos.

Após dose i.v. *bolus* foi possível quantificar o LaSOM 70 apenas nos três primeiros tempos de coleta (0,25, 0,5 e 1 h) para os três animais investigados, sendo as concentrações a partir de 4 h abaixo do LIQ do método analítico. Desse modo, a determinação dos parâmetros farmacocinéticos ficou

prejudicada. LaSOM 60 e LaSOM 65 apresentaram concentrações acima do LIQ até 4 h e 8 h pós-dose, respectivamente, e amostras que apresentaram concentrações acima do limite superior de quantificação foram diluídas. Os perfis médios, dessas duas DHPMs, podem ser observados na Figura 3.



**Figura 3.** Perfis plasmáticos médios de LaSOM 60 (▲) e LaSOM 65 (■) após dose i.v. de 1 mg/kg (n = 3/grupo) (média ± DP).

Os parâmetros farmacocinéticos determinados por abordagem não-compartimental para LaSOM 60 e LaSOM 65 estão apresentados na Tabela 5, juntamente com os parâmetros determinados através da avaliação da farmacocinética convencional de estudos prévios com LaSOM 65. Para as duas DHPMs, o perfil plasmático médio indica curvas com duas inclinações, que não podem ser adequadamente avaliadas utilizando apenas quatro tempos de coleta. Desse modo, a confiabilidade dos parâmetros determinados após a dose i.v. é reduzida. Essa constatação é corroborada pela comparação dos parâmetros determinados para LaSOM 65 no presente trabalho e em estudo prévio. Apesar da meia-vida ser muito semelhante nas duas abordagens, os valores de  $CL_{tot}$  e  $V_d$  são muito discrepantes devido à grande diferença observada na  $ASC_{0-\infty}$ . Desse modo, a abordagem *rapid PK* não se mostrou adequada para caracterizar a farmacocinética após dose i.v. dessas duas DHPMs. Esse problema poderia ser solucionado com a utilização de método analítico mais sensível. Cabe ressaltar que a dose de 1 mg/kg foi utilizada, pois

doses superiores se mostraram tóxicas após administração i.v. do LaSOM 65 em estudo prévio (TORRES *et al.*, 2014).

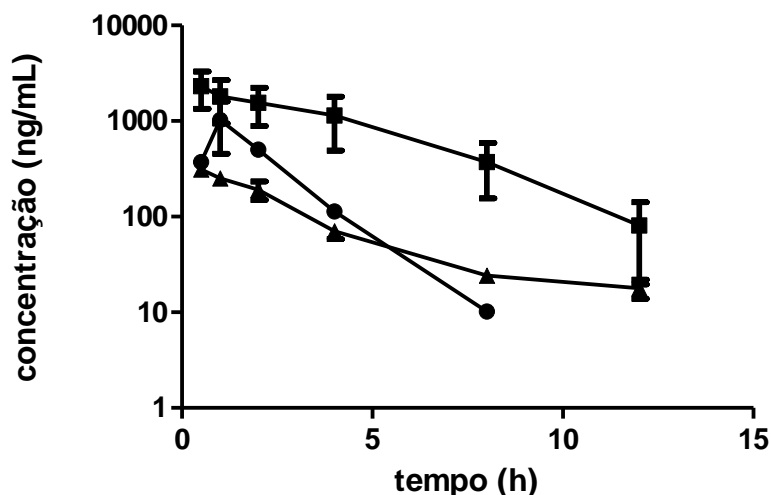
**Tabela 5.** Parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 60 e LaSOM 65 determinados por abordagem não-compartimental após administração i.v. de 1 mg/kg a ratos *Wistar*.

Parâmetros Farmacocinéticos	LaSOM 60	LaSOM 65	LaSOM 65*
$\lambda$ ( $h^{-1}$ )	1,0 $\pm$ 0,3	0,45 $\pm$ 0,11	0,43 $\pm$ 0,10
$t_{1/2}$ (h)	0,7 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,4
ASC <sub>0-∞</sub> ( $\mu g \cdot h / mL^{-1}$ )	2,73 $\pm$ 0,73	16,45 $\pm$ 8,5	1,2 $\pm$ 0,2
MRT (h)	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,4
CL <sub>tot</sub> (L/h/kg)	0,4 $\pm$ 0,1	0,07 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,13
Vd (L/kg)	0,2 $\pm$ 0,1	0,05 $\pm$ 0,04	1,77 $\pm$ 0,34

\*Retirado de TORRES *et al.*, 2014. Valores representam média  $\pm$  desvio padrão;  $\lambda$  = constante de velocidade de eliminação;  $t_{1/2}$  = meia-vida; ASC<sub>0-∞</sub> = área sob a curva; MRT = tempo de residência médio; CL<sub>tot</sub> = *clearance* total; Vd = volume de distribuição; n = 3 animais/grupo (*rapid PK*); n = 8 animais/grupo (PK convencional).

### 3.3.2. Administração oral

A investigação da farmacocinética, após administração oral da dose de 10 mg/kg, foi avaliada com sete tempos de coleta até 24 h pós-dose, como na via i.v. Entretanto, a caracterização do perfil plasmático foi realizada com as concentrações determinadas até 8 h pós-dose para o LaSOM 70 e 12 h pós-dose para LaSOM 60 e LaSOM 65. Todas as concentrações nestes tempos de coleta foram superiores ao LIQ. Amostras que apresentaram concentrações acima do limite superior de quantificação foram diluídas. No primeiro tempo de coleta pós-dose, 0,5 h, obteve-se concentração máxima, não sendo possível se observar a fase de absorção do LaSOM 60 e LaSOM 65. LaSOM 70 apresentou pico de concentração 1 h após a dose, como pode ser observado na Figura 4.



**Figura 4.** Perfis plasmáticos médios de LaSOM 70 (●), LaSOM 60 (▲) e LaSOM 65 (■) após dose oral de 10 mg/kg (n = 3/grupo) (média ± DP).

Na Tabela 6 são apresentados os valores dos parâmetros farmacocinéticos determinados por abordagem não-compartimental para as três DHPMs. Todas apresentaram meia-vida curta de 1,1 h (LaSOM 70), 2,9 h (LaSOM 60) e 2,2 h (LaSOM 65); *clearance* total ( $CL_{tot}/F$ ) elevado (LaSOM 60 =  $9,8 \pm 1,9$  L/h/kg; LaSOM 70 =  $5,46 \pm 1,86$  L/h/kg), sendo que LaSOM 65 apresentou o menor *clearance* dentre as três DHPMs (LaSOM 65 =  $1,7 \pm 1,4$  L/h/kg) e volume de distribuição ( $Vd/F$ ) moderado (LaSOM 65 =  $4,8 \pm 3,6$  L/kg) a elevado (LaSOM 60 =  $43,0 \pm 22,0$  L/kg; LaSOM 70 =  $8,48 \pm 2,77$  L/kg).

O volume de distribuição ( $Vd/F$ ) determinado para o LaSOM 60 foi bastante elevado. No entanto, deve-se considerar que esse volume foi determinado em relação à biodisponibilidade, podendo ser reduzido de modo importante caso a biodisponibilidade oral seja baixa.

O percentual extrapolado de ASC após administração oral foi inferior a 20% para todas as DHPMs investigadas (Tabela 6), indicando que foi possível caracterizar adequadamente a fase de eliminação dos três compostos com o desenho experimental empregado.



**Tabela 6.** Parâmetros farmacocinéticos dos LaSOM 70, LaSOM 60 e LaSOM 65 determinados por abordagem não-compartimental após administração oral de 10 mg/kg a ratos Wistar.

<b>Parâmetros Farmacocinéticos</b>	<b>LaSOM 70</b>	<b>LaSOM 60</b>	<b>LaSOM 65</b>	<b>LaSOM 65*</b>
$\lambda$ (h <sup>-1</sup> )	0,64 ± 0,02	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,39 ± 0,06
t <sub>1/2</sub> (h)	1,08 ± 0,03	2,9 ± 1,0	2,2 ± 0,9	1,8 ± 0,3
ASC <sub>0-inf</sub> (µg.h/.mL <sup>-1</sup> )	2,0 ± 0,77	1,04 ± 0,18	10,28 ± 9,07	7,1 ± 0,8
ASC <sub>extrapolada</sub> (%)	0,86 ± 0,29	6,7 ± 1,0	2,3 ± 2,1	--
MRT (h)	1,64 ± 0,48	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,8	4,8 ± 0,7
CL <sub>tot</sub> /F (L/h/kg)	5,46 ± 1,86	9,8 ± 1,9	1,7 ± 1,4	1,45 ± 0,09
Vd/F (L/kg)	8,48 ± 2,77	43,0 ± 22,0	4,8 ± 3,6	3,72 ± 0,51

\*Retirado de TORRES *et al.*, 2014; Valores representam média ± desvio padrão;  $\lambda$  = constante de velocidade de eliminação; t<sub>1/2</sub> = meia-vida; ASC<sub>0-∞</sub> = área sob a curva; MRT = tempo de residência médio; CL<sub>tot</sub> = *clearance* total; Vd = volume de distribuição; F = biodisponibilidade; n = 3 animais/grupo (*rapid PK*); n = 8 animais/grupo (PK convencional).

Novamente na via oral, a variabilidade observada para o LaSOM 60 foi menor que a observada para o LaSOM 65. A comparação da constante de velocidade de eliminação, meia-vida, área sob a curva, tempo de residência médio, *clearance* total ( $CL_{tot}/F$ ) e volume de distribuição ( $Vd/F$ ) determinado para o LaSOM 65 no presente trabalho e no estudo prévio, este empregando farmacocinética convencional (TORRES *et al.*, 2014), mostra grande semelhança entre os valores, indicando que a abordagem *rapid PK* foi adequada para caracterizar os perfis plasmáticos após administração oral. Desse modo, pode-se inferir que os parâmetros obtidos são confiáveis para essa via de administração e também para as outras duas DHPMs. Pode-se observar na Tabela 6 que a biodisponibilidade não foi determinada e, desse modo,  $CL_{tot}$  e  $Vd$  são relativos à biodisponibilidade, que depende dos dados de via i.v. para ser determinada, o que não se mostrou possível no presente estudo.

#### 3.4. Distribuição Cerebral

Os resultados da distribuição cerebral das DHPMs estão apresentados na Tabela 7. Como estas NEQ estão sendo investigadas para tratamento de glioma e, considerando que LaSOM 65 apresentou a melhor atividade *in vitro* contra linhagens celulares de glioma (CANTO *et al.*, 2011), mas baixa penetração cerebral (TORRES *et al.*, 2014), resolveu-se investigar a penetração no cérebro com apenas um tempo de coleta após a administração i.v. Desse modo, a penetração cerebral foi determinada pela relação entre a concentração tecidual/concentração plasmática nesse tempo de coleta. Todas as DHPMs apresentaram concentrações cerebrais após 1 h da administração, sendo que o LaSOM 70 obteve a maior relação concentração tecido/plasma ( $0,37 \pm 0,06$ ). A menor penetração foi observada para LaSOM 65 ( $0,14 \pm 0,04$ ). Torres e colaboradores (2014) utilizaram a relação  $ASC_{0-t}$  tecido/ $ASC_{0-t}$  plasma até 2 h após a dose para determinar o fator de penetração no cérebro (ft) do LaSOM 65, sendo encontrado o valor de 0,35. Apesar de o presente trabalho ter avaliado a penetração cerebral pela relação de concentração cérebro/plasma em apenas um tempo de coleta e o trabalho previamente

realizado ter avaliado a relação de ASC, em ambos os estudos de distribuição tecidual o LaSOM 65 apresentou penetração cerebral baixa (14% a 35%), indicando que para utilização dessa DHPM, no tratamento de glioma, seria necessário o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica que aumentasse a penetração cerebral do composto.

Todas as DHPMs investigadas apresentaram penetração cerebral baixa, na faixa de 14% (LaSOM 65) a 37% (LaSOM 70). Como os valores de coeficiente de partição (logP) determinados experimentalmente por CLAE-UV (Capítulo 1) foram muito semelhantes entre si para essas DHPMs: 2,00 (LaSOM 60), 1,86 (LaSOM 70) e 2,06 (LaSOM 65), não foi possível correlacionar a lipofilia com a maior ou menor penetração cerebral desses compostos.

**Tabela 7.** Penetração cerebral das DHPMs 1 h após administração i.v. de 1 mg/kg\*.

DHPMs	LaSOM 60	LaSOM 70	LaSOM 65
$C_t$ (ng/g)	23,45 ± 4,59	68,08 ± 21,45	25,09 ± 6,25
$C_t/C_p$	0,29 ± 0,03	0,37 ± 0,06	0,14 ± 0,04

Média ± desvio padrão; n = 3/grupo;  $C_t$  = concentração tecidual;  $C_p$  = concentração plasmática.

Todas as DHPMs apresentaram uma meia-vida curta, em média de 2 h, um *clearance* muito elevado e Vd moderado (LaSOM 65) e alto (LaSOM 60 e LaSOM 70), de acordo com a classificação de Caldwell e colaboradores (2004). O LaSOM 70 apresentou uma maior penetração cerebral (0,37 ± 0,06), comparado com as outras DHPMs. Os resultados do *rapid* PK e da farmacocinética convencional do LaSOM 65 foram semelhantes na administração oral, indicando que esta estratégia de *screening* pode ser aplicada para investigar outras DHPMs. Os resultados de penetração cerebral sugerem que nenhuma das DHPMs investigadas apresenta características de distribuição tecidual adequadas para seguir na investigação visando o tratamento do glioma.

#### 4. Conclusões

Um método bioanalítico que quantifica simultaneamente os LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65 foi desenvolvido e validado por CLAE-EM/EM. Este método foi utilizado em estudos de investigação pré-clínica da farmacocinética e distribuição cerebral dessas DHPMs empregando-se a estratégia de *rapid PK* e *cassete analysis*, o que possibilitou a avaliação simultânea de três compostos utilizando um pequeno número de animais e uma menor quantidade de amostras quando comparado com os estudos de farmacocinética convencional.

A abordagem *rapid PK* demonstrou ser uma estratégia adequada na determinação dos parâmetros farmacocinéticos destas DHPMs após administração oral, podendo ser aplicada em estudos posteriores de avaliação pré-clínica. Após administração intravenosa, um método analítico mais sensível seria necessário para permitir a melhor caracterização dos perfis plasmáticos e permitir a determinação dos parâmetros farmacocinéticos com mais exatidão. A comparação dos parâmetros farmacocinéticos das três DHPMs investigadas, aliada aos resultados de atividade contra linhagens de glioma *in vitro*, indicam que nenhuma das DHPMs apresenta atividade antitumoral e penetração cerebral importante que justifique a continuidade da investigação como agente para o tratamento do glioma.

#### Agradecimentos

Agradecemos ao INCT-if e PNPd/CAPES, pelo auxílio financeiro e ao CNPq e CAPES pelas bolsa mestrado e pós-doutorado.

#### 5. Referências

MAYER, T.U. *et al.* Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science*. 286: 971-974, 1999.

YAN, Y. *et al.* Inhibition of a Mitotic Motor Protein: Where, How, and Conformational Consequences. *Journal of Molecular Biology*. 335: 547-554, 2004.

NIX, D.E. *et al.* Antibiotic Tissue Penetration and its Relevance: Models of Tissue Penetration and Their Meaning. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35 (10): 1947-1952, 1991.

CANTO, R. F. S. *et al.* Synthesis of Dihydropyrimidin-2-one/thione Library and Cytotoxic Activity Against the Human U138-MG and Rat C6 Glioma Cell Lines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 22 (7):1379-1388, 2011.

HAN, H. *et al.* An Efficient Approach for the Rapid Assessment of Oral rat Exposures for New Chemical Entities in Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95 (8): 1684-1692, 2006.

LI, C. *et al.* A Modern *in vivo* Pharmacokinetic Paradigm: Combining Snapshot, Rapid and Full PK Approaches to optimize and Expedite Early Drug Discovery. *Drug Discovery Today*. 18 (1/2): 71- 78, 2013.

LIU, B. *et al.* Snapshot PK: A Rapid Rodent *in vivo* Preclinical Screening Approach. *Drug Discovery Today*. 13 (7/8): 360-367, 2008.

TORRES, B. *et al.* Pre-Clinical Pharmacokinetics and Acute Toxicological Evaluation of a Monastrol Derivative Anticancer Candidate LaSOM 65 in Rats. *Xenobiotica*. 44: 254-263, 2014.

STUEPP, C.S. Atividade Anti-Tumoral do Composto LaSOM 65, Derivado do Monastrol, em Linhagens de Gliomas. Porto Alegre: UFRGS, 2011. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CALDWELL, G.W. *et al.* Allometric Scaling of Pharmacokinetic Parameters in Drug Discovery: Can Human CL, Vss and t1/2 be Predicted from *in vivo* Rat Data?. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 29 (2): 133-143, 2004.

SHARGEL, L., WU-PONG, S., YU, A.B.C., *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. McGraw-Hill, New York, p. 52–184, 2005.

FDA, Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução 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. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br> desde 2012.



## **DISCUSSÃO GERAL**

---





Na fase de descoberta de novos candidatos a fármacos, a farmacocinética de novas entidades químicas (NEQ) é avaliada visando à caracterização do perfil plasmático de concentração *versus* tempo e a determinação de parâmetros farmacocinéticos que irão auxiliar na compreensão da absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) destes compostos. Estratégias de *screening* farmacocinético têm sido utilizadas nos últimos anos visando acelerar essa etapa, que requer tempo, recursos e grande número de animais e amostras para investigação de apenas uma molécula, podendo essa não seguir adiante nos estudos de desenvolvimento devido a problemas de ADME.

Uma série tio e oxo de 4-iril-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas, sintetizada pelo Laboratório de Química Orgânica Medicinal (LaSOM) da UFRGS, apresentaram atividade citotóxica promissora contra linhagens de glioma humano (U138-MG) e murino (C6), demonstrando uma inibição mais acentuada que o precursor da série, o monastrol (CANTO *et al.*, 2011). A investigação aprofundada da farmacocinética e farmacodinâmica *in vivo* de uma das DHPMs da série - LaSOM 65 - que apresentou a melhor atividade nas culturas celulares, demonstrou que essa DHPM não reduz o tumor em modelo de glioma em ratos (STUEPP, 2011), provavelmente por apresentar uma baixa penetração cerebral (TORRES *et al.*, 2014). Neste trabalho, visando conhecer o comportamento farmacocinético de outras DHPMs da série de modo mais acelerado, resolveu-se empregar a estratégia de *screening* farmacocinético.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou aprofundar o conhecimento destas NEQ, determinando as propriedades físico-químicas de oito DHPMs e realizando um *screening* farmacocinético dos LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65, aplicando a estratégia de *rapid* PK e *cassette analysis*.

O coeficiente de partição (logP) e o coeficiente de ionização (pka) são parâmetros físico-químicas determinantes do comportamento de moléculas em sistemas biológicos, relacionados à permeabilidade, absorção e toxicidade do composto. Estes parâmetros também podem auxiliar no desenvolvimento de métodos analíticos/bioanalíticos, prevendo-se quais solventes, pH ou aditivos ajudarão na solubilidade, no menor tempo de retenção ou na melhor ionização em sistemas cromatográficos.

O logP e o pKa da série de DHPMs foram determinados experimentalmente por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotiodo. Esta técnica tem a vantagem de ser rápida e reprodutível, correlacionando o fator de capacidade da molécula, no sistema cromatográfico, com o logP de substâncias referência ou o pH da fase móvel, dependendo de qual parâmetro físico-químico se deseja determinar.

As DHPMs apresentaram um logP moderado, na faixa de 1,23 a 2,26, sendo o monastrol, a DHPM menos lipofílica e o LaSOM 63, a mais lipofílica. No entanto, alterações realizadas na estrutura química da molécula precursora, o monastrol, para obtenção dos derivados tio e oxo, não causaram efeitos importantes no logP das moléculas, já que todas apresentaram a mesma classificação lipofílica (moderada). A lipofilia moderada é citada na literatura como sendo adequada para se obter uma boa permeabilidade no epitélio intestinal.

A determinação do pKa foi realizada apenas para o LaSOM 63, o qual apresentou uma curva sigmóide característica de relação de dependência da ionização com o pH da fase móvel. O LaSOM 63 apresentou um pKa de 4,0. Para as demais DHPMs não foi possível determinar a influência do pH na ionização, podendo esse resultado ser devido às moléculas já estarem com seus grupamentos ionizados ou à faixa de pH testada (1,5 a 11,5), que não permitiu a determinação do pKa.

Visando quantificar simultaneamente as oito DHPMs investigadas em uma mesma corrida analítica, avaliou-se a possível influência da coeluição dessas moléculas no sinal espectrométrico de massas (supressão iônica ou aumento na ionização) umas das outras. Este ensaio foi realizado em CLAE acoplado em *tandem* a espectrômetro de massas (EM). Primeiramente otimizou-se as condições de ionização de cada DHPM e escolheu-se a transição *m/z* dos íons precursor e produto para melhor monitorar cada molécula separadamente. Num segundo momento, procedeu-se a coeluição dos compostos e determinou-se a presença de supressão iônica ou aumento de ionização para cada uma das DHPMs em presença das demais. Nesse estudo, observou-se que seis DHPMs (LaSOM 60, 70, 65, 115, 63 e monastrol) podem ser quantificadas simultaneamente, nas condições analíticas e espectrométricas aplicadas, sem haver influência no sinal de ionização. Os

LaSOM 67 e LaSOM 62 demonstraram sofrer e causar interferência na ionização, quando combinados com as demais DHPMs. Esses resultados guiaram o estabelecimento de método bioanalítico para a aplicação em estudos de *screening* farmacocinético pré-clínico destas NEQ.

Um método analítico para quantificação de LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65 em amostras biológicas, além do padrão interno nifedipino, foi desenvolvido em CLAE-EM/EM *electrospray* positivo e coluna em fase reversa. O método foi validado apresentando especificidade, seletividade, precisão, exatidão e linearidade na faixa de 10-1000 ng/mL para cada DHPM.

O *screening* farmacocinético pré-clínico dos LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65 foi conduzido em *ratos Wistar* utilizando-se duas vias de administração, i.v. e v.o, nas doses de 1 e 10 mg/kg, respectivamente. As estratégias de *rapid PK* e *cassette analysis* foram associadas visando maior rapidez e menor número de amostras para análise. Foram empregados três animais/composto/via de administração, sete tempos de coleta em cada animal e *pool* de amostra por tempo/animal para compostos diferentes. Assim, utilizou-se 18 animais para avaliação farmacocinética das três DHPMs e 42 amostras de plasma no total foram processadas e analisadas. As DHPMs apresentaram um  $t_{1/2}$  curto, de aproximadamente 2 h, um  $CL_{tot}/F$  muito alto, sendo maior que 1,0 L/h/kg para todos os compostos, e um  $Vd_{ss}/F$  moderado ( $4,8 \pm 3,6$  L/kg - LaSOM 65) a alto ( $8,48 \pm 2,77$  L/kg e  $43,0 \pm 22,0$  L/kg, LaSOM 70 e LaSOM 60, respectivamente). Estes parâmetros farmacocinéticos foram determinados com exatidão somente para a v.o, pois na via i.v. as concentrações plasmáticas ficaram abaixo do limite de quantificação do método analítico após 4 a 8 h da administração das DHPMs, impossibilitando a adequada caracterização dos perfis com apenas três a quatro concentrações plasmática pós-dose.

Os resultados obtidos com a avaliação do *screening* farmacocinético do LaSOM 65, realizado neste trabalho, foram comparados com dados determinados previamente em estudo de farmacocinética convencional deste composto (TORRES *et al.*, 2014). Os parâmetros farmacocinéticos obtidos pela v.o. para o LaSOM 65 utilizando a estratégia de *rapid PK* foram semelhantes aos obtidos em estudo de farmacocinética convencional, assumindo-se os valores relativos à biodisponibilidade para *clearance* e volume de distribuição, uma vez que não foi possível determinar a biodisponibilidade do composto no

presente trabalho. Com base nesses resultados, pode-se inferir que os parâmetros farmacocinéticos obtidos para os LaSOM 60 e LaSOM 70, também são confiáveis. Os valores de área sob a curva extrapolados após dose oral foram inferiores a 20% para todas as DHPMs investigadas.

A investigação da distribuição cerebral das três DHPMs foi conduzido utilizando-se homogeneizado de tecido, uma vez que essas NEQ estão sendo investigadas para o tratamento de glioma. O LaSOM 70 apresentou maior relação de concentração tecido/concentração plasma uma hora após dose i.v., ficando em torno de 40%. O LaSOM 65 apresentou uma penetração cerebral de 14%, sendo a menor dentre as três DHPMs investigadas. Torres e colaboradores (2014) determinaram um fator de penetração cerebral de 35% ( $ASC_{0-2h}$  tecido/ $ASC_{0-2h}$  plasma), sendo este o órgão que apresentou menor penetração dentre todos os investigados naquele estudo (fígado, rins, pulmão, tecido adiposo e coração). Não foi possível estabelecer uma correlação entre lipofilia e penetração cerebral, pois todas as DHMPs apresentaram logP semelhantes. Com base nos estudos de PK pré-clínica e distribuição cerebral, pode-se sugerir que nenhuma das DHPM investigadas tem potencial para seguir na investigação, visando um agente para o tratamento de glioma.

Os resultados obtidos neste projeto demonstraram que o *screening* farmacocinético pré-clínico, utilizando a estratégia de *rapid* PK e *cassette analysis*, pode ser aplicado com segurança na investigação simultânea de série de NEQ, desde que seja desenvolvido um método bioanalítico sensível e seletivo para quantificação destas moléculas. A quantificação simultânea de moléculas por CLAE-EM/EM é, sem dúvida, a etapa mais desafiadora dessa estratégia, uma vez que exige equipamento sensível e habilidade analítica do pesquisador para garantir resultados adequados.

**CONCLUSÕES**

---



Os estudos de *screening* farmacocinético pré-clínico e determinação das propriedades físico-químicas das DHPMs possibilitaram concluir que:

- As DHPMs apresentam um logP moderado, na faixa de 1,23 a 2,26;
- O LaSOM 63 apresenta um pka de 4,0;
- Os LaSOM 70, LaSOM 60, LaSOM 65, LaSOM 115, LaSOM 63 e o monastrol podem ser analisados simultaneamente em uma mesma corrida analítica por CLAE-EM/EM, pois não causam interferência na ionização uns dos outros;
- Os LaSOM 60, LaSOM 70 e LaSOM 65 apresentaram uma meia-vida curta, um *clearance* muito alto e um volume de distribuição moderado (LaSOM 65) a alto, após administração oral da dose de 10 mg/kg a ratos *Wistar*;
- O *screening* farmacocinético, utilizando a estratégia de *rapid* PK, mostrou semelhança, pela via de administração oral, para o LASOM 65, dos parâmetros obtidos pela farmacocinética convencional realizada previamente, indicando que a estratégia se aplica às DHPMs;
- As DHPMs avaliadas não apresentaram uma boa penetração cerebral, demonstrando, que essas NEQ, não apresentam potencial para seguir adiante nas investigações, visando aplicação no tratamento de glioma.





## REFERÊNCIAS

---



- ATWAL, K. S. *et al.* Dihydropyrimidine Calcium Channel Blockers. 3-carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic Acid Esters as Orally Effective Antihypertensive Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 34 (2): 806-811, 1991.
- BARTOLINI, M. *et al.* Determination of the Dissociation Constants (pK) of Basic A Acetylcholinesterase Inhibitors by Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 958: 59–67, 2002.
- BERMAN, J. *et al.* Simultaneous Pharmacokinetic Screening of a Mixture of Compounds in the Dog Using API LC/MS/MS Analysis for Increased Throughput. *Journal of Medicinal Chemistry*. 40 (6): 827-829, 1997.
- BIGINELLI, P. Aldehyde-Urea Derivatives of Aceto- and Oxaloacetic Acids. *Gazzetta Chimica Italiana*. 23: 360-416, 1893.
- BUETERS, T. *et al.* High-Throughput Analysis of Standardized Pharmacokinetic Studies in the Rat Using Sample Pooling and UPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55: 1120-1126, 2011.
- CANTO, R.F.S. Síntese de diidropirimidinonas análogas ao Monastrol e avaliação pré-clínica do LaSOM 65. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Farmácia/UFRGS. Porto Alegre, 2009.
- CANTO, R. F. S. *et al.* Synthesis of Dihydropyrimidin-2-one/thione Library and Cytotoxic Activity Against the Human U138-MG and Rat C6 Glioma Cell Lines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 22 (7):1379-1388, 2011.
- CHEN, X.; DU, G. Target Validation: A Door to Drug Discovery. *Drug Discoveries and Therapeutics*. 1(1): 23-29, 2007.
- DOAN, T. N. *et al.* High-Throughput Target Validation in Model Organism. *Drug Discovery Today: Targets*. 3 (5): 191-197, 2004.
- EDDERSHAW, P. J. *et al.* ADME/PK as Part of a Rational Approach to Drug Discovery. *Drug Discovery Today*. 5 (9): 409-414, 2000.
- ESPADA, A. *et al.* Application of LC-MS and Related Techniques to High-Throughput Drug Discovery. *Drug Discovery Today*. 13 (9/10): 417-423, 2008.
- GONZALEZ, G. *et al.* Evaluation of Ionization Constants of Drugs in Aqueous Organic Mixtures from Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography. *International Journal of Pharmaceutics*, 84: RI-R4, 1992.
- GOODNOW JR, R. A. Hit and Lead Identification: Integrated Technology-Based Approaches. *Drug Discovery Today: Technologies In Silico Techniques*. 3 (4): 367-375, 2006.

HAN, H. *et al.* An Efficient Approach for the Rapid Assessment of Oral rat Exposures for New Chemical Entities in Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95 (8): 1684-1692, 2006.

HUGHES, J. P. *et al.* Principles of Early Drug Discovery. *British Journal of Pharmacology*. 162: 1239-1249, 2011.

HURKO, O. Future Drug Discovery and Development. *Molecular Genetics and Metabolism*. 100: S92-S96, 2010.

JANG, G. R. *et al.* Pharmacokinetics and Its Role in Small Molecule Drug Discovery Research. *Medicinal Research Reviews*. 21 (5): 382-396, 2001.

JANOS, P. Determination of Equilibrium Constants from Chromatographic and Electrophoretic Measurements. *Journal of Chromatography A*. 1037: 15–28, 2004.

KAPPE, C. O. 100 Years of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. *Tetrahedron*. 49 (32): 6937-6963, 1993.

KERNS, E.; DI, L. Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 8 (7): 316-322, 2003.

KERNS, E.H. *et al.* Pharmaceutical Profiling Method for Lipophilicity and Integrity Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 791: 381–388, 2003.

KERNS, E. H.; DI, L. Physicochemical Profiling: Overview of the Screens. *Drug Discovery Today:Technologies*. 1 (4): 343-348, 2004.

KERNS, H.; DI, L. Drug Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization. Elsevier, 2008.

KESERU, G.; MAKARA, G.M. Hit Discovery and hit-to-lead Approaches. *Drug Discovery Today*. 11 (15/16): 741-748, 2006.

KISHI, H.; HASHIMOTO, Y. Evaluation of the Procedures for the Measurement of Water Solubility and N-Octanol/Water Partition Coefficient of Chemicals Results of a Ring Test in Japan. *Chemosphere*. 18 (9/10): 1749-1759, 1989.

KORFMACHER, W. A. *et al.* Cassette-accelerated Rapid Rat Screen: A Systematic Procedure for the Dosing and Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization tandem Mass Spectrometric Analysis of New Chemical Entities as Part of New Drug Discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 15: 335-340, 2001.

KORFMACHER, W. A. Foundation Review: Principles and Applications of LC-MS in New Drug Discovery. *Drug Discovery Today*. 10 (20): 1357-1367, 2005.

KROP, H. B. *et al.* N-Octanol-Water Partition Coefficients, Aqueous Solubilities and Henry's Law Constants of Fatty Acid Esters. *Chemosphere*. 34 (1): 107-119, 1997.

KUO, B. *et al.* Sample Pooling to Expedite Bioanalysis and Pharmacokinetic Research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.16: 837-846, 1998.

LAGERWERF, F. M. *et al.* Exploring the Boundaries of Bioanalytical Quantitative LC-MS/MS. *Trends in Analytical Chemistry*. 19 (7):418-427, 2000.

LEIZERMAN, I. *et al.* Differential effects of monastrol in two human cell lines. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61 (16): 2060-2070, 2004.

LI, C. *et al.* A Modern *in vivo* Pharmacokinetic Paradigm: Combining Snapshot, Rapid and Full PK Approaches to optimize and Expedite Early Drug Discovery. *Drug Discovery Today*. 18 (1/2): 71- 78, 2013.

LIPINSKI, C. Drug-Like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 44: 235-249, 2000.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 23 (1/3): 3-25, 1997.

LIU, B. *et al.* Snapshot PK: A Rapid Rodent *in vivo* Preclinical Screening Approach. *Drug Discovery Today*. 13 (7/8): 360-367, 2008.

LU, D. *et al.* Lipophilicity Screening of Novel Drug-Like Compounds and Comparison to Clog P. *Journal of Chromatography A*. 1258: 161– 167, 2012.

MACAROV, C. A. *et al.* Multi-residue Determination of the Penicillins Regulated by the European Union, in Bovine, Porcine and Chicken Muscle, by LC-MS/MS. *Food Chemistry*. 135: 2612-2621, 2012.

MANITPISITKUL, P.; WHITE, R. E. Whatever Happened to Cassette Dosing Pharmacokinetics?. *Drug Discovery Today*. 9 (15): 652-658, 2004.

MANNHOLD, R. *et al.* Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of Log P Methods on More Than 96,000 Compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98 (3): 861-893, 2009.

MAYER, T.U. *et al.* Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science*. 286: 971-974, 1999.

MEI, H. *et al.* Rapid *in vivo* Oral Screening in Rats: Reliability, Acceptance Criteria, and Filtering Efficiency. *The AAPS Journal*. 8 (3): E493-E500, 2006.

NAGILLA, R. *et al.* Cassette Dosing for Pharmacokinetics Screening in Drug Discovery: Comparison of Clearance, Volume of Distribution, Half-life, Mean Residence Time, and Oral Bioavailability Obtained by Cassette and Discrete Dosing in Rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 100 (9): 3862-3874, 2011.

NETTEKOVENA, M. *et al.* Highly Potent and Seletive Cannabinoid Receptor 2 Agonists: Initial hit Optimization of an Adamantyl hit Series Identified from High Throughput Screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 23: 1177-1181, 2013.

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method (2004).

OLAH, T. V. *et al.* The Simultaneous Determination of Mixtures of Drug Candidates by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry as an *in vivo* Drug Screening Procedure. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 11: 17-23, 1997.

PALLICER, J. M. *et al.* Extension of the Liquid Chromatography/Quantitative Structure–Property Relationship Method to Assess the Lipophilicity of Neutral, Acidic, Basic and Amphotheric Drugs. *Journal of Chromatography A*. 1240: 113–122, 2012.

PETERS, T. *et al.* Interaction of the Mitotic Kinesin Eg5 Inhibitor Monastrol with P-glycoprotein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 372: 291-299, 2006.

PETIT, J. *et al.* Softening the Rule of Five — Where to Draw the Line? *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20: 5343–5351, 2012.

RAVULA, S. B. *et al.* Lead Optmization of 2-(piperidin-3yl)-1H-benzimidazoles: Identification of 2-morpholin- and 2-thiomorpholin-2-yl-1H-benzimidazoles as Selective and CSN Penetrating H1-antihistamines for Insomnia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22: 421-426, 2012.

RUSSOWSKY, D. *et al.* Synthesis and Differential Antiproliferative Activity of Biginelli Compounds Against Cancer Cell Lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorganic Chemistry*. 34: 173-182, 2006.

SANZ-NEBOT, V. *et al.* Prediction of Retention Behaviour and Evaluation of pK Values of A Peptides and Quinolones in Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 933: 45–56, 2001.

SHAFFER, J. E. *et al.* Use of “N-in-One” Dosing to Create an In Vivo Pharmacokinetics Database for Use in Developing Structure-Pharmacokinetic Relationship. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 88 (3): 1999.

STUEPP, C.S. Atividade Anti-Tumoral do Composto LaSOM 65, Derivado do Monastrol, em Linhagens de Gliomas. Porto Alegre: UFRGS, 2011. Dissertação

(Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

TITOV, D. V.; LIU, J.O. Identification and Validation of Protein Targets of Bioactive Small Molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20: 1902-1909, 2102.

TONG, X. *et al.* Characterization of a Technique for Rapid Pharmacokinetic Studies of Multiple Co-eluting Compounds by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20: 773-784, 1999.

TORRES, B. *et al.* Pre-Clinical Pharmacokinetics and Acute Toxicological Evaluation of a Monastrol Derivative Anticancer Candidate LaSOM 65 in Rats. *Xenobiotica*. 44: 254-263, 2014.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica: As Bases Quantitativas da Terapia Farmacológica. Tradução Eduardo Célia Palma, Helen Pedroni, Teresa Dalla Costa – Porto Alegre: Artmed, 2009.

WANG, G. *et al.* DNA Binding Properties and Biological Evaluation of Dihydropyrimidinones Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 114: 214-219, 2013.

WATERBEEMD, H. *et al.* Property-Based Design: Optimization of Drug Absorption and Pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry*. 44 (9): 1313-1333, 2001.

WATERBEEND, H.; GIFFORD, E. ADMET *In Silico* Modelling: Towards Prediction Paradise?. *Nature Reviews/Drug Discovery*. 2:192-203, 2003.

WHITE, R. E.; MANITPISITKUL, P. Pharmacokinetic Theory of Cassette Dosing in Drug Discovery Screening. *Drug Metabolism and Disposition*. 29 (7): 957-966, 2001.

WU, G.; DOBERSTEIN, S. K. HTS Technologies in Biopharmaceutical Discovery. *Drug Discovery Today*. 11 (15/16): 718-724, 2006.

YAN, Y. *et al.* Inhibition of a Mitotic Motor Protein: Where, How, and Conformational Consequences. *Journal of Molecular Biology*. 335: 547-554, 2004.

ZHANG, L. *et al.* Case Study: Technology Initiative Led to Advanced Lead Optimization Screening Processes at Bristol-Myers Squibb, 2004-2009. *Drug Discovery Today*. 17 (13/14): 733-740, 2012.

ZHANG, N. *et al.* Integrated Sample Collection and Handling for Drug Discovery Bioanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 23: 551-560, 2000.





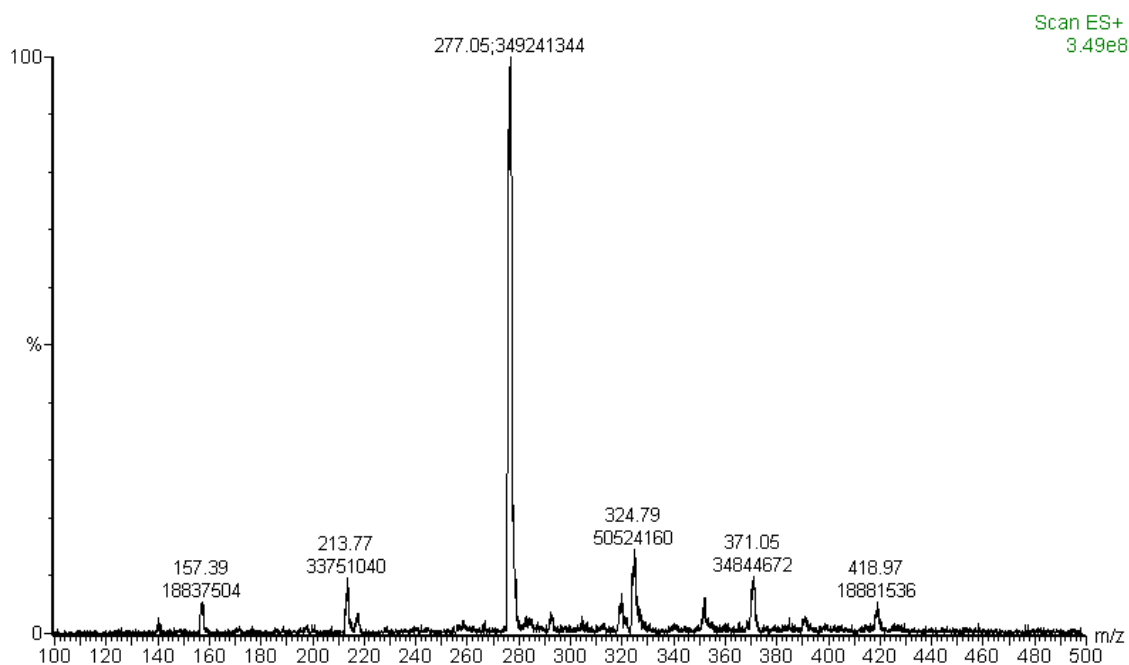
**ANEXOS**

---

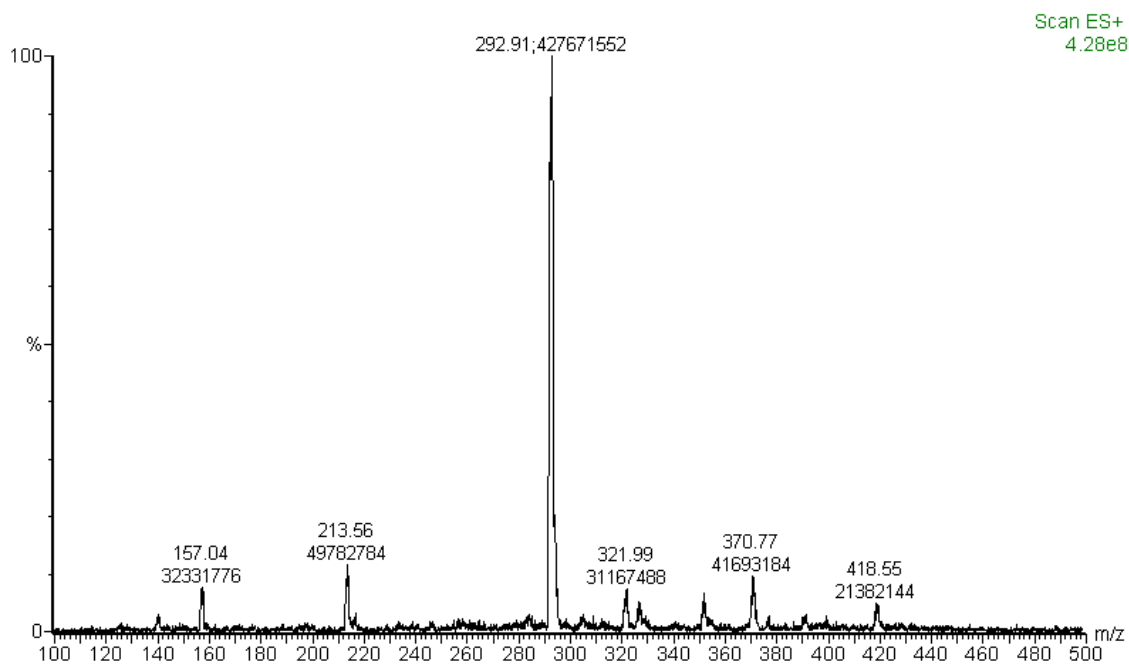


## ANEXO 1

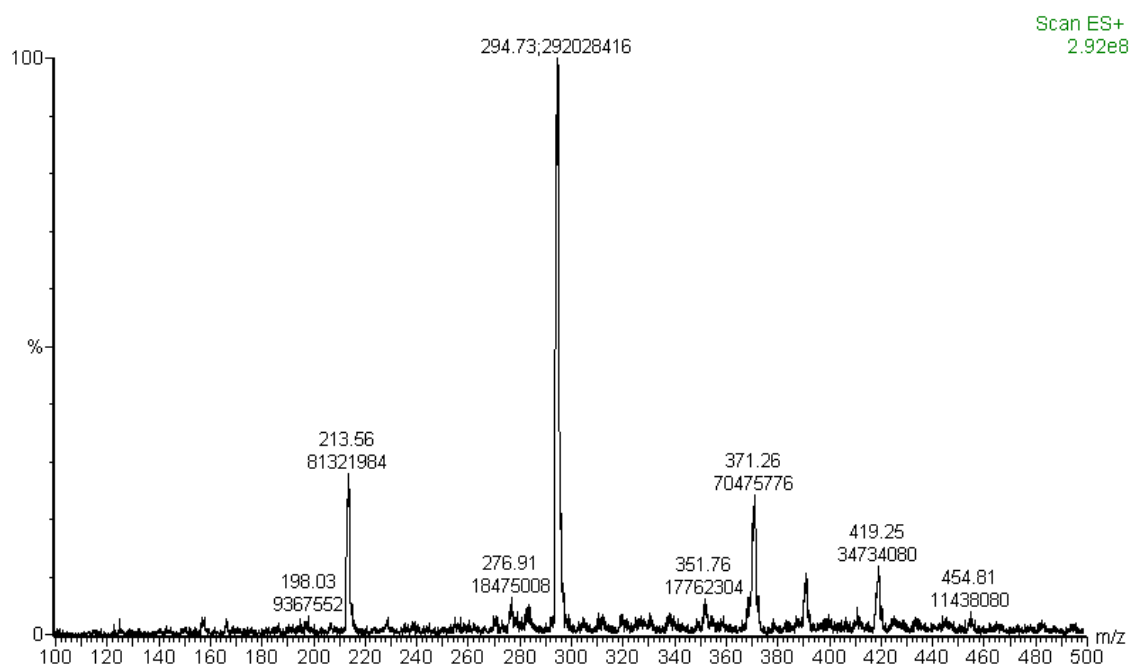
Espectro do LaSOM 60 ( $m/z$  277,05) no modo ESI+ após infusão direta em EM.



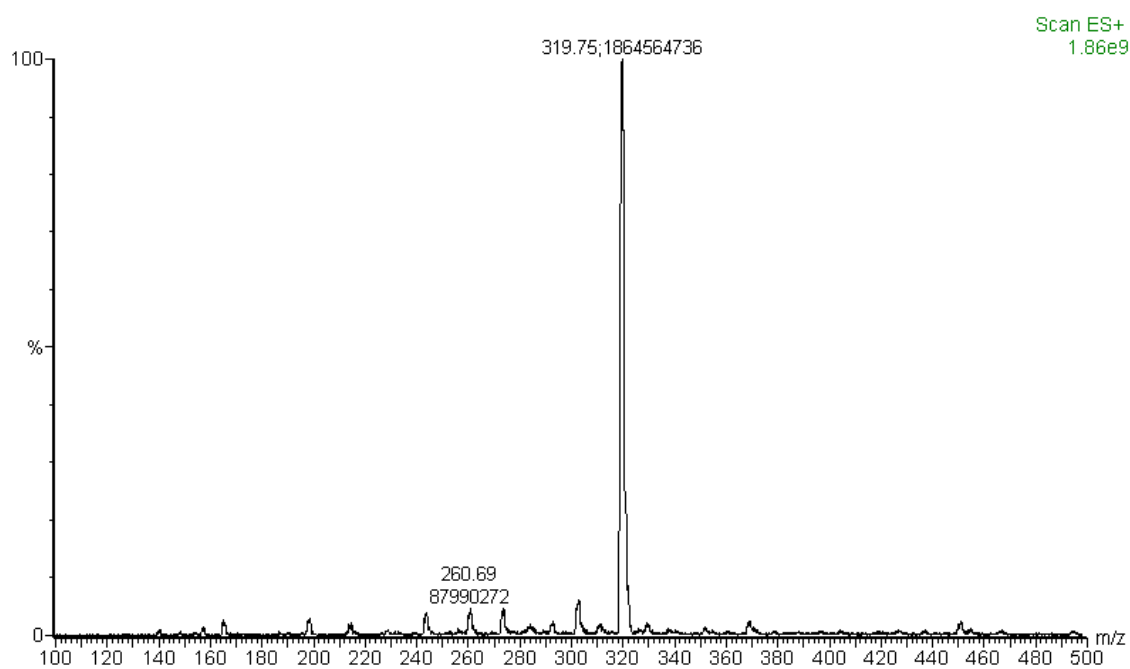
Espectro do monastrol ( $m/z$  292,91) no modo ESI+ após infusão direta em EM.



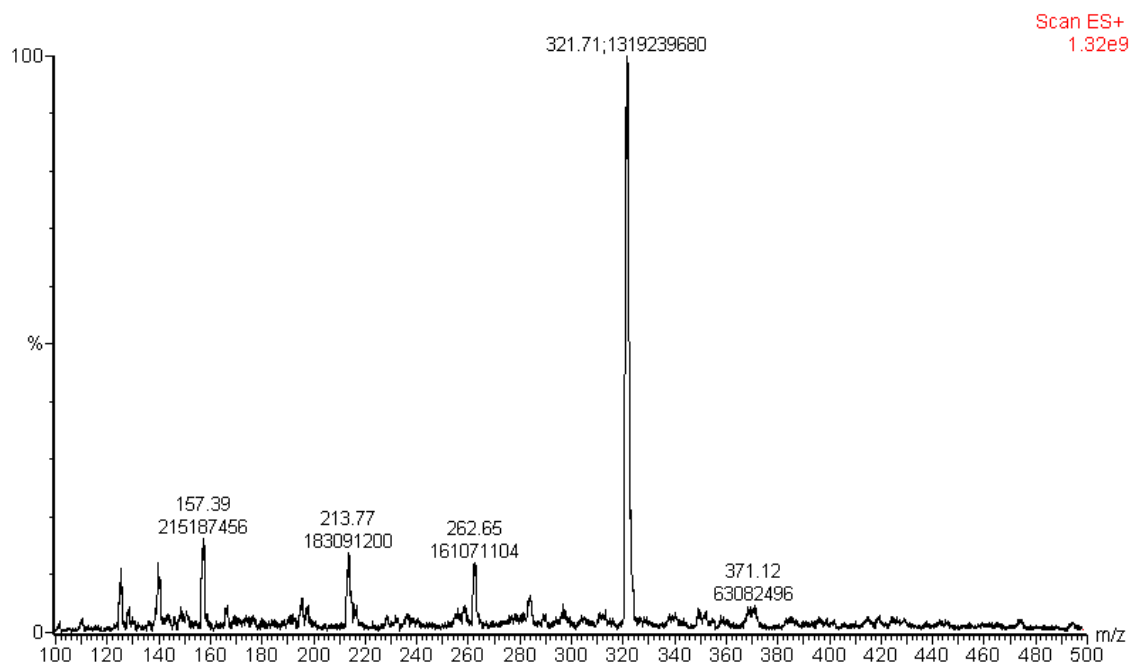
Espectro do LaSOM 62 ( $m/z$  294,73) no modo ESI+ após infusão direta em EM.



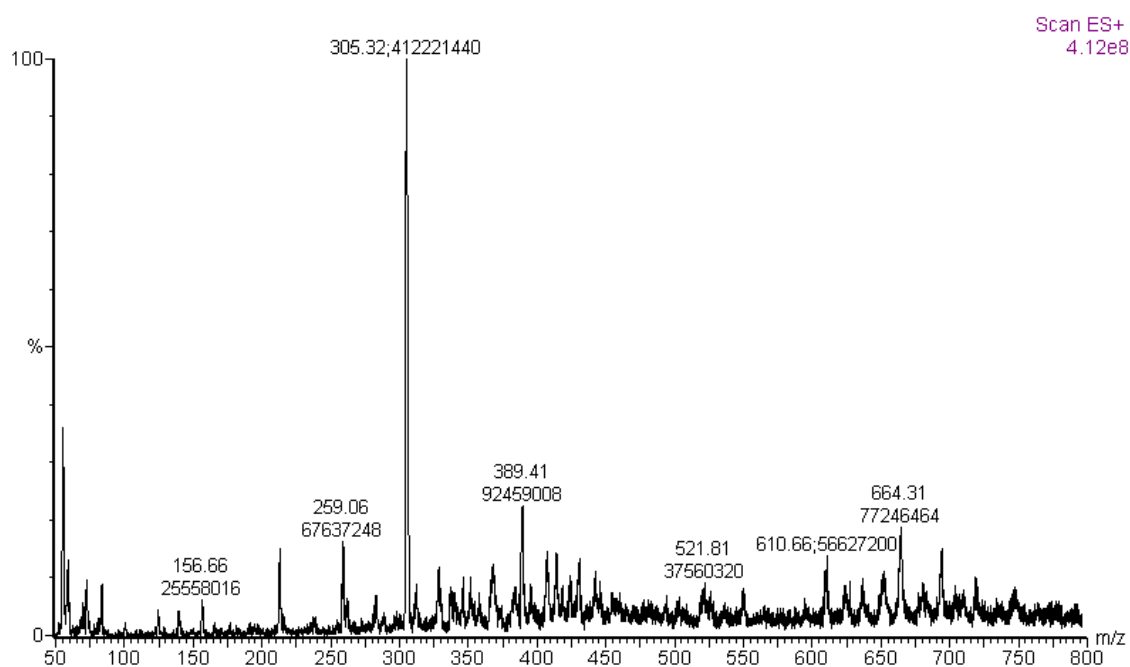
Espectro do LaSOM 63 ( $m/z$  319,75) no modo ESI+ após infusão direta em EM.



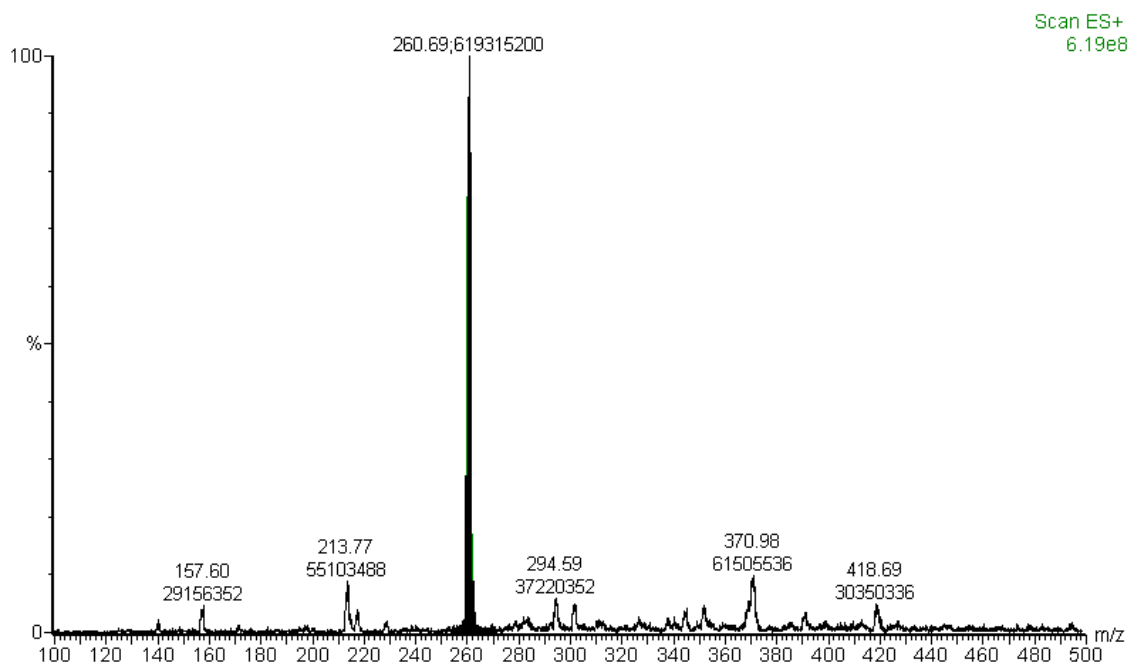
Espectro do LaSOM 65 ( $m/z$  321,71) no modo ESI+ após infusão direta em EM.



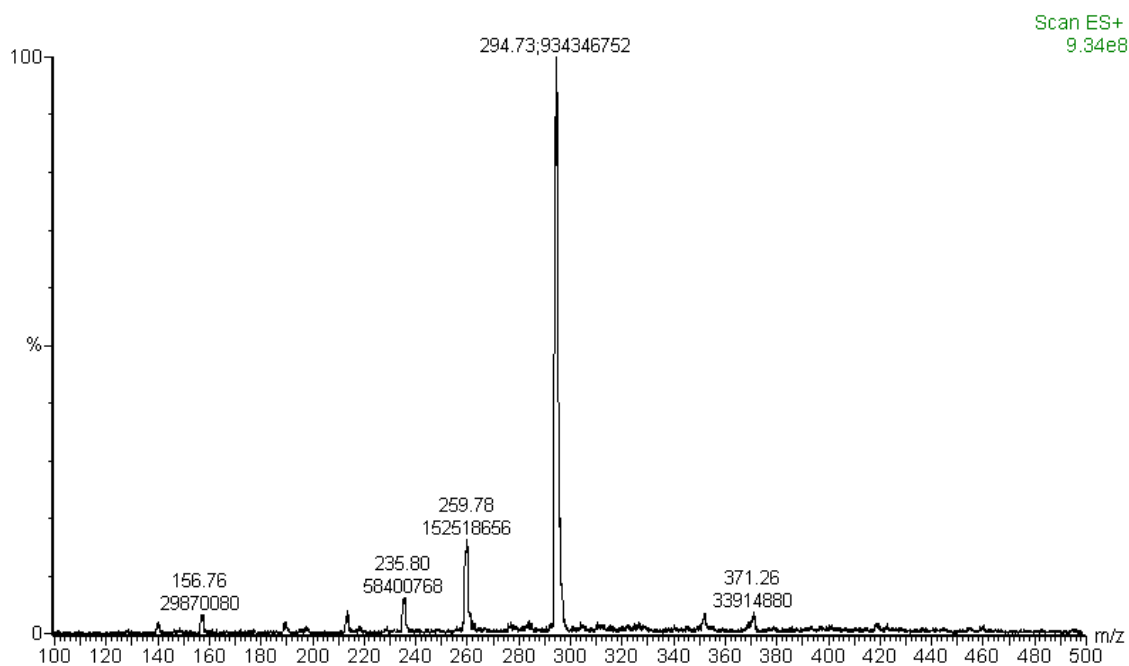
Espectro do LaSOM 67 ( $m/z$  305,32) no modo ESI+ após infusão direta em EM.



Espectro do LaSOM 70 ( $m/z$  260,69) no modo ESI+ após infusão direta em EM.



Espectro do LaSOM 115 ( $m/z$  294,73) no modo ESI+ após infusão direta em EM.



## ANEXO 2

Protocolo de Aprovação do Estudo pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS).



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



### **CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 24138

Título: Avaliação da relação estrutura/farmacocinética de uma série de 4-aryl-3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA - coordenador desde 01/08/2012

VERA LUCIA EIFLER LIMA - pesquisador desde 01/08/2012

Fernanda Rodrigues Galves - Aluno de Mestrado desde 01/08/2012

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 04/03/2013 - Sala de Reuniões do 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Central., em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 90 a 150 ratos Wistar, machos e adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.*

Porto Alegre, Segunda-Feira, 18 de Março de 2013

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética