


AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ADME/TOX IN SILICO E IN VITRO DE PRODUTOS NATURAIS ATRAVÉS DOS MODELOS PAMPA TGI E PAMPA BHE

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.445172411207>

Data de aceite: 21/11/2024

Dienifer Kaline Heiss

Centro Universitário Univel - Cascavel PR
<https://lattes.cnpq.br/2258491154623389>

Bruno Henrique de Villa Kraus

Centro Universitário Univel - Cascavel PR
<https://lattes.cnpq.br/5684021373493467>

Tiago Tizziani

Centro Universitário Univel - Cascavel PR
Universidade Federal de Santa Catarina –
UFSC - Florianópolis SC
<https://orcid.org/0000-0002-2651-0557>

RESUMO: As membranas lipídicas atuam como barreiras biológicas envolvendo um conjunto diverso de processos físico-químicos e bioquímicos no corpo humano. Na farmacocinética, a permeação transmembrana está diretamente relacionada à absorção do fármaco e sua ação no alvo desejado. O aumento da probabilidade de sucesso na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, a serem administrados por diferentes vias, está intimamente ligado à avaliação de características relacionadas à sua permeabilidade, através de membranas biológicas. Neste contexto, o presente

trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a permeabilidade passiva transmembrana aparente de uma di-hidroestirilpirona (1), uma estirilpirona (2) e uma xantonina (3), obtidas de *Polygala altomontana* e *Polygala densiracemosa*, respectivamente. Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Wohnsland et al. (2001) com adaptações. No modelo mimetizando a permeabilidade intestinal (PAMPA TGI), o lipídio utilizado foi 1% de fosfatidilcolina (p/v) em dodecano; já para mimetizar a barreira hematoencefálica (PAMPA BBB) foi utilizado PBL (Porcine Brain Lipid) a 1% (p/v) em dodecano. A melhor permeabilidade foi observada para a diidroestirilpirona (1) com permeabilidade aparente (Papp) de $1,02 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ e 2,83% de retenção de membrana (RM) no modelo PAMPA TGI e Papp de $4,14 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e RM de 54,88% no modelo PAMPA BBB. Esses resultados demonstram que o composto 1 tem potencial de pesquisa em modelos de atividade no sistema nervoso central, embora a permeação para a BHE seja menor que a barreira intestinal, devido à sua maior seletividade. A estirilpirona 2 apresentou um TGI Papp de $4,93 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e um MR de 9,52%; BHE Papp de $5,06 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e RM de 7,13%; a menor

permeabilidade do composto 2 em relação ao 1 pode estar relacionada ao seu menor Log P observado *in silico*. A xantona (3) apresentou um TGI Papp de $4,26 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ e um RM de 11,86% e um Papp BBB de $5,37 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ e um RM de 16,06%, demonstrando a menor permeação entre os compostos avaliados. O que se justifica devido à sua menor lipofilicidade. **PALAVRAS-CHAVE:** Farmacocinética, ADME/Tox, permeabilidade, PAMPA TGI, PAMPA BHE.

EVALUATION OF ADME/TOX PROPERTIES *IN SILICO* AND *IN VITRO* OF NATURAL PRODUCTS USING THE PAMPA GIT AND PAMPA BBB MODELS

ABSTRACT: Lipid membranes act as biological barriers involving a diverse set of physicochemical and biochemical processes in the human body. In pharmacokinetics, transmembrane permeation is directly related to drug absorption and its action on the desired target. Increasing the probability of success in the research and development of new drugs, to be administered by different routes, is closely linked to the evaluation of characteristics related to their permeability through biological membranes. In this context, the present study aimed to evaluate *in vitro* the apparent passive transmembrane permeability of a dihydrostyrylpyrone (1), a styrylpyrone (2) and a xanthone (3), obtained from *Polygala altomontana* and *Polygala densiracemosa*, respectively. The tests were performed according to the methodology described by Wohnsland et al. (2001) with adaptations. In the model mimicking intestinal permeability (PAMPA TGI), the lipid used was 1% phosphatidylcholine (w/v) in dodecane; to mimic the blood-brain barrier (PAMPA BBB), PBL (Porcine Brain Lipid) at 1% (w/v) in dodecane was used. The best permeability was observed for dihydrostyrylpyrone (1) with apparent permeability (Papp) of $1.02 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ and 2.83% membrane retention (MR) in the PAMPA TGI model and Papp of $4.14 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ and MR of 54.88% in the PAMPA BBB model. These results demonstrate that compound 1 has research potential in models of activity in the central nervous system, although permeation to the BBB is lower than the intestinal barrier, due to its greater selectivity. Styrylpyrone 2 showed a TGI Papp of $4.93 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ and a MR of 9.52%; BBB Papp of $5.06 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ and MR of 7.13%; the lower permeability of compound 2 in relation to 1 may be related to its lower Log P observed *in silico*. Xanthone (3) showed a TGI Papp of $4.26 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ and a MR of 11.86% and a BBB Papp of $5.37 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ and a MR of 16.06%, demonstrating the lowest permeation among the compounds evaluated. This is justified due to its lower lipophilicity.

KEYWORDS: Pharmacokinetics, ADME/Tox, permeability, PAMPA GIT, PAMPA BBB.

INTRODUÇÃO

As membranas lipídicas atuam como barreiras biológicas envolvendo um conjunto diverso de processos físico-químicos e bioquímicos no corpo humano (KERNES, 2008). Na farmacocinética, a permeação transmembrana está diretamente relacionada à absorção do fármaco e sua ação no alvo desejado. O aumento da probabilidade de sucesso na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, a serem administrados por diferentes vias, está intimamente ligado à avaliação de características relacionadas à sua permeabilidade, através de membranas biológicas (SCHNEIDER, 2011).

Estudar as propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo e excreção - ADME) de compostos é parte fundamental na descoberta de novos fármacos (LOMBARDO et al., 2017). No estágio inicial de pesquisa e desenvolvimento destes, o ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) é um dos modelos *in vitro* mais utilizados para prever a absorção passiva transcelular. Através desse modelo, é possível saber se os compostos que apresentaram potencial atividade *in vitro* chegarão ao seu alvo *in vivo*, seja na absorção do trato gastrointestinal (PAMPA TGI) ou no sistema nervoso central (PAMPA BHE) pela permeação da barreira hematoencefálica (PETIT et al., 2016).

Os fármacos podem transpor as barreiras biológicas por diferentes mecanismos. A difusão passiva é o principal mecanismo de transporte transmembranar para a maioria dos fármacos que entram na circulação sistêmica e dependem das propriedades físico-químicas dos mesmos, como a lipofilicidade (OOSTENDORP; BEIJNEN; SCHELLENS, 2009).

A administração de fármacos pela via oral é desejável para a maioria dos medicamentos, devido à conveniência e facilidade de adaptação do paciente. Após o medicamento ser administrado oralmente, ele é dissolvido em fluidos gastrointestinais e absorvido pelo sistema digestivo. A absorção ocorre principalmente no intestino delgado, onde as moléculas permeiam a membrana celular da parede do intestino atingindo a circulação sanguínea (SUN et al., 2017).

O ensaio PAMPA avalia a capacidade de um composto se difundir de um compartimento doador (contendo o composto testado diluído em tampão) para um compartimento receptor (contendo somente o tampão), que são separados por uma membrana artificial lipofílica. Dependendo da composição da membrana artificial usada, diferentes barreiras biológicas podem ser mimetizadas (CHEN et al., 2008).

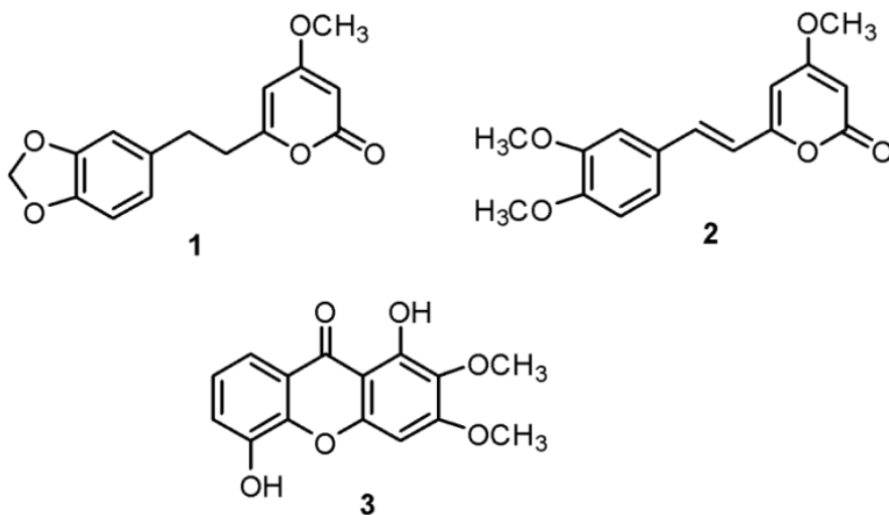


Figura 1 – Compostos selecionados para os ensaios *in silico* e *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela: modelos PAMPA TGI e PAMPA BHE

Os ensaios de permeabilidade foram realizados de acordo com a metodologia descrita por WOHNSLAND e FALLER, 2001 com adaptações.

Neste ensaio utiliza-se dois compartimentos, um doador e outro aceptor, contendo tampão aquoso que mimetiza o pH fisiológico, separados por uma membrana artificial disposta sobre um filtro poroso, formando um sanduíche.

No dia anterior à realização dos ensaios de permeabilidade, foram preparadas as soluções doadoras pela diluição das soluções estoque das amostras em DMSO (1000 ppm) em tampão fosfato 50% (v/v) e agitação durante a noite. Após agitação, as soluções doadoras foram filtradas. Em seguida, os filtros de uma placa sanduíche de 96 poços foram revestidos com uma solução de 10 µL de solução de 1% (m/v) do lipídio fosfatidilcolina em dodecano para mimetizar a absorção gastrointestinal e em PBL (*Porcine Brain Lipid*) para mimetizar a barreira hematoencefálica. Depois, 150 µL das soluções foram adicionadas aos poços doadores e 300 µL da solução aceptora (50% DMSO em tampão fosfato) foram adicionados aos poços da placa aceptora. A placa doadora foi acoplada sobre a placa aceptora e incubada no escuro por um período de 5 horas a temperatura ambiente sob agitação a cada 20 min.

Logo após, em frascos separados foram adicionados 150 µL da solução doadora em 300 µL da solução aceptora rendendo as respectivas soluções de equilíbrio. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Depois da incubação, a placa doadora e a placa aceptora foram separadas, e os poços e as soluções de equilíbrio foram analisados diretamente por HPLC a fim de se determinar as respectivas áreas. A permeabilidade PAMPA foi calculada utilizando a seguinte equação (WOHNSLAND; FALLER, 2001):

$$Paap = \frac{V_D V_A}{(V_D V_A) At} (-\ln(1 - r))$$

Onde: V_D é o volume do poço doador; V_A é o volume do poço aceptor; A é área do filtro; t é o tempo em segundos e r é a razão entre a área dos poços aceptores e área das soluções de equilíbrio obtidas por HPLC.

Lipofilicidade (Log P)

A determinação do log P calculado dos compostos isolados neste trabalho foi realizada através do programa Molinspiration (Cheminformatics). Os compostos que apresentam maior coeficiente de partição, ou seja, têm maior afinidade pela fase orgânica, tendem a apresentar maior taxa de permeabilidade pelas biomembranas hidrofóbicas (BARREIRO; FRAGA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela: modelos PAMPA TGI e PAMPA BHE

No presente trabalho, a permeabilidade foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Wohnsland e Faller (2001), com adaptações. Para mimetizar a absorção gastrointestinal foi utilizado o lipídio fosfatidilcolina e para mimetizar a barreira hematoencefálica foi usado PBL (*Porcine Brain Lipid*) (WOHNSLAND; FALLER, 2001). A melhor permeabilidade foi observada para a di-hidroestirilpirona (1) com Papp de $1,02 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ e 2,83% de retenção de membrana (RM) no modelo PAMPA TGI e Papp de $4,14 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e RM de 54,88% no modelo PAMPA BHE. Estes resultados demonstram que o composto 1 possui potencial de investigação em modelos de atividade no sistema nervoso central. A estirilpirona (2) apresentou Papp TGI de $4,93 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e RM de 9,52%; Papp BHE de $5,06 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e RM de 7,13%; a menor permeabilidade do composto 2 em relação ao 1 pode estar relacionada ao menor Log P do mesmo. A xantona (3) demonstrou a menor permeação entre os compostos avaliados. O que se justifica devido a maior polaridade da mesma.

Composto	Papp TGI (cm s ⁻¹)	RM (%)	Papp BHE (cm s ⁻¹)	RM (%)
1	$1,02 \times 10^{-5}$	2,83	$4,14 \times 10^{-6}$	54,88
2	$4,93 \times 10^{-6}$	9,52	$5,06 \times 10^{-6}$	7,13
3	$4,26 \times 10^{-7}$	11,86	$5,37 \times 10^{-7}$	16,06

Tabela 1 - Permeabilidade aparente dos compostos analisados pelos modelos PAMPA TGI e PAMPA BHE.

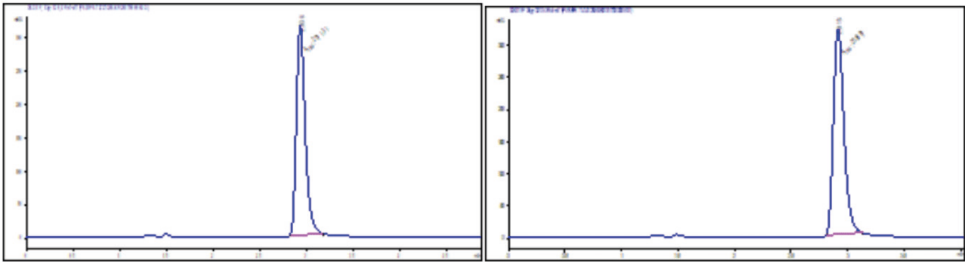


Figura 2 – Cromatograma obtido em HPLC-DAD (λ 320 nm) da solução de equilíbrio do composto (3).

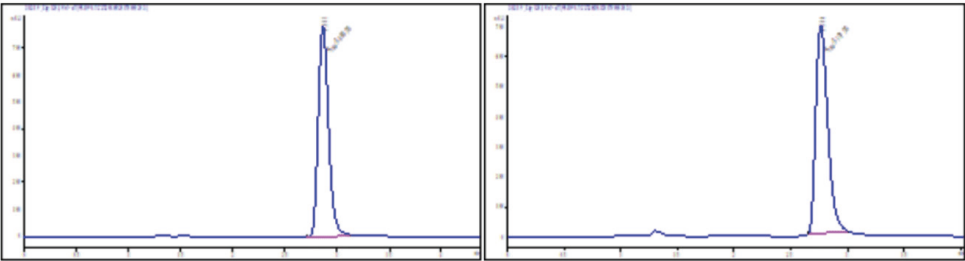


Figura 3 – Cromatograma obtido em HPLC-DAD (λ 320 nm) da solução doadora TGI e BHE do composto (3).

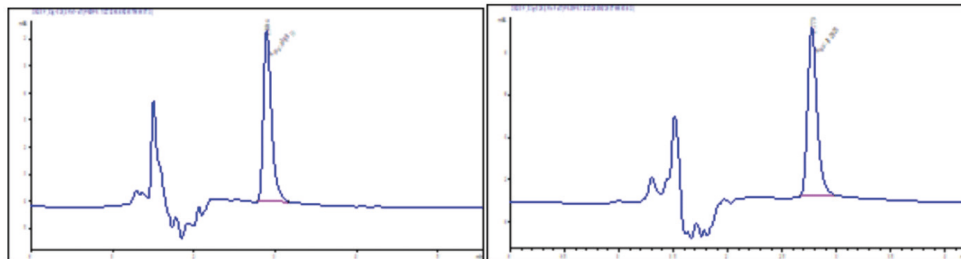


Figura 4 - Cromatograma obtido em HPLC-DAD (λ 320 nm) da solução aceptora TGI e BHE do composto (3).

Lipofilicidade

A lipofilicidade, expressa como o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log P$), constitui uma das propriedades mais importantes na ação de fármacos, influenciando tanto nos processos farmacocinéticos e farmacodinâmicos quanto na toxicidade dos fármacos (TSOPELAS; GIAGINIS; TSANTILI-KAKOULIDOU, 2017).

Embora a lipofilicidade tenha um papel importante na permeabilidade de fármacos e suas interações com receptores, elevados valores de $\log P$ estão associados a fármacos com características indesejadas, como de metabolismo demorado e imprevisível, alta ligação a proteínas plasmáticas ou acúmulo nos tecidos, o que pode acarretar em toxicidade (SMITH; JONES; WALKER, 1996).

A determinação do $\log P$ calculado dos compostos isolados neste trabalho foi realizada através do programa Molinspiration (Cheminformatics). Os compostos que apresentam maior coeficiente de partição, ou seja, têm maior afinidade pela fase orgânica, tendem a apresentar maior taxa de permeabilidade pelas biomembranas hidrofóbicas, apresentando melhor perfil de biodisponibilidade, o que pode resultar no aumento de seus efeitos farmacológicos ou até mesmo toxicidade (BARREIRO; FRAGA, 2014).

Nas últimas décadas, vários estudos demonstraram a importância de se monitorar as propriedades físico-químicas de fármacos, a fim de se obter menores problemas relacionados à má absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos mesmos (WARING et al., 2015). Começando com a regra proposta por Lipinski, chamada de “*Rule of Five*” ou Regra dos Cinco, que é um conjunto de valores, que classifica os compostos, de acordo com a maior ou menor probabilidade de serem absorvidos, após administração oral (LIPINSKI et al., 1997).

A “Regra dos 5” de Lipinski estabelece que a má absorção ou permeação de compostos é mais provável quando:

- O $\log P$ está acima de 5;
- Existem mais de 5 doadores de ligação de H (expressos como a soma de OH e NH);
- Existem mais de 10 aceptores de ligação de H (expressos como a soma de N e O);
- A massa molecular (MM) é superior a 500.

Como pode ser observado na **Tabela 2** a di-hidroestirilpirona **1**, a estililpirona **2** e a xantona **3** apresentaram log P entre a faixa considerada ideal. Além disso, nenhuma violação da Regra de Lipinski foi observada para estes compostos.

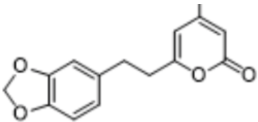
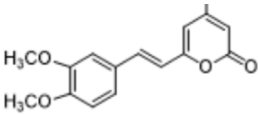
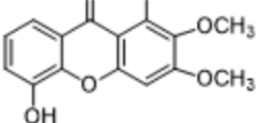
Composto	Estrutura	Log P	OH, NH	O, N	MM	Violações
1			0	5	274,08	0
2		2,96	0	5	288,10	0
3		2,83	2	6	288,06	0

Tabela 2 - Valores de Log P calculados e demais parâmetros que influenciam na absorção e permeação para os compostos selecionados.

CONCLUSÃO

A realização de *screening* de compostos isolados por métodos preditivos ou experimentais de propriedades físico-químicas envolvidas no processo ADME/Tox são muito importantes na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. A di-hidroestirilpirona **1**, a estililpirona **2** e a xantona **3** apresentaram boa permeação pelas membranas biológicas mimetizadas para o trato gastrointestinal e barreira hematoencefálica nos modelos PAMPA TGI e PAMPA BHE. Além disso, nenhuma violação da Regra de Lipinski foi observada para estes compostos.

REFERÊNCIAS

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. [s.l.] Artmed Editora, 2014.

CHEN, X. et al. A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 7, p. 1511–1520, 10 jul. 2008.

KERNS, E.H.; et al. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*. California: Elsevier, 2008.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, jan. 1997.

LOMBARDO, F. et al. In Silico Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics (ADME-PK): Utility and Best Practices. An Industry Perspective from the International Consortium for Innovation through Quality in Pharmaceutical Development. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 9097–9113, 22 nov. 2017.

OOSTENDORP, R. L.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 2, p. 137–147, abr. 2009.

PETIT, C. et al. Prediction of the Passive Intestinal Absorption of Medicinal Plant Extract Constituents with the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA). **Planta Medica**, v. 82, n. 05, p. 424–431, 12 fev. 2016.

SCHNEIDER, N.F.Z. (Dissertation in Pharmacy), Federal University of Santa Catarina, 2011.

SMITH, D. A.; JONES, B. C.; WALKER, D. K. Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics. **Medicinal Research Reviews**, v. 16, n. 3, p. 243–266, maio 1996.

SUN, H. et al. Highly predictive and interpretable models for PAMPA permeability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 1266–1276, fev. 2017.

TSOPELAS, F.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A. **Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery**Expert Opinion on Drug Discovery, 2017.

WARING, M. J. et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 7, p. 475–486, 19 jul. 2015.

WOHNSLAND, F.; FALLER, B. High-Throughput Permeability pH Profile and High-Throughput Alkane/Water log P with Artificial Membranes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 923–930, mar. 2001.