

Análise *in silico* do perfil farmacocinético e toxicológico de fármacos em pesquisa para o tratamento da COVID-19

***In silico* analysis of the pharmacokinetic and toxicological profile of drugs in research for the treatment of COVID-19**

Análisis *in silico* del perfil farmacocinético y toxicológico de fármacos em investigación para el tratamiento de la COVID-19

Recebido: 20/10/2020 | Revisado: 29/10/2020 | Aceito: 30/10/2020 | Publicado: 04/11/2020

Kallyne Zilmar Cunha Bastos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3116-8434>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: kallynezilmar@hotmail.com

Andreza Huete da Silva Cortêz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2847-9351>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: andreza_huet@hotmail.com

Thalya Huet Carneiro Cortêz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7954-1875>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: thalya.huet@hotmail.com

Ingrid Sousa Pinto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7236-4562>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: sousaingrid74@gmail.com

Joubert Aires de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3830-4988>

Centro Universitário Santo Agostinho, Brasil

E-mail: airesjoubert@yahoo.com.br

Resumo

A pesquisa em pauta tem como objetivo o fornecimento de informações sobre os medicamentos em estudo para o tratamento da COVID-19, além de elucidar dados dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos que possam auxiliar na terapia do paciente

acometido com o coronavírus, através de uma análise *in silico*. Para alcançar os objetivos propostos, utilizou-se de ferramentas *in silico*, empregando os softwares ACD/Chem Sketch (versão 14.0) e Marvin Sketch. A análise dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos foi feita através do servidor PreADMET, que realiza a predição dos dados baseando-se na relação estrutura/atividade. Para complementar os dados coletados em ferramentas computacionais realizou-se um levantamento bibliográfico nas principais bases de dados sobre os parâmetros analisados. Conforme as análises dos resultados ADME os medicamentos abiraterona e brequinar são os que apresentam mais parâmetros farmacocinéticos desejáveis. Alguns dos medicamentos observados demonstraram respostas satisfatórias, em especial a cloroquina, que atendeu ao parâmetro de passagem na BHE, uma vez que o coronavírus vem causando manifestações no SNC, porém esta medicação está relacionada com o crescimento de mortes por arritmias. Já os parâmetros toxicológicos apresentam em sua maioria fármacos não mutagênicos e não carcinogênicos e, em relação ao hERG, a maioria classifica-se como médio risco. Os fármacos empregados no tratamento dos pacientes cardiopatas devem ser escolhidos cuidadosamente, pois alguns deles elevam o risco cardíaco. A ivermectina e a nitazoxanida apresentam metabólitos com potencial mutagênico, portanto, devem ser utilizados com cautela.

Palavras-chave: COVID-19; Análise *in silico*; Cloroquina.

Abstract

The objective of the research is to provide information on the drugs under study for the treatment of COVID-19, as well as to elucidate data on pharmacokinetic and toxicological parameters that may impact the therapy of patients affected by coronavirus, by an *in silico* analysis. To achieve the proposed objectives, *in silico* tools were used, using ACD/Chem Sketch (version 14.0) and Marvin Sketch software. The analysis of pharmacokinetic and toxicological parameters was performed through the Preadmet server, which predicts the data based on the structure/activity relationship. To complement the data collected in computational tools, a bibliographic survey was performed in the main databases on the analyzed parameters. According to the analysis of the ADME results, abiraterone and brequinar medications present the most desirable pharmacokinetic parameters. Some of the drugs observed demonstrated satisfactory responses, especially chloroquine, which met the passage parameter in the HBS, since the coronavirus has been causing manifestations in the CNS, however, this medication is related to the growth of arrhythmia deaths. On the other hand, the toxicological parameters present mostly non-mutagenic and non-carcinogenic

drugs and, in relation to hERG, most of them are classified as medium risk. The drugs used to treat cardiopathic patients should be chosen carefully, as some of them increase cardiac risk. Ivermectin and nitazoxanide present metabolites with mutagenic potential, therefore they should be used with caution.

Keywords: COVID-19; Analysis in silico; Chloroquine.

Resumen

La investigación en pauta tiene como objetivo el suministro de información sobre los medicamentos en estudio para el tratamiento de COVID-19, además de elucidar datos de los parámetros farmacocinéticos y toxicológicos que puedan impactar en la terapia del paciente acometido con el coronavirus, mediante un análisis in silico. Para alcanzar los objetivos propuestos, se utilizó de herramientas in silico, empleando los softwares ACD/Chem Sketch (versión 14.0) y Marvin Sketch. El análisis de los parámetros farmacocinéticos y toxicológicos se realizó a través del servidor Preadmet, que realiza la predicción de los datos basándose en la relación estructura/actividad. Para complementar los datos recogidos en herramientas computacionales se realizó un estudio bibliográfico en las principales bases de datos sobre los parámetros analizados. Según los análisis de los resultados ADME los medicamentos abiraterona y brequinar son los que presentan más parámetros farmacocinéticos deseables. Algunos de los medicamentos observados demostraron respuestas satisfactorias, en particular la cloroquina, que atendió al parámetro de paso en la BHE, una vez que el coronavirus viene causando manifestaciones en el SNC pero, esta medicación está relacionada con el crecimiento de muertes por arritmias. Ya los parámetros toxicológicos presentan en su mayoría fármacos no mutagénicos y no carcinogénicos y, en relación al hERG, la mayoría se clasifica como medio riesgo. Los fármacos empleados en el tratamiento de los pacientes cardiopatías deben ser elegidos cuidadosamente, pues algunos de ellos elevan el riesgo cardíaco. La ivermectina y la nitazoxanida presentan metabolitos con potencial mutagénico, por lo que deben utilizarse con precaución.

Palabras clave: COVID-19; Análisis in silico; Cloroquina.

1. Introdução

Em 31 de dezembro de 2019, em Wuhan, uma das cidades mais populosas da China e capital da província de Hubei, foram apresentados os primeiros casos de uma provável pneumonia na população cuja etiologia era desconhecida. A princípio, o causador da doença

foi classificado como um vírus de RNA envelopado e atualmente é designado como SARS-CoV-2 pertencente à classe dos coronavírus. O vírus foi isolado pela primeira vez em 1937, porém, somente em 1965 foi denominado oficialmente por tal nome, pois através da microscopia notou-se que o mesmo apresentava formato de coroa (Guan et al., 2020; Oliveira, 2020).

Alguns componentes desta classe possuem como principal alvo o sistema respiratório humano e já ocasionaram outros surtos anteriormente, os quais representaram uma potencial ameaça a saúde pública, como a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) que ocorreu em 2002, na China e a síndrome respiratória do oriente médio (MERS-CoV), que aconteceu em 2012, na Arábia Saudita. E na atualidade, tem-se o novo SARS-CoV-2, o qual tem ocasionado a COVID-19 (Organização Mundial da Saúde, 2020; Rothan, Byrareddy, 2020).

A medida que a doença foi se alastrando por todo o mundo, em 31 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou que o surto ocasionado pelo coronavírus constituía o mais alto nível de alerta da organização, ou seja, tratava-se de uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) e, em 11 de março, declarou que a COVID-19 qualifica-se como uma pandemia (Oliveira, 2020).

Estima-se que em fevereiro de 2020 já havia em média 81.000 casos confirmados mundialmente e até 18 de outubro do mesmo ano já se passavam de 40 milhões de casos confirmados, com pouco mais de 1,1 milhões de mortes, 27.500.000 de recuperados e 235 países, áreas ou territórios atingidos. Até a mesma data no Brasil já se passavam de 5.200.000 de casos confirmados, 150.000 mortes e mais de 4.600.000 de recuperados (Guan et al, 2020; Organização Mundial de Saúde, 2020; Brasil, 2020).

A transmissão da doença pode acontecer por meio do contato direto com pessoas doentes (abraços, aperto de mão), ou utensílios infectados por gotículas de salivas, espirros e tosse. Considera-se que o período de incubação do vírus corresponda a aproximadamente 5 dias, portanto os sintomas tendem a aparecer neste período de tempo. A duração entre o início dos sintomas e o óbito do paciente dura em média 14 dias, a depender da idade e sistema imunológico do mesmo, bem como histórico de doenças crônicas e outras comorbidades. Os sintomas mais recorrentes em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 são tosse, dispneia, febre, fadiga, perda do paladar e olfato (Rothan & Byrareddy, 2020).

No momento a grande preocupação mundial é que ainda não existem fármacos antivirais exclusivos para um potencial tratamento contra a COVID-19 ou vacina para prevenir a doença e, mediante a realidade, várias empresas aceleraram as pesquisas e desenvolvimento de possíveis medicamentos e vacinas (Oliveira, 2020).

Uma das alternativas viáveis inicialmente para tratamento foi à utilização de antivirais de amplo espectro como os inibidores de protease (lopinavir/ritonavir), inibidores da neuraminidase (oseltamivir), peptídeo, inibidores da RNA polimerase (remdesivir), com a finalidade de atenuar a infecção e a cloroquina (Rothan & Byrareddy, 2020).

Através de pesquisas realizadas pela Fundação Oswaldo Cruz foram feitas três observações, a primeira foi a utilização do atazanavir de forma isolada, medicação utilizada para tratamento do HIV, que por sua vez inibiu a replicação viral e diminuiu a produção de proteínas inflamatórias no pulmão. A segunda observação foi a combinação do atazanavir com o ritonavir, que é um fármaco também utilizado para tratamento contra o HIV e a terceira foi a comparação das duas primeiras alternativas medicamentosas com a cloroquina (Rodrigues et al. 2020).

A cloroquina vinha sendo incluída em inúmeros ensaios e estudos clínicos por todo o mundo, porém, a revista *The Lancet* constatou a partir de uma pesquisa realizada com 96 mil pacientes que tal fármaco e seu análogo (hidroxicloroquina) sozinhos ou combinados com macrolídeos (azitromicina) não apresentaram benefícios comprovados no tratamento da COVID-19 o que fez com que a OMS interrompesse os ensaios clínicos realizados com esta medicação, visto que a mesma pode estar associada ao crescimento no risco de mortes por distúrbios cardíacos, como arritmias (Organização Mundial de Saúde, 2020; Mehra, Dersai, Ruschitzka & Patel, 2020).

A presente pesquisa apresenta como objetivo o fornecimento de informações sobre os medicamentos em estudo utilizados para o tratamento da COVID-19, além de elucidar dados dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos dos fármacos em pesquisa que possam auxiliar na terapia do paciente acometido com o coronavírus, através de uma análise *in silico*.

2. Metodologia

Segundo proposto no objetivo, este estudo trata-se de uma pesquisa de cunho experimental. Para Lakatos e Marconi (2011), a pesquisa experimental compreende uma ação ativa do pesquisador na análise dos efeitos das variáveis sobre o objeto, podendo ser realizada em qualquer local, com respeito à manipulação, ao controle e à distribuição aleatória. Quanto à natureza, a pesquisa classifica-se como quali-quantitativa. Portanto, trata-se de um procedimento metodológico cujas variáveis são controláveis.

Análise *in silico* de dados farmacocinéticos e toxicológicos

O presente trabalho foi realizado com o auxílio de alguns softwares, sendo esses: ACD/Chem Sketch, Marvin Sketch e PreADMET, os quais possuem a finalidade de avaliar as características farmacocinéticas e toxicológicas dos medicamentos em teste para o tratamento da COVID-19.

O ACD/Chem Sketch (versão 14.0) foi utilizado para desenhar a estrutura de cada fármaco utilizado na pesquisa, além de salvar e otimizar (segundo os parâmetros de mecânica clássica) e, em seguida, exportar no formato (.mol). Com o auxílio do Marvin Sketch, confirmou-se a identidade das moléculas, buscando-se em bases dados (PubChem e ChemSpider). Na sequência, realizou-se a predição dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos com o auxílio do servidor PreADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>). O uso desta ferramenta *in silico* baseia-se essencialmente na relação estrutura atividade (REA), reunindo dados presentes em diversos bancos de dados.

Analisou-se então os seguintes fármacos em teste: Atazanavir, Abiraterona, Brequinar, Cloroquina, Favipiravir, Hidroxicloroquina, Ivermectina, Lopinavir, Nafamostat, Nitazoxanida, Remdesivir, Ribavirina e Ritonavir. Os parâmetros farmacocinéticos avaliados foram: BBB (passagem através da barreira hematoencefálica); CaCo2 (capacidade de absorção); HIA (absorção no intestino humano); PPB (ligação às proteínas plasmáticas); SP (permeabilidade na pele) e PGP inhibition (inibição da glicoproteína P). Já os toxicológicos foram: carcino_mouse (carcinogenicidade em camundongos); carcino_rat (carcinogenicidade em ratos); hERG inhibition (inibição do gene hERG) e Teste de Ames (cepas TA 100 (-S9), TA 100 (+S9), TA 1535 (-S9) e TA 1535 (+S9)). Os valores obtidos na predição quantitativa foram exibidos com 3 casas decimais, de acordo com as Regras de Arredondamento na Numeração Decimal (Norma ABNT NBR 5891).

Levantamento Bibliográfico

De forma complementar à análise *in silico*, ocorreu um levantamento bibliográfico sobre os fármacos incluídos neste trabalho. Nesta etapa contou-se com os dados contidos nas principais bases de dados científicos, tais como, SciELO - Scientific Electronic Library Online, LILACS - Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde e PubMed - National Library of Medicine and National Institute of Health.

3. Resultados e Discussão

Os parâmetros avaliados no software PreADMET são classificados em farmacocinéticos e toxicológicos, sendo este último posto em destaque através do teste de Ames. Os resultados foram representados respectivamente pelos Quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1. Dados farmacocinéticos dos fármacos em pesquisa para o tratamento da COVID-19, de acordo com o software PreADMET.

Medicamentos	BBB	CaCo2	HIA	PPB	SP (cm/h)	PGP inhibition
Atazanavir	0,285	21,197	88,538	86,563	-2,208	Sim
Abiraterona	6,750	37,819	97,078	100,00	-2,230	Sim
Brequinar	0,109	26,792	97,503	97,756	-2,526	Sim
Cloroquina	7,733	56,615	98,056	92,534	-2,535	Não
Favipiravir	0,259	17,014	72,755	3,519	-4,431	Não
Hidroxicloroquina	2,288	46,084	94,661	88,996	-3,085	Não
Ivermectina	0,329	50,611	91,300	90,330	-2,252	Sim
Lopinavir	1,104	24,605	93,801	89,712	-2,520	Sim
Nafamostat	0,127	21,016	68,219	51,046	-3,015	Não
Nitazoxanida	0,010	0,4248	67,568	72,273	-3,892	Sim
Remdesivir	0,045	3,2648	53,506	81,269	-2,671	Não
Ribavirina	0,150	1,3644	21,502	7,3294	-5,221	Não
Ritonavir	0,041	35,882	93,192	86,385	-2,617	Sim

Fonte: PreADMET.

Conforme os dados representados no quadro 1, o primeiro parâmetro representado diz respeito ao BBB (*blood-brainbarrier*), o qual se constitui por células endoteliais de ligações intracelulares apertadas e com ausência de fenestrações. O BBB é classificado como a mais significativa barreira para limitar e restringir a passagem de substâncias da corrente sanguínea para o cérebro e isto se dá devido a sua alta impenetrabilidade e seletividade. No que se refere à classificação da passagem de moléculas pela barreira hematoencefálica (BHE), tem-se os seguintes valores: $>2,0$, entre $0,1$ e $2,0$ e $<0,1$, sendo estes respectivamente denominados como: atravessa livremente, atravessa de forma moderada e atravessa de forma reduzida ou não atravessa (Sharma, Lakkadwala, Modgil, & Singh, 2016; Dolabela et al., 2018).

De acordo com resultados demonstrados pôde-se observar que a cloroquina, abiraterona e hidroxcloroquina apresentam respectivamente os valores de BBB de 7,733, 6,750 e 2,288, sendo assim classificadas como substâncias que atravessam livremente a BHE. O lopinavir, ivermectina, atazanavir, favipiravir, ribavirina, nafamostat e brequinar (1,104,

0,329, 0,285, 0,259, 0,150, 0,127 e 0,109), compreendem os medicamentos que apresentam a travessia pela BHE de forma moderada. Enquanto que o remdesivir, ritonavir e a nitazoxanida (0,045, 0,041, 0,010) atravessam de forma reduzida ou não atravessam a barreira.

Segundo estudos realizados o coronavírus pode afetar o Sistema Nervoso Central (SNC), além do Sistema Respiratório, ocasionando o aparecimento de agitação, perda de memória, confusão mental e desorientação, sendo assim, os medicamentos que atravessam a BHE livremente são possivelmente os melhores para minimizar ou debelar tais manifestações, porém, em contra partida, aqueles que são classificados como de passagem de forma reduzida ou nula são considerados mais seguros quando se trata de efeitos no SNC, visto que o ideal seja que o fármaco não atravesse a BHE tão facilmente, uma vez que essa travessia pode ocasionar o aparecimento de efeitos e manifestações no SNC (Felice, et al., 2020; Zhu, et al., 2018).

Ao investigar os parâmetros de absorção foi analisada a permeabilidade cutânea e em células epiteliais Caco2. As células Caco2 são originadas de adenocarcinoma do intestino grosso humano e ao longo dos anos estas células estão sendo extensivamente utilizadas em ensaios para avaliação de absorção e permeabilidade de substâncias com a finalidade de atingir um prognóstico fundamentado quanto à absorção de moléculas por permeabilidade de membranas, podendo mensurar até a capacidade de absorção *in vivo* (Dolabela et al., 2018; Ohta et al., 2020).

Estudos farmacocinéticos preconizam a seguinte classificação quanto à permeabilidade em células Caco2: > 70 nm/sec: alta permeabilidade, 4-70 nm/sec: média permeabilidade, > 4nm/sec: baixa permeabilidade, assim conforme observado tabela 1 os medicamentos cloroquina, ivermectina, hidroxicloroquina, abiraterona, ritonavir, brequinavir, lopinavir, atazanavir, nafamostat e favipiravir apresentam média permeabilidade enquanto que o remdesivir, ribavirina e nitazoxanida apresentam baixa permeabilidade nas células Caco2 (Dolabela et al., 2018).

Ao que diz respeito a permeabilidade, foi analisado o parâmetro de permeabilidade cutânea (*Skin Permeability*). Tal fator é de grande importância na indústria farmacêutica quando se trata de substâncias as quais serão administradas por via transdérmica bem como para verificação do perigo que essas substâncias podem ocasionar ao entrar em contato com a pele. As análises farmacocinéticas categorizam a permeabilidade cutânea em baixa e alta, conforme realizações de estudos, sendo alta para valores <0,1 e baixa para valores >0,1, em consequência desses valores todos os medicamentos analisados apresentaram alta

permeabilidade, uma vez que esses apresentaram resultados $<0,1$ para SP (Alliance, 2016; Dolabela et al., 2018).

A respeito da absorção intestinal humana, esta foi mensurada a partir do parâmetro HIA (*human intestinal absorption*) que é entendida como a somatória do grau de absorção e biodisponibilidade, que por sua vez é observada por meio da excreção nas fezes, bile e urina e enfim emitida em percentagem pela dose de fármaco administrado por via oral que chega a veia porta hepática. Este parâmetro é tido como um dos mais importantes para o perfil de ação dos fármacos que são administrados através da via oral e como delineamento da absorção no trato gastrointestinal (TGI) (Ando, Hisaka, & Suzuki, 2015).

Os ensaios farmacocinéticos demonstram que valores entre 0% e 20% a absorção intestinal é considerada baixa, entre 20% e 70% é moderada e $>70\%$ é elevada, sendo assim mediante os resultados observados no quadro 1 os medicamentos cloroquina, brequinar, abiraterona, hidroxicloroquina, lopinavir, ritonavir, ivermectina, atazanavir e favipiravir apresentam valores superiores a 70%, portanto possuem elevada absorção intestinal, enquanto que o nafamostat, nitazoxanida, remdesivir e ribavirina expressaram valores entre 20% e 70%, tendo a absorção intestinal moderada. Tendo em vista tais resultados, o valor ideal da absorção vai depender da finalidade do medicamento, bem como a sua forma farmacêutica final. O ideal é que os laboratórios formulem os medicamentos para que apresentem absorção de acordo com a necessidade da patologia, afim de que a medicação não se encontre de forma excessiva ou diminuída na corrente sanguínea (Le, 2019; Dolabela et al., 2018).

Ainda conforme os parâmetros analisados no quadro 1, tem-se o PPB (*Plasma Protein Binding* ou ligação às proteínas plasmáticas), que corresponde a um fator de extrema relevância para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos bem como análises farmacocinéticas. Quanto maior o número de moléculas/fármaco se encontrarem ligados às proteínas plasmáticas, maior a capacidade delas de atuarem como forma de reservatório aumentando assim a disponibilidade do fármaco no organismo. (Santos, Daniel, Próspero, & Costa, 2018).

Os fármacos que não se ligam muito as proteínas plasmáticas possuem um maior difusão para os tecidos, possuindo alto nível de ligação ao alvo farmacológico, contudo possuem alta taxa de eliminação, acontecendo o contrário com os fármacos que se ligam muito as proteínas plasmáticas, que possuem uma menor taxa de eliminação, assim a co-administração de dois ou mais fármacos que ambos se ligam altamente as proteínas plasmáticas pode resultar em uma concentração plasmática da forma livre de um ou de ambos mais alta que o esperado, isto se devendo ao fato desses fármacos competirem pelo mesmo

sítio de ligação as proteínas plasmáticas, o que pode gerar efeitos terapêuticos ou tóxicos maiores (Golan, 2017).

Mediante a esta informação e considerando que ligações as proteínas plasmáticas superiores a 75% são elevadas, pode-se observar que os medicamentos abiraterona, brequinar, cloroquina, ivermectina, lopinavir, hidroxycicloroquina, atazanavir, ritonavir, remdesivir e nitazoxanida evidenciaram elevada ligação as proteínas plasmáticas tendo como consequência a redução da fração livre e uma menor distribuição do fármaco para os tecidos, no entanto uma menor taxa de eliminação. Já os fármacos nafamostat, ribavirina e favipiravir apresentaram uma baixa ligação as proteínas plasmáticas, assim possuindo frações livres maiores, contudo com uma menor taxa de eliminação (Moda, 2011; Santos, et al., 2018; Franco et al., 2007).

O último parâmetro avaliado foi PGP inhibition, que corresponde à inibição da glicoproteína P que é encontrada nas células epiteliais. Esta glicoproteína é determinada como um dos locais seletivos para passagem de compostos químicos estranhos ao organismo humano e tem como uma atribuição primordial na excreção, contribuindo para supressão de fármacos, provocando a diminuição da biodisponibilidade de muitos medicamentos (Amin, 2013).

Sendo assim, através dos resultados obtidos o atazanavir, abiraterona, brequinar, ivermectina, lopinavir, nitazoxanida e ritonavir inibem, a glicoproteína P causando o impedimento do efluxo desses fármacos depois que são absorvidos, já e a cloroquina, favipiravir, hidroxycicloroquina, nafamostat, remdesivir e ribavirina por sua vez, não inibem a PGP, podendo ser preciso administrar quantidades mais altas destes medicamentos, uma vez que essa inibição da glicoproteína pode ocasionar uma diminuição da biodisponibilidade desses fármacos Amin, 2013).

Quadro 2. Dados toxicológicos dos fármacos em pesquisa para o tratamento da COVID-19, de acordo com o software PreADMET.

Medicamentos	Carcino_ Mouse	Carcino_ Rat	hERG inhibition
Atazanavir	Não	Não	Ambíguo
Abiraterona	Sim	Não	Médio risco
Brequinar	Não	Não	Médio risco
Cloroquina	Não	Sim	Médio risco
Favipiravir	Não	Sim	Baixo risco
Hidroxicloroquina	Não	Não	Médio risco
Ivermectina	Não	Sim	Ambíguo
Lopinavir	Não	Não	Ambíguo
Nafamostat	Não	Sim	Médio risco
Nitazoxanida	Não	Não	Médio risco
Remdesivir	Sim	Não	Ambíguo
Ribavirina	Não	Sim	Médio risco
Ritonavir	Não	Não	Ambíguo

Fonte: PreADMET.

Em geral, os estudos de carcinogenicidade são realizados em organismos que possuem metabolismo o mais semelhante possível com o do homem, conforme preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). No Quadro 2 pôde-se observar que, entre os fármacos escolhidos para o teste, somente a Abiraterona e o Remdesivir apresentaram resultados positivos para o potencial de carcinogenicidade em camundongos. Já em ratos, esse potencial foi positivo para Cloroquina, Favipiravir, Ivermectina, Nafamostat e Ribavirina.

Por tratar-se de um estudo não clínico, a análise *in silico* não assegura total segurança farmacológica e toxicinética de um fármaco, fazendo-se necessária a utilização de outros estudos da substância teste. Nos dados referentes a predição *in silico* realizada no PreADMET, o que confere maior confiabilidade aos resultados é a utilização de dados do National Toxicology Program (NTP) e do Food and Drug Administration (FDA), através de aplicação de algoritmos. Além disso, a aplicação do servidor possibilita a redução de custos e tempo de análise (Jónsdóttir; Jørgensen, & Brunak, 2005; Benfenati, 2016; Efinger, O'Driscoll, McAllister, & Fotaki, 2018).

Ainda sobre os parâmetros toxicológicos representados no Quadro 2, o servidor PreADMET realiza a predição da inibição do hERG. Este parâmetro viabiliza a avaliação da influência do fármaco em teste na função cardíaca, devido à capacidade do gene hERG de codificar a subunidade α do canal de potássio presente no miócito. A inibição do gene acarreta o bloqueio do canal de potássio controlado por voltagem, que é essencial para o potencial de

ação no coração. Desta forma, ao inibir a codificação do canal, torna a fase de repolarização do potencial de ação mais lenta e reflete no prolongamento do intervalo QT, tendo como consequência possíveis problemas cardíacos como insuficiência e arritmias (Jing, Easter, Peters, Kim, & Enydy, 2015).

Entre os fármacos testados, o Atazanavir, a Ivermectina, o Lopinavir, o Remdesivir e o Ritonavir apresentaram resultado ambíguo na inibição do hERG. A classificação mencionada não é clara quanto ao risco potencial, não podendo sozinha excluir ou confirmar o risco cardíaco, devendo ser complementada com outros testes. Os demais fármacos apresentam médio risco para o parâmetro em questão, com exceção do Favipiravir, que é de baixo risco. Apesar do risco representado na predição, existem fármacos comercializados com resultados semelhantes, no entanto, sem efeitos no miocárdio, havendo assim a necessidade de testes *in vivo* para confirmar o risco (Pimentel, Gomes, Costa, & Alves, 2019).

Quadro3. Resultados do teste de Ames *in silico* dos fármacos em pesquisa para o tratamento da COVID-19, de acordo com o software PreADMET.

Medicamentos	TA 100 (-S9)	TA 100 (+S9)	TA 1535 (-S9)	TA 1535 (+S9)
Atazanavir	-	-	-	-
Abiraterona	-	-	-	-
Brequinar	-	-	-	-
Cloroquina	-	-	-	-
Favipiravir	-	+	+	+
Hidroxicloroquina	-	-	-	-
Ivermectina	-	+	-	+
Lopinavir	-	-	-	-
Nafamostat	-	-	-	-
Nitazoxanida	+	+	+	+
Remdesivir	-	-	-	-
Ribavirina	-	-	+	-
Ritonavir	-	-	-	-

(-): não mutagênica; (+): mutagênica. Fonte: PreADMET.

Os dados representados no Quadro 3 trazem alguns resultados negativos quanto à possibilidade de mutagenicidade dos fármacos, com exceção do Favipiravir, Ivermectina, Nitazoxanida e Ribavirina, que apresentam resultados positivos para, pelo menos, uma das cepas utilizadas na predição.

O Teste de Ames apresenta potencial relevância quando se considera características mutagênicas de uma determinada substância. Este teste é capaz de detectar mutações no material genético envolvido na síntese do aminoácido histidina (Kauffmann et al., 2020). Para

a realização do teste, empregam-se linhagens de *Salmonella typhimurium* para verificar a possibilidade de mutagenicidade e é um teste amplamente aceito (Zeiger, 2019).

O teste de Ames baseia-se na utilização de cepas indicadoras de *S. typhimurium*, sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas cepas reverterem seu caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e passam a formar colônias em um meio desprovido deste aminoácido (Moreira, Santos, Varella, Varanda, & Vilegas, 2002).

Como pode ser visualizado no Quadro 3, as cepas empregadas no teste de Ames realizado no programa PreADMET (TA 100 e TA 1535) estão em concordância com as cepas definidas pela ANVISA no “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” nos estudos de genotoxicidade, conferindo ao teste, maior confiabilidade. No entanto, o guia preconiza o uso de 5 cepas distintas.

Cada cepa testada no teste de Ames sugere uma interpretação. De acordo com Grandis (2016), as cepas TA 100 e TA1535, tem relação direta com mutações no par guanina-citosina. A primeira detecta a presença de agentes mutagênicos capazes de gerar substituição por pares de bases no material genético. Já a segunda representa uma substituição específica no par, a partir de uma reação de metilação.

No teste, as cepas são representadas quanto a presença ou não da fração S9, sendo identificadas, respectivamente, por (+S9) e (-S9). Esta fração simula condições de metabolismo e é composta por frações hepáticas microsomais e citosólicas (Calixto, 2012). Dessa forma, ao realizar o teste na presença da fração S9, há a possibilidade de testar a mutagenicidade dos metabólitos produzidos por cada substância submetida ao teste, por simular uma ativação metabólica pelo fígado de rato.

É possível identificar nos resultados, que o Favipiravir foi positivo para a presença de mutagenicidade na cepa TA 100 na presença da fração S9 e na cepa TA 1535 foi positivo com e sem a fração S9. A Ivermectina (cepas TA 100 e TA 1535), apresenta resultados negativos para a presença de mutagenicidade, no entanto, quando testada na presença da fração S9, passam a ser positivos, o que indica o potencial mutagênico dos metabólitos produzidos. Já a Ribavirina (cepa TA 1535) encontra-se em uma condição inversa à mencionada anteriormente. A Nitazoxanida foi positiva para todas as cepas testadas, inclusive nas cepas com S9 mix. Cabe ressaltar que apesar da sensibilidade do teste de Ames, devem ser realizados testes complementares para o estudo, não podendo, sozinho, excluir ou confirmar genotoxicidade.

4. Considerações Finais

A partir dos parâmetros farmacocinéticos analisados observou-se que a cloroquina atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, dessa forma, há a possibilidade de o fármaco agir contra as manifestações clínicas no SNC causadas pelo SARS-Cov-2, em contra partida, pode ocorrer também mais efeitos colaterais no SNC. Este medicamento por sua vez não apresenta comprovação por meios experimentais *in vivo* e *in vitro* contra o COVID-19, sendo assim o uso desta deve ser avaliado em relação a eficácia na doença e aos possíveis efeitos colaterais desencadeados por ela. Apesar dos avanços, há ainda a necessidade de continuidade de pesquisas sobre o tema abordado, com a finalidade de subsidiar o desenvolvimento de tratamento.

O remdesivir apresentou uma absorção intestinal equilibrada, sendo mais difícil ocorrer o risco de toxicidade ou overdose com esse medicamento. A maioria dos fármacos se ligam muito as proteínas plasmáticas, exceto o favipiravir, e ribavirina. A ribavirina apresentou o maior potencial de permeabilidade cutânea, enquanto que a respeito da glicoproteína P, o atazanavir, abiraterona, brequinar, ivermectina, lopinavir, nitazoxanida e ritonavir inibem essa glicoproteína impedindo o efluxo dos fármacos.

Com base na análise toxicológica, quanto à inibição do gene hERG, a maioria dos fármacos testados são considerados de médio risco, este dado é considerado preocupante, pois está relacionado ao risco cardíaco. O agravante reside no fato da própria doença oferecer risco aumentado aos pacientes cardiopatas e, dessa forma, corrobora a importância da cautela na escolha dos fármacos que serão utilizados. Com relação ao potencial carcinogênico, somente o atazanavir, o brequinar, a hidroxicloroquina, o lopinavir, a nitazoxanida e o ritonavir, foram negativos para as espécies testadas, no entanto, esse potencial deve ser excluído ou confirmado somente com testes complementares.

Quanto ao potencial mutagênico representado pelo teste de Ames, muitos dos fármacos não apresentaram resultados positivos para as cepas testadas, no entanto, não se pode excluir a possibilidade de mutagenicidade dos fármacos quanto às cepas que não foram testadas no PreADMET. O favipiravir, a ivermectina e a nitazoxanida apresentaram resultados positivos na presença da fração S9, no entanto, a nitazoxanida possui predição mutagênica mesmo com a ausência do S9 mix. A ivermectina e a nitazoxanida estão sendo amplamente empregadas em protocolos de tratamento para casos suspeitos e confirmados da COVID-19 e considerando a predição de mutagenicidade, torna-se válido um alerta para o uso destes medicamentos.

Referências

Alliance, D. (2016). Estudo químico, predições in silico das propriedades adme/tox e atividade larvicida do óleo essencial da raiz philodendron deflexum poepp. Ex schott sobre aedes egypti linneu e anopheles albirtasis s.l. Recuperado de <https://www2.unifap.br/ppcs/files/2017/12/estudo-qu%3%8dmico-predi%3%87%3%95es-in-silico-das-propriedades-admetox-e-atividade-larvicida-do-%3%93leo-essencial-da-raiz-philodendron-deflexum-poepp.-ex-schott-sobre-aedes.pdf>

Amin, L. (2013). P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Targets Insights*, 7, 27-34.

Ando, H., Hisaka, A., & Suzuki, H. (2015). A new physiologically based fármacokinetic model for the prediction of gastrointestinal drug absorption: translocation model. *Drug Metabolism and Disposition*, 23(4), 590-602.

Benfenati, E. (Ed.). (2016). *In silico methods for predict in gdrug toxicity*. Humana Press.

Brasil (2020). COVID-19 no Brasil. Recuperado de: https://susanalitico.saude.gov.br/extensions/COVID-19_html/COVID-19_html.html

Brasil. (2013). *Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos* (versão 2). Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Calixto, L. A. (2012). *Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos: aplicações de estudo de metabolismoin vitro*. 148f. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, Brasil.

Dolabela, M. F., Silva, A. R. P. D., Ohashi, L. H., Bastos, M. L. C., Silva, M. C. M. D. & Vale, V. V. (2018). Estudo in silico das atividades de triterpenos e iridoides isolados de Himatanthus articulatus (Vahl) Woodson. *Revista Fitos*, 12(3), 227-242.

Efinger, A., O'Driscoll, C. M., McAllister, M., & Fotaki, N. (2018). Previsão ADME In vitro e In silico. Em A. Talevi, e PA Quiroga (Eds.), *Processos ADME em Ciências Farmacêuticas: Dosagem, Design e Farmacoterapia Sucesso* Springer.

Felice, F. G. De., Moll, F. T., Moll, J., Munoz, D. P. & Ferreira, S T. (2020) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the Central Nervous System. *Trends in Neurosciences*.

Franco, G. C. N., Cogo, K., Montan, M. F., Bergamaschi, C. de C., Groppo, F. C., Volpato, M. C., Andrade, E. D. de & Rosalen, P. L. (2007) Interações medicamentosas: fatores relacionados ao paciente (Parte I). *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac., Camaragibe*.

Golan, D. E., Jr Tashjian, A., Armstrong, E, J & Armstrong, A, W. (2017). *Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Grandis, R. A. (2016). Avaliação da atividade mutagênica de complexos heteroléticos de Rutênio (II) com atividade anti - *Mycobacterium tuberculosis*. 36-37. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Araraquara, São Paulo.

Guan, W., Ni, Yu Hu, Z., Liang, C. W., Ou, J. H., Liu, H. L., Shan, C. L., Hui, D.S.C., Du, B., Li, L., Zeng, G Yuen., K. Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., Li S., Wang, J., Liang, Z., Peng, Y., Wei, L., Liu, Y., Hu, Y., Peng, P., Wang, J., Liu, J., Chen, Z., Li, G., Zheng, Z., Qiu, S., Luo, J., Ye, C., Zhu, S., Zhong N., (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New England Journal of Medicine*, 382, 1708-1720.

Jing, Y., Easter, A., Peters, D., Kim, N., & Enyedy, I. J. (2015). In silico prediction of hERG inhibition. *Future medicinal chemistry*, 7(5), 571-586.

Jónsdóttir, S. Ó., Jørgensen, F. S., & Brunak, S. (2005). Prediction methods and databases with in chemo informatics: emphasis on drugs and drug candidates. *Bioinformatics*, 21(10), 2145-2160.

Kauffmann, K., Gremm, L., Brendt, J., Schiwy, A., Bluhm, K., Hollert, H. & Büchs, J. (2020). Alternative type of Ames test allows for dynamics mutagenicity detection by online monitoring of respiration activity. *Science of The Total Environment*, 137862.

Le, J. Absorção de medicamentos (2019). Recuperado de: <https://www.msmanuals.com/pt/casa/medicamentos/administra%C3%A7%C3%A3o-de-medicamentos-e-farmacocin%C3%A9tica/absor%C3%A7%C3%A3o-de-medicamentos>.

Mehra, R. M., Dersai, S. S., Ruschitzka, F. & Patel, A.N. (2020). Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis. *The Lancet*, (20), 31180-6.

Moda, T. L (2011). Modelagem *in silico* de propriedades farmacocinéticas para avaliação de candidatos a novos fármacos (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Moreira, R. R. D., Santos, L.E., Varella, S.D., Varanda, E. A. & Vilegas, W. (2002). Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus laipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoidicos 7- metoxilados relacionados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12 (1), 11-19.

Pimentel, V. D., Gomes, G. F., Costa, C. L. S. da. & Alves, W. dos S. Avaliação do potencial toxicológico e farmacocinético *in silico* de Anadantoflavona. *Princípios em farmácia*, 3, 20-25.

Ohta, Y., Kazuki, K., Abe, S., Oshimura, M., Kobayashi, K. & Kazuki, Y. (2020). Development of Caco-2 cells expressing four CYPs via a mammalian artificial chromosome. *BMC Biotechnology*, 20 (44), 1-10.

Oliveira, E. H. A. (2020). Coronavírus: Prospecção científica e tecnológica dos fármacos em estudo para tratamento da COVID-19. *Cadernos de Prospecção*, 13, (2), 412-423.

Organização Mundial de Saúde. (2020). Pandemia por doença de coronavírus. Recuperado de: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.

Rodrigues, n. F., sacramento, c q., lima8, c. R., silva, f. S. Da., Ferreira1, a, c., mattos, m., de freitas, c. S. De, soares, v. C., dias, s. Da s. G., temerozo, j. R., miranda, m., matos, a. R., bozza, f. A., carels, n., alves, c. R., siqueira, m. M., bozza,p. T., souza, t. M. L., (2020). Atazanavir inhibits sars-cov-2 replication and pro-inflammatory cytokine production. *Cold spring harbor laboratory*, (1), 020925.

Rothan, H. A., Byrareddy, S. N. (2020). The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *Journal of Autoimmunity*, 109, 102433.

Santos, R. da C., Daniel, I. C., Próspero, D. F. A., & Costa, L. S. (2018). Modificação molecular incremental: análise de parâmetros físicoquímicos, farmacocinéticos e toxicológicos in silico de fármacos inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRSs). *Boletim Informativo Geum*, 9 (2), 31-38.

Sharma, G., Lakkadwala, S., Modgil, A. & Singh, J. (2016). The role of cell-penetrating peptide and transferrin on enhanced delivery of drug to brain. *International Journal of molecular sciences*, 17 (6), 806-821.

World Health Organization. (2020). Q&A: Hydroxychloroquine and COVID-19. Recuperado de: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-hydroxychloroquine-and-COVID-19>.

Zeiger, E. (2019). The test that changed the world: the Ames test and the regulation of chemicals. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 841, 43–48.

Zhu, L., Zhao, J., Zhang, Y., Zhou, W., Yin, L., Wang, Y., Fan, Y., & Liu, H. (2018). ADME properties evaluation in drug discovery: In silico prediction of blood brain partitioning. *Molecular diversity*, 22(4), 979-990.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Kallyne Zilmar Cunha Bastos – 25%

Andreza Huete da Silva Cortêz – 25%

Thalya Huet Carneiro Cortêz – 15%

Ingrid Sousa Pinto – 15%

Joubert Aires de Sousa – 20%