Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microssomas hepáticos

DANIEL BLASCKE CARRÃO

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP
2015

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microssomas hepáticos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química

Orientado: Daniel Blascke Carrão

Orientador: Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO -SP
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

FICHA CATALOGRÁFICA

Carrão, Daniel Blascke

Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microssomas hepáticos. Ribeirão Preto, 2015.

118 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Química.

Orientador: de Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes

1. Artepelin C. 2. Cinética enzimática. 3. Metabolismo in vitro. 4. Microssomas hepáticos. 5. Própolis verde brasileira

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIEL BLASCKE CARRÃO

Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microssomas hepáticos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Química

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho à Valéria, o grande amor da minha vida, e à minha mãe Elisabete pelo amor e incentivo aos estudos

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira**, orientador, amigo e padrinho de casamento. Agradeço pela oportunidade de realizar minha iniciação científica e meu mestrado sob sua orientação, você é um exemplo de profissional a ser seguido. Obrigado pelo apoio em todos os momentos, principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha **Família** pelo amor incondicional. Minha esposa Valéria, meus pais, Elisabete e Salvador, meus irmãos Gabriel e Samuel, meus avôs Maria Rosa e Alcindo, meus tios Elisa Regina e Isonel, meu primo Henrique, meus sogros Elza e Antônio e minhas sobrinhas Lavínia, Sofia, Larissa e Beatriz muito obrigado por todo o apoio.

Aos meus **Grandes Amigos**, Bruno Cervantes, Luís Henrique (Boliche) e Matheus Alonso (Pato) pela amizade incondicional, apoio nos momentos mais difíceis, companheirismo, risadas, churrascos e litros e litros de Coca Cola.

Aos meus **Amigos do Laboratório de Metabolismo In Vitro e Técnicas de Separação (LABMETS)**, Bruno Mineiro, Fernanda, Fernando, Julia, Maísa, Marcela, Mariana, Nayara, Simone e Thiago Cavassani pela amizade, companheirismo, auxílio nos experimentos e discussões produtivas que tivemos.

À **Andresa Aparecida Berretta e Silva** por ter gentilmente cedido o Artepelin C para a realização dos estudos.

Ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes**, pela disponibilidade de utilização dos espectrômetros de massa empregados nesse trabalho e ao seu orientando de doutorado, **Lucas Maciel**, pela disponibilidade e o imenso auxílio na execução dos experimentos de espectrometria de massa e discussão dos resultados obtidos.

Ao **Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti**, pelo auxílio na interpretação dos espectros de massa e disponibilidade para discutir minhas dúvidas.

Ao **Técnico Vinícius Palaretti** pela disponibilidade e auxílio nas execuções das análises de ressonância magnética nuclear.

Aos os meus **Professores** no mestrado, pelos ensinamentos em aula e disponibilidade de discussão de dúvidas.

Aos meus **Amigos da USP** que fiz durante minha graduação e mestrado pela amizade e apoio nos meus estudos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto,** técnicos de laboratório, funcionários, técnicos administrativos, secretários e pessoal da limpeza pelo suporte durante o mestrado.

Às **Agências de Fomento**, Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

CARRÃO, D. B. **Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microssomas hepáticos**. 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O Artepelin C (ART C) é um produto natural presente na própolis verde brasileira que apresenta diversas atividades biológicas. Dentre essas, destacam-se as atividades anticancerígenas, o que o torna um promissor candidato à fármaco para o tratamento de diversos tipos de câncer (pulmão, rins, cólon, testículos, próstata e leucemia). A determinação do metabolismo de um candidato a fármaco é uma das etapas primordiais no desenvolvimento do mesmo. Atualmente, modelos in vitro para a determinação do metabolismo do candidato frente às enzimas da citocromo P450 (CYP450) vem sendo largamente utilizados. Esses modelos apresentam como principais vantagens a simplicidade, o baixo custo e a ausência ou uso reduzido de animais. No presente trabalho, avaliou-se o metabolismo in vitro do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos, com o objetivo de caracterizar os parâmetros cinéticos enzimáticos e identificar os possíveis metabólitos formados durante o metabolismo. Para tanto, foi desenvolvido e validado um método analítico para análise do ART C em meio microssomal. A análise do ART C foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna C_{18} e fase móvel composta por metanol : solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (70:30, v/v). A vazão utilizada foi de 1,2 mL min^{-1} e a detecção foi realizada em 315 nm. A metodologia analítica foi validada de acordo com o guia para validação de métodos bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, avaliando-se os parâmetros seletividade, linearidade, efeito residual, limite inferior de quantificação, precisão, exatidão e estabilidade, sendo que os resultados obtidos corroboraram com as exigências do guia. A seguir, foram determinadas as condições de velocidade inicial da reação enzimática (V_0), necessárias para a determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos do metabolismo do ART C em microssomas hepáticos de ratos e humanos. As condições de V_0 determinadas foram tempo de incubação de 30 minutos e concentração proteica microssomal de 0,5 mg mL^{-1} para os microssomas de ratos e tempo de incubação de 40 minutos e concentração proteica microssomal de 0,5 mg mL^{-1} para os microssomas de humanos. O modelo microssomal de rato demonstrou um possível perfil cinético sigmoidal, adequando-se ao modelo cinético de Hill. Os parâmetros cinéticos determinados foram: $V_{máx}$ = 0,7567 ± 0,0212 µmol mg^{-1} min^{-1}, coeficiente de Hill = 10,90 ± 2,80 e S_{50} = 33,35 ± 0,55 µM. A partir desses parâmetros obteve-se o clearance intrínseco para o ART C de 16,63 ± 1,52 µL min^{-1} mg^{-1}. Para o modelo microssomal de humanos, os resultados do metabolismo do ART C não se adequaram a nenhum dos modelos cinéticos enzimáticos já descritos. Em ambos os modelos microssomais, foi possível a identificação de dois metabólitos do ART C. Para tanto, foi empregado a cromatografia liquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução ou acoplada a espectrometria de massa de múltiplos estágios. Os resultados revelaram que ambos os metabólitos formados são produtos de hidroxilação do ART C.

Palavras-chave: Artepelin C, Cinética enzimática, Metabolismo in vitro, Microssomas hepáticos, Própolis verde brasileira

ABSTRACT

CARRÃO, D. B. **In vitro metabolism of the major compound of Brazilian green propolis, Artepillin C, employing liver microsomes.** 2015. 118 f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Artepillin C (ART C) is a natural product present in Brazilian green propolis, which has several biological properties. Among these ones, the anticancer properties have been highlighted, making ART C a promising drug candidate for treatment of several types of cancer (lungs, kidneys, colon, testicles, prostate and leukemia). The knowledge of a drug metabolism is one of the key stages in early drug development. Nowadays, in vitro models have been used to determine the metabolic route by the cytochrome P450 (CYP450) enzymes for a drug candidate. The main advantages of using these models are the simplicity, the relative low cost and the absence or reduced use of animals. In this project, we determined the in vitro metabolism of ART C by employing rat and human liver microsomes, in order to characterize the enzymatic kinetics parameters and to identify possible produced metabolites during the metabolism. To accomplish that, an analytical method was developed and validated for ART C analysis in microsomal medium. The ART C analysis was carried out by high performance liquid chromatography, using a C_{18} column and methanol : formic acid aqueous solution 0.1% (70:30, v/v) as mobile phase. The flow rate used was 1.0 mL min^{-1} and detection was set at 315 nm. The analytical methodology was validated according to ANVISA guideline for bioanalytical method validation. The following parameters were evaluated: selectivity, linearity, carryover, lower limit of quantification, precision, accuracy and stability, wherein the obtained results corroborate to the guide's requirement. Hereafter, the initial velocity conditions for the enzymatic reaction (V_0) of ART C metabolism in rat and human liver microsomes was determined. The V_0 conditions were incubation time 30 minutes and microsomal protein concentration 0.5 mg mL^{-1} for rat microsomes and incubation time 40 minutes and microsomal protein concentration 0.5 mg mL^{-1} for human microsomes. The metabolism by rat liver microsomes suggested a sigmoidal profile, adapting to the Hill's kinetics model. The enzymatic kinetics parameters determined were: V_{max} = 0.7567 ± 0.0212 µmol mg^{-1} min^{-1}, Hill coefficient = 10.90 ± 2.80 and S_{50} = 33.35 ± 0.55 µM. Based on these parameters, the calculated intrinsic clearance for ART C was 16.63 ± 1.52 µL min^{-1} mg^{-1}. The in vitro metabolism assay employing human microsomes did not fit any enzymatic kinetics models. In both microsomal models, two ART C metabolites were determined. The identification of the metabolites was performed by liquid chromatography coupled to a high resolution mass spectrometry or coupled to a multiple-stage mass spectrometry. The results revealed that both ART C metabolites were produced after a hydroxylation reaction.

Keywords: Artepillin C, Kinetic enzymatic, In vitro metabolism, Liver microsomes, Brazilian green propolis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ART C ($C_{19}H_{24}O_3$)..... 5
Figura 2. Perfil cinético de Michaelis-Menten (adaptado de Nelson e Cox (2004))..... 12
Figura 3. Perfis cinéticos atípicos. A) Multienzimático, B) Bifásico, C) Cinética de Hill, D) Cinética de inibição pelo substrato (adaptado de Seibert e Tracy (2014)). 14
Figura 4. Gráfico de Eadie-Hofstee. A) Michaelis-Menten, B) Cinética Bifásica, C) Cinética de Hill, D) Cinética de inibição pelo substrato (adaptado de Seibert e Tracy (2014)). 15
Figura 5. Espectro de massas do ART C em alta resolução no modo negativo. Espectrômetro de massa micrOTOF II-ESI-Q-TOF, voltagem do capilar e do *end plate* –3500 V e 500 V, respectivamente..... 34
Figura 6. Espectro de massas do ART C em alta resolução no modo positivo. Espectrômetro de massa micrOTOF II-ESI-Q-TOF, voltagem do capilar e do *end plate* 3500 V e –500 V, respectivamente..... 35
Figura 7. Espectro de RMN ^{1}H do ART C. Espectrômetro Bruker® - Modelo DRX500 - Ultra Shield®, com magneto de 11,74 T e sonda multinuclear de detecção inversa (1H: 500,13 MHz e 13C: 125,77 MHz)..... 38
Figura 8. Cromatograma da análise do ART C por HPLC-DAD em (A) 315 nm (____) e em (B) 275 nm (____) – (1) produto de degradação do ART C. Condições analíticas na **Tabela 7**..... 40
Figura 9. Avaliação das energias de colisão para a fragmentação do ART C no modo negativo. Espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo (TQ) (Waters® Corporation, Milford, EUA), tensão de –2,5 kV. 42
Figura 10. Cromatograma da análise do ART C no UHPLC-MS no modo SRM (*m/z* 299 > 255 para quantificação e *m/z* 299 > 285 para confirmação) – (1) produto de degradação da solução padrão do ART C. Condições analíticas na **Tabela 8**..... 43
Figura 11. Avaliação do solvente extrator na ELL do ART C (n = 4)..... 45
Figura 12. Cromatogramas no HPLC-DAD da extração do ART C nas condições finais da ELL empregando microssomas hepáticos de ratos (A) 315 nm (___), (B) 275 nm (___), o branco microssomal de ratos (C) 315 nm (___), (D) 275 nm (___) e o branco microssomal de humanos (E) 315 nm (___), (F) 275 nm (___). Condições analíticas na **Tabela 7**. 46

Figura 13. Avaliação da solubilidade do ART C (166,45 µmol L^{-1}) em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}), solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) + 0,1% (m/v) Cremophor® e solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) + 0,1% (m/v) Cremophor® + 2% (v/v) acetonitrila ($p > 0,05$). 48

Figura 14. Avaliação da estabilidade do ART C nas condições de incubação nos tempos de 30, 60 e 90 minutos, A) 144,26 µmol L^{-1} e B) 14,15 µmol L^{-1} ($p > 0,05$). Temperatura de incubação: 37°C. 49

Figura 15. Cromatogramas do estudo prévio de metabolismo do ART C (144,26 µmol L^{-1}) empregando microssomas hepáticos de ratos - (A) Metabolismo (___); (B) Controle, sem a adição de NADPH (___); (C) Branco, sem a adição do ART C (___) – (M1) possível metabólito 1; (M2) possível metabólito 2; (1) produto de degradação da solução padrão do ART C. Condições analíticas na **Tabela 7**. 50

Figura 16. Cromatogramas do estudo prévio de metabolismo do ART C (144,26 µmol L^{-1}) empregando microssomas hepáticos de humanos - (A) Metabolismo (___); (B) Controle, sem a adição de NADPH (___); (C) Branco, sem a adição do ART C (___) – (M1) possível metabólito 1; (M2) possível metabólito 2; (1) produto de degradação da solução padrão do ART C. Condições analíticas na **Tabela 7**. 51

Figura 17. Seletividade da metodologia analítica – Cromatogramas no HPLC-DAD da extração do ART C nas condições finais da ELL empregando microssomas hepáticos de ratos (A) 315 nm (___), (B) 275 nm (___), o branco microssomal de ratos (C) 315 nm (___), (D) 275 nm (___) e o branco microssomal de humanos (E) 315 nm (___), (F) 275 nm (___). Condições analíticas na **Tabela 7**. 53

Figura 18. Erro relativo percentual (ER %) vs Conc. ART C, utilizando a regressão linear com ponderação 1/x. 54

Figura 19. Avaliação da depleção do ART C (0,50 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de ratos. Tempo de incubação: 30 min (n = 3). 60

Figura 20. Avaliação da depleção do ART C (19,97 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de ratos. Tempo de incubação: 30 min (n = 3). 61

Figura 21. Avaliação da depleção do ART C (69,91 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de ratos. Tempo de incubação: 30 min (n = 3). 61

Figura 22. Avaliação da depleção do ART C (0,50 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de ratos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3)..... 63
Figura 23. Avaliação da depleção do ART C (19,97 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de ratos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3)..... 64
Figura 24. Avaliação da depleção do ART C (69,91 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de ratos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3)..... 64
Figura 25. Avaliação da depleção do ART C (0,50 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de humanos. Tempo de incubação: 40 min (n = 3)..... 66
Figura 26. Avaliação da depleção do ART C (19,97 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de humanos. Tempo de incubação: 40 min (n = 3)..... 67
Figura 27. Avaliação da depleção do ART C (69,91 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de humanos. Tempo de incubação: 40 min (n = 3)..... 67
Figura 28. Avaliação da depleção do ART C (0,50 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de humanos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3). 69
Figura 29. Avaliação da depleção do ART C (19,97 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de humanos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3). 69
Figura 30. Cinética enzimática sigmoidal (n = 3) do metabolismo do ART C pelas enzimas da CYP450 empregando microssomas hepáticos de ratos. 71
Figura 31. Gráfico de Eadie-Hofstee (n = 3) da cinética enzimática do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos..... 72
Figura 32. Cinética enzimática do metabolismo do ART C pelas enzimas da CYP450 empregando microssomas hepáticos de ratos..... 73
Figura 33. Cromatogramas (detector de arranjo de diodos – 315 nm) do estudo para a identificação dos metabólitos do ART C. A) metabolismo in vitro do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos e B) controle empregando microssomas

hepáticos de ratos. (M1) metabólito 1; (M2) metabólito 2. Condições analíticas no **item 3.15.1**. 76

Figura 34. Espectro de massas de alta resolução dos metabólitos M1 (A) e M2 (B) do ART C. 76

Figura 35. Possíveis metabólitos do ART C formados por hidroxilação ou epoxidação. A, B, C, D e E – possíveis estruturas químicas dos metabólitos do ART C. 79

Figura 36. Espectros de massa de MS^n do ART C, no modo negativo de ionização. Condição analítica no **item 3.15.2**. 81

Figura 37. Esquema de fragmentação MS^n proposto para o ART C, no modo negativo de ionização. 82

Figura 38 Esquema de fragmentação MS^n proposto para os metabólitos do ART C, no modo negativo de ionização. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades biológicas da PVB. 3
Tabela 2. Propriedades biológicas atribuídas ao ART C..... 6
Tabela 3. Patentes relacionadas ao ART C..... 8
Tabela 4. Concentrações de ART C em meio microssomal empregadas na validação analítica..... 26
Tabela 5. Resultados da análise de espectrometria de massa de alta resolução do padrão analítico de ART C. 36
Tabela 6. RMN ^{1}H do ART C. 37
Tabela 7. Condições de análise cromatográfica no HPLC-DAD. 39
Tabela 8. Condições de análise cromatográfica no UHPLC-MS. 41
Tabela 9. Algumas características físico-químicas do ART C. 44
Tabela 10. Condições finais da ELL. 46
Tabela 11. Recuperação da ELL (n = 3). 47
Tabela 12. Porcentagem de metabolização do ART C (n = 3). 51
Tabela 13. Linearidade (n = 5). 54
Tabela 14. Análise da validade da regressão e da falta de ajusta (ANOVA). 55
Tabela 15. Precisão e exatidão intraensaio (n = 5). 56
Tabela 16. Precisão e exatidão interensaio (n = 15). 56
Tabela 17. Estabilidade nas condições de incubação (n = 5). 57
Tabela 18. Estabilidade no auto-injetor por 24 horas (n = 5). 58
Tabela 19. Estabilidade na exposição à luz (n = 5). 59
Tabela 20. Avaliação da concentração proteica correspondente a depleção de 10% do ART C no tempo de incubação de 30 minutos, empregando microssomas hepáticos de ratos. 62
Tabela 21. Avaliação do tempo de incubação correspondente a depleção de 10% do ART C na concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1}, empregando microssomas hepáticos de ratos..... 65
Tabela 22. Avaliação da concentração proteica correspondente a depleção de 10% do ART C no tempo de incubação de 40 minutos, empregando microssomas hepáticos de humanos..... 68

Tabela 23. Avaliação do tempo de incubação correspondente a depleção de 10% do ART C na concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1}, empregando microssomas hepáticos de humanos. 70
Tabela 24. Parâmetros cinéticos enzimáticos do metabolismo do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos. 72
Tabela 25. Abundância relativa das isoformas da CYP e respectiva contribuição ao metabolismo de fármacos (JIA; LIU, 2007). 74
Tabela 26. Reações mais comuns de metabolismo de fase I, com as respectivas alterações estruturais e a diferença na massa molecular entre o metabólito e o substrato (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009). 77
Tabela 27. Resultados da análise de espectrometria de massa de alta resolução (modo negativo) dos metabólitos do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos. 78
Tabela 28. Íons produto do ART C obtidos na análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de múltiplo estágios 80
Tabela 29. Íons produto dos metabólitos do ART C obtidos na análise por HPLC-MS^n 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ART C	Artepelin C
CE	Eletroforese capilar
C_{EXP}	Concentração experimental
CG	Cromatografia gasosa
CL*intr*	Clearance intrínseco
C_{NOM}	Concentração nominal
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CYP450	Citocromo P450
DAD	Detector de arranjo de diodos
DPR %	Desvio padrão relativo percentual
E	Enzima
ELL	Extração líquido-líquido
EMA	*European Medicines Agency*
ER %	Erro relativo percentual
ES	Complexo enzima-substrato
FID	Detector de ionização em chama
ESI	Ionização por *eletrospray*
FDA	*Food and Drug Administration*
h	Coeficiente de Hill
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de

	diodo
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa
IT	Analisador de massa do tipo *íon trap*
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
m/z	Razão massa carga
SEM	Monitoramento de reações selecionadas
MS	Espectrometria de massa
MS^n	Fragmentações de múltiplos estágios
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina
Na-TFA	Solução de ácido trifluoroacético sodiado
P	Produto
PI	Padrão interno
PVB	Própolis verde brasileira
Q-TOF	Analisador de massa do tipo quadrupolo – tempo de voo
QqQ	Analisador de massa do tipo triplo quadrupolo
R	Coeficiente de correlação
Rec	Recuperação
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
S	Desvio padrão
S	Substrato
[S]	Concentração de substrato
S_{50}	Concentração de substrato em que a velocidade da reação é 50% da velocidade máxima de reação

TMS	Tetrametilsilano
TOF	Analisador de massa do tipo tempo de voo
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
V	Velocidade da reação enzimática
V_0	Velocidade inicial da reação enzimática
$V_{máx}$	Velocidade máxima da reação enzimática
X	Média das concentrações obtidas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA 1

1.2. ARTEPELIN C 4

1.3. ESTUDOS DE METABOLISMO 8

1.3.1. METABOLISMO IN VITRO 9

1.3.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA 11

1.3.3. IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS 16

1.3.4. METABOLISMO DO ARTEPELIN C 16

1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS 17

2. OBJETIVOS 19

2.1. OBJETIVOS GERAIS 19

2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS 19

3. MATERIAIS E MÉTODOS 20

3.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO 20

3.2. REAGENTES E SOLVENTES 20

3.3. MICROSSOMAS HEPÁTICOS 21

3.4. ANÁLISE DO PADRÃO ANALÍTICO 21

3.4.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO 21

3.4.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO 21

3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 22

3.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA 22

3.7. MEIO MICROSSOMAL 23

3.8. PREPARO DA AMOSTRA 23

3.8.1. RECUPERAÇÃO DA ELL 23

3.9. ESTUDO DE SOLUBILIDADE 24

3.10. ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE 24

3.11. ESTUDO PRÉVIO DE METABOLISMO IN VITRO 25

3.12. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA 25

3.12.1. SELETIVIDADE 26

3.12.2. LINEARIDADE E EFEITO RESIDUAL 26
3.12.3. LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO 27
3.12.4. PRECISÃO E EXATIDÃO 27
3.12.5. ESTABILIDADE 27
3.12.5.1. CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO 28
3.12.5.2. AUTO-INJETOR POR 24 HORAS 28
3.12.5.3. EXPOSIÇÃO À LUZ 28
3.13. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE METABOLISMO 28
3.13.1. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS 28
3.13.2. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE HUMANOS 29
3.14. CINÉTICA ENZIMÁTICA 30
3.14.1. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS 30
3.14.2. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE HUMANOS 31
3.15. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS 31
3.15.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO 31
3.15.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MÚLTIPLOS ESTÁGIOS 32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
4.1. ANÁLISE DO PADRÃO ANALÍTICO 33
4.1.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO 33
4.1.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO 36
4.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 39
4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAEFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA 40
4.4. PREPARO DE AMOSTRA 44
4.4.1. RECUPERAÇÃO DA ELL 47
4.5. ESTUDO DE SOLUBILIDADE 47
4.6. ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE 49
4.7. ESTUDO PRÉVIO DO METABOLISMO IN VITRO 50
4.8. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA 52
4.8.1. SELETIVIDADE 52
4.8.2. LINEARIDADE E EFEITO RESIDUAL 53
4.8.3. LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO 55
4.8.4. PRECISÃO E EXATIDÃO 55
4.8.5. ESTABILIDADE 57
4.8.5.1. CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO 57
4.8.5.2. AUTO-INJETOR POR 24 HORAS 58

4.8.5.3. EXPOSIÇÃO À LUZ 58
4.9. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE METABOLISMO 59
4.9.1. MICROSSOMAS HEPÁTICO DE RATOS 59
4.9.1.1. CONCENTRAÇÃO PROTEICA 59
4.9.1.2. TEMPO DE INCUBAÇÃO 62
4.9.2. MICROSSOMAS HEPÁTICO HUMANOS 65
4.9.2.1. CONCENTRAÇÃO PROTEICA 65
4.9.2.2. TEMPO DE INCUBAÇÃO 68
4.10. CINÉTICA ENZIMÁTICA 70
4.10.1. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS 71
4.10.2. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE HUMANOS 73
4.11. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS 75
4.11.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA ALTA RESOLUÇÃO 75
4.11.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MÚLTIPLO ESTÁGIOS 79
5. CONCLUSÃO 85
REFERÊNCIAS 86

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma imensa biodiversidade botânica, abrigando a maior flora do planeta e, portanto, possui as condições básicas necessárias para a estruturação de um programa nacional de bioprospecção, em busca de produtos naturais candidatos a novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Substâncias derivadas de animais, plantas e micro-organismos são utilizadas para o tratamento de doenças desde os princípios da medicina. A investigação de produtos naturais como fonte de novos fármacos alcançou seu pico na indústria farmacêutica entre 1970–1980, o que resultou em um aumento na quantidade de fármacos não sintéticos desenvolvidos. Das 877 pequenas moléculas introduzidas no mercado entre 1981 e 2002, quase metade (49%) foram produtos naturais, análogos semissintéticos de produtos naturais ou compostos sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN; CARTER, 2005).

Levando-se em conta esse dado, fica evidente a importância da investigação de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos. Portanto, a pesquisa visando à descoberta de novas entidades químicas, oriundas de produtos naturais, com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos é extremamente importante. Entre os diversos produtos naturais pesquisados, a própolis verde brasileira ocupa um lugar de destaque.

1.1. PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA

A palavra própolis é derivada do grego, em que *pro* significa “em defesa” ou “na entrada” e *polis* “comunidade” ou “cidade”, ou seja, “em defesa da comunidade” (WAGH, 2013). A própolis é um produto natural resinoso e balsâmico obtido pelas abelhas através da colheita de resinas de plantas, folhas e seus exsudatos presentes no seu habitat, que são combinadas na colmeia com secreções glandulares, enzimas e ceras (FIGUEIREDO, 2015). Devido as suas propriedades resinosas e mecânicas, a própolis é utilizada pelas abelhas na construção e no reparo da colmeia, com o objetivo de selá-la, protegê-la de predadores e micro-organismos; e, também, de agentes físicos como a luz, a chuva, o vento e o frio (WAGH, 2013).

Desde a antiguidade, a própolis é utilizada como um medicamento natural. Os médicos gregos e romanos a utilizavam no tratamento de feridas como agente antisséptico e cicatrizante, os egípcios a utilizavam para embalsamar os mortos, devido as suas propriedades antiputrefativas e os incas a empregavam como agente antitérmico (SFORCIN; BANKOVA, 2011). A Farmacopeia de Londres, no século XVII, foi a primeira a classificar a própolis como medicamento natural e o seu uso, na Europa, se tornou popular entre os séculos XVII e XX (WAGH, 2013).

A composição química da própolis está intrinsecamente relacionada com a flora presente na região geográfica de sua origem e varia, também, de acordo com condições sazonais, características genéticas das abelhas e a presença de contaminantes (RIGH; NEGRI; SALATINO, 2013). Em geral, a própolis é composta de 50–60% de resinas, 30–40% de ceras, 5–10% óleos essenciais, 5% de pólen, além de microelementos (como o alumínio e o magnésio) e vitaminas (BARTH et al., 2013). Mais de 300 compostos químicos já foram identificados em própolis de diferentes regiões, as principais classes dos compostos encontrados são flavonoides, ácidos fenólicos, compostos aromáticos, óleos voláteis, terpenos e ceras (TORETI et al., 2013).

Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, mais especificamente na região do cerrado brasileiro, as abelhas da espécie *Apis mellifera* utilizam a planta *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha, como principal fonte para a produção de própolis (BARTH et al., 2013). A própolis oriunda dessa região apresenta uma cor verde característica e, por isso, é mundialmente conhecida como própolis verde brasileira (PVB) (MACHADO et al., 2012).

A PVB pode ser empregada como um medicamento natural, devido as diversas propriedades biológicas que são associadas a mesma (**Tabela 1**).

Tabela 1. Propriedades biológicas da PVB.

Propriedade Biológica	Efeito	Referência
Antiangiogênico	Extrato aquoso da PVB apresenta atividade relacionada a antiangiogênese em humanos	CHIKARAISHI et al., 2010
Anticâncer	Aumento da apoptose em células cancerígenas da próstata	SZLISZKA et al., 2011
	Quimiopreventivo na carcinogênese de pele em ratos	PEREIRA-FILHO et al., 2014
	Antiproliferativo em diversas linhagens celulares tumorais	DE OLIVEIRA et al., 2014
Anti-hipertensiva	Atividade anti-hipertensiva em ratos	MARUYAMA et al., 2009
Anti-inflamatória	Regulação de inflamossomas, responsáveis pelo processo inflamatório	HORI et al., 2013
	Modulação da inflamação, angiogênese e fibrogênese em implantes intraperitoneais de ratos	LIMA et al., 2014
Antimicrobiana	Atividade contra bactérias Gram-positivas da cavidade oral	SKABA et al., 2013
	Atividade contra fungos responsáveis por doenças de pele	NGATU et al., 2011
Antimutagênico	Antimutagênico dependendo da concentração em células de ovário de ratos	TAVARES et al., 2006
Antioxidante	Atividade antioxidante atribuída a compostos fenólicos da PVB	TEIXEIRA et al., 2010
	Eliminação de radicais livres	ROCHA et al, 2012
Antiulcerogênica	Atividade em ratos com lesão gástrica causada por etanol e estresse	BARROS et al., 2007
Antiviral	Atividade contra o vírus *Avian influenza* (Influenza A)	TAKEMURA et al., 2012
Imunomoduladora	Melhora no sistema imunológico inato e adaptativo em ratos envelhecidos	GAO et al., 2014

Essas diversas propriedades biológicas da PVB são oriundas da ampla variedade de compostos químicos presentes na mesma, podendo a atividade biológica ser atribuída a uma única substância ou ao sinergismo entre duas ou mais substâncias (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013).

A maioria das propriedades biológicas está relacionada a presença de compostos pertencentes à classe dos fenóis, que de acordo com a região de produção, fonte de coleta das resinas, variabilidade genética da abelha rainha, técnica utilizada na produção e estação do ano, podem variar qualitativamente e quantitativamente (TORETI et al., 2013). A sazonalidade é um fator determinante na composição química da própolis, pois fatores fenológicos influenciam diretamente na biossíntese de metabólitos secundários da planta utilizada como fonte para a produção da própolis (TEIXEIRA et al., 2010). Por exemplo, a quantidade de flavonoides presentes na PVB pode variar, de acordo com a estação do ano e período de produção e coleta da mesma, influenciando significativamente na composição e, consequentemente nas características físico-químicas e na atividade biológica da mesma (FIGUEIREDO et al., 2015).

Os componentes de interesse da própolis devem ser extraídos com o objetivo de remover o material inerte e preservar a fração desejada (SLISZKA et al., 2011). O solvente mais comumente utilizado para extrair os componentes ativos da própolis é o etanol (TRUSHEVA; TRUNKOVA; BANKOVA, 2007). Os principais componentes do extrato etanólico da PVB são derivados do ácido cinâmico, flavonoides, ácidos benzoicos e benzoatos, compostos aromáticos não hidroxilados, ácidos alifáticos e ésteres (CHANG et al., 2008).

A PVB possui cada vez mais destaque no mercado internacional, devido às suas diversas propriedades biológicas e à presença de compostos distintos dos encontrados em outros tipos de própolis como a drupanina, a bacarina, o kaempferide e o Artepelin C, com destaque especial para o último (SZLISZKA et al., 2013).

1.2. ARTEPELIN C

Em 1994, Aga e colaboradores isolaram e identificaram três compostos da PVB que apresentaram atividade antimicrobiana. Entre eles, destaca-se o Artepelin C (ART C), ácido 3-(4-hidroxi-3,5-di(3-metil-2-buten-1-il)fenil)-2-(E)-propenóico, que apresentou a maior atividade antimicrobiana dentre os compostos isolados (AGA et al, 1994). O ART C

(**Figura 1**) é um composto fenólico, derivado hidroxilado e diprenilado do ácido cinâmico (PAULINO et al., 2008).

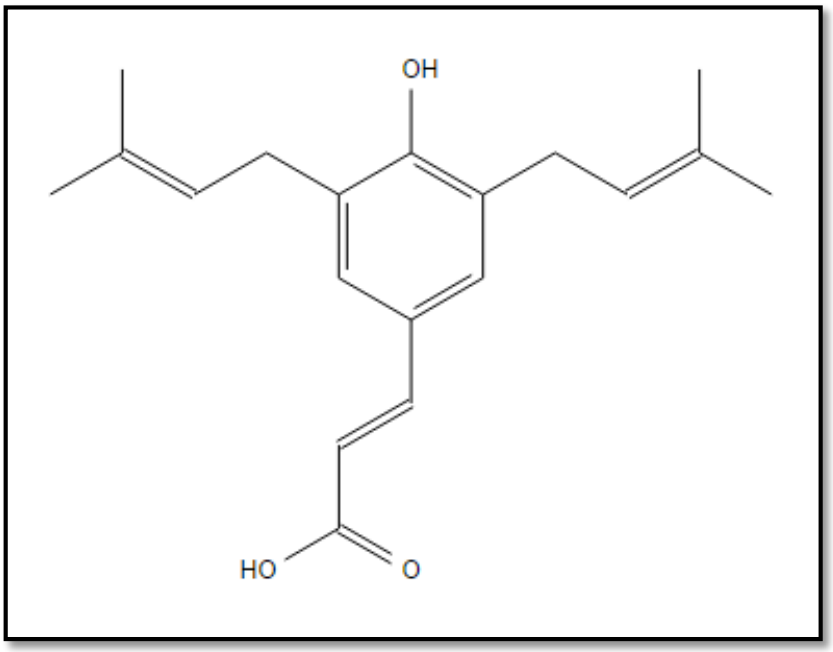

Figura 1. Estrutura química do ART C ($C_{19}H_{24}O_3$)

Park e colaboradores (2004) identificaram a presença de ART C na origem botânica da PVB, a *Baccharis dracunculifolia*, identificando que o mesmo é proveniente da planta e, portanto, é um marcador característico desse tipo de própolis. Hata e colaboradores (2012) reportaram que o ART C é o principal responsável pelo sabor picante característico desse tipo de própolis. O ART C é um dos componentes majoritários da PVB (SOUSA et al., 2007) e é o componente majoritário de seu extrato alcoólico (SZLISZKA et al., 2013). Portanto, pode ser utilizado como marcador fitoquímico para a identificação da mesma, sendo também considerado como um indicador da sua qualidade para exportação (ANTUNES; DA SILVA; ESTRADA, 2008).

O ART C destaca-se, também, dentre os outros compostos presentes na PVB, devido as diversas propriedades biológicas que são atribuídas a esse composto (**Tabela 2**).

Tabela 2. Propriedades biológicas atribuídas ao ART C

Propriedade Biológica	Efeito	Referência
Anticâncer	Atividade anticâncer através indução da apoptose celular.	KIMOTO et al., 1996
	Atividade citotóxica preferencial em células humanas tumorais	MATSUNO et al., 1997
	Indução da apoptose em células leucêmicas humanas	KIMOTO et al., 1998a
	Atividade antitumoral em células humanas com supressão do crescimento tumoral	KIMOTO et al., 1998b
	Prevenção da carcinogênese: proteção contra formação de câncer no pulmão e nos testículos em ratos	KIMOTO et al., 1999
	Prevenção da carcinogênese: proteção contra formação de câncer renal induzido em ratos	KIMOTO et al., 2000
	Inibição do desenvolvimento do câncer pulmonar em ratos	KIMOTO et al., 2001a
	Efeito antileucêmicos com efeitos inibitórios limitados em linfócitos normais	KIMOTO et al., 2001b
	Atividade preventiva no desenvolvimento de células humanas de cólon cancerígenas	SHIMIZU et al., 2005
	Suprime o câncer de cólon através da indução do metabolismo de fase II de agentes cancerígenos	SHIMIZU et al., 2006
	Efeito preventivo contra a angiogênese tumoral *in vivo* e inibição da proliferação endotelial celular	AHN et al., 2007
	Bloqueio seletivo do crescimento tumoral em ratos	MESSERLI et al., 2009
	Efeito imunopreventivo em células da próstata cancerígenas induzindo a apoptose	SZLISZKA et al., 2012
Antidiabético	Redução do risco de diabetes do tipo II	CHOI et al., 2011
Anti-inflamatória	Atividade anti-inflamatória e efeito analgésico em ratos	PAULINO et al., 2008
Antimicrobiana	Composto da PVB com maior atividade antibacteriana	AGA et al., 1994

Antioxidante	Alto potencial antioxidante contra a peroxidação do ácido linoleico em solução micelar	HAYASHI et al., 1999
	Inibição da peroxidação lipídica em ratos	KIMOTO et al., 2001a
	Eficiente na eliminação de radicais livres	NAKANISHI et al., 2003
	Antioxidante com alta biodisponibilidade em células intestinais Caco-2 e hepáticas Hep2G	SHIMIZU et al., 2004
Imunomoduladora	Ativação do sistema imunológico	KIMOTO et al., 1998b

Observando-se as diversas propriedades biológicas atribuídas ao ART C, fica evidente o potencial que esse composto possui para o desenvolvimento de um fármaco e como a maioria dos estudos reporta a sua propriedade anticancerígena, é um candidato promissor para o tratamento de diversos tipos de câncer (pulmão, rins, cólon, testículos, próstata e leucemia). Outros derivados do ácido cinâmico, que também são componentes da PVB como a drupanina e a bacarina, também possuem atividade inibitória em células cancerígenas humanas induzindo a apoptose, porém são menos potentes do que o ART C (AKAO et al., 2003).

Shimizu e colaboradores (2004) demonstraram que o ART C sofre absorção no sistema intestinal sem conversão metabólica, e é um antioxidante biodisponível que previne danos oxidativos no DNA celular. Konishi (2005) reportou que o ART C é principalmente permeado nas células intestinais Caco-2 através de difusão transcelular passiva, embora também seja absorvido intracelularmente por transportadores monocarboxílicos. Além disso, estudos in vivo realizados em ratos demonstram que a absorção e a biodisponibilidade do ART C são suficientes para a produção de efeitos biológicos. A absorção via administração oral de 10 mg kg^{-1} de ART C em ratos tem pico máximo após 1 h com concentração plasmática de 22 µg mL^{-1} (PAULINO et al., 2008).

Como o ART C é um produto natural com enorme potencial para o desenvolvimento de fármaco existe grande interesse do mercado farmacêutico por esse composto. Em uma pesquisa efetuada na plataforma *Integrity* da Thomson Reuters (2015) foram encontradas algumas patentes relacionadas ao ART C (**Tabela 3**).

Tabela 3. Patentes relacionadas ao ART C.

Título	Empresa	Data de Publicação	Número da Patente
Agente antitumoral	Hayashibara	Mar/1997	JP 1997071528
Agente controlador da apoptose	Hayashibara	Out/1997	EP 0800826
Agente anticancerígeno	Morakawa Kenkodo	Jun/2006	JP 2006143685
Agente antidiabético	Erina	Abr/2012	JP 2012072136

A existência de patentes relacionadas às propriedades biológicas do ART C comprova o enorme potencial desse produto natural para o desenvolvimento de um fármaco. Atualmente, a empresa Hayashibara está realizando estudos pré-clínicos visando o desenvolvimento do ART C como um fármaco oncolítico, no momento, o desenvolvimento se encontra na etapa de estudos biológicos (*Integrity* Thomson Reuters, 2015).

O *Food and Drug Administration* (FDA) (2006) preconiza a realização de estudos de metabolismo no estágio inicial de desenvolvimento de candidatos a fármacos, já que esses estudos são essenciais para a caracterização dos parâmetros cinéticos do metabolismo, a avaliação do potencial de interação fármaco-fármaco, a identificação da via metabólica e, também, a identificação dos metabólitos formados. Os resultados dos estudos de metabolismo, além das informações sobre os mecanismos de ação, a toxicidade, a distribuição e a excreção de um composto, podem indicar se o candidato a fármaco deve ou não ser submetido às próximas etapas de desenvolvimento.

1.3. ESTUDOS DE METABOLISMO

A avaliação do metabolismo de produtos naturais com potencial para se tornarem novos fármacos, veem se mostrando um campo de pesquisa em constante crescimento, devido a ampla demanda pela descoberta de novas substâncias químicas. A função do metabolismo é modificar estruturalmente xenobióticos apolares e lipofílicos, convertendo-os em produtos (metabólitos), na maioria das vezes mais polares, de forma a facilitar o processo de eliminação no organismo (FASINU; BOUIC; ROSENKRANZ, 2012).

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo, porém o intestino, os rins, os pulmões, a pele e o epitélio nasal também atuam no processo (ASHA;

VIDYAVATHI, 2010). O metabolismo de xenobióticos pode ser dividido em reações de fase I e de fase II. As reações de metabolismo de fase I são reações de oxidação, redução e hidrólise, que são responsáveis por modificar estruturalmente os xenobióticos tornando-os mais polares; e as reações de metabolismo fase II são reações de conjugação, com adição de ácido glucurônico (via UDP-glucuronil transferases), grupamentos sulfato (via sulfotransferares) ou grupamentos acetilas (via acetiltransferases). As reações de metabolismo de fase I e II têm como objetivo a formação de compostos mais polares que possam ser excretados pelas fezes e urina (SAHOO et al., 2015).

As enzimas da citocromo P450 (CYP450) são um grupo de hemeproteínas encontradas no fígado, que são o principal maquinário enzimático responsável pelas reações de metabolismo de fase I (ASHA; VIDYAVATHI, 2010), além disso, essas enzimas também estão relacionadas à biossíntese de hormônios e mensageiros secundários (ATKINS, 2005). Esse grupo de enzimas está presente em todos os seres vivos e possui a capacidade de catalisar inúmeras reações como: hidroxilação de alcanos, epoxidação de alcenos, N-desalquilação de aminas secundárias e terciárias, N-oxidação de aminas aromáticas, O-desalquilação, hidroxilação de anéis aromáticos, entre outras (MANSUY, 2010).

O grupo de enzimas da CYP450 é divido em famílias, que são representadas através de números (por exemplo CYP1 e CYP3), que possuem similaridade de 40% na sequência de aminoácidos que a constituem, e em subfamílias, que são representadas através de letras (CYP1A, CYP3A), que possuem similaridade de 55% na sua sequência de aminoácidos (SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013). Dentre as isoformas da CYP450 presentes em humanos, a CYP3A4 é a mais abundante e a sua “promiscuidade” permite que mais da metade dos fármacos que são administrados em seres humanos sejam metabolizados por essa enzima (SEVRIOUKOVA; POULOS, 2013).

1.3.1. METABOLISMO IN VITRO

Para avaliar o comportamento de um substrato frente as enzimas da CYP450, modelos de metabolismo in vitro são utilizados. Esses modelos representam uma aproximação efetiva para estimar o metabolismo in vivo humano (ASHA; VIDYAVATHI, 2010), já que tratam-se de simplificações de organismos animais mais complexos que apresentam como vantagens a possibilidade da utilização de pequenas quantidades da substância a ser avaliada, a simplicidade de execução do experimento, o custo

relativamente razoável dos estudos e, principalmente, as razões éticas da utilização de modelos in vitro, pois esses estudos podem ser utilizados inicialmente para a avaliação do metabolismo de um substrato, diminuindo sensivelmente a utilização de estudos com animais (STEPAN et al., 2013).

A utilização de estudos de metabolismo in vitro não elimina a necessidade de realização de estudos in vivo, já que ambos fornecem informações complementares, mas diminui significativamente a quantidade de substratos que devem ser submetidos aos estudos in vivo. As informações que cada modelo de metabolismo oferece devem ser exploradas; por exemplo no estudo de metabolismo in vitro é possível predizer o clearance intrínseco do fármaco e, dessa forma, fazer uma estimativa do clearance hepático in vivo (LIPSCOMB; POET, 2008).

Vários são os modelos utilizados para estudo de metabolismo in vitro: fígado perfundido isolado, fatias de fígado, hepatócitos, frações S9 hepáticas, frações citosólicas hepáticas, microssomas hepáticos, linhagens transgênicas de células e isoformas recombinantes (FASINU; BOUIC; ROSENKRANZ, 2012; ASHA; VIDYAVATHI, 2010). O modelo in vitro mais empregado em estudos de metabolismo são os microssomas hepáticos, que são a fração sub-celular do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, constituindo-se principalmente de enzimas da CYP450, flavinas monoxigenases e glutationa-S-transferases. A sua obtenção é realizada por meio da homogeneização do fígado e a separação dos outros constituintes das células hepáticas por ultracentrifugação diferencial (PELKONEN, 1974). Para que esse modelo de metabolismo in vitro possa ser utilizado é necessária a adição de cofatores, como por exemplo o NADPH (fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina), que é responsável pela transferência de elétrons para que ocorram as reações de fase I (ASHA, VIDYAVATHI, 2010).

As principais vantagens da utilização de microssomas em estudos de metabolismo são: a simplicidade, o baixo custo, ser um modelo bem caracterizado e a estabilidade do mesmo quando armazenado em condições adequadas e, além disso, esse tipo de modelo é empregado na realização de estudos de inibição enzimática, através da adição de inibidores seletivos da isoformas das CYPs (ASHA; VIDYAVATHI, 2010; WU et al., 2012; LI, 2005). Já em relação as desvantagens, pode-se citar a presença de concentrações mais altas da CYPs nos microssomas do que as encontradas no fígado intacto; a ausência de enzimas e de cofatores citosólicos, o que pode ocasionar a não descoberta de metabólitos que são formados no fígado intacto; e, além disso, as condições de incubação (força iônica, temperatura, pH de incubação e presença de solvente orgânico) extremamente específicas

para a realização de estudos de metabolismo, que se alteradas podem afetar significativamente os resultados (ASHA; VIDIAVATHI, 2010).

A combinação de modelos de metabolismo in vitro é importante para se obter informações importantes (FASINU, BOUIC, ROSENKRANZ, 2012). Como demonstrado por Li e colaboradores (2012) informações obtidas por estudos de metabolismo in vitro empregando microssomas de ratos, cachorros, macacos e humanos, além de fração hepática S9 humana, corroboraram para a identificação e confirmação dos metabólitos formados durante o metabolismo da 20 (S)-ginsenoside.

1.3.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Ao contrário da maioria das enzimas que catalisam apenas uma única reação e, portanto, são altamente específicas, as enzimas da CYP450 são responsáveis por metabolizar uma grande variedade de substratos. A baixa seletividade dessas enzimas é benéfica para que os diversos xenobióticos aos quais somos expostos diariamente possam ser metabolizados; porém essas enzimas são cataliticamente menos eficientes do que as enzimas em geral, devido aos seus sítios ativos serem maiores e menos específicos (SEIBERT; TRACY, 2014).

O modelo cinético de Michaelis-Menten é o mais utilizado para descrever o comportamento da maioria das enzimas (BEZERRA; FRAGA; DIAS, 2013). Michaelis e Menten (1913) postularam que, primeiramente, a enzima (E) se liga reversivelmente ao substrato (S) para formar o complexo enzima-substrato (ES), em uma etapa relativamente rápida. Posteriormente, o ES se dissocia dando origem a enzima na sua forma livre e ao produto (P).

$$E + S \leftrightarrows ES \rightarrow E + P \quad \textbf{(Equação 1)}$$

em que, **E** – enzima, **S** – substrato, **ES** – complexo enzima-substrato e **P** – produto.

Como a etapa de dissociação possui uma velocidade de reação muito menor do que a primeira etapa, a dissociação do ES é a etapa limitante e, dessa forma, a velocidade da reação desse ser proporcional a concentração do ES. Quando a enzima é adicionada ao substrato, o estado estacionário, em que a concentração do ES permanece constante, é atingido rapidamente, ou seja, a velocidade de formação é igual a velocidade de consumo

do complexo. Em estudos cinéticos, a velocidade inicial da reação enzimática (V_0) é medida no estado estacionário e, esses estudos são chamados de cinética enzimática de estado estacionário (NELSON; COX, 2004).

A **Figura 2** apresenta o perfil característico da cinética de Michaelis-Menten.

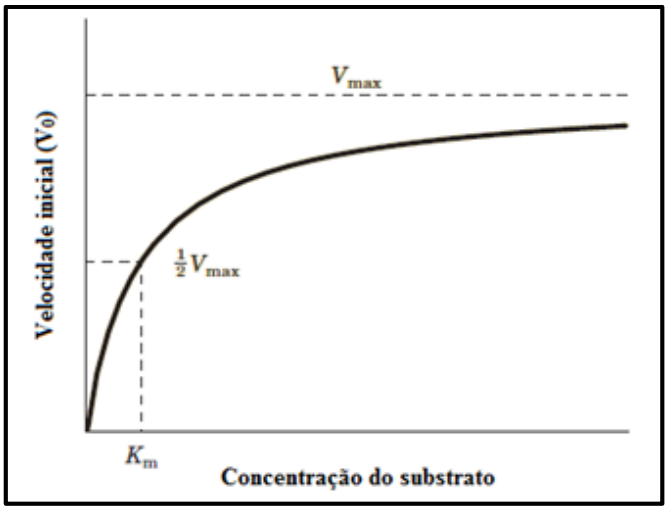

Figura 2. Perfil cinético de Michaelis-Menten (adaptado de Nelson e Cox (2004))

Os dois principais parâmetros utilizados para avaliar os dados cinéticos enzimáticos de metabolismo são a velocidade máxima da reação enzimática ($V_{máx}$) de metabolismo e a constante de Michaelis-Menten (K_m), que é a concentração de substrato correspondente a 50% da velocidade máxima da reação enzimática de metabolismo (ASHA, VYDIAVATHI, 2010). A **Equação 2** relaciona esses parâmetros e é conhecida como equação de Michaelis-Menten (GOLICNIK, 2011):

$$V = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \quad \textbf{(Equação 2)}$$

em que, **V** – velocidade da reação enzimática, $\mathbf{V_{máx}}$ – velocidade máxima da reação enzimática, **[S]** – concentração de substrato e $\mathbf{K_m}$ – constante de Michaelis-Menten.

Utilizando os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) obtidos em estudos cinéticos enzimáticos é possível se determinar o clearance intrínseco de eliminação do substrato. O clearance intrínseco (CL_{intr}) expressa a capacidade máxima de depuração do fármaco e fornece uma estimativa da capacidade do organismo em eliminar o substrato, desconsiderando-se a existência do fluxo sanguíneo e de ligação a proteínas (GOODMAN, GILMAN, 2007). Utilizando-se o CL_{intr} obtido em estudos de metabolismo in vitro é

possível predizer o clearance hepático in vivo (LIPSCOMB; POET, 2008). A **Equação 3** correlaciona os parâmetros cinéticos enzimáticos com o CL_{intr}.

$$CL_{intr} = \frac{V_{máx}}{K_m} \text{ (Equação 3)}$$

em que, $\mathbf{CL_{intr}}$ – clearance intrínseco, $\mathbf{V_{máx}}$ – velocidade máxima de reação e $\mathbf{K_m}$ – constante de Michaelis-Menten.

As enzimas da CYP450 podem apresentar o perfil cinético de Michelis-Menten, porém em alguns casos apresentam perfis cinéticos atípicos. Isso ocorre porque as enzimas da CYP450 possuem múltiplos sítios ativos, que são maiores e menos específicos do que os das enzimas em geral, tornando possível que ocorra a ligação de múltiplas moléculas do substrato à uma enzima (WESTER et al., 2004) e, além disso, é possível que o metabolismo seja catalisado por múltiplas enzimas (SEIBERT; TRACY, 2014).

Entre os perfis cinéticos atípicos das reações das enzimas da CYP450 pode-se citar a cinética multienzimática (**Figura 3A**), em que mais de uma enzima é responsável pela reação enzimática. Para se observar esse tipo de cinética é necessário que os valores de K_m e $V_{máx}$ de cada enzima sejam significativamente diferentes (HOUSTON; KENWORTHY; GALETIN, 2003) e para avaliar individualmente a cinética de cada enzima, pode ser utilizado as isoformas recombinantes das enzimas, que são expressas individualmente (por exemplo, CYP3A4). A cinética bifásica (**Figura 3B**) pode ser classificada como uma cinética multienzimática ou como uma cinética em que a mesma enzima possui múltiplos sítios ativos com diferentes valores de K_m e $V_{máx}$ (SEIBERT; TRACY, 2014).

A cinética de Hill (**Figura 3C**) é característica de enzimas que possuem múltiplos sítios ativos. Nesse tipo de perfil é observado um efeito homotrópico em que a ligação de uma molécula do substrato em um sítio ativo altera a conformação estrutural da enzima, modificando a afinidade, dos outros sítios ativos da enzima, pelas outras moléculas do substrato (SEIBERT; TRACY, 2014). A **Equação 4** é conhecida como equação de Hill, é derivada da equação de Michaelis-Menten e descreve esse tipo de cinética enzimática.

$$V = \frac{V_{máx}\,[S]^h}{S_{50}+[S]^h} \text{ (Equação 4)}$$

em que, **V** – velocidade da reação enzimática, $\mathbf{V_{máx}}$ – velocidade máxima da reação enzimática, **[S]** – concentração de substrato, $\mathbf{S_{50}}$ – concentração de substrato em que a velocidade da reação é 50% da velocidade máxima de reação e **h** – coeficiente de Hill.

O grau de cooperatividade ou coeficiente de Hill (h) é um parâmetro que indica se o cooperativismo é positivo (h > 1), em que a ligação da primeira molécula do substrato à enzima aumenta a afinidade da molécula subsequente pela enzima; negativo (h < 1), em que a ligação da primeira molécula diminui a afinidade da molécula subsequente pela enzima; ou a ausência de cooperativismo (h = 1), em que a ligação da primeira molécula não altera a afinidade da molécula subsequente à enzima, transformando a equação de Hill (**Equação 4**) na equação de Michaelis-Menten (**Equação 2**) (SEIBERT; TRACY, 2014).

A cinética de inibição pelo substrato (**Figura 3D**) é uma cinética característica pela redução da velocidade da reação enzimática em altas concentrações de substrato. Esse tipo de cinética é ocorre devido à ligação de mais de uma molécula do substrato no sítio ativo da enzima, com as moléculas que se ligam subsequentemente reduzindo a velocidade reacional do sítio ativo (TRACY; HUMMEL, 2004).

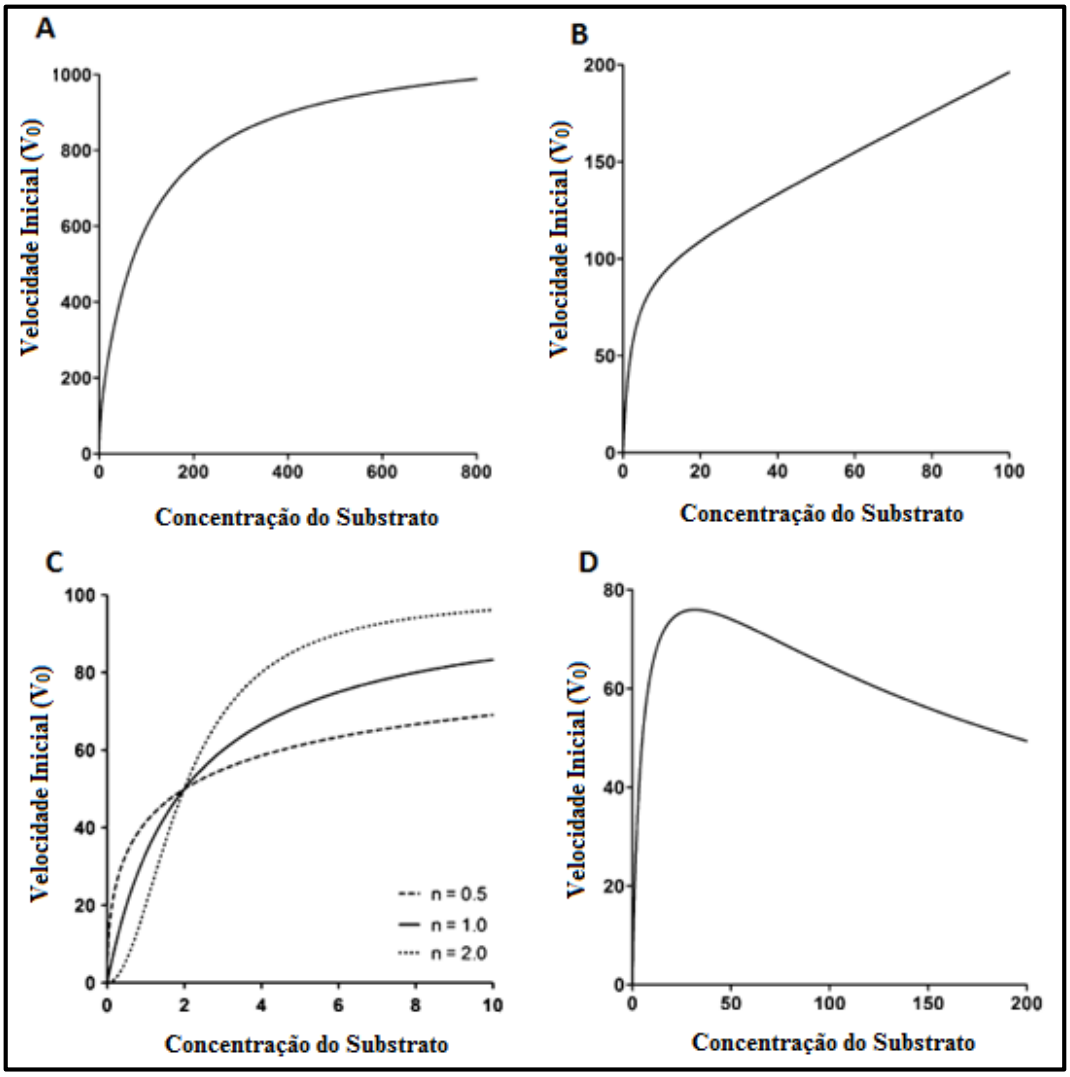

Figura 3. Perfis cinéticos atípicos. A) Multienzimático, B) Bifásico, C) Cinética de Hill, D) Cinética de inibição pelo substrato (adaptado de Seibert e Tracy (2014)).

Nem sempre o comportamento das cinéticas atípicas pode ser diferenciado da hipérbole característica da cinética enzimática de Michaelis-Menten. O gráfico de Eadie-Hofstee é uma transformação do gráfico da cinética enzimática muito utilizado para se distinguir os comportamentos cinéticos atípicos das enzimas do comportamento Michaeliano típico. Como pode ser observado na **Figura 4** o gráfico de Eadie-Hofstee relaciona a velocidade da reação enzimática pela razão entre a velocidade da reação enzimática e a concentração do substrato, tornando possível a distinção com maior facilidade da cinética de Michaelis-Menten das cinéticas atípicas.

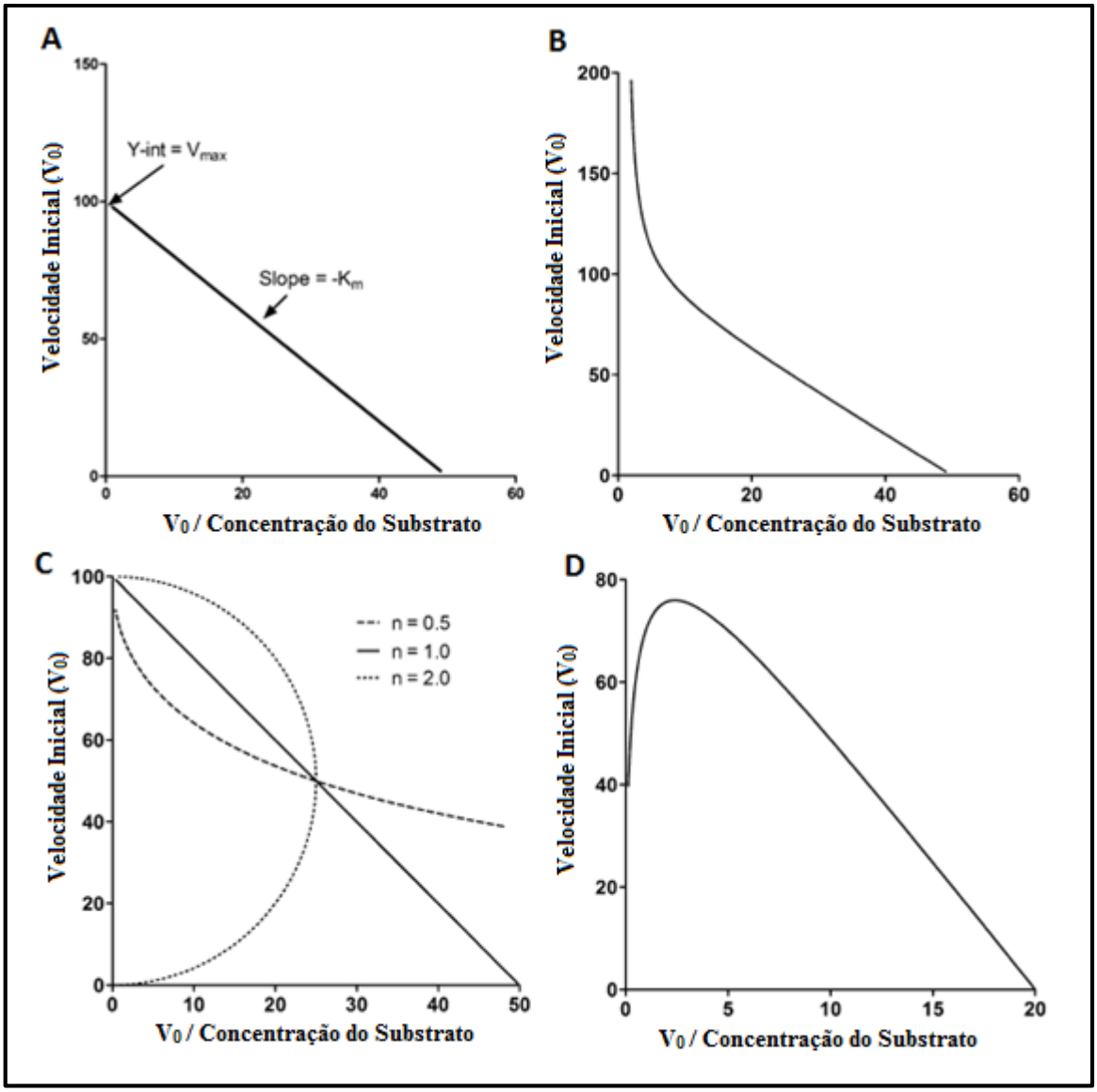

Figura 4. Gráfico de Eadie-Hofstee. A) Michaelis-Menten, B) Cinética Bifásica, C) Cinética de Hill, D) Cinética de inibição pelo substrato (adaptado de Seibert e Tracy (2014)).

1.3.3. IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS

A maioria dos metabólitos formados durante o metabolismo de um fármaco são mais polares e, em geral, possuem menor atividade farmacológica em relação ao mesmo, porém alguns metabólitos podem possuir maior, igual ou até mesmo diferente atividade farmacológica em relação ao fármaco (ZHANG et al., 2007).

As enzimas da CYP450 podem transformar compostos não tóxicos em metabólitos que são tóxicos ou até mesmo carcinogênicos (ASHA; VYDIAVATHI, 2010). Por outro lado, em alguns casos, o processo de metabolismo pode fazer com que pró-fármacos, como tamoxifeno, enalapril e levodopa, quando metabolizados deem origem a metabólitos bioativos (FASINU, BOUIC, ROSENKRANZ, 2012).

Portanto, é de fundamental importância a identificação dos possíveis metabólitos formados, para que seja possível o conhecimento das propriedades farmacológicas, farmacocinéticas, toxicológicas e do mecanismo de eliminação dos mesmos, antes de se investir em um fármaco em potencial (OBACH, 2013).

1.3.4. METABOLISMO DO ARTEPELIN C

O ART C é um potencial candidato fármaco, porém poucos estudos de metabolismo foram realizados sobre o mesmo. Naramoto, Kato e Ichihara (2014) utilizaram isoformas microssomais recombinantes de humanos, para realizar estudos do potencial de interação dos principais marcadores da PVB com fármacos, conhecidos como marcadores específicos de algumas isoformas da CYP450. Através da adição de um extrato etanólico da PVB, foi medido o potencial de inibição do ART C em cada isoforma avaliada e calculada a concentração individual de ART C presente no extrato da PVB, responsável por causar inibição $\geq$ 70%. Os resultados mostraram que o ART C exibiu potencial de inibição para as isoformas recombinantes das CYP1A2, CYP2C9 e CYP2C19.

Esse estudo é o único a reportar o comportamento do ART C frente às enzimas da CYP450, o que mostra a falta de informação desse produto natural a respeito do metabolismo desse produto natural. A realização de estudos de metabolismo para caracterização dos parâmetros cinéticos e a identificação dos possíveis metabólitos formados são etapas de fundamentais para futuros estudos clínicos empregando o ART C.

1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

O desenvolvimento de metodologias analíticas eficientes, sensíveis e seletivas é extremamente necessário para que sejam realizados estudos de metabolismo in vitro, tanto para a caracterização dos parâmetros cinéticos quanto para a identificação dos metabólitos formados. O uso de técnicas analíticas adequadas é de fundamental importância para a condução de experimentos analíticos em matrizes biológicas (LIU; JIA, 2007).

As metodologias analíticas desenvolvidas para estudos de metabolismos in vitro têm como objetivo separar e quantificar o candidato a fármaco avaliado e de identificar e caracterizar os possíveis metabólitos formados. Além disso, com o auxílio de técnicas analíticas de separação é possível obter isoladamente os metabólitos formados em uma quantidade significativa e, dessa forma, é possível avaliar as suas propriedades farmacológicas (MUTLIB et al., 2013). A escolha da técnica analítica empregada está intimamente associada a finalidade do estudo realizado.

Para estudos de cinética enzimática, com o objetivo de caracterização de parâmetros cinéticos, é necessário a utilização de técnicas analíticas que possibilitem separação e quantificação do substrato avaliado. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), utilizando analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ), é a técnica analítica mais empregada em estudos quantitativos de metabolismo in vitro (KORFMACHER, 2005). Outras técnicas analíticas de separação também são utilizadas para estudos cinéticos enzimáticos, dentre elas, a cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia gasosa (CG) (ZHANG et al., 2007), assim como, outros tipos de detectores como o arranjo de diodos (DAD) e o detector de ionização em chama (FID).

Para estudos de identificação de metabólitos as técnicas mais utilizadas são a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) com analisador de massa do tipo tempo de voo (TOF) ou analisador de massas do tipo *íon trap* (IT) (KORFMACHER, 2005).

A espectrometria de massa (MS) com analisador do tipo tempo de voo (TOF) com ionização por *eletrospray* (ESI) é uma excelente técnica para a determinação da identidade de compostos químicos. O analisador de tempo de voo (TOF) possui uma alta velocidade de aquisição de dados e fornece medidas de massas com alta exatidão. A alta exatidão nas massas obtidas permite a identificação da fórmula química do composto em questão, podendo diferenciar até mesmo compostos que possuem a mesma massa nominal, mas que

possuem composição elementar diferente, já que esses possuem massas exatas diferentes (LACORTE; FERNANDEZ-ALBA, 2006). O analisador de massas do tipo *íon trap* (IT) é um analisador de massas de múltiplo estágios, que fornece importantes informações de fragmentações de múltiplo estágios (MS^n) do composto avaliado, sendo uma excelente ferramenta a ser utilizada para a identificação estrutural dos metabólitos formados em estudos de metabolismo in vitro (KORFMACHER, 2005).

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica qualitativa que fornece informações estruturais dos compostos analisados. A RMN é uma técnica de detecção não destrutiva, o que garante a possibilidade de realizar outros tipos de análises a mesma amostra, o que é essencial quando se trabalha com produtos naturais, já que na maioria das vezes a quantidade de amostra é limitada (CORCORAN; SPRAUL, 2003). Porém, como na maioria dos casos a quantidade de metabólitos formados em estudos de metabolismo in vitro empregando microssomas hepáticos é pequena, nem sempre é possível realizar esse tipo de análise, já que a quantidade de massa necessária para se obter um espectro de RMN, seja de hidrogênio ou de carbono, nem sempre é obtida (NASSAR; TALLAT, 2004).

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Estudar o metabolismo in vitro do Artepelin C, componente majoritário da própolis verde brasileira, empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos, com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos enzimáticos após metabolismo e identificar os metabólitos formados.

2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- ✓ Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para análise do Artepelin C por HPLC em microssomas hepáticos;
- ✓ Estudo prévio de metabolismo in vitro do Artepelin C empregando microssomas hepáticos de ratos e humanos;
- ✓ Caracterização dos parâmetros cinéticos enzimáticos após metabolismo in vitro, empregando microssomas hepáticos de rato e de humanos;
- ✓ Identificação dos metabólitos do Artepelin C formados em ratos e humanos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

O padrão analítico do Artepelin C (ART C) foi adquirido da empresa Wako Pure Chemicals (Osaka, Japão), como um composto isolado da própolis, e as soluções padrão de ART C foram preparadas em acetonitrila. A solução padrão de diclofenaco de sódio, utilizado como padrão interno (PI) (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canadá) foi preparada na concentração de 50 µg mL^{-1} em metanol. Para o preparo das soluções foi utilizada a balança analítica Sartorius, modelo CPA225D (Goettingen, Alemanha) e o agitador de tubos tipo *mixer* Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, Brasil). As soluções foram armazenadas a –20°C e protegidas da luz.

3.2. REAGENTES E SOLVENTES

Água ultrapura foi obtida no Sistema Direct-Q 3 MilliQ da Millipore (Massachusetts, EUA). Metanol, acetonitrila e clorofórmio, grau cromatografia foram adquiridos da Panreac (Barcelona, Espanha). Todos os demais reagentes, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico diidratado, ácido fórmico e ácido clorídrico (Synth, Diadema, Brasil), tris(hidroximetil)aminometano e Hepes (J. T. Baker, Phillisburg, EUA), cloreto de potássio granular (Mallinckrodt Chemicals, Xalostoc, México), macrogol glicerol ricinoleato (Cremophor®) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram grau analítico.

Os componentes do sistema de geração de NADPH, fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina, glicose-6-fosfato e a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

3.3. MICROSSOMAS HEPÁTICOS

Os microssomas hepáticos de ratos e de humanos foram adquiridos da empresa Corning Life Science (Arizona, EUA), na concentração proteica de 20 mg mL^{-1} e foram armazenados a –80°C até o uso.

3.4. ANÁLISE DO PADRÃO ANALÍTICO

O padrão analítico do ART C, adquirido da Wako, foi submetido a análises por espectrometria de massa de alta resolução e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para a confirmação da identidade do composto químico adquirido.

3.4.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO

O padrão analítico do ART C foi diluído em metanol : H_2O (1:1, v/v) e diretamente introduzido no espectrômetro de massa micrOTOF II-ESI-Q-TOF da Bruker Daltonics® (Billerica, EUA), equipado com analisador de massas do tipo quadrupolo – tempo de voo (Q-TOF), com o auxílio de uma bomba de infusão (Kd Scientific, EUA) com vazão de 300 µL h^{-1}. A voltagem do capilar e do *end plate* foram 3500 V e –500 V (modo positivo de ionização) e –3500 V e 500 V (modo negativo de ionização), *transfer* 100 µs, temperatura do gás de secagem (nitrogênio) 180°C, vazão de 4 L min^{-1} e pressão de 2 Bar. Para calibração interna utilizou-se solução de ácido trifluoroacético sodiado (Na-TFA), com concentração de 10 mg mL^{-1}. O programa empregado na aquisição dos dados foi o software Bruker Compass Data Analysis 4.1 (Bremen, Germany).

3.4.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

Para as análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) a solução padrão de ART C foi preparada em clorofórmio deuterado (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), contendo tetrametilsilano (TMS). As análises foram realizadas em espectrômetro Bruker® - Modelo DRX500 - Ultra Shield®, com magneto de 11,74 T e sonda multinuclear de detecção inversa (1H: 500,13 MHz e 13C: 125,77 MHz) para tubos de 5 mm de diâmetro, com sistema de *lock* de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de 53,5 Gauss cm^{-1}).

3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Foi utilizado sistema para cromatografia liquida de alta eficiência da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba unitária de solvente LC-20AT, forno CTO-20A; degaseificador online DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A, injetor automático SIL-10AF e detector de arranjo de diodo (190-800 nm) SPD-M20A. Foi utilizada a coluna Ascentis Express Fused Core C_{18} (100 mm x 4,6 mm x 2,7 µm de tamanho de partícula) e a coluna de guarda Ascentis Express C_{18} (3,0 mm x 4,6 mm 2,7 µm) da Supelco (Pensilvânia, EUA). A fase móvel utilizada foi metanol : solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) (70:30, v/v) com vazão de 1,2 mL min^{-1}, temperatura de análise de 30°C e volume de injeção de 10 µL. Foram monitorados para detecção os comprimentos de onda de 275 nm (para a análise do PI) e 315 nm (para a análise do ART C). Os dados foram analisados utilizado o software LC Solution versão 1.25 SP1.

3.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

Foi utilizado um sistema para cromatografia liquida Acquity UHPLC™ (Waters® Corp., Milford, EUA) equipado com bomba binária de solvente, degaseificador on-line, auto-injetor, detector de arranjo de diodo (eLamba 800) e analisador de massa do tipo triplo quadrupolo (TQ) (Waters® Corporation, Milford, EUA) equipado com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI). Foi utilizada uma coluna Acquity™ UHPLC BEH C_{18} (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm). A fase móvel utilizada foi metanol : solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (60:40, v/v) com vazão de 0,3 mL min^{-1}, temperatura de 30°C e injeção de 10 µL amostra. A tensão utilizada no ESI foi de –2,5 kV, os valores de tensão do cone, cone extrator e lentes, foram respectivamente de: –20; –2 e 0,2 V. A temperatura da fonte foi de 150 °C, a temperatura de dessolvatação foi de 350 °C, a vazão do gás de dessolvatação (nitrogênio) foi de 650 L h^{-1} e a vazão no cone (nitrogênio) foi de 50 L h^{-1}. A energia de colisão (argônio) foi de 25 eV. A detecção foi realizada no modo SRM (monitoramento de reações selecionadas), as fragmentações monitoradas foram, razão massa carga, *m/z* 299 > 255 e *m/z* 299 > 200, para quantificação e confirmação, respectivamente. Os dados foram coletados utilizando o software MassLynx versão 3.5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.7. MEIO MICROSSOMAL

O meio reacional microssomal foi preparado em tubo âmbar e constituído de ART C em acetonitrila (5 µL), do sistema de geração de NADPH (50 µL), na concentração final de 5 mmol L^{-1} de glicose-6-fosfato, 0,25 mmol L^{-1} de fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina e 0,5 unidades da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e da solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) + 0,1% (m/v) Cremophor®, completando um volume de 200 µL. As amostras foram pré-incubadas por 10 minutos a 37°C, em banho-maria com agitação da marca Marconi, modelo MA093 (São Paulo, SP, Brasil). O metabolismo foi iniciado pela adição de microssomas hepático de ratos ou de humanos (40 µL) e encerrado com o início do procedimento de preparo de amostra.

3.8. PREPARO DA AMOSTRA

A metodologia de preparo de amostra utilizada foi a extração líquido-líquido (ELL). Após a incubação foram adicionados ao meio microssomal 1,0 mL de clorofórmio, 200 µL de ácido clorídrico (0,1 mol L^{-1}) e 50 µL de PI (diclofenaco de sódio). As amostras foram agitadas por 15 minutos a 1500 rpm em agitador orbital *Vibrax* VXR Basic da IKA (Staufen, Alemanha) e centrifugadas a 1800 g por 10 minutos a 4°C em centrífuga Hitachi HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão). Em seguida, a fase orgânica foi coletada (750 µL), evaporada sob fluxo de ar comprimido, a amostra foi solubilizada em 80 µL de uma mistura metanol : água (50:50, v/v) e submetida a agitação com o auxílio do agitador de tubos tipo *mixer* Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil).

3.8.1. RECUPERAÇÃO DA ELL

A recuperação do ART C do meio microssomal foi avaliada (n = 3) nas concentrações de 2,48 (baixa), 70,74 (média) e 144,26 µmol L^{-1} (alta). Para isso, as áreas do ART C obtidas de amostras extraídas do meio microssomal (i) foram comparadas com as áreas do ART C obtidas de amostras branco microssomais (ii) (sem o ART C) fortificadas, após a extração, com ART C. Foi admitido 100% de recuperação para as amostras de branco microssomais fortificadas com o ART C (ii) e a recuperação das amostras extraídas do meio microssomal (i) foram determinadas por comparação de áreas, com as respectivas concentrações de ART C. A reprodutibilidade da recuperação da

metodologia foi expressa pelo desvio padrão relativo percentual (DPR %), admitindo-se como aceitável um valor inferior a 15%.

3.9. ESTUDO DE SOLUBILIDADE

Foi realizado um estudo de solubilidade do ART C nas condições de incubação no meio microssomal, sem a adição de NADPH, com a finalidade de garantir que a concentração de ART C adicionada ao meio microssomal fosse solúvel no mesmo e, portanto, disponível para a metabolização pelas enzimas da CYP450 dos microssomas hepáticos.

Para isso foram avaliadas (n = 5), em tubo âmbar, as solubilidades da maior concentração de ART C utilizada (166,45 µmol L^{-1} no meio microssomal) em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) e solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) + Cremophor® 0,1% (m/v). As soluções foram analisadas diretamente (sem preparo de amostra) por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e comparadas com soluções de ART C na mesma concentração preparadas em metanol (controle), considerando 100% de solubilidade nesse solvente. Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism, através do teste *t Student* (não-pareado).

3.10. ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE

Foi realizado um estudo prévio de estabilidade do ART C nas condições de incubação em meio microssomal, sem a adição de NADPH, com a finalidade de garantir que o ART C é estável nas condições de incubação.

Para isso foram avaliadas (n = 5), em tubo de âmbar, concentrações de 14,15 µmol L^{-1} e 144,26 µmol L^{-1} de ART C em meio microssomal nas condições de incubação (37°C), durante 0 (controle), 30, 60 e 90 minutos. As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra e analisadas no HPLC-DAD. Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism, através do teste *t Student* (não-pareado).

3.11. ESTUDO PRÉVIO DE METABOLISMO IN VITRO

Foi realizado um estudo prévio de metabolismo in vitro do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos. Nesses estudos, foram avaliadas as concentrações do ART C no meio microssomal de 14,15 µmol L^{-1} e 144,26 µmol L^{-1}. Os meios microssomais com a adição de ART C foram pré-incubados por 10 minutos a 37°C. As reações foram iniciadas com a adição de microssomas hepáticos de ratos ou de humanos na concentração proteica final de 1,0 mg mL^{-1}. Controles, sem a adição de NADPH e brancos, sem a adição do ART C foram avaliados tanto para os microssomas hepáticos de ratos quanto para o de humanos. Após 60 minutos, as reações foram encerradas com o início da etapa de preparo amostra e as amostras foram analisadas no HPLC-DAD.

3.12. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A metodologia analítica desenvolvida foi validada de acordo com o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos (*Guideline on bioanalytical method validation*) da *European Medicines Agency* (EMA, 2011) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Em tubos de ensaio âmbar foram adicionados 5 µL de ART C, 50 µL de água ultrapura, 40 µL de microssomas hepáticos, na concentração proteica final de 1,0 mg mL^{-1}, e 105 µL de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) + 0,1% Cremophor®. As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra e analisadas. A **Tabela 4** apresenta as concentrações de ART C, em meio microssomal, que foram utilizadas para a validação da metodologia.

Tabela 4. Concentrações de ART C em meio microssomal empregadas na validação analítica.

Definição	**C_{NOM} (µM)**
Limite Inferior de Quantificação (LIQ)	0,68
Controle de Qualidade Baixo (CQB)	2,48
Controle de Qualidade (CQ)	19,70
Controle de Qualidade Médio (CQM)	70,74
Controle de Qualidade Alto (CQA)	144,26
Limite Superior de Quantificação (LSQ)	166,45

C_{NOM} – concentração nominal

3.12.1. SELETIVIDADE

A seletividade da metodologia foi avaliada através da análise de amostras do meio microssomal hepáticos de ratos e de humanos na ausência do substrato (ART C). Posteriormente, foi avaliada a presença de interferentes da matriz no tempo de retenção do ART C e do PI.

3.12.2. LINEARIDADE E EFEITO RESIDUAL

A linearidade da metodologia foi avaliada no intervalo de concentração do ART C de 0,68 – 166,45 µM. A correlação linear entre as concentrações nominais e as razões de área do ART C e do PI foi avaliada, ponderando a curva analítica (peso 1/x), e foram determinados o coeficiente de correlação (r) e a equação da reta, também foi avaliado o gráfico de resíduos. Além disso, a adequação do modelo foi avaliada com a análise da validade da regressão e o teste de falta de ajusta (ANOVA *lack of fit*), calculando os valores de F e *p*, para um nível de confiança de 95% e graus de liberdade n-1. Os cálculos estatísticos foram realizados empregando o programa Minitab 16 Statistical Software.

O efeito residual (*carry over*) foi avaliado através da análise de uma amostra branca, seguida de uma amostra do LSQ e duas amostras brancas. Foi admitido aceitável a presença de até 20% e 5% de interferentes no tempo de retenção do ART C e do PI, respectivamente, em comparação com as amostras do LIQ (EMA, 2011).

3.12.3. LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração do ART C que poderia ser determinada (n = 5) com precisão e exatidão aceitáveis (± 20%). A precisão foi expressa como desvio padrão relativo percentual (DPR %) e a exatidão como erro relativo percentual (ER %).

$$DPR\ (\%) = \frac{s}{X}\ x\ 100$$ **(Equação 5)**

em que, **s –** desvio padrão e **X** – média das concentrações obtidas.

$$ER\ (\%) = \frac{C_{EXP} - C_{NOM}}{C_{NOM}}\ x\ 100$$ **(Equação 6)**

em que, $\mathbf{C_{EXP}}$ – concentração experimental e $\mathbf{C_{NOM}}$ – concentração nominal.

3.12.4. PRECISÃO E EXATIDÃO

Para a precisão e exatidão da metodologia bioanalítica foram avaliadas (n = 5) nas concentrações de ART C de 0,68 (LIQ), 2,48 (CQB), 70,74 (CQM) e 144,26 µmol L^{-1} (CQA) no meio microssomal. A precisão e exatidão foram expressas na forma de desvio padrão relativo percentual (DPR %) e erro relativo percentual (ER %), respectivamente.

Os experimentos de precisão e exatidão intraensaio foram realizados no mesmo dia, já os experimentos de precisão e exatidão interensaio foram realizados em três dias consecutivos. Curvas analíticas para a quantificação do ART C nesses ensaios foram realizadas diariamente. Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com os critérios de aceitação para o DPR (%) e o ER (%), de ± 20% para o LIQ e ± 15% para o CQB, o CQM e o CQA (EMA, 2011).

3.12.5. ESTABILIDADE

Foram realizados testes de estabilidade (n = 5) nas concentrações de 2,48 (CQB) e 144,26 µmol L^{-1} (CQA) do ART C em amostras microssomais. As amostras de estabilidade foram quantificadas utilizando curvas analíticas preparadas no mesmo dia do estudo. A concentração média obtida para cada concentração foi comparada com a respectiva concentração nominal. Foram considerados aprovados no teste de estabilidade

resultados dentro de ± 15% em relação a concentração nominal. Foram avaliadas a estabilidade nas (i) condições de incubação, no (ii) auto-injetor por 24 horas e na (iii) exposição à luz.

3.12.5.1.CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

As amostras foram submetidas as condições de incubação, ou seja, em banho-maria a 37°C por 50 minutos. A seguir, realizou-se o procedimento de preparo de amostra e as mesmas foram analisadas por HPLC-DAD.

3.12.5.2.AUTO-INJETOR POR 24 HORAS

As amostras foram submetidas as condições de incubação e posteriormente foi realizado o procedimento de preparo de amostra. Após serem solubilizadas em metanol : H_2O (1:1 v/v – solvente de injeção), as amostras foram colocados no auto-injetor e analisadas por HPLC-DAD, após 24 horas.

3.12.5.3.EXPOSIÇÃO À LUZ

As amostras foram preparadas em tubos de vidro transparentes, submetidas as condições de incubação, e posteriormente, o procedimento de preparo de amostra foi realizado e as mesmas foram analisadas por HPLC-DAD.

3.13. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE METABOLISMO

Os seguintes parâmetros, (i) concentração de proteínas microssomais e (ii) tempo de incubação foram avaliados para determinar as condições de velocidade inicial de reação (V_0), para posteriormente realizar o estudo de variação da concentração do substrato e assim determinar os parâmetros cinéticos enzimáticos do metabolismo in vitro do ART C, empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos.

3.13.1. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS

Para a definição da faixa linear de depleção do ART C em função da concentração proteica microssomal, foram avaliadas três concentrações de ART C no meio microssomal:

0,50 (baixa); 19,97 (média) e 69,91 µmol L^{-1} (alta). Para isso, foram adicionados em tubos de vidro âmbar (n = 3) 5 µL de ART C em acetonitrila, 50 µL do sistema de geração de NADPH e 105 µL de solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}). As amostras foram pré-incubados à 37°C em banho-maria durante 10 minutos e, a seguir, foram adicionados os microssomas hepáticos de ratos nas concentrações proteicas de 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg mL^{-1}. A incubação foi realizada, sob agitação à 37°C em banho-maria durante 30 minutos. Após o tempo de incubação ser atingido, a reação foi encerrada com o início da etapa de preparo da amostra seguidas por injeção no HPLC-DAD e analisadas. Posteriormente, os dados foram plotados em um gráfico de área normalizada do ART C pelo PI versus concentração microssomal proteica. A regressão linear dos dados foi realizada e a concentração proteica microssomal a ser utilizada no estudo de cinética enzimática empregando microssomas hepáticos de ratos foi estabelecida considerando o intervalo linear de depleção do ART C e 10% de depleção do mesmo.

Para a definição da faixa linear de depleção do ART C em função do tempo de incubação, foram avaliadas as concentrações de ART C no meio microssomal de 0,50 (baixa); 19,97 (média) e 69,91 µmol L^{-1} (alta). Para isso, foram adicionados em tubos de vidro âmbar (n = 3) 5 µL de ART C em acetonitrila, 50 µL do sistema de geração de NADPH e 105 µL de solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}). As amostras foram pré-incubados à 37°C em banho-maria durante 10 minutos e, a seguir, foram adicionados 40 µL de microssomas hepático de ratos, a fim de se obter uma concentração proteica microssomal final de 0,50 mg mL^{-1}. A incubação foi realizada, sob agitação à 37°C em banho-maria, nos tempos de 0, 5, 10, 20, 30 e 50 minutos. Após o tempo de incubação ser atingido, a reação foi encerrada com o início da etapa de preparo da amostra e as amostras foram injetadas no HPLC-DAD. Posteriormente, os dados foram plotados em um gráfico de área normalizada do ART C com o PI versus o tempo de incubação. A regressão linear dos dados foi realizada e o tempo de incubação a ser utilizado no estudo de cinética enzimática empregando microssomas hepáticos de ratos foi estabelecido considerando o intervalo linear de depleção do ART C e 10% de depleção do mesmo.

3.13.2. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE HUMANOS

A otimização dos parâmetros foi otimizada empregando o mesmo procedimento descrito no **item 3.13.1**. Foram avaliadas as concentrações de ART C no meio microssomal de 0,50 (baixa); 19,97 (média) e 69,91 µmol L^{-1} (alta). Para a otimização da concentração

proteica microssomal foram avaliadas (n = 3) as concentrações de 0; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg mL^{-1} no tempo de incubação de 40 minutos. Para a otimização do tempo de incubação foram avaliados os tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 minutos na concentração proteica microssomal de 0,50 mg mL^{-1}. Posteriormente foram determinadas a concentração proteica e o tempo de incubação a serem utilizados no estudo de cinética enzimática empregando microssomas hepáticos de humanos.

3.14. CINÉTICA ENZIMÁTICA

O estudo de cinética enzimática do ART C foi avaliado empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos nas condições V_0 otimizadas no **item 3.13**.

3.14.1. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS

Para a cinética enzimática do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos utilizou-se um valor de concentração proteica de 0,5 mg mL^{-1} e tempo de incubação de 30 minutos. Foram avaliadas as concentrações de ART C no intervalo de 1,41 – 166,45 µmol L^{-1}. Para isso, em tubos âmbar (n = 3) foram adicionados 5 µL de ART C, 50 µL do sistema de geração de NADPH e 105 µL de tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) + Cremophor® 0,1% (m/v). As amostras foram pré-incubados à 37°C em banho-maria durante 10 minutos e, a seguir, foram adicionados 40 µL de microssomas hepático de ratos (concentração proteica final de 0,50 mg mL^{-1}), após 30 minutos de incubação as reações foram interrompidas com o início do procedimento de preparo de amostra. As amostras foram analisadas e quantificadas por HPLC-DAD com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia do estudo. As concentrações nominais, de cada concentração de ART C, foram subtraídas das concentrações obtidas, de forma a se obter a concentração metabolizada pelas enzimas da CYP450. A velocidade de reação enzimática, para cada concentração, foi determinada através da normalização da concentração metabolizada pela concentração proteica (0,5 mg mL^{-1}) e pelo tempo de incubação (30 minutos). Os resultados obtidos foram plotados em gráfico de velocidade de reação enzimática pela concentração do ART C e analisados por regressão não-linear utilizando para tanto o programa Origin 9.1 empregando modelos cinéticos enzimáticos, para se obter os parâmetros enzimáticos do ART C frente as enzimas da CYP450 de microssomas hepáticos de ratos.

3.14.2. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE HUMANOS

A cinética enzimática do ART C empregando microssomas hepáticos de humanos foi realizado utilizando concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1} e tempo de incubação de 40 minutos, empregando o mesmo procedimento descrito no **item 3.14.1**.

3.15. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

Para o estudo de identificação dos metabólitos do ART C formados foram avaliados os modelos de metabolismo in vitro empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos. As amostras de metabolismo (n = 10), para cada modelo microssomal avaliado, foram preparadas e incubadas (**item 3.7**) individualmente. Em ambos os casos, o experimento foi realizado empregando concentração proteica de 1,0 mg mL^{-1} e tempo de incubação de 50 minutos. Durante o procedimento de preparo da amostra (**item 3.8**), previamente a secagem da fase orgânica coletada, as amostras de cada modelo microssomal foram combinadas, formando *pools* de amostras. Os *pools* de amostra foram evaporados sob fluxo de ar comprimido, solubilizados em 80 µL de uma mistura metanol : água (50:50, v/v) e submetida a agitação com o auxílio do agitador de tubo. Controles (n = 10), sem a presença de NADPH, também foram combinados em *pools*, para cada modelo microssomal. As amostras e os controles foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa de alta resolução e por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa de múltiplo estágios, visando a identificação dos metabólitos do ART C formados durante o metabolismo in vitro.

3.15.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO

Para os experimentos de espectrometria de massa de alta resolução visando a identificação dos metabólitos do ART C foram realizadas análises em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da marca Shimadzu® (Kyoto, Japão), composto de bombas de alta pressão (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A3), injetor com amostrador de 100 µL (SIL-20A HT), detector espectrofotométrico de arranjo de diodo SPD-M20A (200 a 600 nm), módulo de comunicação (CBM-20A) e forno para coluna (CTO-20A). Foram utilizadas a coluna Ascentis Express Fused Core C_{18} (100 mm x 4,6

mm x 2,7 µm de tamanho de partícula) e a coluna de guarda Ascentis Express C_{18} (3,0 mm x 4,6 mm 2,7 µm) da Supelco (Pensilvânia, EUA). A fase móvel utilizada foi metanol : solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) (70:30, v/v) com vazão de 1,2 mL min^{-1}, temperatura de análise de 30°C e volume de injeção de 10 µL. O HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa micrOTOF II - ESI-ToF Bruker Daltonics® (Billerica, Massachusetts, EUA). Conforme descrito no **item 3.4.1** o equipamento foi calibrado com uma solução de ácido trifluoroacético sodiado (Na-TFA) a 10 mg mL^{-1}. Os espectros foram adquiridos em modo negativo, empregando ionização por *eletrospray* (ESI) e analisador de massas do tipo tempo de voo (TOF). Capilar –3500 V; *end plate* 500 V; skimmer (1) 40 V; skimmer (2) 22 V; hexapolo (1) 23 V; hexapolo RF 80 V; temperatura do gás de secagem (N_2) 200°C; vazão do gás de secagem 9 L min^{-1} e pressão 4 Bar. O programa empregado na aquisição dos dados foi o software Bruker Compass DataAnalysis 4.1 (Bremen, Alemanha).

3.15.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MÚLTIPLOS ESTÁGIOS

Para os experimentos de espectrometria de massa de múltiplos estágios visando a identificação dos metabólitos do ART C foram realizadas análises em um sistema para cromatografia liquida de alta eficiência da marca Shimadzu® (Kyoto, Japão), composto de bombas de alta pressão (LC-20AD), degaseificador (DGU-20A3), injetor com amostrador de 100 µL (SIL-20A HT), detector espectrofotométrico de arranjo de diodo SPD-M20A (200 a 600 nm), módulo de comunicação (CBM-20A) e forno para coluna (CTO-20A). Foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas descritas no **item 3.15.1**. O HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa amaZon-SL *íon trap* (IT) Bruker Daltonics® (Billerica, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos em modo negativo, empregando IES, e analisador de massas do tipo *íon trap*. Capilar –3500 V; *end plate* 500 V; temperatura do gás de secagem (N_2) 275°C, vazão do gás de secagem 7 L min^{-1} e pressão 30 psi. O programa empregado na aquisição dos dados foi o software Bruker Compass Data Analysis 4.1 (Bremen, Alemanha).

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DO PADRÃO ANALÍTICO

É de extrema importância confirmar que o padrão analítico adquirido, o qual será utilizado em pesquisas qualitativas e quantitativas, é de fato o composto químico alvo do estudo, pois assim evita-se que resultados analíticos errôneos e enganosos sobre o respectivo composto sejam publicados (KELMAN; WRIGHT, 2012). A utilização de técnicas analíticas, como a espectrometria de massa de alta resolução, a ressonância magnética nuclear, o infravermelho e a termogravimetria são ferramentas importantes para se avaliar a identidade e a pureza do padrão analítico em questão.

Como o padrão analítico do ART C obtido (Wako) foi isolado da própolis, foram realizadas análises do mesmo por espectrometria de massa de alta resolução e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio para confirmar a identidade do composto adquirido e seu grau de pureza.

4.1.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO

A utilização da espectrometria de massa com analisador do tipo quadrupolo – tempo de voo (Q-TOF) permite a obtenção da massa nominal exata do composto químico analisado e, dessa forma, é possível a identificação da fórmula química do mesmo. O espectrômetro de massa utilizado possui como fonte de ionização o *eletrospray* (ESI) e, dessa forma, foi possível obter o espectro de massas de alta resolução do ART C no modo de negativo de ionização (**Figura 5**) e no modo positivo de ionização (**Figura 6**).

No modo negativo o único íon detectado foi o *m/z* 299,1641; o qual foi usado como o íon diagnóstico $[M-H]^-$. No modo positivo foram detectados os íons *m/z* 339,1350; 323,1614 e 301,1795; os quais também foram usados como íons diagnósticos do $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+H]^+$, respectivamente.

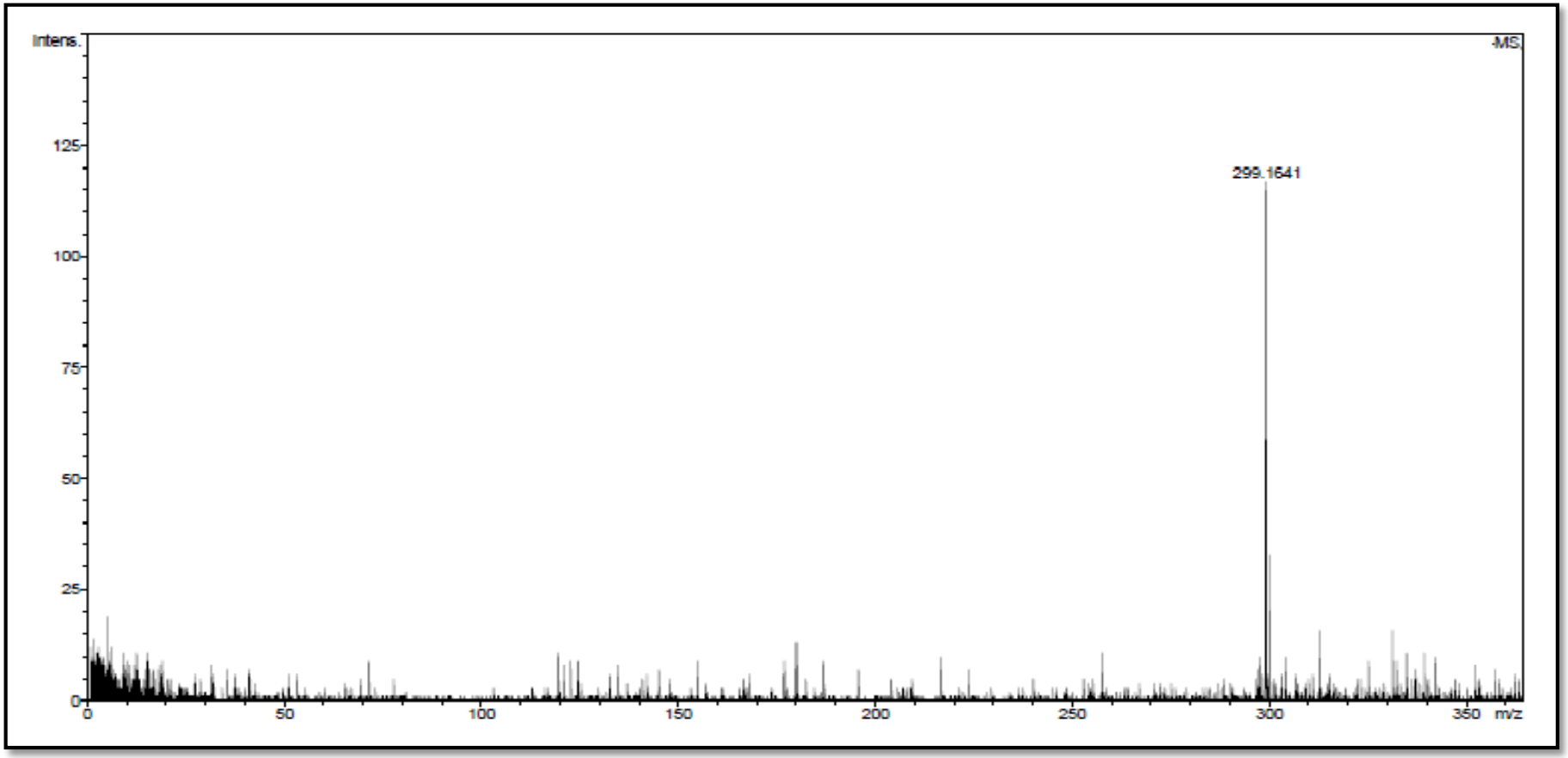

Figura 5. Espectro de massas do ART C em alta resolução no modo negativo. Espectrômetro de massa micrOTOF II-ESI-Q-TOF, voltagem do capilar e do *end plate* –3500 V e 500 V, respectivamente.

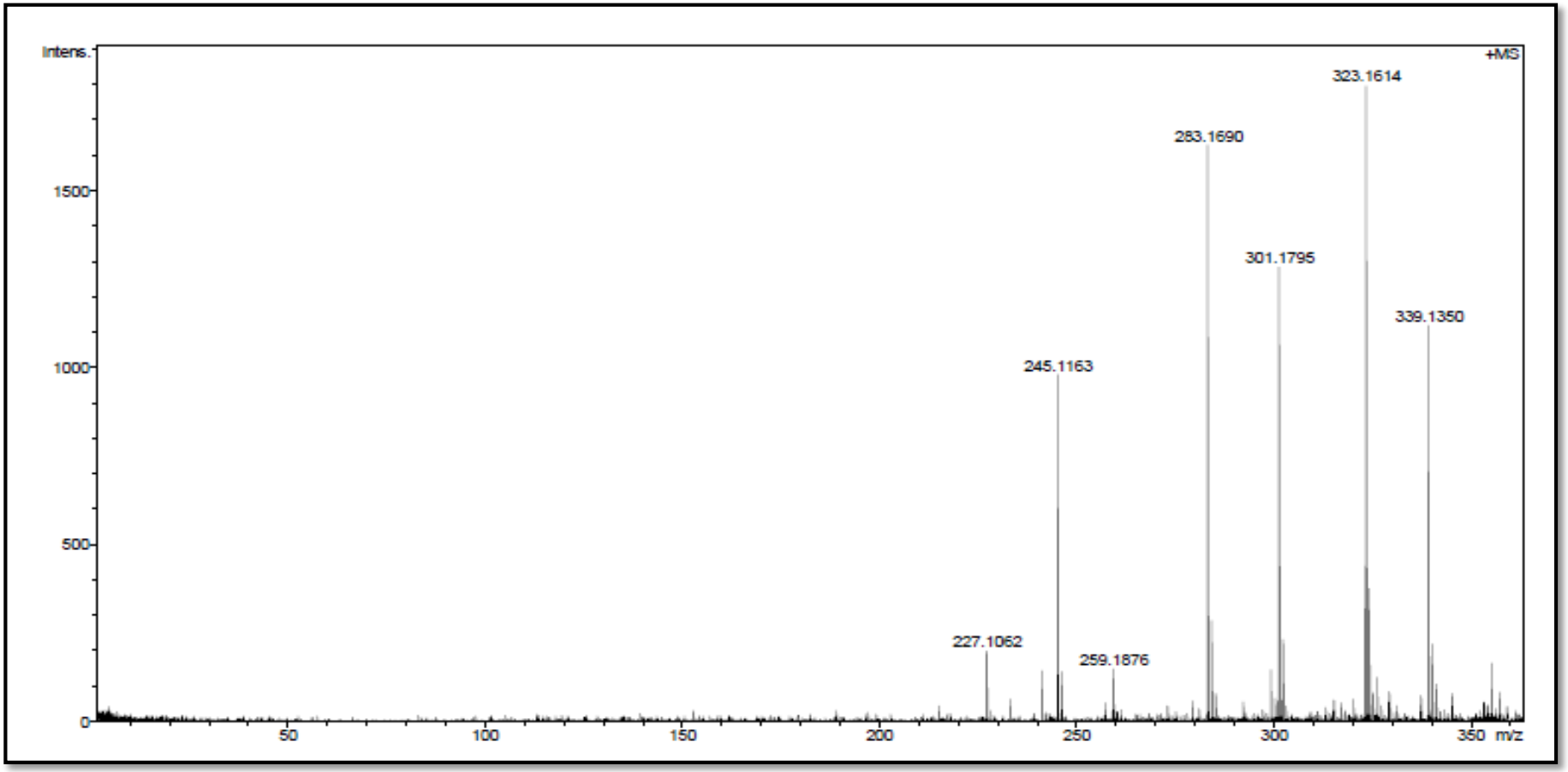

Figura 6. Espectro de massas do ART C em alta resolução no modo positivo. Espectrômetro de massa micrOTOF II-ESI-Q-TOF, voltagem do capilar e do *end plate* 3500 V e –500 V, respectivamente.

A **Tabela 5** apresenta as fórmulas químicas propostas para os íons detectados, com o respectivo erro (ppm) em relação a massa exata da fórmula química proposta, calculado de acordo com a (**Equação 7)**.

$$Erro\ (ppm) = \frac{m/z_{acurada} - m/z_{exata}}{m/z_{exata}}\ x\ 10^6$$ **(Equação 7)**

em que, $m/z_{acurada}$ – razão massa carga obtida experimentalmente e m/z_{exata} – razão massa carga teórica.

Tabela 5. Resultados da análise de espectrometria de massa de alta resolução do padrão analítico de ART C.

Íon Diagnóstico	Fórmula Química	*m/z* Acurada	*m/z* Exata	Erro (ppm)
$[M+H]^+$	$C_{19}H_{25}O_3^+$	301,1795	301,1798	1,89
$[M+Na]^+$	$C_{19}H_{24}O_3Na^+$	323,1614	323,1618	1,00
$[M+K]^+$	$C_{19}H_{24}O_3K^+$	339,1350	339,1357	2,00
$[M-H]^-$	$C_{19}H_{23}O_3^-$	299,1641	299,1647	–2,00

As análises por espectrometria de massa de alta resolução do padrão analítico avaliado, permitiram a identificação com alta exatidão (erros relativos máximos de 2 ppm) da fórmula química do composto avaliado ($C_{19}H_{24}O_3$). Como a fórmula química obtida é mesma do ART C (**Figura 1**), pode-se concluir que o composto químico presente no padrão analítico é o ART C ou também algum isômero do mesmo.

Como o analisador de massa utilizado foi um analisador sequencial do tipo quadrupolo – tempo de voo, também foi possível observar a presença de fragmentos do íon molecular no espectro de massa obtidos, esses são oriundos da fragmentação do ART C na fonte de ionização ou no analisador quadrupolo do Q-TOF (**Figura 6**) (os resultados dos estudos de fragmentação do ART C serão discutidos no **item 4.11.2**).

4.1.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

A ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) é uma técnica importante para a identificação de composto químicos, pois as análises podem ser realizadas facilmente, obtendo resultados que fornecem importantes informações

estruturais do composto analisado e ao mesmo tempo como é uma técnica de análise não destrutiva, é possível recuperar o padrão analítico submetido a análise (KELMAN; WRIGHT, 2012).

No espectro de RMN ^{1}H é possível obter informações sobre os grupos funcionais presentes no composto, através dos sinais de deslocamento químico; a conectividade estrutural desses grupos funcionais, através dos padrões e constantes de acoplamento e, além disso, é possível sugerir o número de hidrogênios correspondentes a cada sinal, através da integração dos sinais (HUANG et al., 2007). Dessa forma, é aconselhável que padrões analíticos quando adquiridos sejam submetidos a esse tipo de análise (KELMAN; WRIGHT, 2012). A **Figura 7** apresenta o espectro de RMN ^{1}H do ART C.

A **Tabela 6** apresenta os resultados experimentais obtidos na análise de RMN ^{1}H do padrão analítico do ART C comparados com os dados existentes na literatura.

Tabela 6. RMN ^{1}H do ART C.

Experimental	**UTO et al., 2002**	**AGA et al., 1994**
7,70 (d, 1H, J = 15,9 Hz)	7,69 (d, 1H, J = 15,6 Hz)	7,69 (1H, d, J = 15,9 Hz)
7,23 (s, 2H)	7,20 (s, 2H)	7,20 (2H, s)
6,29 (d, 1H, J = 15,6 Hz)	6,29 (d, 1H, J = 15,6 Hz)	6,29 (1H, d, J = 15,9 Hz)
5,31 (m, 2H)	5,31 (t, 2H, J = 6,8 Hz)	5,31 (2H, br. t)
3,35 (d, 4H, J = 7,2 Hz)	3,35 (d, 4H, J = 6,8 Hz)	3,35 (4H, br. d, J = 7,2 Hz)
1,79 (12 H)	1,79 (s, 6H)	1,79 (6H, s)
	1,78 (s, 6H)	1,78 (6H, s)

Como pode ser observado na **Tabela 6**, o espectro de RMN ^{1}H obtido para o padrão analítico avaliado corrobora com os espectros de RMN ^{1}H do ART C existentes na literatura, comprovando que o padrão analítico adquirido da Wako é realmente o ART C. Como a estrutura química do ART C possui uma dupla ligação carbono-carbono (**Figura 1**) o mesmo possui um isômero *cis/trans*, que possuiria os mesmos sinais no espectro de RMN ^{1}H, porém como a constante de acoplamento J (H, H) do sinal obtido, referente aos hidrogênios vicinais a dupla ligação na análise foi de 15,6 Hz, característica de compostos *trans* (CONSTANTINO, 2006) pode-se concluir que o único isômero presente no padrão analítico é o ART C.

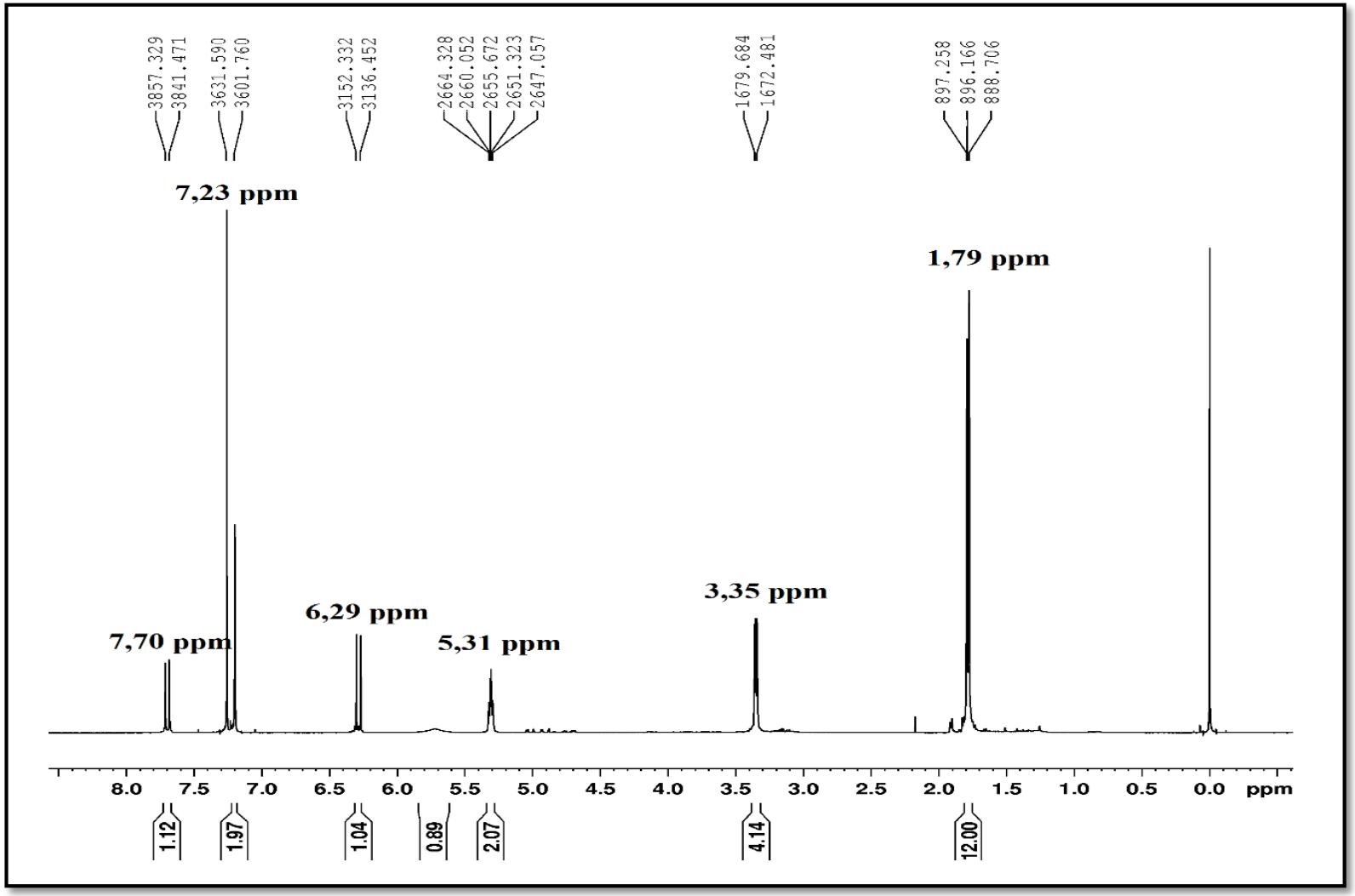

Figura 7. Espectro de RMN ^{1}H do ART C. Espectrômetro Bruker® - Modelo DRX500 - Ultra Shield®, com magneto de 11,74 T e sonda multinuclear de detecção inversa (1H: 500,13 MHz e 13C: 125,77 MHz).

Portanto, utilizando-se as técnicas de espectrometria de massa de alta resolução e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio comprovou-se que o padrão analítico, adquirido da Wako, é realmente o ART C e que o mesmo se encontra livre de impurezas em quantidades significativas.

4.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A metodologia analítica de separação e quantificação do ART C foi desenvolvida utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD) no modo fase reversa. Para isso, utilizando-se a coluna Ascentis Express Fused Core C_{18}, foram avaliados como fase móvel distintas proporções de metanol, acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico. O objetivo foi obter condições adequadas de análise para os estudos de metabolismo in vitro, ou seja, curto tempo de análise e capacidade de separar o ART C dos possíveis metabólitos formados e interferentes microssomais.

Como os possíveis metabólitos formados devem possuir características mais polares do que o ART C e a metodologia empregada foi o modo fase reversa, em que composto mais polares eluem primeiramente, os metabólitos formados possuíram tempo de retenção menor do que o do ART C. Dessa forma, buscou-se uma condição de análise em que o tempo de retenção do ART C fosse relativamente baixo (menor que 10 minutos), mas que fosse possível separá-lo dos seus possíveis metabólitos. Dentre os compostos avaliados para serem utilizados como padrão interno (PI), o diclofenaco de sódio foi o que apresentou melhores resultados e, portanto, foi escolhido para ser utilizado. A **Tabela 7** mostra as condições de análise empregadas para análise do ART C e o PI por HPLC-DAD.

Tabela 7. Condições de análise cromatográfica no HPLC-DAD.

Parâmetro	Condição otimizada
Coluna	Ascentis Express Fused Core C18 (100 mm x 4,6 mm x 2,7 µm)
Fase Móvel	Metanol: Solução acidificado de ácido fórmico 0,1% (70:30 v/v)
Vazão	1,2 mL min^{-1}
Temperatura de análise	30°C
Volume de injeção	10 µL
Detecção	315 nm (ART C) e 275 nm (PI)

Como pode ser observado no cromatograma **Figura 8**, a metodologia analítica de separação e quantificação por HPLC-DAD desenvolvida cumpriu com os objetivos necessários para a análise do ART C, tempo de análise total de 8 minutos com o ART C e o PI possuindo tempos de retenção de 6,8 e 4,1 minutos, respectivamente; e sendo provavelmente capaz de separar os possíveis metabólitos formados.

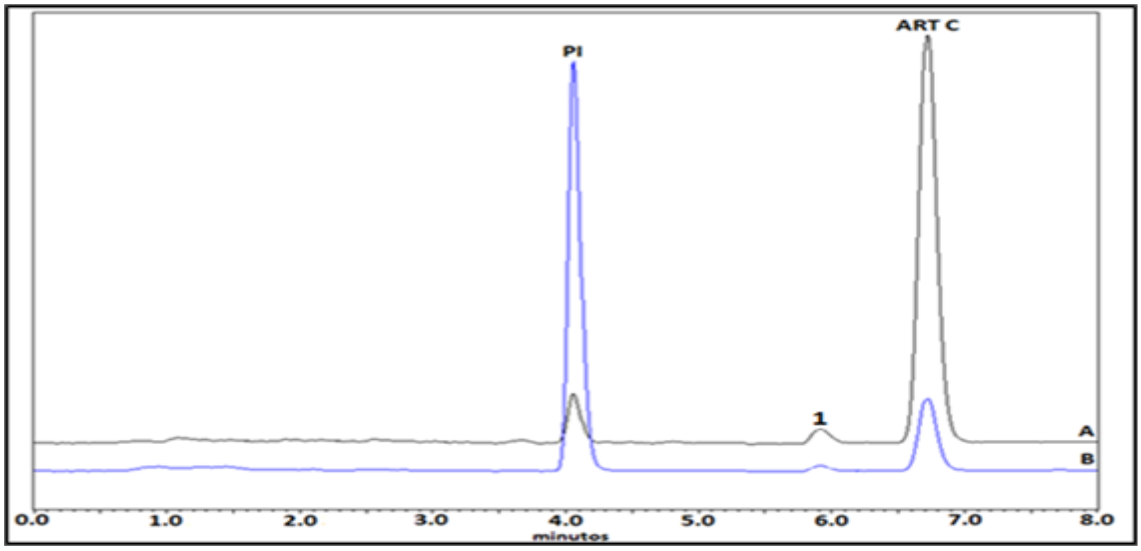

Figura 8. Cromatograma da análise do ART C por HPLC-DAD em (A) 315 nm (____) e em (B) 275 nm (____) – (1) produto de degradação do ART C. Condições analíticas na **Tabela 7**.

Além disso, é possível observar a presença de interferente na análise (**Figura 8**) no tempo de retenção de 5,9 minutos. Como foi confirmado, pelas análises **item 4.1**, o padrão analítico do ART C adquirido da Wako apresenta uma elevada pureza, portanto, o interferente presente na análise deve ser um produto de degradação do ART C, que possivelmente é formado durante o preparo e utilização da solução padrão, e/ou durante o armazenamento desse analito.

4.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAEFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

Com o intuito de aumentar a seletividade e a sensibilidade da análise foi, também, desenvolvida uma metodologia analítica de separação empregando a cromatografia líquida de ultraeficiência acoplada a espectrometria de massa (UHPLC-MS), com analisador de massa do tipo triplo quadrupolo (TQ), a partir das condições cromatográficas utilizadas no

HPLC-DAD (**item 4.2**). Foram realizados ajustes na vazão empregada e na proporção dos solventes utilizados na fase móvel (**Tabela 8**).

A seguir, os modos positivo e negativo de ionização por *eletrospray* foram avaliados. No modo positivo de ionização o íon molecular $[M+H]^+$ do ART C possui *m/z* de 301 e no modo negativo de ionização o íon molecular $[M-H]^-$ do ART C possui *m/z* 299. O modo negativo de ionização se mostrou mais sensível e, portanto, foi o escolhido para ser utilizado.

Após isso, avaliou-se a energia de colisão utilizada, de forma que fosse possível observar a formação dos fragmentos do ART C de maior intensidade. Foram avaliadas as energias de colisão de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 eV. Como ilustra a **Figura 9** a energia de colisão mais adequada para essas condições foi de 25 eV.

Definidos o modo de ionização e a energia de colisão utilizados na metodologia, foram selecionadas as fragmentações que seriam monitoradas para a detecção empregando o modo SRM (Monitoramento de Reações Selecionadas). Como pode ser observado na **Figura 9**, os íons filhos do ART C que apresentam a maior intensidade são os íons *m/z* 200 e *m/z* 255, portanto as transições *m/z* 299 > 255 e *m/z* 299 > 200 foram selecionadas para quantificação e confirmação, respectivamente.

A **Tabela 8** mostra as condições de análise empregadas no UHPLC-MS.

Tabela 8. Condições de análise cromatográfica no UHPLC-MS.

Parâmetro	**Condição otimizada**
Coluna	AcquityTM UHPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm)
Fase Móvel	Metanol : Solução acidificada de ácido fórmico 0,1% (60:40 v/v)
Vazão	0,3 mL min^{-1}
Temperatura de análise	30°C
Volume de injeção	10 µL
Eletrospray	– 2,5 kV
Energia de colisão	25 eV
SEM	*m/z* 299 > 255 (quantificação) e *m/z* 299 > 200 (confirmação)

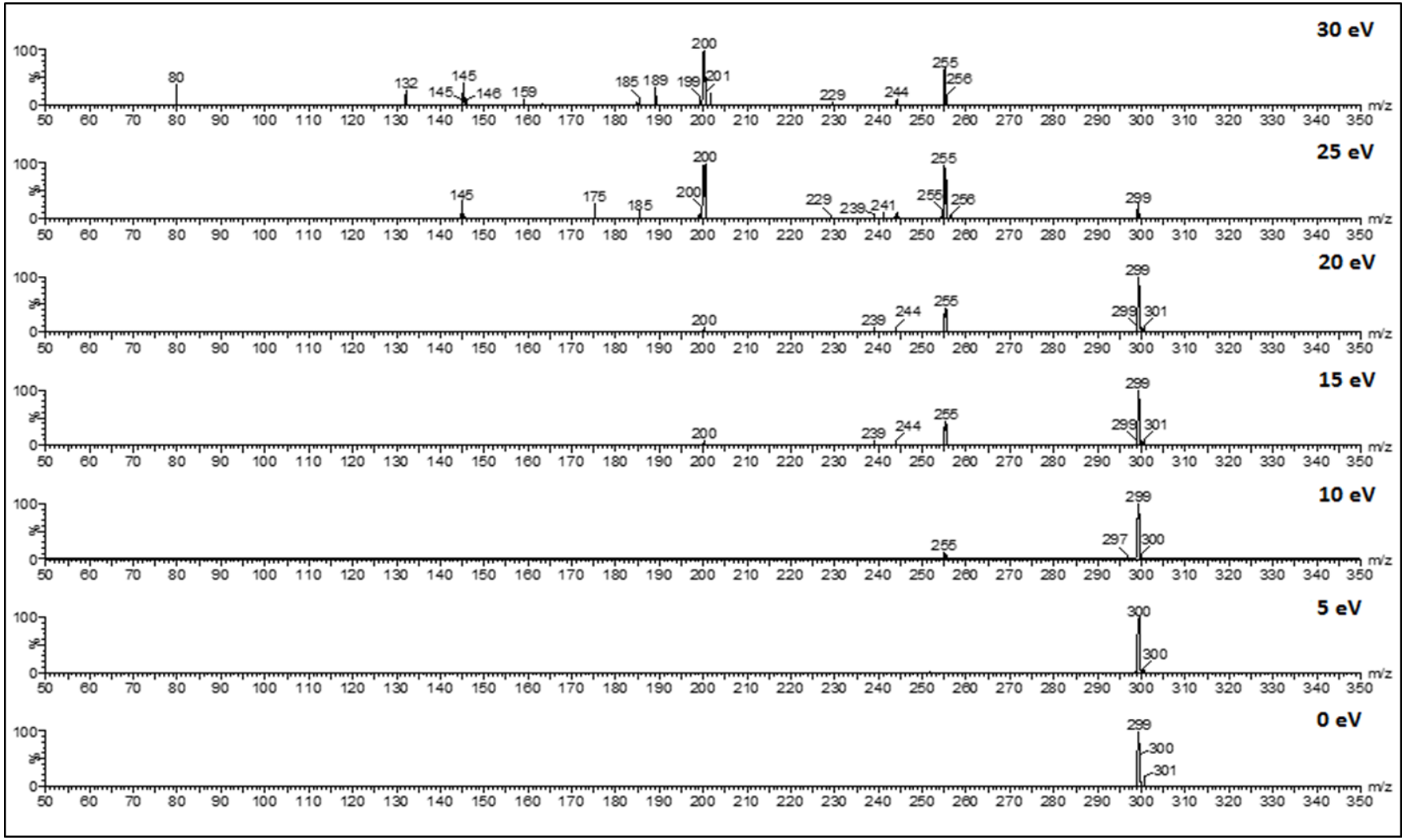

Figura 9. Avaliação das energias de colisão para a fragmentação do ART C no modo negativo. Espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo (TQ) (Waters® Corporation, Milford, EUA), tensão de –2,5 kV.

.

A **Figura 10** ilustra o cromatograma da análise do ART C no UHPLC-MS empregando o modo SRM de detecção. O tempo de retenção do ART C foi de 7,3 minutos.

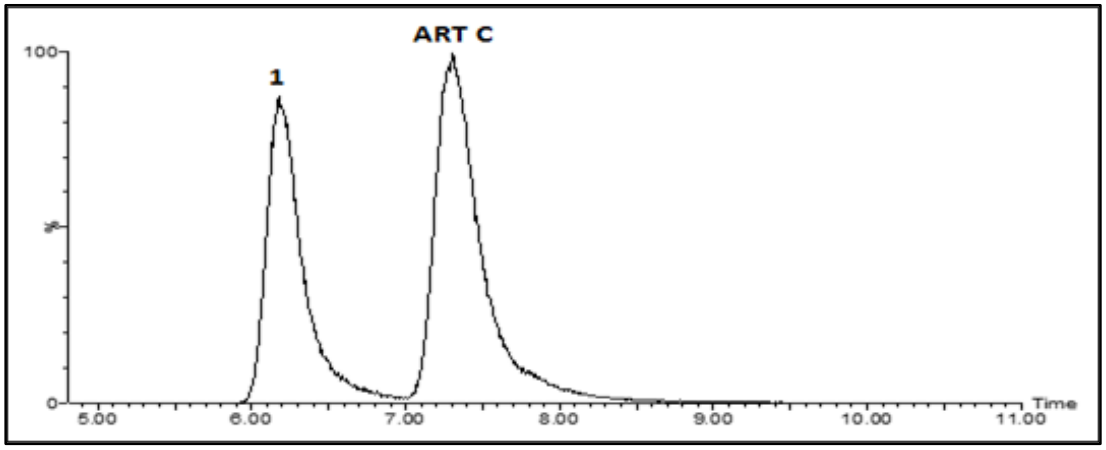

Figura 10. Cromatograma da análise do ART C no UHPLC-MS no modo SRM (*m/z* 299 > 255 para quantificação e *m/z* 299 > 285 para confirmação) – (1) produto de degradação da solução padrão do ART C. Condições analíticas na **Tabela 8**.

Como pode ser observado no cromatograma da **Figura 10**, foi identificado a presença de um interferente na análise, com tempo de retenção de 6,1 minutos, que possui a mesma *m/z* que o ART C e, também, as mesmas fragmentações selecionadas no modo SRM de detecção. Esse interferente, que também foi observado na análise por HPLC-DAD, conforme discuto **item 3.5,** é possivelmente um produto de degradação da solução padrão do ART C. Como esse interferente possui a mesma *m/z* e fragmentações do ART C é possível concluir que o mesmo é um isômero do mesmo, que é formado a partir da degradação do ART C na solução padrão do mesmo.

Após o desenvolvimento das duas metodologias analítica, HPLC-DAD e UHPLC-MS, optou-se por utilizar a primeira, pois apesar da metodologia de UHPLC-MS possuir maior seletividade e sensibilidade, também foi possível observar a presença do mesmo interferente na análise. A metodologia de HPLC-DAD desenvolvida cumpriu as exigências necessárias para as análises do estudo de metabolismo in vitro do ART C e, além disso, o equipamento para a execução da mesma era mais acessível e possuía maior disponibilidade de uso.

4.4. PREPARO DE AMOSTRA

A amostra em estudos de metabolismo in vitro é o meio microssomal, que é uma matriz biológica relativamente complexa; desta forma, foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia de preparo de amostra, para tornar a amostra compatível com a técnica de análise utilizada. A metodologia de preparo de amostra escolhida para ser utilizada nos estudos de metabolismo do ART C foi a extração líquido-líquido (ELL), que se baseia no equilíbrio de partição do analito entre duas fases imiscíveis.

A ELL apresenta como vantagens a sua simplicidade, a diversidade de solventes orgânicos puros disponíveis comercialmente, a possibilidade de pré-concentração da amostra e a capacidade de precipitar as proteínas presentes no meio microssomal (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001), o que a torna compatível com a análise por HPLC-DAD e MS. Porém, a ELL apresenta como desvantagens a baixa eficiência de extração para analitos com alta afinidade pela água, as impurezas presentes no solvente extrator podem ser concentradas com o analito e a toxicidade dos solventes orgânicos empregados (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A escolha adequada do solvente orgânico utilizado e o ajuste do pH da amostra são os fatores mais importantes a serem avaliados para se obter uma boa recuperação do analito. As características físico-químicas do analito devem, portanto, ser conhecidas para que as condições de extração sejam ajustadas. A

Tabela 9 apresenta algumas características físico-químicas do ART C (SCIFINDER WEB, 2015).

Tabela 9. Algumas características físico-químicas do ART C.

Parâmetro	Valor
pK_a	4,69 ± 0,10
log P	4,670 ± 0,391

Como o ART C é um composto ácido, o ajuste do pH da amostra para valores menores que o do seu pK_a, resulta em maiores valores de recuperação, pois nessa condição o ART C estará na sua forma protonada (molecular) favorecendo a partição do analito da fase aquosa para a fase orgânica. Dessa forma, o pH da amostra foi ajustado com a adição

de 200 µL de ácido clorídrico 0,1 mol L^{-1}, resultando em um pH da amostra de aproximadamente 3.

Como as amostras dos estudos de metabolismo são aquosas, um solvente orgânico com características apolares deve ser utilizado como solvente extrator. Os solventes orgânicos avaliados foram acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, hexano, hexano : isopropanol (50:50, v/v), hexano : isopropanol (75:25, v/v) e éter metil terc-butílico (**Figura 11**).

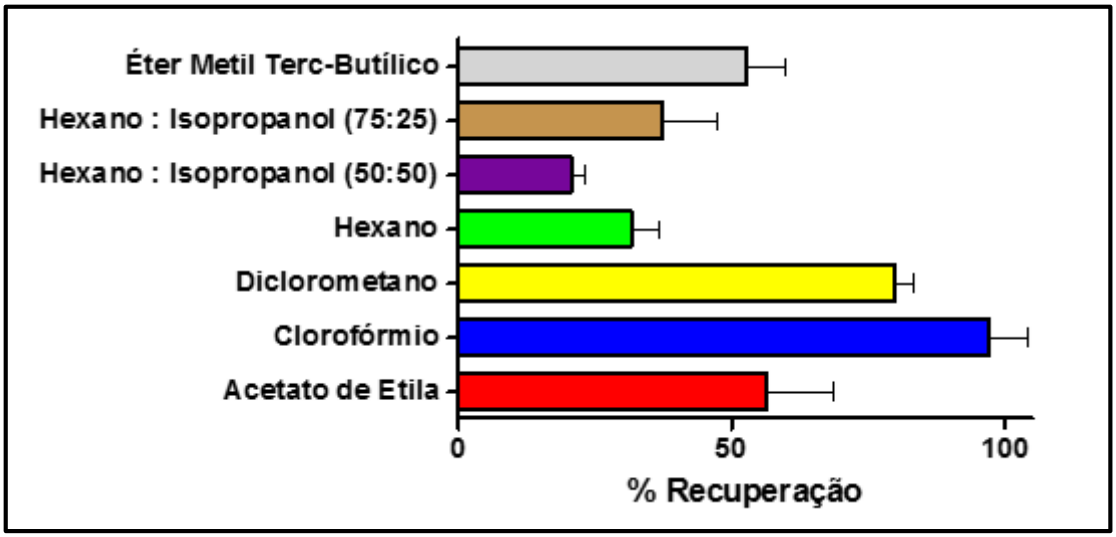

Figura 11. Avaliação do solvente extrator na ELL do ART C (n = 4).

Como pode ser observado na **Figura 11**, dentre os solventes orgânicos avaliados para a extração do ART C do meio microssomal, o clorofórmio foi o solvente extrator que apresentou o melhor valor de recuperação (~ 97%) e seletividade adequada para a análise das amostras microssomais.

A utilização da padronização interna é de extrema importância em métodos bioanalíticos de preparo de amostra visando a diminuição de erros experimentais. O padrão interno deve possuir características físico-químicas semelhantes ao analito de interesse, para que possa ser efetivamente extraído nas mesmas condições estabelecidas. Dessa forma, o diclofenaco de sódio, analito com característica ácida, pKa de 4,2 e Log P de 4,5, foi utilizado como PI para as análises do ART C em meio microssomal na concentração de 50 µg mL^{-1}. A **Tabela 10** apresenta as condições finais da ELL.

Tabela 10. Condições finais da ELL.

Parâmetro	Condição
Volume de amostra	200 µL
Volume de ácido clorídrico 0,1 mol L^{-1}	200 µL
PI (diclofenaco de sódio) (50 µg mL^{-1})	50 µL
Solvente extrator (volume)	Clorofórmio (1 mL)
Tempo de extração	15 minutos
Velocidade de agitação	1500 rpm
Centrifugação	1800 x g/ 10 minutos / 4°C
Volume de fase orgânica coletada	750 µL

A **Figura 12** ilustra os cromatogramas no HPLC-DAD da extração do ART C nas condições finais da ELL empregando microssomas hepáticos e o branco microssomal (sem adição do ART C), nos comprimentos de onda de 315 e 275 nm.

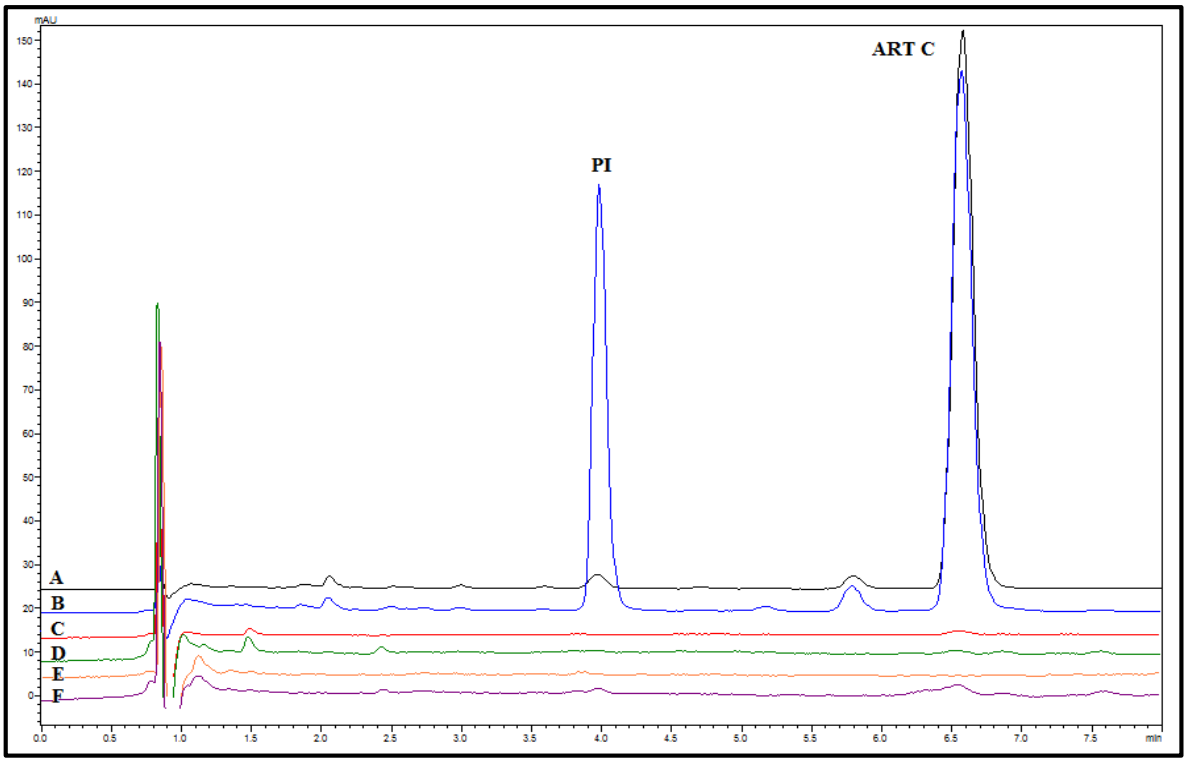

Figura 12. Cromatogramas no HPLC-DAD da extração do ART C nas condições finais da ELL empregando microssomas hepáticos de ratos (A) 315 nm (___), (B) 275 nm (___), o branco microssomal de ratos (C) 315 nm (___), (D) 275 nm (___) e o branco microssomal de humanos (E) 315 nm (___), (F) 275 nm (___). Condições analíticas na **Tabela 7**.

Como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 12**, a metodologia analítica de preparado de amostra desenvolvida cumpriu com os objetivos necessários para a realização dos estudos de metabolismo in vitro, tornando a amostra compatível com o sistema de análise (HPLC-DAD) com seletividade e recuperação adequadas.

4.4.1. RECUPERAÇÃO DA ELL

A recuperação da metodologia de preparo de amostra é a capacidade da mesma em extrair o analito da amostra que o contém. Foram avaliadas amostras em 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto) que foram comparadas com amostras brancas de meio microssomal fortificadas com o ART C após a extração.

Os valores de recuperação da extração obtidos foram de 94, 99 e 103% para a concentração baixa, média e alta, respectivamente, com desvios padrões relativos aceitáveis (menores que 15 %), o que indica que a metodologia de extração possui uma reprodutibilidade adequada.

Tabela 11. Recuperação da ELL (n = 3).

C_{NOM} (µM)	Rec (%)	DPR (%)
2,48	94	13
70,74	99	4
144,26	103	10

C_{NOM} – Concentração nominal
Rec – Recuperação
DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

4.5. ESTUDO DE SOLUBILIDADE

Durante o desenvolvimento de fármacos é importante avaliar a solubilidade do composto químico estudado, pois a baixa solubilidade do mesmo pode comprometer resultados em outros experimentos, afetando significativamente o desenvolvimento do mesmo como fármaco (ALSENZ; KANSY, 2007). A avaliação da solubilidade do ART C é um parâmetro fundamental a ser avaliado previamente a realização do estudo cinético de metabolismo in vitro. É necessário garantir que todo ART C adicionado ao meio

microssomal esteja disponível (solúvel) nas condições de incubação para a metabolização pelas enzimas da CYP450, para que os resultados obtidos sejam fidedignos.

Os resultados do estudo de solubilidade mostraram que a solução de ART C (166,45 µmol L^{-1}) em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) apresentou solubilidade de aproximadamente 90% em relação ao controle (metanol) (**Figura 13**). A análise estatística comprova que existem diferenças significativas ($p > 0,05$) na solubilidade do ART C em solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) e no controle, metanol.

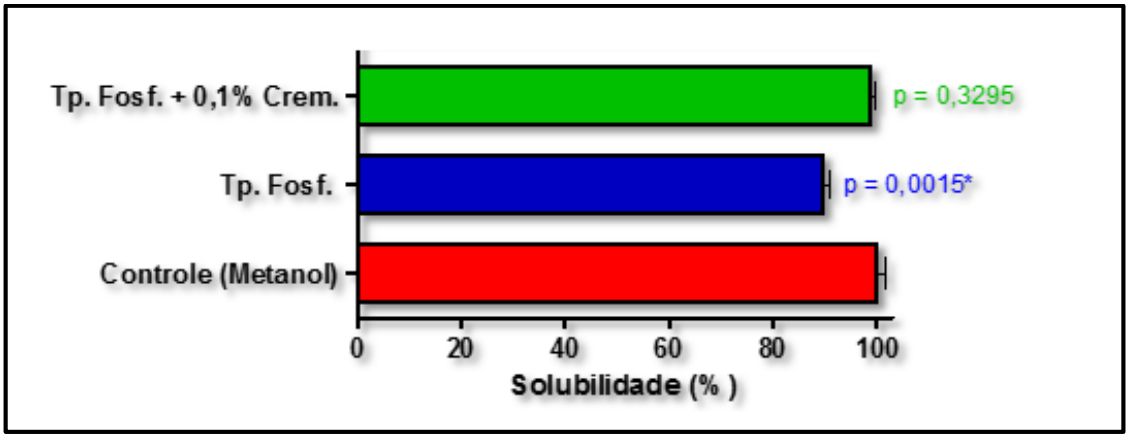

Figura 13. Avaliação da solubilidade do ART C (166,45 µmol L^{-1}) em solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}), solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) + 0,1% (m/v) Cremophor® e solução tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) + 0,1% (m/v) Cremophor® + 2% (v/v) acetonitrila ($p > 0,05$).

O uso de solventes orgânicos é muito empregado para aumentar a solubilidade de compostos químicos com baixa solubilidade. Porém, sabe-se que em estudos de metabolismo in vitro, o emprego de solventes orgânicos pode interferir prejudicialmente na atividade enzimática das enzimas da CYP450, influenciando significativamente nos resultados obtidos (LI et al., 2010). Visando aumentar a solubilidade do ART C no meio microssomal, sem prejudicar a atividade das enzimas da CYP450 optou-se pela utilização de tensoativos no meio microssomal.

Randall, Cheng e Kotchevar (2011) reportaram que a adição de Cremophor®, um agente solubilizante, em meio microssomal até a concentração de 0,25% (m/v) não causa prejuízo a atividade das enzimas da CYP450 e, portanto, não afeta o metabolismo do ART C. Dessa forma, avaliou-se a adição de 0,1% (m/v) de Cremophor® ao meio microssomal e os resultados obtidos foram satisfatórios, com o ART C possuindo 100% de solubilidade

no meio microssomal com 0,1% de Cremophor® (**Figura 13**). A análise estatística comprovou que não existem diferenças significativas em relação ao controle ($p > 0,05$).

4.6. ESTUDO PRÉVIO DE ESTABILIDADE

É necessário garantir que o ART C seja estável nas condições de incubação e metabolismo, para garantir que qualquer decaimento da concentração do substrato avaliado seja ocasionado pela atividade enzimática das enzimas da CYP450. Para isso, o estudo da estabilidade foi realizado em concentrações de 14,15 µmol L^{-1} e 144,26 µmol L^{-1} de ART C, sem a adição do cofator NADPH. A **Figura 14** apresenta os resultados obtidos no estudo prévio de estabilidade do ART C nas condições de incubação.

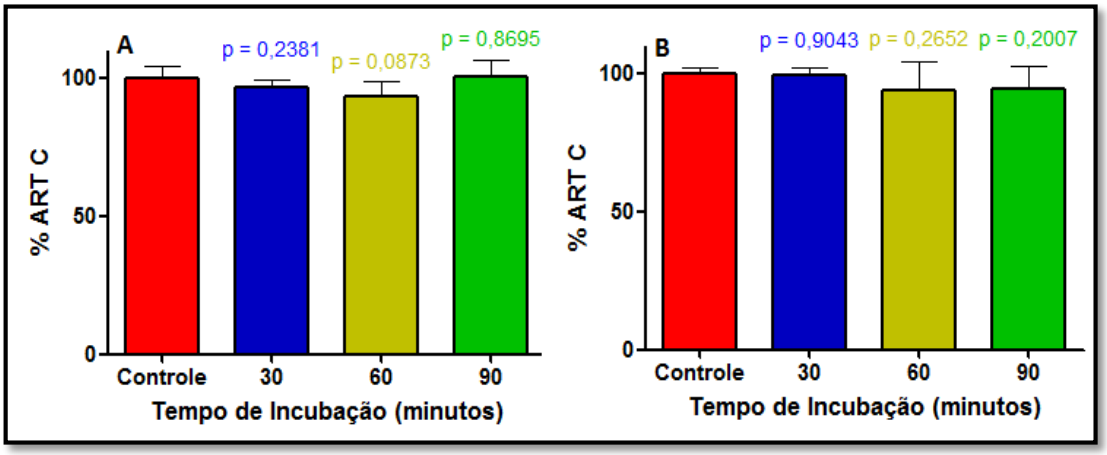

Figura 14. Avaliação da estabilidade do ART C nas condições de incubação nos tempos de 30, 60 e 90 minutos, A) 144,26 µmol L^{-1} e B) 14,15 µmol L^{-1} ($p > 0,05$). Temperatura de incubação: 37°C.

Os resultados obtidos mostraram que não ocorreu nenhuma variação significativa (comprovado por análises estatísticas, $p > 0,05$) na concentração do ART C, quando submetido as condições de incubação por até 90 minutos em ambas as concentrações avaliadas. Esse resultado assegura que o ART C é estável nas condições de incubação e que, portanto, qualquer diminuição da concentração do mesmo durante os estudos de metabolismo in vitro é oriunda da atividade das enzimas da CYP450. Durante a etapa de validação analítica a estabilidade do ART C nas condições de incubação será um dos parâmetros avaliados (**item 3.12.5.1**).

4.7. ESTUDO PRÉVIO DO METABOLISMO IN VITRO

Um estudo prévio de metabolismo in vitro do ART C foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade das enzimas da CYP450 presentes em microssomas hepáticos de ratos e/ou de humanos em metabolizar o ART C e, possivelmente formar algum metabólito do mesmo. É importante avaliar previamente o metabolismo in vitro de um substrato antes da execução de estudos de determinação de parâmetros cinéticos enzimáticos e de identificação de metabólitos formados, para garantir que as condições de incubação estão corretamente definidas. A concentração proteica utilizada foi de 1,00 mg mL^{-1} e o tempo de incubação foi de 60 minutos para ambas as espécies.

A **Figura 15** apresenta os cromatogramas dos estudos de metabolismo in vitro do ART C, na concentração de 144,26 µmol L^{-1}, empregando microssomas hepáticos de ratos, assim como o branco microssomal e o respectivo controle.

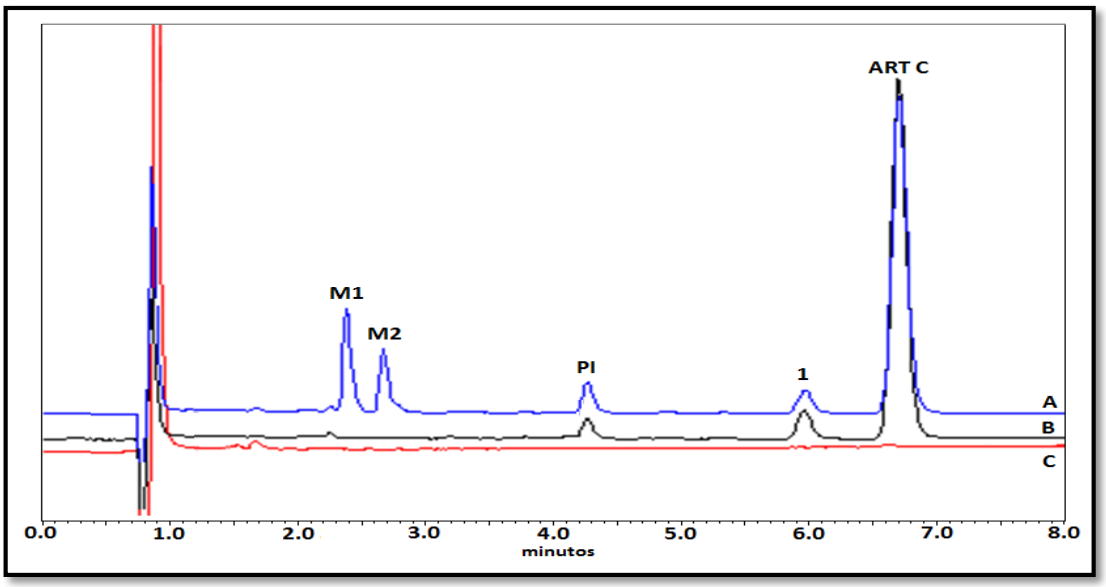

Figura 15. Cromatogramas do estudo prévio de metabolismo do ART C (144,26 µmol L^{-1}) empregando microssomas hepáticos de ratos - (A) Metabolismo (___); (B) Controle, sem a adição de NADPH (___); (C) Branco, sem a adição do ART C (___) – (M1) possível metabólito 1; (M2) possível metabólito 2; (1) produto de degradação da solução padrão do ART C. Condições analíticas na **Tabela 7**.

A **Figura 16** apresenta os cromatogramas dos estudos de metabolismo in vitro do ART C, na concentração de 144,26 µmol L^{-1}, empregando microssomas hepáticos de humanos assim como o branco microssomal e o respectivo controle.

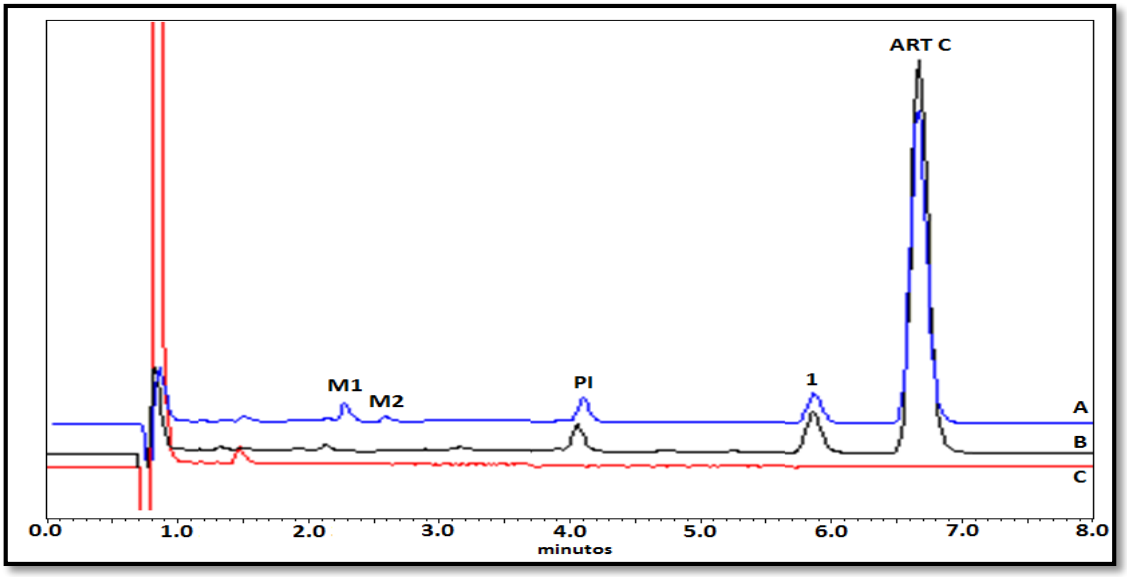

Figura 16. Cromatogramas do estudo prévio de metabolismo do ART C (144,26 µmol L^{-1}) empregando microssomas hepáticos de humanos - (A) Metabolismo (___); (B) Controle, sem a adição de NADPH (___); (C) Branco, sem a adição do ART C (___) – (M1) possível metabólito 1; (M2) possível metabólito 2; (1) produto de degradação da solução padrão do ART C. Condições analíticas na **Tabela 7**.

A **Tabela 12** apresenta as porcentagens de metabolização do ART C nas concentrações de 14,15 µmol L^{-1} e 144,26 µmol L^{-1} empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos. Os controles foram considerados como 0% de metabolismo do ART C.

Tabela 12. Porcentagem de metabolização do ART C (n = 3).

Microssomas Hepáticos	**Concentração do ART C (µmol L^{-1})**	
	14,15	**144,26**
Ratos	26 ± 1 %	40 ± 1 %
Humanos	10 ± 2 %	24 ± 1 %

Comparando-se os respectivos com os controles, as enzimas da CYP450 presentes nos microssomas hepáticos de ratos foram capazes de metabolizar o ART C em uma maior intensidade, em comparação com as enzimas da CYP450 presentes nos microssomas hepáticos de humanos. Além disso, foi observada a formação de ao menos dois possíveis metabólitos (M1 e M2) do ART C em ambas as espécies avaliadas. O tempo de retenção de M1 foi de 2,4 minutos e o de M2 foi de 2,7 minutos. Como os possíveis metabólitos do ART C formados possuem tempo de retenção menor do que o ART C e, além disso, a

metodologia de análise empregada foi a cromatografia líquida de eficiência no modo fase reversa, pode-se concluir que ambos os metabólitos formados são mais polares do que o ART C, como esperado.

O estudo preliminar de metabolismo in vitro do ART C provou que o emprego de microssomas hepáticos de ratos e de humanos são modelos viáveis para o estudo de metabolismo do ART C, possuindo potencial para serem utilizados na determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos e na identificação dos possíveis metabólitos formados.

4.8. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação analítica é uma etapa essencial no desenvolvimento da metodologia analítica desenvolvida, pois é importante garantir que o método desenvolvido seja adequado ao estudo proposto (BONFILIO et al., 2012). Como não existe um guia de validação analítica para estudos de metabolismo in vitro, a metodologia analítica de análise do ART C em microssomas hepáticos foi validada de acordo com o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos (*Guideline on bioanalytical method validation*) do *European Medicines Agency* (EMA, 2011) e o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Os parâmetros avaliados foram seletividade, efeito residual, linearidade, limite inferior de quantificação, precisão e exatidão intra- e interdia, recuperação e estabilidade.

A metodologia analítica foi validada empregando microssomas hepáticos de ratos. Em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, os *slopes* das curvas analíticas em meio microssomal de ratos e de humanos não apresentaram diferenças significativas e, dessa forma, é mais viável a utilização de microssomas hepáticos de ratos para a validação da metodologia analítica.

4.8.1. SELETIVIDADE

A seletividade adequada da metodologia analítica é de suma importância para se obter resultados confiáveis, pois garante que a matriz não possui nenhum componente endógeno que possa ser um interferente na análise do ART C e do PI (EMA, 2014). Como pode-se observar na **Figura 17**, a metodologia analítica desenvolvida se mostrou seletiva, já que não foi observada a presença de nenhum interferente oriundo da matriz (meio microssomal) no mesmo tempo de retenção que o do ART C ou o do PI.

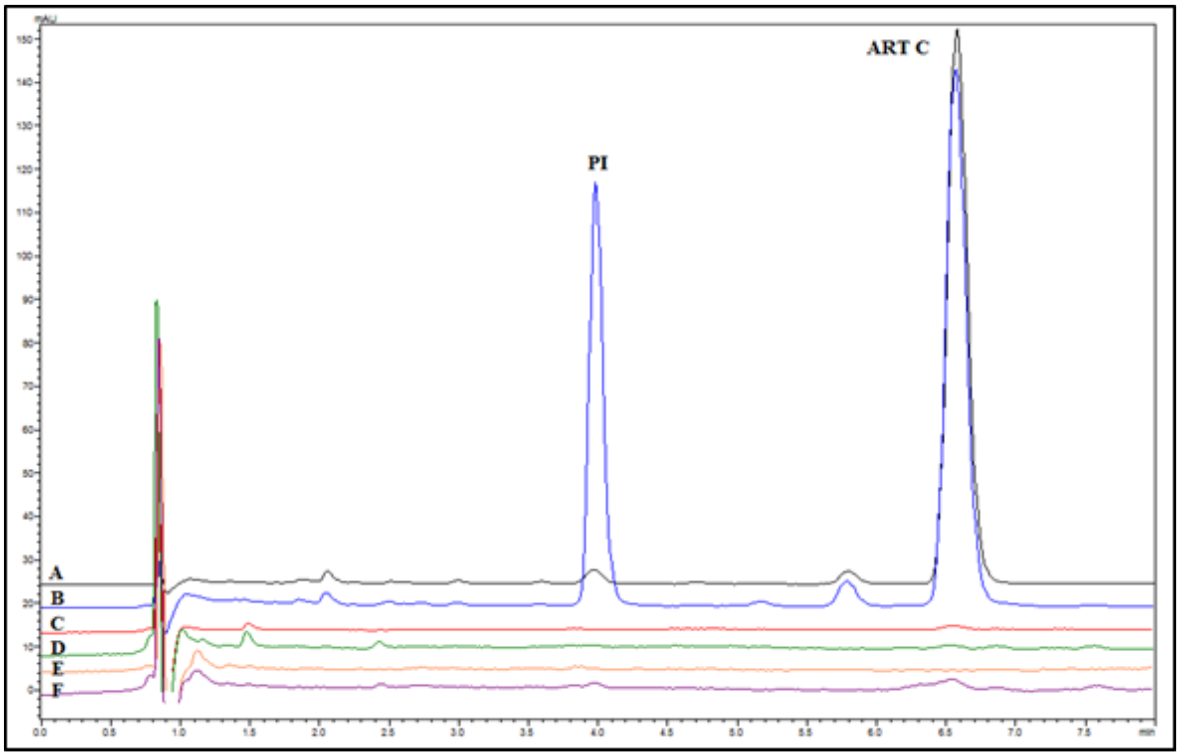

Figura 17. Seletividade da metodologia analítica – Cromatogramas no HPLC-DAD da extração do ART C nas condições finais da ELL empregando microssomas hepáticos de ratos (A) 315 nm (___), (B) 275 nm (___), o branco microssomal de ratos (C) 315 nm (___), (D) 275 nm (___) e o branco microssomal de humanos (E) 315 nm (___), (F) 275 nm (___). Condições analíticas na **Tabela 7**.

4.8.2. LINEARIDADE E EFEITO RESIDUAL

A linearidade da metodologia analítica é a capacidade da mesma em fornecer, dentro de um determinado intervalo, resultados diretamente proporcionais ou proporcionais de acordo com transformações matemáticas à concentração nominal do analito na amostra (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARLA-BROCH, 2012).

O intervalo avaliado na metodologia analítica desenvolvida foi de 0,68 – 166,45 µmol L^{-1}. Realizando-se a regressão linear, empregando o método dos mínimos quadrados sem ponderação, não foi possível assegurar a linearidade da metodologia, pois não foi possível assegurar exatidão (ER % > 15%) adequada para todas as concentrações avaliadas.

Almeida, Castel-Branco e Falcão (2002) mostraram que na validação de métodos bioanalíticos a utilização de ponderação para a análise da regressão linear é uma ferramenta importante que pode ser utilizada para garantir a linearidade da metodologia desenvolvida. Sendo assim, foram realizadas regressões lineares com ponderações de diferentes pesos 1/x, $1/x^2$ e $1/x^{1/2}$. A ponderação com peso de 1/x foi a que apresentou os

resultados mais satisfatórios (menor ∑ER %), sendo que os resultados se encontram dentro dos valores especificados pelos guias de validação, com precisão (DPR %) e exatidão (ER %) de ± 15% e coeficiente de correlação maior (r) que 0,99 (**Tabela 13**) (ANVISA, 2012; EMA, 2011), comprovando que a metodologia analítica apresenta linearidade adequada para a quantificação do ART C nos estudos de metabolismo in vitro.

Tabela 13. Linearidade (n = 5).

Analito	Intervalo (µM)	Equação linear	r
Artepelin C	0,68 – 166,45	y = 0,0312 x – 0,0149	0,9991
	Conc. ART C (µM)	**ER (%)**	**DPR (%)**
	0,68	-3	12
	2,48	-1	14
	19,70	2	9
	70,74	2	3
	144,26	0	5
	166,45	-1	4

r – coeficiente de correlação

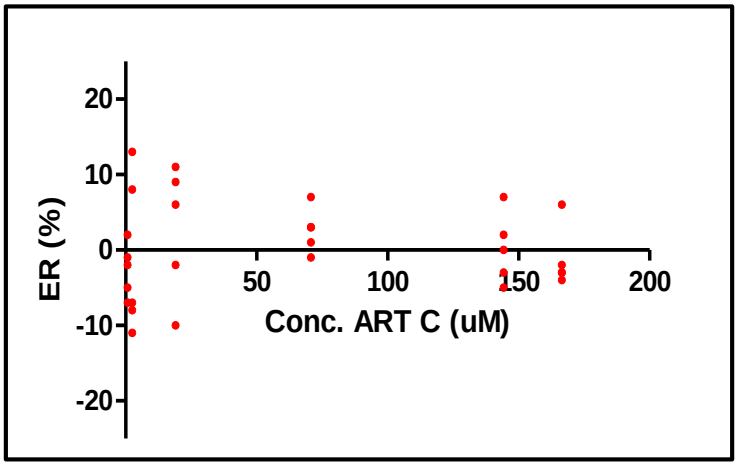

Figura 18. Erro relativo percentual (ER %) vs Conc. ART C, utilizando a regressão linear com ponderação 1/x.

Para o teste de validade da regressão o valor de F calculado foi maior que o valor crítico (2,62) e o valor de p menor que 0,05 (α = 0,05%), comprovando a validade da regressão. Para o teste de falta de ajuste, o valor de F calculado foi menor que o valor

crítico (2,62) e o valor de p maior que 0,05 (α = 0,05%), comprovando a ausência de falta de ajuste.

Tabela 14. Análise da validade da regressão e da falta de ajusta (ANOVA).

Analito	Validade da regressão		Falta de ajuste	
	Valor de F	Valor de p	Valor de F	Valor de p
Artepelin C	14357,45	0,00	0,70	0,63

A metodologia analítica desenvolvida não apresentou efeito residual (*carry over*). As amostras brancas analisadas anteriormente e posteriormente à análise de uma amostra do LSQ não apresentaram a presença do ART C e do PI. Dessa maneira, garante-se que em uma batelada de análises não há interferência nenhuma da análise anterior na subsequente (EMA, 2014).

4.8.3. LIMITE INFERIOR DE QUANTIFICAÇÃO

O limite inferior de quantificação (LIQ) de uma metodologia analítica é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARLA-BROCH, 2012).

A metodologia bioanalítica desenvolvida permite a quantificação mínima de 0,68 µmol L^{-1} de ART C em meio microssomal, com erro relativo percentual (ER %) de –3% e desvio padrão relativo percentual (DPR %) de 12%, ou seja, com valores de exatidão e precisão aceitáveis para o LIQ de um método bioanalíticos (ER e DPR ± 20%) (ANVISA, 2012; EMA, 2011).

4.8.4. PRECISÃO E EXATIDÃO

A precisão de uma metodologia é a proximidade do resultado obtido em uma série de análises realizadas da mesma amostra, ela pode ser expressa como desvio padrão relativo percentual (DPR %). A exatidão de uma metodologia é a proximidade do valor de concentração encontrado na análise e o valor real da concentração do analito na amostra, e pode ser expressa como erro relativo percentual (ER %) (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARLA-BROCH, 2012).

A precisão e exatidão da metodologia bioanalítica foram avaliadas em 4 níveis de concentração do ART C (LIQ, CQB, CQM e CQA). Nos experimentos intraensaio (**Tabela 15**) os valores de precisão e exatidão obtidos se encontram dentro dos valores máximos aceitáveis pela legislação (± 20% para o LIQ e ± 15% para as outras concentrações) (ANVISA, 2012; EMA, 2011).

Tabela 15. Precisão e exatidão intraensaio (n = 5).

Amostras	C_{NOM} (µM)	C_{EXP} (µM)	ER (%)	DPR (%)
LIQ	0,68	0,66	-3	12
CQB	2,48	2,46	-1	14
CQM	70,74	72,51	2	3
CQA	144,26	144,36	0,1	5

C_{NOM} – Concentração nominal
C_{EXP} – Concentração experimental
ER (%) – Erro relativo percentual
DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

Nos experimentos interensaio (**Tabela 16**) os valores de precisão e exatidão obtidos, também se encontram dentro dos valores máximos aceitáveis pela legislação (± 20% para o LIQ e ± 15% para as outras concentrações) (ANVISA, 2012; EMA, 2011).

Tabela 16. Precisão e exatidão interensaio (n = 15).

Amostras	C_{NOM} (µM)	C_{EXP} (µM)	ER (%)	DPR (%)
LIQ	0,68	0,70	3	6
CQB	2,48	2,50	1	10
CQM	70,74	71,43	1	4
CQA	144,26	146,79	2	6

C_{NOM} – Concentração nominal
C_{EXP} – Concentração experimental
ER (%) – Erro relativo percentual
DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

Dessa forma, pode-se concluir que a metodologia analítica desenvolvida possui precisão e exatidão intra- e interensaio aceitáveis para que possam ser realizados estudos quantitativos de metabolismo in vitro do ART C.

4.8.5. ESTABILIDADE

O analito de interesse em uma amostra pode se degradar anteriormente a execução da análise, devido as condições a que é submetido durante o experimento e a execução da metodologia desenvolvida para a sua análise (RAMBLA-ALEGRE; ESTEVE-ROMERO; CARLA-BROCH, 2012). Portanto, é necessário garantir a estabilidade do ART C nas condições que é submetido nos estudos de metabolismo in vitro e durante o procedimento de análise das amostras. A estabilidade do ART C foi avaliada em situações reais da rotina laboratorial, na análise de amostras de forma a garantir a veracidade dos resultados. As condições avaliadas foram: nas condições de incubação durante o estudo de metabolismo in vitro, no auto-injetor por 24 horas e na exposição a luz.

4.8.5.1. CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

Para a avaliação da estabilidade do ART C nas condições de incubação durante o estudo de metabolismo in vitro, as amostras (2 níveis de concentração – CQB e CQA) foram deixadas em banho-maria a 37°C por 50 minutos. Com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia, as amostras de estabilidade foram quantificadas e os resultados obtidos (**Tabela 17**) comprovaram a estabilidade do ART nas condições de incubação durante os estudos de metabolismo in vitro. Dessa forma, pode-se concluir que a diminuição da concentração do ART C nas amostras durante os estudos de metabolismo in vitro ocorrem devido a atividade das enzimas da CYP450.

Tabela 17. Estabilidade nas condições de incubação (n = 5).

Amostras	C_{NOM} (µM)	C_{EXP} (µM)	ER (%)	DPR (%)
CQB	2,48	2,51	1	8
CQA	144,26	153,84	7	1

C_{NOM} – Concentração nominal
C_{EXP} – Concentração experimental
ER (%) – Erro relativo percentual
DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

4.8.5.2. AUTO-INJETOR POR 24 HORAS

Para a avaliação da estabilidade do ART C no auto-injetor por 24 horas, as amostras (2 níveis de concentração – CQB e CQA) foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra e acondicionadas no auto-injetor do equipamento; posteriormente, após 24 horas as mesmas foram analisadas no HPLC-DAD. Com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia, as amostras de estabilidade foram quantificadas e os resultados obtidos comprovaram a estabilidade do ART no auto-injetor por 24 horas (**Tabela 18**). Portanto, conclui-se que é possível deixar as amostras no auto-injetor por até 24 horas sem que haja prejuízo nos resultados obtidos.

Tabela 18. Estabilidade no auto-injetor por 24 horas (n = 5).

Amostras	C_{NOM} (µM)	C_{EXP} (µM)	ER (%)	DPR (%)
CQB	2,48	2,47	–0,2	8
CQA	144,26	144,66	0,3	2

C_{NOM} – Concentração nominal
C_{EXP} – Concentração experimental
ER (%) – Erro relativo percentual
DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

4.8.5.3. EXPOSIÇÃO À LUZ

Para a avaliação da estabilidade do ART C a exposição à luz, as amostras (2 níveis de concentração – CQB e CQA) foram preparadas em tubos de vidro transparentes (tempo de preparo de aproximadamente 30 minutos) e submetidas à metodologia de análise. Com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia em tubos âmbar, as amostras de estabilidade foram quantificadas. Como pode ser observado na **Tabela 19** o ART C não se mostrou estável a exposição à luz, o que se comprova pelos erros relativos fora do limite aceitável (ANVISA, 2012; EMA, 2011) e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Portanto, pode-se concluir que as amostras não podem ser submetidas a exposição à luz, já que o ART C não é estável à essa condição, sendo, portanto, necessário a utilização de tubos de vidro âmbar para a execução dos experimentos, para que a veracidade dos resultados obtidos seja assegurada.

Tabela 19. Estabilidade na exposição à luz (n = 5).

Amostras	C_{NOM} (µM)	C_{EXP} (µM)	ER (%)	DPR (%)
CQB	2,48	1,88	–24	6
CQA	144,26	122,69	–15	5

C_{NOM} – Concentração nominal
C_{EXP} – Concentração experimental
ER (%) – Erro relativo percentual
DPR (%) – Desvio padrão relativo percentual

4.9. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE METABOLISMO

Após a validação da metodologia analítica, iniciaram-se os estudos visando a determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos do ART C empregando os modelos microssomais hepáticos de ratos e de humanos. Como discutido no **item 1.3.2**, em estudos cinéticos enzimáticos é necessário assegurar que a velocidade medida seja a velocidade inicial da reação enzimática (V_0), correspondente ao estado estacionário em que a concentração do substrato [S] diminuirá linearmente em relação a concentração proteica microssomal e ao tempo de incubação (NELSON; COX, 2004). Na maioria dos estudos cinéticos enzimáticos, assume-se que na condição máxima de 10% de depleção da concentração do substrato avaliado, a velocidade medida é a V_0 (BEZERRA; FRAGA; DIAS, 2013).

4.9.1. MICROSSOMAS HEPÁTICO DE RATOS

Inicialmente, foram determinadas as condições de V_0 para os microssomas hepático de ratos. Foram avaliadas 3 concentrações de ART C no meio microssomal 0,50 (baixa); 19,97 (média) e 69,91 µM (alta), com o intuito de investigar se é possível atender a condição de V_0 em todas as concentrações utilizadas na determinação dos parâmetros cinéticos do ART C. Os parâmetros concentração proteica microssomal e tempo de incubação foram avaliados independentemente para a determinação das condições de V_0.

4.9.1.1. CONCENTRAÇÃO PROTEICA

A concentração proteica microssomal foi o primeiro parâmetro avaliado para garantir as condições de V_0 do ART C. Optou-se, primeiramente, por avaliar a

concentração proteica e, posteriormente, o tempo de incubação. A concentração proteica foi avaliada primeiramente, pois utilizando-se menor concentração proteica microssomal possível no estudo de metabolismo, a quantidade de microssomas hepáticos utilizada será menor e, consequentemente, o custo do estudo também. Para a avaliação da concentração proteica, fixou-se o tempo de incubação em 30 minutos e a mesma foi avaliado no intervalo de 0,10 – 1,00 mg mL^{-1}.

A **Figura 19** apresenta os resultados obtidos na avaliação da concentração proteica empregada para a concentração baixa de ART C (0,50 µM).

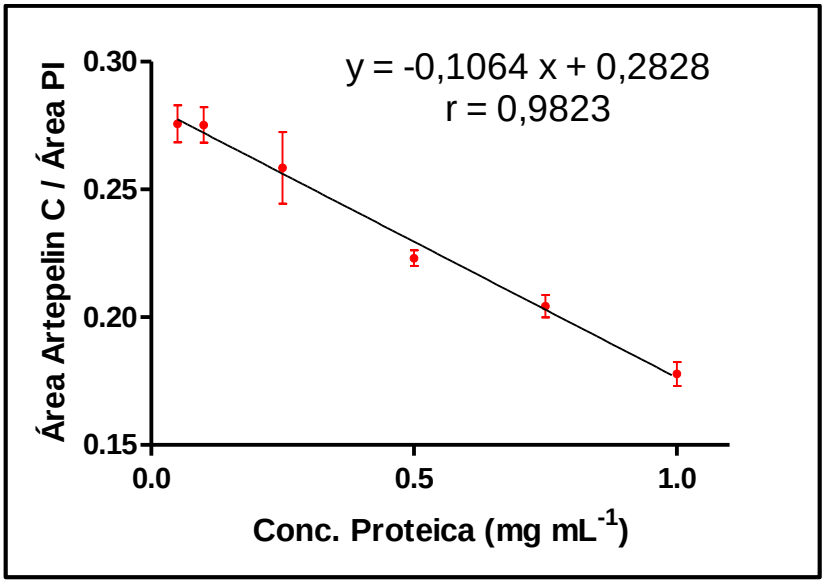

Figura 19. Avaliação da depleção do ART C (0,50 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de ratos. Tempo de incubação: 30 min (n = 3)

Como pode ser observado (**Figura 19**), para a concentração de 0,50 µM de ART C, no intervalo de concentração proteica avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,9823. Dessa forma, utilizando-se a equação obtida e considerando-se a relação da área do ART C pela área do PI no controle (sem a adição de NADPH) como 0% de depleção do substrato, determinou-se a concentração proteica de 0,43 mg mL^{-1}, a responsável pela depleção de 10% ART C.

A **Figura 20** apresenta os resultados obtidos na avaliação da concentração proteica empregada para a concentração média de ART C (19,97 µM). Como pode ser observado, para a concentração de 19,97 µM de ART C, no intervalo de concentração proteica avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,9055. Dessa forma, da mesma forma como descrito anteriormente, determinou-se a concentração proteica de 0,51 mg mL^{-1}, a responsável pela depleção de 10% do ART C. Por fim, a

Figura 21 apresenta os resultados obtidos na avaliação da concentração proteica empregada para a concentração alta de ART C (69,91 µM). Nesse caso, a concentração proteica de 0,26 mg mL^{-1}, correspondeu a depleção de 10% do ART C.

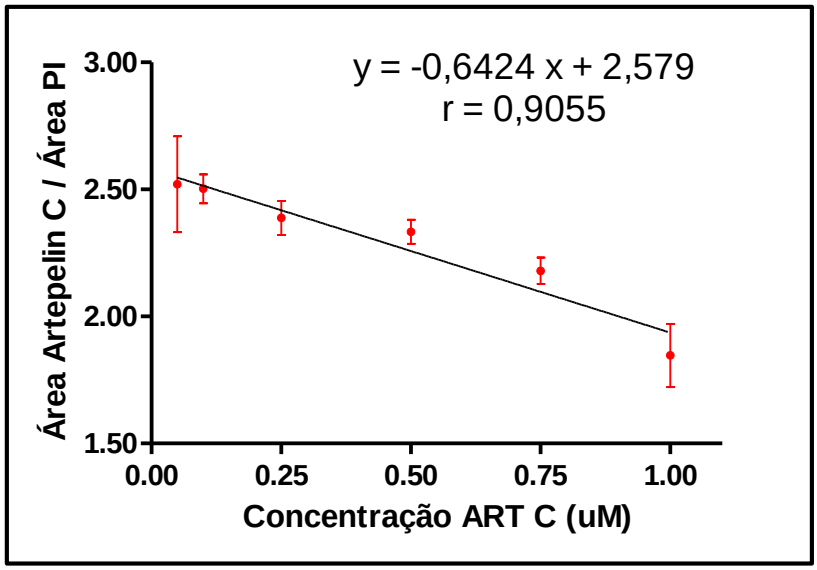

Figura 20. Avaliação da depleção do ART C (19,97 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de ratos. Tempo de incubação: 30 min (n = 3).

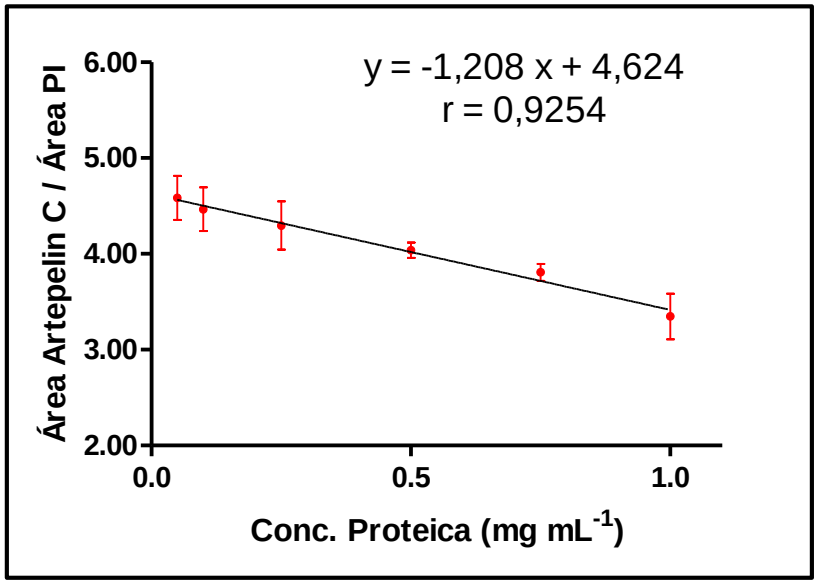

Figura 21. Avaliação da depleção do ART C (69,91 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de ratos. Tempo de incubação: 30 min (n = 3).

A **Tabela 20** apresenta as concentrações proteicas correspondentes a depleção de 10% do ART C no tempo de incubação de 30 minutos, empregando microssomas hepáticos de ratos, nas 3 concentrações de ART C avaliadas.

Tabela 20. Avaliação da concentração proteica correspondente a depleção de 10% do ART C no tempo de incubação de 30 minutos, empregando microssomas hepáticos de ratos.

Conc. ART C (µM)	Conc. Proteica (mg mL^{-1})
0,50	0,43
19,97	0,51
69,91	0,26

Analisando a **Tabela 20** é possível observar que a concentração proteica, correspondente a depleção de 10% da concentração do ART C, em cada concentração de ART C avaliada não é a mesma. Com o intuito de utilizar a mesma concentração proteica para todas as concentrações de ART C utilizadas no estudo de cinética enzimática optou-se por definir a concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1}, como a adequada para os estudos, visto que apesar desse valor corresponder a uma depleção de substrato maior do que 10% para a concentração baixa e alta de ART C, essa concentração proteica se encontra dentro do intervalo linear de depleção do substrato, para todas as concentrações de ART C avaliadas e, dessa forma a velocidade da reação enzimática que será medida corresponderá a V_0.

4.9.1.2. TEMPO DE INCUBAÇÃO

Otimizada a concentração proteica que será utilizada nos estudos de cinética enzimática, partiu-se para a avaliação do parâmetro tempo de incubação. O tempo de incubação também deve apresentar relação linear com a depleção do substrato, de forma a assegurar que a velocidade medida é a V_0. A utilização de um tempo de incubação razoável é necessária para diminuir os erros causados por pequenas variações no mesmo. Para a avaliação do tempo de incubação, fixou-se a concentração proteica em 0,50 mg mL^{-1} (conforme determinado no **item 4.9.1.1**) e o mesmo foi variado no intervalo de 0 – 50 minutos.

A **Figura 22** apresenta os resultados obtidos na avaliação do tempo de incubação empregado para a concentração baixa de ART C (0,50 µM). Como pode ser observado para a concentração de 0,50 µM de ART C, no intervalo de tempo de incubação avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,9736. Dessa

forma como descrito anteriormente, determinou-se o tempo de incubação de 15 min, correspondente a depleção de 10% do ART C.

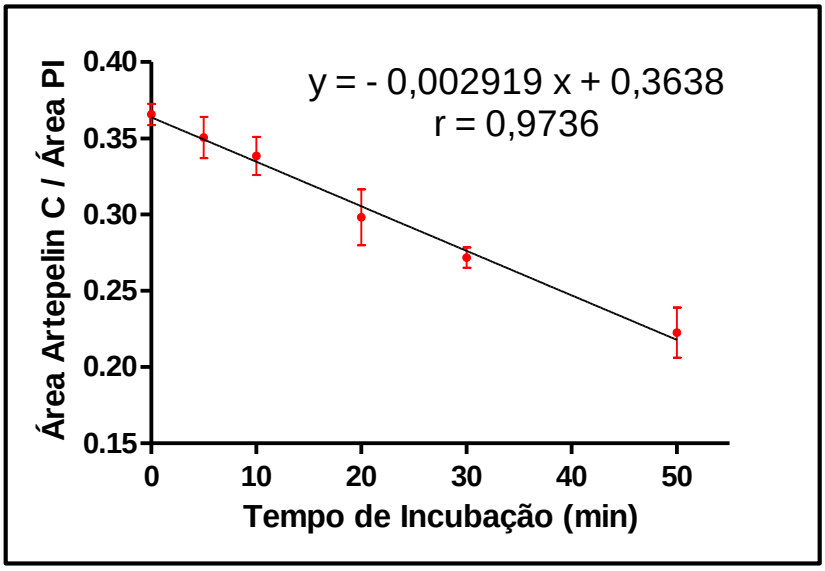

Figura 22. Avaliação da depleção do ART C (0,50 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de ratos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3).

As **Figura 23** e **24** apresentam os resultados obtidos na avaliação do tempo de incubação empregado para a concentração média de ART C (19,97 µM) e alta (69,91 µM), respectivamente. Como pode ser observado na **Figura 23**, para a concentração de 19,97 µM de ART C, no intervalo de tempo de incubação avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,8933 e o tempo de incubação responsável pela depleção de 10% do ART C foi de 26 min. Já para a concentração de 69,91 µM de ART C (**Figura 24**), no intervalo de tempo de incubação avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,8794 e 30 min de tempo de incubação foi determinado como correspondente a depleção de 10% do ART C do meio microssomal.

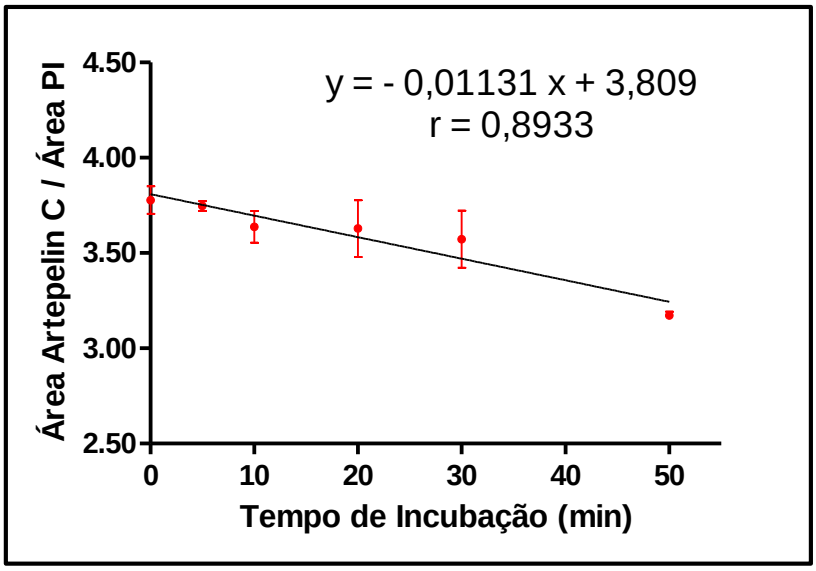

Figura 23. Avaliação da depleção do ART C (19,97 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de ratos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3).

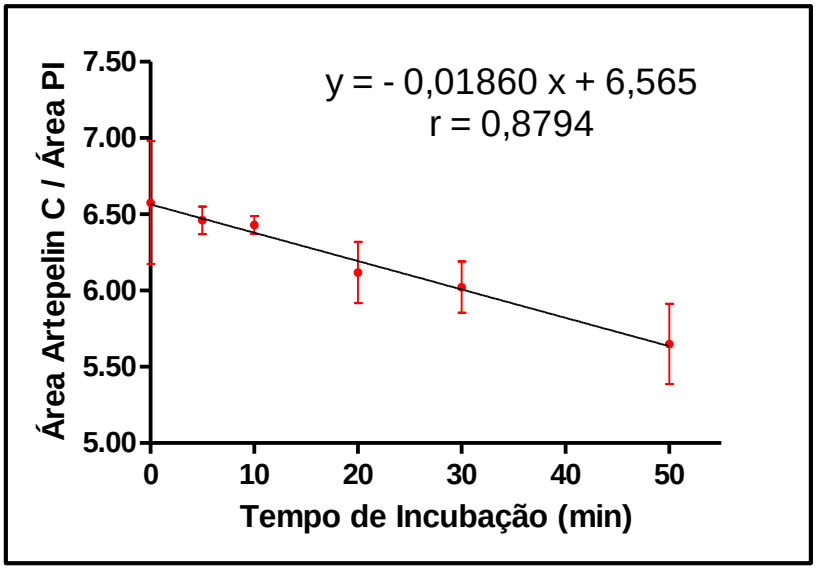

Figura 24. Avaliação da depleção do ART C (69,91 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de ratos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3).

A **Tabela 21** apresenta os tempos de incubação correspondentes a depleção de 10% do ART C na concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1}, empregando microssomas hepáticos de ratos, nas 3 concentrações de ART C avaliadas.

Tabela 21. Avaliação do tempo de incubação correspondente a depleção de 10% do ART C na concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1}, empregando microssomas hepáticos de ratos.

Conc. ART C (µM)	Tempo de Incubação (min)
0,50	15
19,97	26
69,91	30

Analisando a **Tabela 21** é possível observar que o tempo de incubação, correspondente a depleção de 10% da concentração do ART C, em cada concentração de ART C avaliada não é o mesmo. Da mesma forma descrita para a otimização da concentração proteica, optou-se por definir o tempo de incubação de 30 min, como o adequado para os estudos cinéticos enzimáticos, visto que apesar desse valor corresponder a uma depleção de substrato maior do que 10% para a concentração baixa e média de ART C, esse tempo de incubação se encontra dentro do intervalo linear de depleção do substrato, para todas as concentrações de ART C avaliadas e, dessa forma a velocidade da reação enzimática que será medida corresponderá a V_0.

Portanto, os parâmetros de concentração proteica e tempo de incubação determinados que serão utilizados no estudo de cinética enzimática do ART C empregando o modelo de microssomas hepático de ratos, são 0,50 mg mL^{-1} e 30 minutos, respectivamente.

4.9.2. MICROSSOMAS HEPÁTICO HUMANOS

Para a otimização das condições de incubação empregando o modelo de microssomas hepáticos de humanos avaliaram-se os parâmetros concentração proteica e tempo de incubação, da mesma forma descrita no **item 4.9.1**.

4.9.2.1. CONCENTRAÇÃO PROTEICA

A concentração proteica microssomal avaliada primeiramente. Dessa forma, fixou-se o tempo de incubação em 40 minutos e a mesma foi avaliado no intervalo de 0,10 – 1,00 mg mL^{-1}.

A **Figura 25** apresenta os resultados obtidos na avaliação da concentração proteica empregada para a concentração baixa de ART C (0,50 µM).

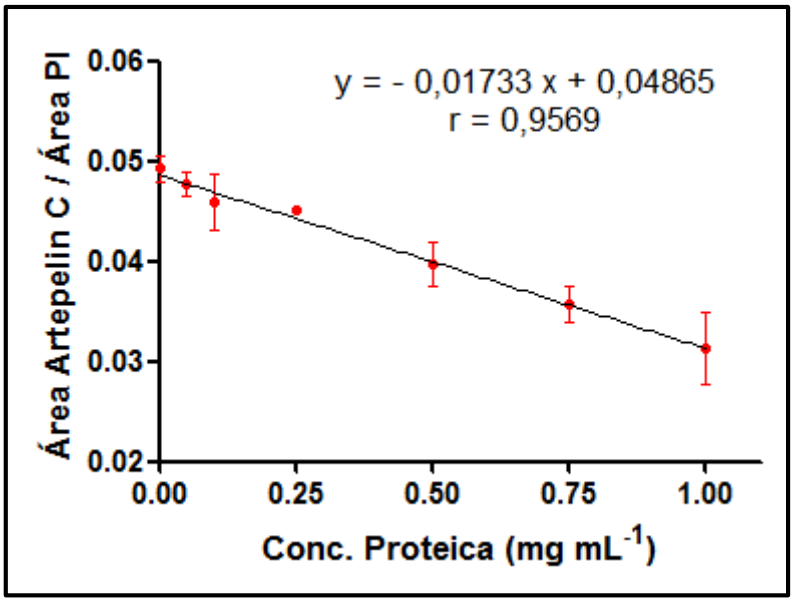

Figura 25. Avaliação da depleção do ART C (0,50 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de humanos. Tempo de incubação: 40 min (n = 3).

Como pode ser observado (**Figura 25**), para a concentração de 0,50 µM de ART C, no intervalo de concentração proteica avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,9569. Dessa forma, utilizando-se a equação obtida e considerando-se a relação da área do ART C pela área do PI no controle (sem a adição de NADPH) como 0% de depleção do substrato, determinou-se a concentração proteica de 0,42 mg mL^{-1}, a responsável pela depleção de 10% do ART C.

As **Figura 26** e **27** apresentam os resultados obtidos na avaliação da concentração proteica empregada para a concentração média de ART C (19,97 µM) e alta (69,91 µM). Como pode ser observado na **Figura 26**, para a concentração média, no intervalo de concentração proteica avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,9271. Portanto, empregando a equação da reta determinou-se como responsável pela depleção de 10% do ART C a concentração de 0,56 mg mL^{-1}. Já para a concentração mais alta (**Figura 27**) no intervalo de concentração proteica avaliado, não foi possível determinar depleção do substrato, visto que as razões da área do ART C pela área do PI, para cada concentração avaliada, não apresentaram variações com o aumento da concentração proteica, o que pode ser comprovado observando-se as barras de erros para cada ponto. Dessa forma, não foi possível determinar a condição ideal de concentração proteica para essa concentração de ART C.

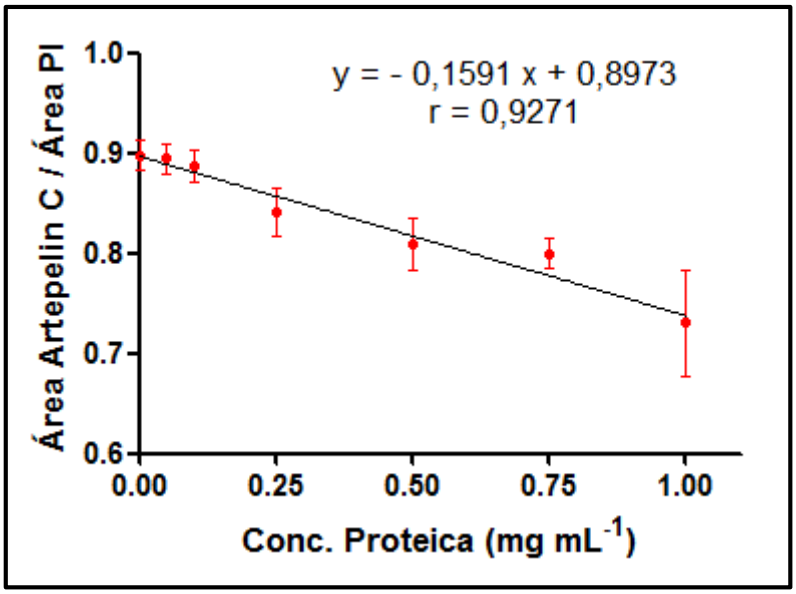

Figura 26. Avaliação da depleção do ART C (19,97 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de humanos. Tempo de incubação: 40 min (n = 3).

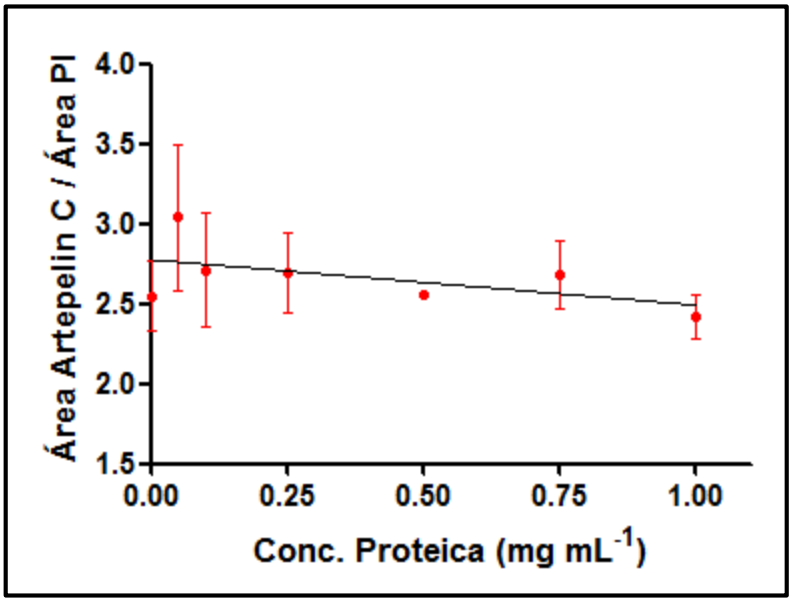

Figura 27. Avaliação da depleção do ART C (69,91 µmol L^{-1}) em função da concentração proteica, empregando microssomas hepáticos de humanos. Tempo de incubação: 40 min (n = 3).

A **Tabela 22** apresenta as concentrações proteicas correspondentes a depleção de 10% do ART C no tempo de incubação de 40 minutos, empregando microssomas hepáticos de humanos, nas 3 concentrações de ART C avaliadas.

Tabela 22. Avaliação da concentração proteica correspondente a depleção de 10% do ART C no tempo de incubação de 40 minutos, empregando microssomas hepáticos de humanos.

Conc. ART C (µM)	Conc. Proteica (mg mL^{-1})
0,50	0,42
19,97	0,56
69,91	----

Analisando a **Tabela 22** é possível observar que a concentração proteica, correspondente a depleção de 10% da concentração do ART C, em cada concentração de ART C avaliada não é a mesma e, além disso, não foi possível determinar a concentração proteica para a concentração alta de ART C. Com o intuito de utilizar a mesma concentração proteica para todas as concentrações de ART C utilizadas no estudo de cinética enzimática optou-se por definir a concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1}, como a adequada para os estudos, visto que apesar desse valor corresponder a uma depleção de substrato maior do que 10% para a concentração baixa, essa concentração proteica se encontra dentro do intervalo linear de depleção do substrato, para as concentrações baixa e média avaliadas e, dessa forma a velocidade da reação enzimática que será medida corresponderá a V_0.

4.9.2.2. TEMPO DE INCUBAÇÃO

Após a determinação da concentração proteica, avaliou-se o parâmetro tempo de incubação, similarmente ao descrito no **item 4.9.1.2**. Para a avaliação do tempo de incubação, fixou-se a concentração proteica em 0,50 mg mL^{-1} (conforme determinado no **item 4.9.2.1**) e o mesmo foi variado no intervalo de 0 – 50 minutos.

A **Figura 28** apresenta os resultados obtidos na avaliação do tempo de incubação empregado para a concentração baixa de ART C (0,50 µM).

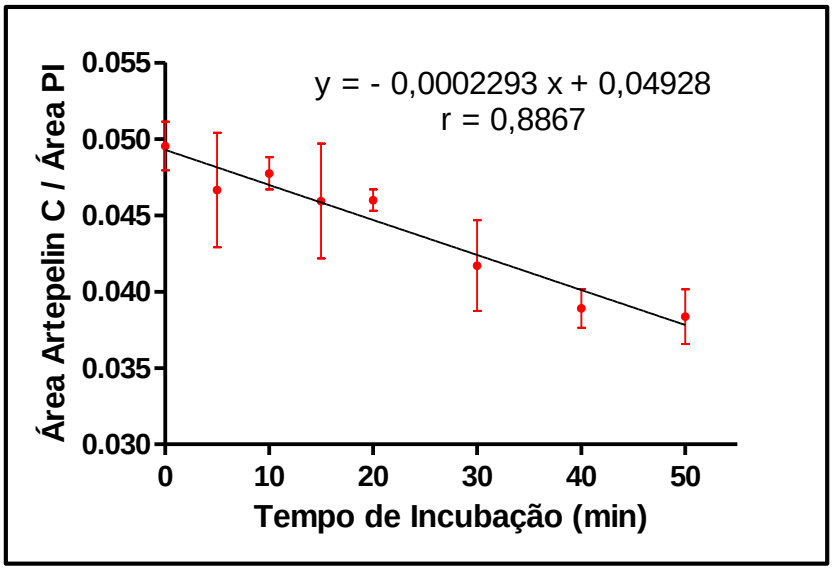

Figura 28. Avaliação da depleção do ART C (0,50 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de humanos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3).

Como pode ser observado (**Figura 28**), para a concentração de 0,50 µM de ART C, no intervalo de tempo de incubação avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,8867. Da mesma forma descrita anteriormente determinou-se o tempo de incubação de 42 min como responsável pela depleção de 10% do ART C.

A **Figura 29** apresenta os resultados obtidos na avaliação do tempo de incubação empregado para a concentração média de ART C (19,97 µM).

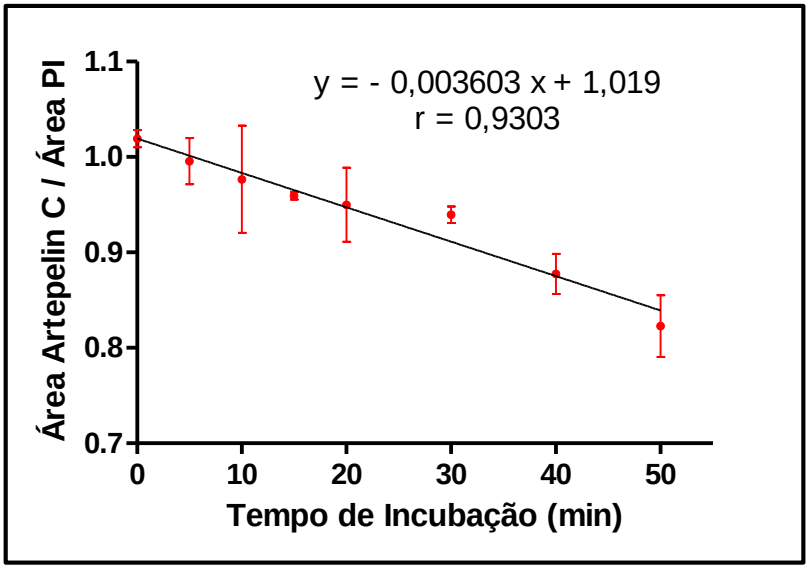

Figura 29. Avaliação da depleção do ART C (19,97 µmol L^{-1}) em função do tempo de incubação, empregando microssomas hepáticos de humanos. Concentração de proteínas microssomais: 0,50 mg mL^{-1} (n = 3).

Como pode ser observado, para a concentração de 19,97 µM de ART C, no intervalo de tempo de incubação avaliado, a depleção do ART C se mostrou linear, com coeficiente de correlação de 0,9303. Dessa forma, utilizando-se o mesmo raciocínio descrito anteriormente, determinou-se o tempo de incubação de 42 min, como responsável pela depleção de 10% do ART C.

A **Tabela 23** apresenta os tempos de incubação correspondentes a depleção de 10% do ART C na concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1}, empregando microssomas hepáticos de ratos, nas 3 concentrações de ART C avaliadas.

Tabela 23. Avaliação do tempo de incubação correspondente a depleção de 10% do ART C na concentração proteica de 0,50 mg mL^{-1}, empregando microssomas hepáticos de humanos.

Conc. ART C (µM)	Tempo de Incubação (min)
0,50	42
19,97	42
69,91	----

Analisando a **Tabela 23** é possível observar que o tempo de incubação, correspondente a depleção de 10% da concentração do ART C, em cada concentração de ART C foi o mesmo. Dessa forma, optou-se por definir o tempo de incubação de 40 min, como o adequado para o estudo de cinética enzimática, visto que esse valor corresponde a depleção de substrato menor do que 10% para a concentração baixa e média de ART C, além de que esse tempo de incubação se encontra dentro do intervalo linear de depleção do substrato e, dessa forma a velocidade da reação enzimática que será medida corresponderá a V_0.

Portanto, os parâmetros de concentração proteica e tempo de incubação determinados que serão utilizados para a determinação da velocidade inicial da reação enzimática (V_0), no estudo de cinética enzimática do ART C empregando o modelo de microssomas hepático de humanos, são 0,50 mg mL^{-1} e 40 minutos, respectivamente.

4.10.CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para se determinar a faixa de concentração do substrato a ser avaliada na cinética enzimática é necessário considerar a sensibilidade do sistema analítico utilizado para

quantificação a fim de definir a menor concentração de substrato utilizada, e a solubilidade do substrato nas condições de incubação, para definir a maior concentração que será empregada. Sendo assim, investigou-se a cinética enzimática do metabolismo do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos, utilizando-se as condições de V_0 determinadas no **item 4.9**.

4.10.1. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATOS

A cinética enzimática do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos foi avaliada utilizando as condições de concentração proteica e tempo de incubação de 0,50 mg mL^{-1} e 30 minutos, respectivamente. A concentração do substrato foi variada no intervalo entre 1,41 – 166,45 µM. A **Figura 30** apresenta o gráfico da velocidade inicial da reação enzimática (V_0) versus a concentração do ART C.

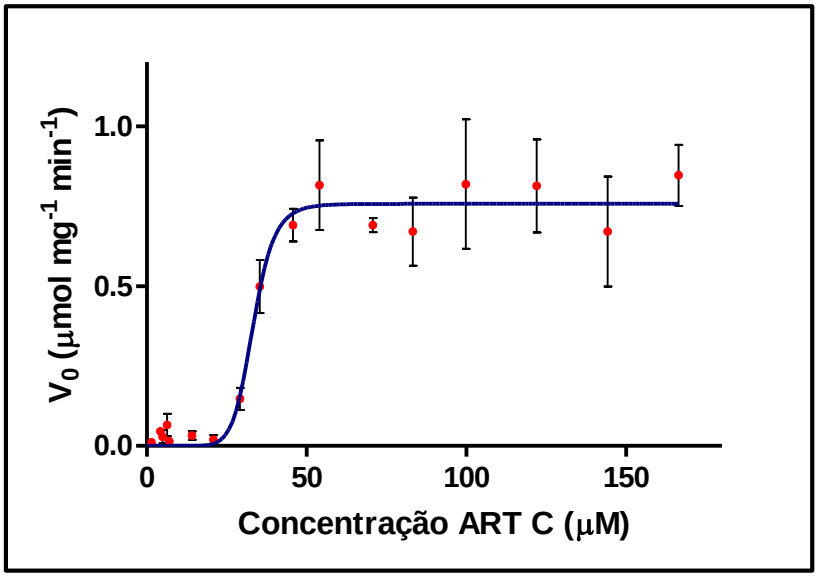

Figura 30. Cinética enzimática sigmoidal (n = 3) do metabolismo do ART C pelas enzimas da CYP450 empregando microssomas hepáticos de ratos.

O comportamento observado na cinética enzimática do ART C foi um comportamento atípico, que não obedece a cinética de Michaelis-Menten usualmente utilizada para descrever comportamentos cinéticos de enzima.

O gráfico de Eadie-Hofstee é uma ferramenta importante para se distinguir e classificar os diferentes comportamentos cinéticos atípicos. A **Figura 31** apresenta o gráfico de Eadie-Hofstee da cinética enzimática do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos.

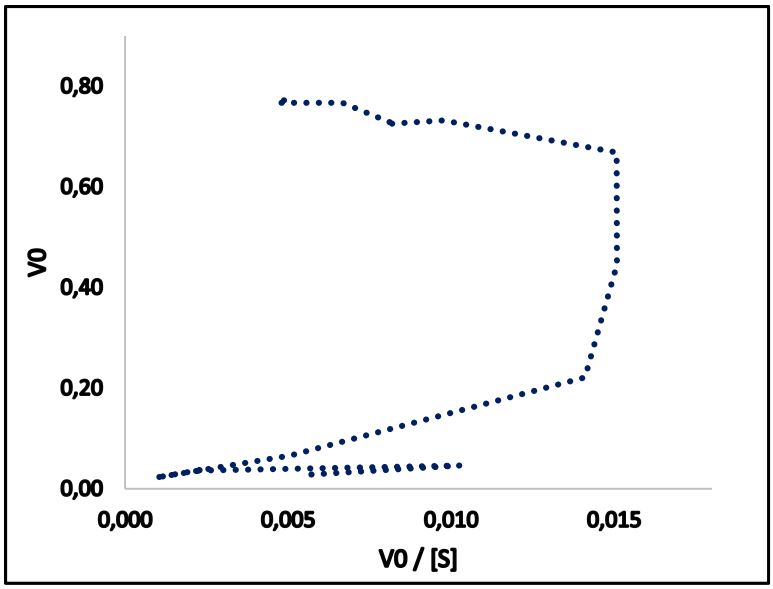

Figura 31. Gráfico de Eadie-Hofstee (n = 3) da cinética enzimática do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos.

A cinética observada nesse estudo é explicada pelo modelo cinético de Hill, que é característico de enzimas que apresentam múltiplos sítios ativos. O comportamento atípico observado na cinética do ART C nesse caso é característico por possuir um perfil sigmoidal, devido a existência de um cooperativismo positivo (n > 1), como pode ser observado no gráfico de Eadie-Hofstee (**Figura 31**), que se apresenta na forma de um "gancho" convexo, característico do cooperativismo (HOUSTON; GALETIN, 2013; WU, 2011). Esse comportamento é característico do aumento da afinidade da enzima pelo substrato após a formação do primeiro complexo enzima-substrato (SEIBERT; TRACY, 2014).

A **Tabela 24** apresenta os resultados obtidos dos parâmetros cinéticos enzimáticos do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos, com os respectivos valores de desvio-padrão. Os parâmetros foram calculados utilizando o programa Origin 9.1 que fornece os valores de velocidade máxima ($V_{máx}$), coeficiente de Hill (h) e S_{50}.

Tabela 24. Parâmetros cinéticos enzimáticos do metabolismo do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos.

Parâmetro	Valor	Desvio Padrão
$V_{máx}$	0,7567 µmol mg^{-1} min^{-1}	± 0,0212
h	10,90	± 2,80
S_{50}	33,35 µM	± 0,55

A partir dos parâmetros cinéticos obtidos para a cinética sigmoidal do ART C é possível calcular o clearance máximo, que fornece uma estimativa do clearance do substrato quando a enzima é completamente ativada, previamente a sua saturação (HOUSTON; KENWORTHY, 2000) (**Equação 8**). Dessa forma, o clearance intrínseco máximo do ART C na cinética enzimática sigmoidal, empregando microssomas hepáticos de ratos, foi de 16,63 ± 1,52 µL min^{-1} mg^{-1}.

$$CL_{máx} = \frac{\frac{V_{máx}}{S_{50}}(h-1)^{1-\frac{1}{h}}}{h} \quad \textbf{(Equação 8)}$$

em que, $\mathbf{CL_{máx}}$ – clearance máximo, $\mathbf{V_{máx}}$ – velocidade máxima da reação enzimática, $\mathbf{S_{50}}$ – concentração de substrato em que a velocidade da reação é 50% da velocidade máxima de reação e **h** – grau de cooperatividade.

4.10.2. MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE HUMANOS

A cinética enzimática do ART C empregando microssomas hepáticos de humanos foi avaliada utilizando as condições de concentração proteica e tempo de incubação de 0,50 mg mL^{-1} e 40 minutos, respectivamente. A concentração do substrato foi variada no intervalo entre 1,00 – 69,91 µM. A **Figura 32** apresenta o gráfico da velocidade inicial da reação enzimática (V_0) versus a concentração do ART C.

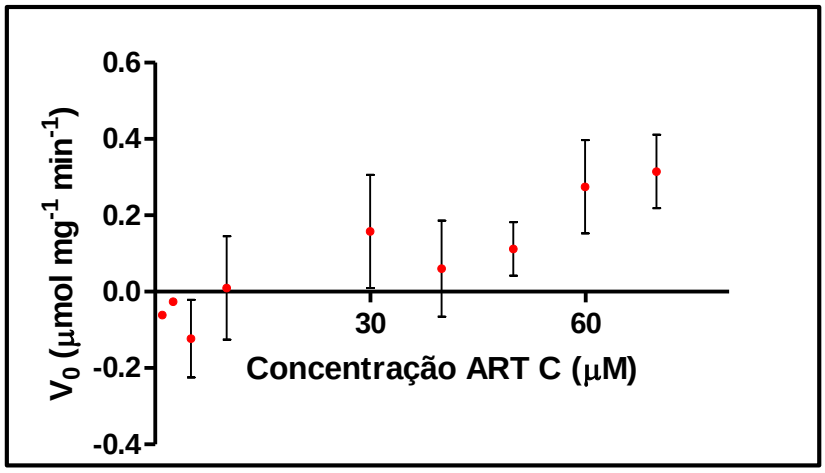

Figura 32. Cinética enzimática do metabolismo do ART C pelas enzimas da CYP450 empregando microssomas hepáticos de ratos.

Como pode ser observado na **Figura 32**, não foi possível identificar qualquer comportamento cinético no metabolismo do ART C empregando microssomas hepáticos

de humanos e, além disso, os resultados obtidos apresentaram altos valores de desvio padrão.

Em comparação com os resultados obtidos no estudo da cinética enzimática do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos, o modelo microssomal de humanos apresentou menor atividade enzimática de metabolismo. Essa diferença de atividade enzimática já havia sido observada no estudo prévio de metabolismo do ART C (**item 4.7**). A maior atividade enzimática no modelo microssomal de rato pode indicar uma maior capacidade de detoxificação do ART C em ratos do que em humanos.

A existência de diferenças nas atividades metabólicas entre os modelos microssomais de ratos e de humanos avaliados já havia sido reportada por Nishimuta e colaboradores (2013), que investigaram as diferenças interespécies da atividade metabólica de um grande número de fármacos comerciais. Além disso, como reportado por Naramoto, Kato e Ichihara (2014) em estudos utilizando isoformas microssomais recombinantes de humanos, o ART C possui potencial de inibição sobre as isoformas recombinantes das CYP1A2, CYP2C9 e CYP2C19, o que pode acarretar na baixa atividade enzimática de metabolismo do mesmo no modelo microssomal humano. A **Tabela 25** apresenta a abundância relativa das isoformas das enzimas da CYP e a sua contribuição no metabolismo de fármacos (JIA; LIU, 2007).

Tabela 25. Abundância relativa das isoformas da CYP e respectiva contribuição ao metabolismo de fármacos (JIA; LIU, 2007).

CYP	**Abundância Relativa (%)**	**Contribuição ao Metabolismo (%)**
3A4/5	29-30	52
1A2	12-13	4-6
2C9	12	10-11
2C8	7	-
2E1	7	2-5
2D6	1,5-4	30
2B6	0,2-5	25
2C19	0,2	4

Dessa forma, pode-se concluir que as CYP1A2, CYP2C9 e CYP2C19 sob as quais o ART C possui potencial de inibição enzimática representam aproximadamente 25% da quantidade total de isoformas presentes no fígado humano e, além disso, essas isoformas são responsáveis pelo metabolismo de aproximadamente 21% dos fármacos metabolizados pelas enzimas da CYP450.

4.11.IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

Para a identificação dos metabólitos formados durante o metabolismo in vitro do ART C, as amostras de metabolismo in vitro e os respectivos controles, para cada modelo microssomal avaliado, foram combinados em *pools* de amostras (n = 10). Os *pools* amostrais foram analisados utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa de alta resolução ou a espectrômetro de massa de múltiplo estágios. As condições de incubação utilizadas nos estudos de identificação de metabólitos foram realizadas empregando como concentração proteica e tempo de incubação de 1,00 mg mL^{-1} e 50 minutos, respectivamente.

4.11.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA ALTA RESOLUÇÃO

A análise por espectrometria de massa de alta resolução dos metabólitos formados do ART C, no estudo de metabolismo in vitro, permite a identificação de seus íons moleculares. Dessa forma, analisando-se a diferença da massa molecular do ART C e do metabólito formado, é possível avaliar qual o tipo de reação de metabolismo de fase I está ocorrendo e, dessa forma, obter importantes informações estruturais dos metabólitos (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009).

Como reportado no **item 3.11**, foram observadas a formação de ao menos dois metabólitos do ART C, em ambos os modelos microssomais avaliados. Como pode ser observado na **Figura 33**, pode-se observar a presença de dois picos (M1 e M2) nas amostras do estudo de metabolismo do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos, os quais não são observados no respectivo controle. Dessa forma, pode-se concluir que ao menos dois metabólitos (M1 e M2), com tempo de retenção de 1,9 e 2,1 minutos, respectivamente, são formados durante o metabolismo do ART C no modelo microssomal de ratos.

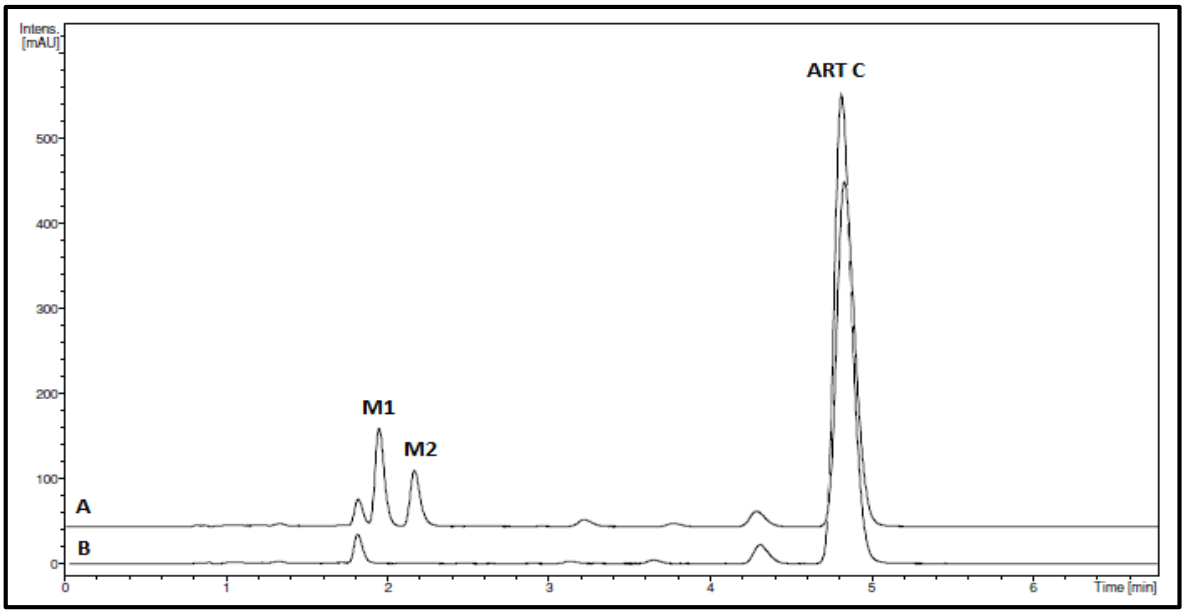

Figura 33. Cromatogramas (detector de arranjo de diodos – 315 nm) do estudo para a identificação dos metabólitos do ART C. A) metabolismo in vitro do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos e B) controle empregando microssomas hepáticos de ratos. (M1) metabólito 1; (M2) metabólito 2. Condições analíticas no **item 3.15.1**.

A **Figura 34** apresenta os espectros de massa de alta resolução, no modo negativo de ionização, dos metabólitos M1 e M2 do ART C formados no estudo de metabolismo in vitro empregando microssomas hepáticos de ratos. Os íons moleculares $[M-H]^-$ dos metabólitos M1 e M2 do ART C, formados no metabolismo in vitro empregando microssomas hepáticos de ratos, possuem *m/z* 315,1612 e *m/z* 315,1609, respectivamente.

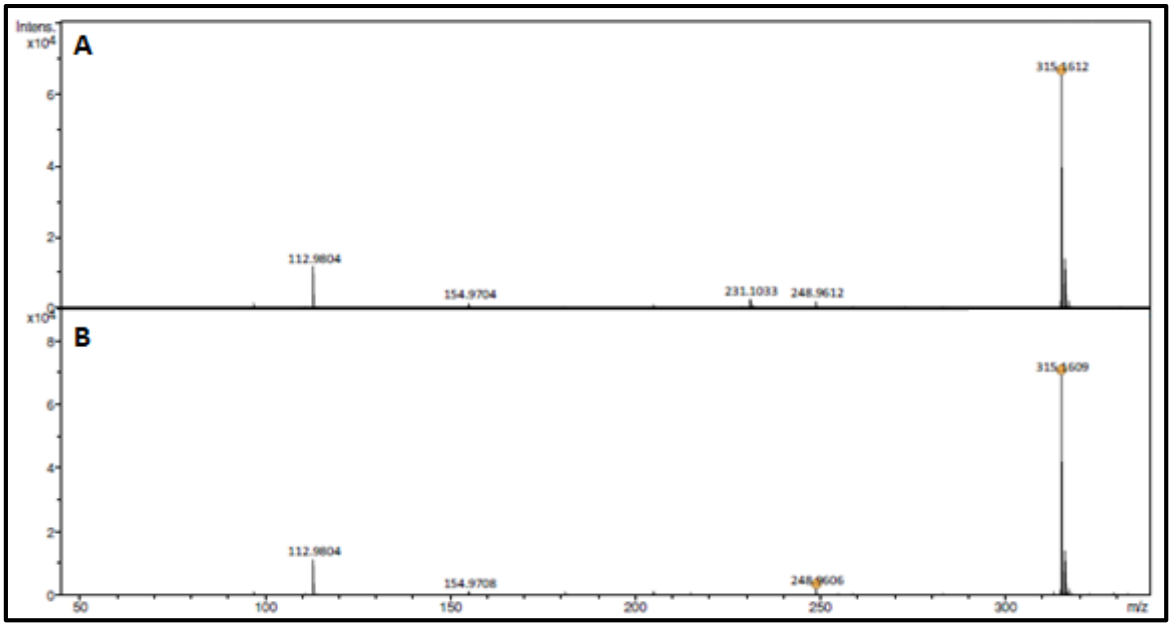

Figura 34. Espectro de massas de alta resolução dos metabólitos M1 (A) e M2 (B) do ART C.

No estudo de metabolismo in vitro do ART C empregando microssomas hepáticos de humanos também foi observada a formação de dois metabólitos do ART C (M1 e M2), sendo que os mesmos apresentam o mesmo tempo de retenção dos metabólitos formados no estudo de metabolismo empregando microssomas hepáticos de ratos e não foram observados no respectivo controle. Os íons moleculares $[M-H]^-$ dos metabólitos M1 e M2 do ART C, formados empregando microssomas hepáticos de humanos, possuem *m/z* 315,1622 e *m/z* 315,1619, respectivamente.

A **Tabela 26** apresenta as reações mais comuns de metabolismo de fase I e as respectivas alterações estruturais e diferenças de massa molecular entre o metabólito e o substrato.

Tabela 26. Reações mais comuns de metabolismo de fase I, com as respectivas alterações estruturais e a diferença na massa molecular entre o metabólito e o substrato (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009).

Reação Metabolismo de Fase I	**Alteração Estrutural**	**Diferença na Massa Molecular (u)**
Desidrogenação	$– H_2$	– 2,0157
Desmetilação	$– CH_2$	– 14,0157
Desidratação	$– H_2O$	– 18,0106
Descarboxilação	$– CO_2$	– 43,9898
Hidroxilação	+ O	+ 15,9949
Epoxidação	+ O	+ 15,9949
Hidratação	$+ H_2O$	+ 18,0106

A **Tabela 27** apresenta as fórmulas químicas propostas para os íons moleculares dos metabólitos formados do ART C, em ambos os modelos microssomais avaliados, assim como, os respectivos erros relativos em relação a massa exata da fórmula química proposta.

Tabela 27. Resultados da análise de espectrometria de massa de alta resolução (modo negativo) dos metabólitos do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos e de humanos.

Modelo Microssomal	Metabólito	Fórmula Química	*m/z* Acurada	*m/z* Exata	Erro (ppm)
Rato	M1	$C_{19}H_{23}O_4^-$	315,1612	315,1596	5,08
	M2	$C_{19}H_{23}O_4^-$	315,1609	315,1596	4,12
Humano	M1	$C_{19}H_{23}O_4^-$	315,1622	315,1596	8,25
	M2	$C_{19}H_{23}O_4^-$	315,1619	315,1596	7,30

Sabendo que o íon molecular $[M-H]^-$ do ART C possui *m/z* 299,1647 (**Tabela 5**) e observando as *m/z* dos íons moleculares $[M-H]^-$ dos metabólitos do ART C, as fórmulas químicas propostas para esses metabolitos e as reações mais comuns de metabolismo de fase I, é possível observar que os metabólitos formados possuem 15,9949 unidades de massa a mais do que o ART C. Essa diferença de massa entre os metabólitos e o substrato em reações de metabolismo de fase I, como pode ser observado na **Tabela 26**, são características de reações de hidroxilação ou epoxidação (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009).

Dessa forma, pode-se concluir, pelos resultados obtidos pelas análises de espectrometria de massa de alta resolução, que os metabólitos formados no estudo de metabolismo in vitro do ART C empregando microssomas hepáticos de ratos ou de humanos são derivados hidroxilados ou epoxidados do ART C (**Figura 35**).

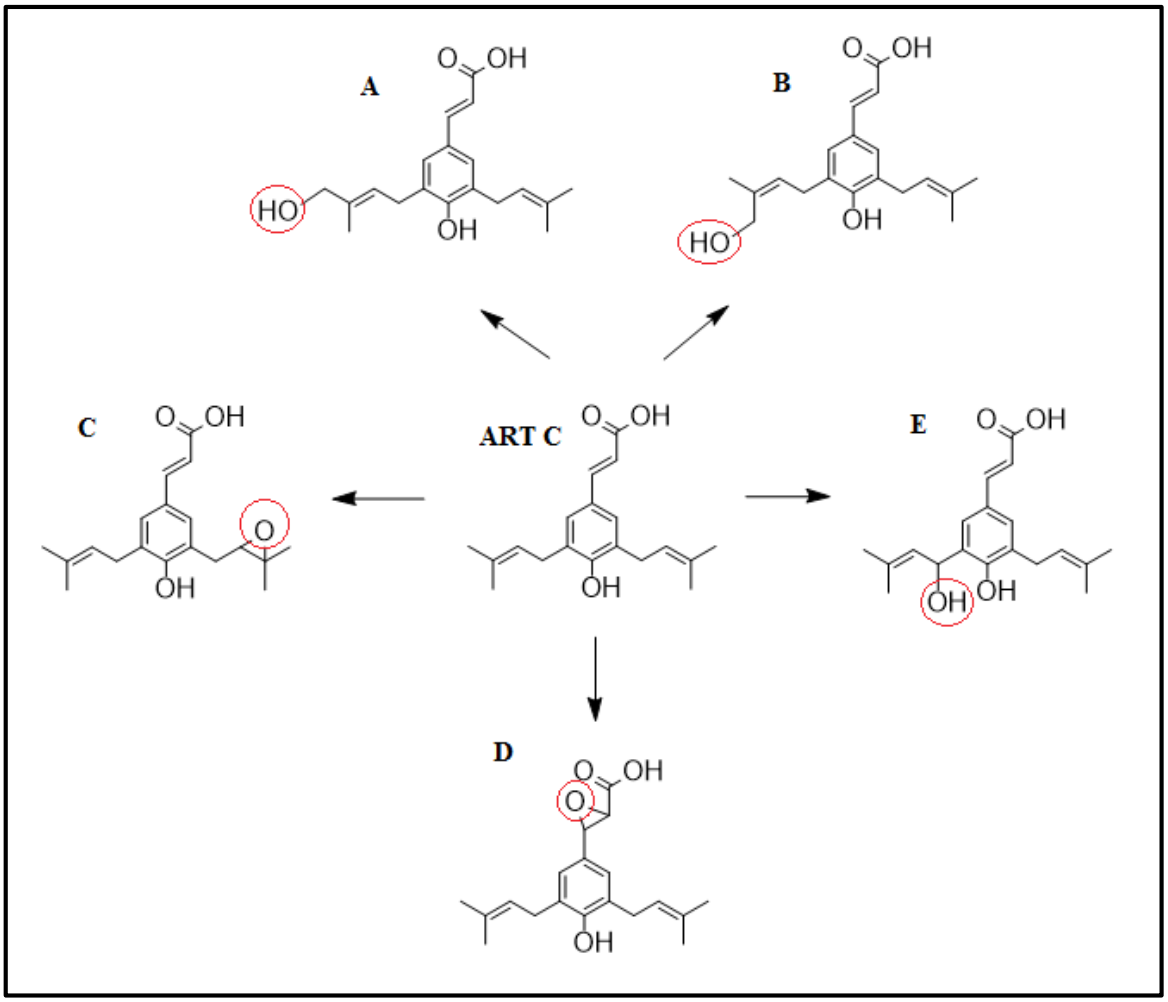

Figura 35. Possíveis metabólitos do ART C formados por hidroxilação ou epoxidação. A, B, C, D e E – possíveis estruturas químicas dos metabólitos do ART C.

4.11.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA DE MÚLTIPLO ESTÁGIOS

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa com analisador do tipo *íon trap* é uma importante ferramenta analítica que pode ser utilizada na identificação de metabólitos em estudos de metabolismo in vitro. O analisador de massa do tipo *íon trap* é um analisador de múltiplo estágios, que apesar de fornecer dados em baixa resolução, é capaz de fornecer importantes informações através de fragmentações de múltiplo estágios (MS^n) dos íons selecionados (KORFMACHER, 2005). Essas informações de MS^n são de suma importância para a identificação de metabólitos.

Primeiramente, analisou-se a fragmentação do ART C, no modo negativo de ionização, com o objetivo de se obter um padrão de fragmentação que ajudasse na identificação dos metabólitos formados nos estudos de metabolismo in vitro. A **Figura 36**

apresenta os espectros de massa de MS^n do ART C e a **Tabela 28** apresenta os íons produtos obtidos através da análise do ART C por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de múltiplo estágios.

Tabela 28. Íons produto do ART C obtidos na análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de múltiplo estágios

Composto	**Tempo de Retenção (min)**	**$[M-H]^-$ *m/z***	**Íons produto (*m/z*) MS^1>MS^2>MS^3>MS^4**
Artepelin C	7,5	299	299>255>200>145

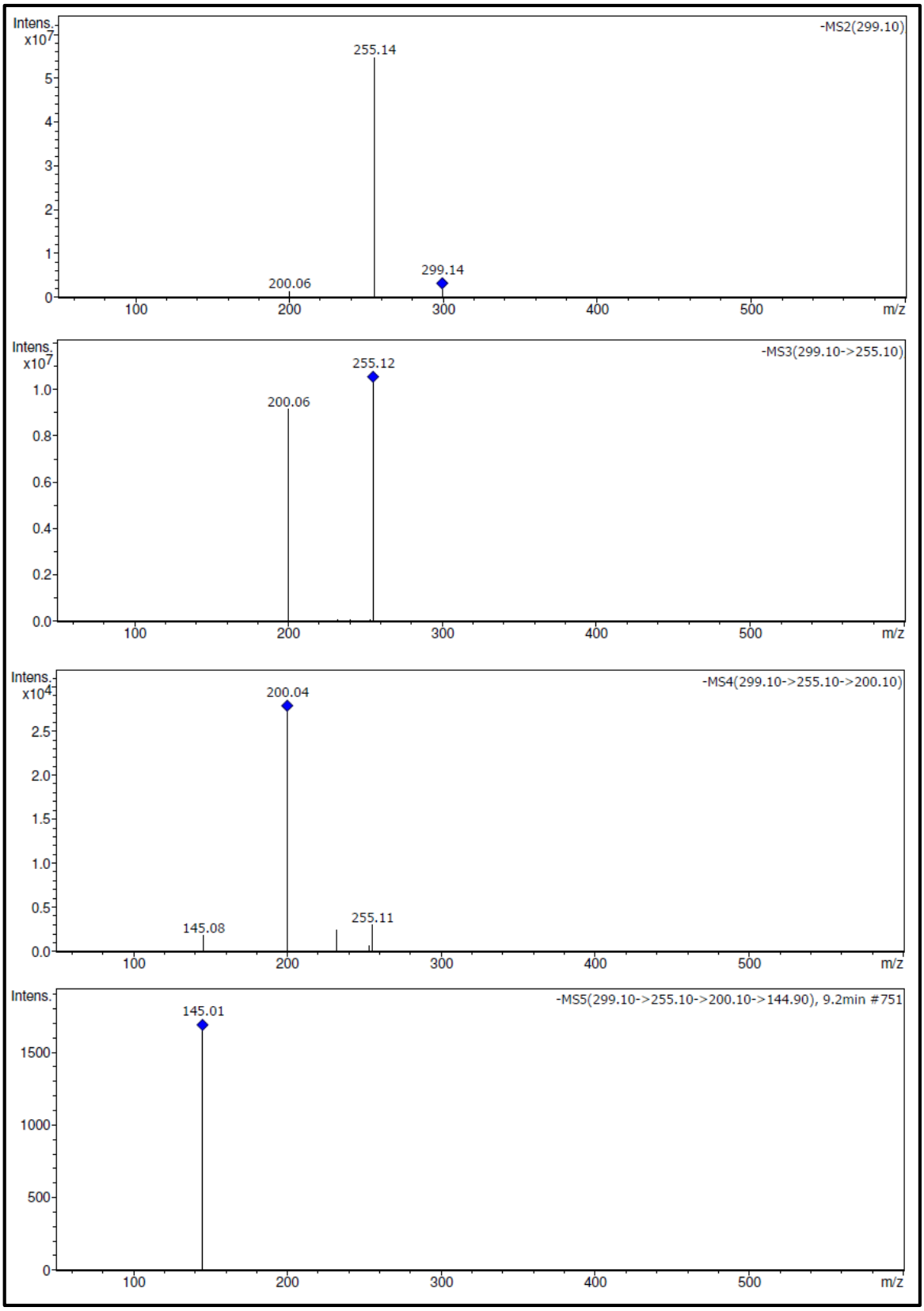

Figura 36. Espectros de massa de MS^n do ART C, no modo negativo de ionização. Condição analítica no **item 3.15.2**.

A **Figura 37** apresenta o esquema proposto para a fragmentação MS^n do ART C, a partir dos dados obtidos na análise por HPLC-MS^n.

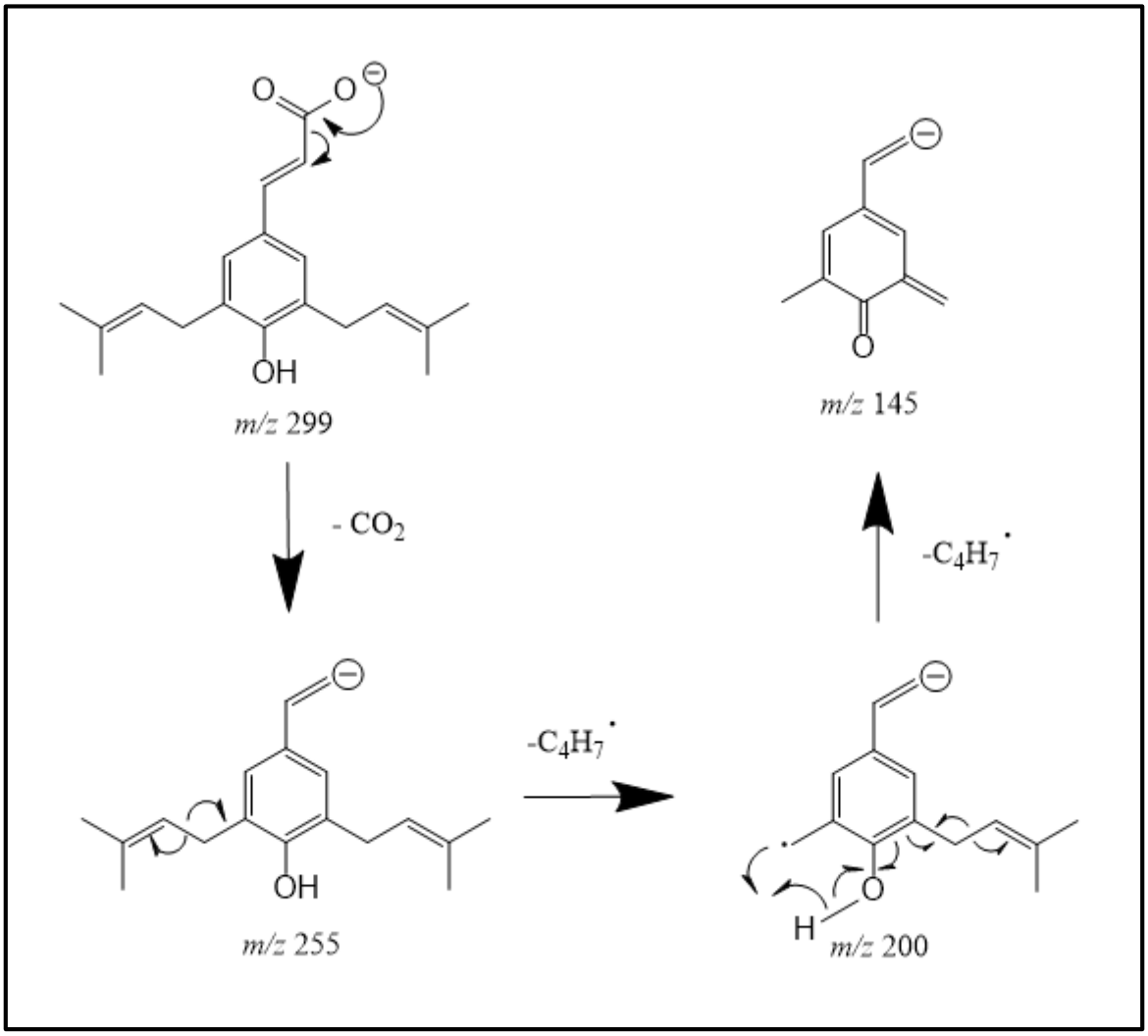

Figura 37. Esquema de fragmentação MS^n proposto para o ART C, no modo negativo de ionização.

Posteriormente, foram analisadas as fragmentações dos metabólitos do ART C, no modo negativo de ionização. Como pode ser observado na **Tabela 29**, os íons produtos formados para os metabólitos do ART C (M1 e M2), formados em ambos os modelos microssomais avaliados, foram os mesmos indicando que os metabólitos formados são estruturalmente muito parecidos.

Tabela 29. Íons produto dos metabólitos do ART C obtidos na análise por HPLC-MS^n

Modelo Microssomal	**Metabólito**	**Tempo de Retenção (min)**	**$[M-H]^-$ *m/z***	**Íons produto (*m/z*) MS^1>MS^2>MS^3>MS^4**
Rato/Humano	M1/M2	1,9/2,1	315	315>271>241>186 315>285>241 315>241 315>201

Utilizando-se as informações dos íons produtos formados a partir dos metabólitos do ART C, o esquema de fragmentação de MS^n proposto para o ART C e o conhecimento obtido pela análise por espectrometria de massa de alta resolução de que os metabólitos formados são hidroxilados ou epoxidados, é possível propor a estrutura dos metabólitos formados.

A formação do íon produto (*m/z* 285) a partir do íon precursor (*m/z* 315) envolve a perda de 30 unidades, que é característica da eliminação de uma molécula de formaldeído (CH_2O) (MCLAFERTTY; TUREEK, 1993). A eliminação de formaldeído é característica de álcoois primários, sendo que a sua ocorrência para epóxidos e álcoois secundários e terciários não é reportada na literatura. A partir destes dados, foi possível concluir que dentre as estruturas dos possíveis metabólitos do ART C mostrados na **Figura 35**, apenas as estruturas A e B (álcoois primários) podem eliminar formaldeído de suas estruturas durante suas fragmentações. A **Figura 38** apresenta o esquema de fragmentação de MS^n proposto para os metabólitos do ART C, no modo negativo de ionização.

Os resultados obtidos sugerem fortemente que a reação de metabolismo que ocorre é uma hidroxilação alílica, levando a formação de dois produtos hidroxilados do ART C (M1 e M2), que são isômeros *E/Z* um ao outro. A impossibilidade de obtenção de uma maior quantidade de massa dos metabólitos do ART C inviabiliza a análise por ressonância magnética nuclear, que seria ideal para a comprovação da identidade dos metabólitos.

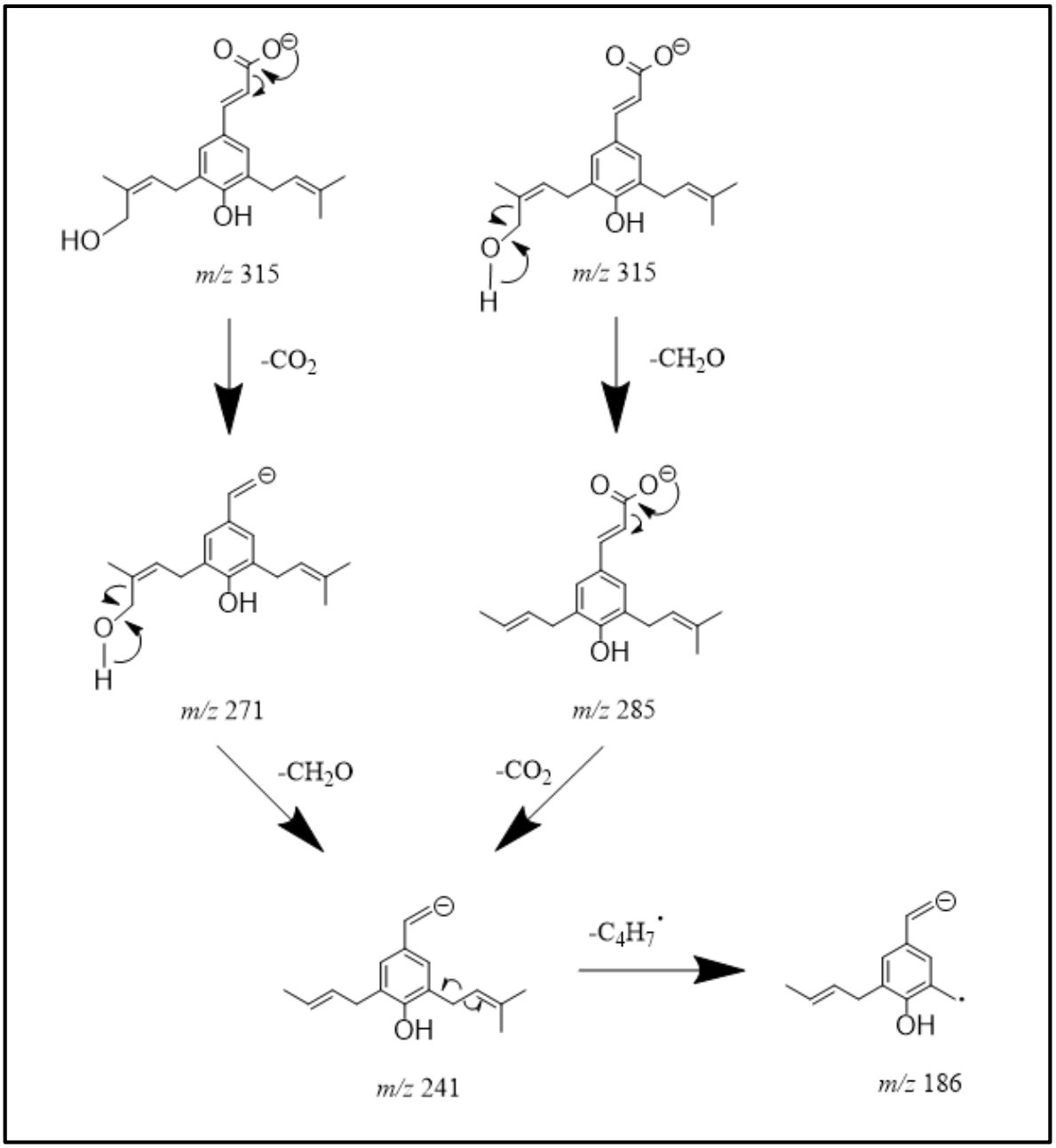

Figura 38 Esquema de fragmentação MS^n proposto para os metabólitos do ART C, no modo negativo de ionização.

5.CONCLUSÃO

Pela primeira vez, foi avaliado o comportamento do ART C frente às enzimas da CYP450. O estudo de metabolismo do ART C, que apresenta diversas atividades biológicas, é uma etapa essencial para o desenvolvimento desse promissor candidato a fármaco. Neste trabalho, os modelos de metabolismo *in vitro* empregados foram os microssomas hepáticos de ratos e de humanos. Para a avaliação do metabolismo do ART C foram desenvolvidos e validados métodos analíticos que possibilitaram a obtenção de resultados quantitativos do estudo de metabolismo. A cinética enzimática obtida para o modelo microssomal de ratos apresentou um perfil sigmoidal característico da cinética de Hill e, além disso, foi possível a determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos, que possibilitaram a obtenção do clearance intrínseco do ART C nesse modelo. No entanto, no modelo microssomal de humanos não foi possível a obtenção de um perfil cinético enzimático característico, devido a baixa atividade enzimática apresentada pelo modelo de humanos, que pode estar associada ao potencial de inibição enzimática do ART C em algumas isoformas da CYP450. Finalmente, com o auxílio da espectrometria de massa foi possível a identificação de dois metabólitos, possivelmente hidroxilados, do ART C em ambos os modelos avaliados.

REFERÊNCIAS

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para validação de métodos bioanalíticos**. RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: 02 nov. 2014.

AHN, M.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAJI, L.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 235-243, 2007.

AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; OHGUCHI, K.; NISHIZAWA, K.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; NOZAWA, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 7, p. 1057-1059, 2003

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatographic B**, Amsterdam, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

ALSENZ, J.; KANSY, M. High throughput solubility measurement in drug discovery and development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 59, n. 7, p. 546-567, 2007.

ANTUNES, O. A. C.; DA SILVA, J. F. M.; ESTRADA, G. O. D. Artepillin C: a review. **Letters in Drug Design and Discovery**, San Francisco, v. 5, n. 2, p. 88-92, 2008.

ATKINS, W. M. Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450-catalyzed reactions. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 291-310, 2005.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs – a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 6, p. 1699-1722, 2010.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROS, M. P.; SOUSA, J. P.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 110, n. 3, p. 567-571, 2007.

BARTH, O. M.; DE FREITAS, A. S.; MATSUDA, A. H.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Botanical origin and Artepillin-C content of Brazilian propolis samples. **Grana**, Oslo, v. 52, n. 2, p. 129-135, 2013.

BEZERRA, R. M. F.; FRAGA, I.; DIAS, A. A. Utilization of integrated Michaelis-Menten equations for enzyme inhibition diagnosis and determination of kinetic constants using Solver supplement of Microsoft Office Excel. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 26-31, 2013.

BONFILIO, R.; CAZEDEY, E. C. L.; ARAÚJO, M. B.; SALGADO, H. R. N. Analytical validation of quantitative high-performance liquid chromatographic methods in pharmaceutical analysis: a practical approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, New York, v. 42, n. 1, p. 87-100, 2012.

CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 4, p. 549-566, 2008.

CHEN, P.; ZHANG, X.; HUANG, T.; YU, Q., CHENG, N. Metabolism of the hepatotoxic CHIKARAISHI, Y.; IZUTA, H.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA S,; HARA, H. Angiostatic effects of Brazilian propolis and its chemical constituents. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 54, n. 4, p. 566-575, 2010.

CHOI, S.; CHA, B.; IIDA, K; LEE, Y.; YONEZAWA, T.; TERUYA, T.; NAGAI, K.; WOO, J. Artepillin C, as a PPARy ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 81, n. 7, p. 925-933, 2011.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica: Curso Básico Universitário**, v. 3, 2006, p. 512.

CORCORAN, O.; SPRAUL, M. LC–NMR–MS in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 8, n. 14, p. 624-631, 2003.

DE OLIVEIRA, P. F.; DE SOUZA LIMA, I. M.; MUNARI, C. C.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents Artepillin C and baccharin. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 80, n. 6, p. 490-492, 2014.

EMA – EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on bioanalytical method validation**, 21 de julho de 2011. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2014.

FASINU, P.; BOUIC, P. J.; ROSENKRANZ, B. Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies – a review. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 13, n. 2, p. 215-224, 2012.

FIGUEIREDO, F. J. B.; DIAS-SOUZA, M. V.; NASCIMENTO, E. A.; DE LIMA, L. R. P. Physicochemical characterization and flavonoid contents of artisanal Brazilian green propolis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Sagar, v. 7, n. 3, p. 64-68, 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Draft Guidance for Industry: Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. **US Food and Drug Administration Publication**, 2006.

GAO, W.; WU, J.; WEI, J.; PU, L.; GUO, C.; YANG, J.; YANG, M.; LUO, H. Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, Mitake, v. 55, n. 1, p. 7-10, 2014.

GOLICNIK, M. Explicit analytic approximations for time-dependent solutions of the generalized integrated Michaelis–Menten equation. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 411, n. 2, p. 303–305, 2011.

GOODMAN, J.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12ª ed. New York: Mcgraw-hill Education, 2012, 2112 p.

HATA, T.; TAZAWA, S.; OHTA, S.; RHYU, M. MISAKA, T.; ICHIHARA, K. Artepillin C, a major ingredient of Brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 channels. **Plos One**, San Francisco v. 7, n. 11, e48072, p. 1-9, 2012.

HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 47, n. 11, p. 1521-1524, 1999.

HORI, J. I.; ZAMBONI, D. S.; CARRÃO, D. B.; GOLDMAN, G. H.; BERRETTA, A. A. The inhibition of inflammasome by Brazilian green propolis (EPP-AF). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2013, n. 2013, Article ID 418508, p. 1-11, 2013.

HOUSTON, J. B.; GALETIN, A. Progress towards predictions of human pharmacokinetics parameters from in vitro technologies. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 35, n. 4, p. 393-415, 2013.

HOUSTON, J. B.; KENWORTHY, K. E.; GALETIN, A. Typical and atypical enzyme kinetics. In: LEE, J. S.; OBACH, R. S.; FISHER, M. B. **Drug metabolizing enzymes: cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development**. Marcel Dekker, New York, 2003, p. 211-254.

HUANG, X.; POWERS, R.; TYMIAK, A.; ESPINA, R.; ROONGTA, V. Introduction to NMR and its application in metabolite structural determination. In: ZHANG, D.; ZHU, M.; HUMPHREYS, W. G. **Drug metabolism in drug design and development**. Wiley, 2007, cap. 12, p. 369-410.

JIA, L.; LIU, X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments. **Current Drug Metabolism**, Hilversum , v. 8, n. 8, p. 822-829, 2007.

KELMAN, D., WRIGHT, A. D. The importance of ^{1}H-nuclear magnetic resonance spectroscopy for reference standard validation in analytical sciences. **PlosOne**, San Francisco, v. 7, n. 7, e42061, 2012.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; AGA, M.; HANAYA, T.; KOHGUCHI, M.; NOMURA, Y.; KURIMOTO, M. Cell cycle and apoptosis in cancer induced by the Artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy**, Tokyo, v. 23, n. 13, p. 1855-1859, 1996.

KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA, S.; YAMAMOTO, Y; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cell lines induced by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Biotherapy**, Tokyo, v. 12, n. 8, p. 1135-1142, 1998a.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M. J.; KURIMOTO, M.; MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, New York, v. 22, n. 6, p. 506-515, 1998b.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; TOMITA, M.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Prevention of renal oxidative damage and carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate with oral administration of propolis and Artepillin C. **Biotherapy**, Tokyo, v. 13, n. 3, p. 273-280, 1999.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M. J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and Artepillin C. **Pathology International**, Carlton South, v. 50, n. 9, p. 679-689, 2000.

KIMOTO, T.; KOYA-MIYATA, S.; HINO, K.; MICALLEF, M. J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and Artepelin C. **Virchows Archiv**, Berlin, v. 438, n. 3, p. 259-270, 2001a.

KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M. J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**, Athens, v. 21, n. 1A, p. 221-228, 2001b.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.

KORFMACHER. W. A. Foundation review: principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 10, n. 20, p. 1357-1367, 2005.

KONISHI, Y. Transepithelial transport of Artepillin C in intestinal Caco-2 cell monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, Amsterdam, v. 1713, n. 2, p. 138-144, 2005.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 25, n. 6, p. 866-880, 2006.

LI, A. P. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. **Drug Discovery Today: Technologies**, Oxford, v.2, n. 2, p. 179-185, 2005.

LI, D.; HAN, Y.; MENG, X.; SUN, X.; YU, Q.; LI, Y.; WAN, L.; HUO, Y.; GUO, C. Effect of regular organic solvents on cytochrome P450-mediated metabolic activities in rat liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, Pomezia, v. 38, n. 11, p. 1922-1925, 2010.

LI, L.; CHEN, X., ZHOU, J.; ZHONG, D. In vitro studies on the oxidative metabolism of 20(S)-ginsenoside Rh2 in human, monkey, dog, rat and mouse liver microsomes and human liver S9. **Drug Metabolism and Disposition**, Pomezia, v. 40, n. 10, p. 2041-2053, 2012.

LIMA, L. D. C.; ANDRADE, S. P.; CAMPOS, P. P.; BARCELOS, L. S.; SORIANI, F. M.; MOURA, S. A. L.; FERREIRA, M. A. N. D. Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14:177, p. 1-9, 2014.

LIPSCOMB, J. C.; POET, T. S. In vitro measures of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 118, n. 1; p. 82-103, 2008.

LIU, X.; JIA, L. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and in vivo studies. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 8, n. 8, p. 815-821, 2007.

MACHADO, J. L.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; SILVA, M. C. P.; REIS, A. S.; COSTA, G. C.; ARRUDA, D. S.; ROCHA, B. A.; VAZ, M. M. O. L. L.; PAES, A. M. A.; GUERRA, R. N. M.; BERRETTA, A. A.; DO NASCIMENTO, F. R. F. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2012, n. 2012, Article ID 157652, p. 1-10, 2012.

MANSUY, D. A. Brief historical overview and recent progress on cytochromes P450: Adaptation and new mechanisms of prodrug bioactivation. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 69, n. 1, p. 62-69, 2010.

MARUYAMA, H.; SUMITOU, Y.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; HARA, H. Antihypertensive effects of flavonoids isolated from Brazilian green propolis in spontaneously hypertensive rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 32, n. 7, p. 1244-1250, 2009.

MATSUNO, T.; JUNG, S. K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxicinnamic acid (Artepillin

C) isolated from propolis. **Anticancer Research**, Athens, v. 17, n. 5A, p. 3565-3568, 1997.

MCLAFFERTY, F. W.; TUREEK, F. **Interpretation of Mass Spectra**. University Science Books, Mill Valley, CA, 1993, 4ª ed.

MESSERLI, S. M.; AHN, M.; KUNIMASA, K.; YANAGIHARA, M.; TATEFUJI, T.; HASHIMOTO, K.; MAUTNER, V.; UTO, Y.; HORI, H.; KUMAZAWA, S.; KAJI, K.; OHTA, T.; MARUTA, H. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. **Phytotherapy Research**, London, v. 23, n. 3, p. 423-427, 2009.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die kinetic der Invertinwirkung. **Biochemische zeitschrift**, Berlin, v. 49, p. 333–369, 1913.

MUTLIB, A.; ESPINA, R.; VISHWANATHAN, K.; BABALOLA, K.; CHEN, Z.; DEHNHARDT, C.; VENKATESAN,A.; MANSOUR, T.; CHAUDHARY, I.; TALAAT, R.; SCATINA, J. Application of quantitative NMR in pharmacological evaluation of biologically generated metabolites: implications in drug discovery. **Drug Metabolism and Disposition**, Pomezia, v. 39, n. 1, p. 106-116, 2011.

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.;; UEDA, J.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of Artepellin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 1, n. 9, p. 1452-1454, 2003.

NARAMOTO, K.; KATO, M.; ICHIHARA, K. Effects of an ethanol extract of Brazilian green propolis on human cytochrome P450 enzyme activities in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington v. 62, n. 46, p. 11296-11302, 2014.

NASSAR, A. E. F.; TALAAT, R. E. Strategies for dealing with metabolite elucidation in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 9, n. 7, p. 317-327, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger – Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman, 2004, 4ª ed., cap. 6, p. 190-237.

NGATU, N. R.; SARUTA, T.; HIROTA, R.; EITOKU, M.; MUZEMBO, B. A.; MATSUI, T.; NANGANA, L. S.; MBENZA, M. A.; KUMAGAI, N.; SUGANUMA, N. Antifungal efficacy of Brazilian green propolis extracts and honey on *Tinea capitis* and *Tinea*

versicolor. **European Journal of Integrative Medicine**, Amsterdam, v. 3, n. 4; p. 281-287, 2011.

NISHIMUTA, H.; NAKAGAWA, T.; NORUMA, N.; YABUKI, M. Species differences in hepatic and intestinal metabolic activities for 43 human cytochrome P450 substrates between human, rats or dogs. **Xenobiotica**, London, v. 43, n. 11, p. 948-955, 2013.

OBACH, R. S. Pharmacologically active drug metabolites: impact on drug discovery and pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 65, n. 2, p. 578-640, 2013.

PAULINO, N.; ABREU, S. R.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.;; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PEREIRA-FILHO, R. N.; BATISTA, F. S.; RIBEIRO, D. R.; MELO, G. C.; REIS, F. P.; MELO, A. U. C.; GOMES, M. Z.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Chemopreventive effect of Brazilian green propolis on experimental dermal carcinogenesis in murine model. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 32, n. 2, p. 522-530, 2014.

PELKONEN, O.; KALTIALA, E. H.; LARMI, T. K. I.; KÄRKI, N. T. Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes. **Chemical-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 205-216, 1974.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARLA-BROCH, S. Is it necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatographic A**, Amsterdam, v. 1232, p. 101-109, 2012.

RANDALL, K.; CHENG, S. W.; KOTCHEVAR, A. T. Evaluation of surfactants as solubilizing agents in microsomal metabolism reactions with lipophilic substrates. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal**, Columbia, v. 47, n. 9, p. 631-639, 2011.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2013, n. 2013, Article ID 267878, p. 1-14, 2013.

ROCHA, B. A.; RODRIGUES, M. R.; BUENO, P. C. P.; MELLO, A. R. C. M.; VAZ, M. M. O. L. L.; NASCIMENTO, A. P.; BARUD, H. S.; BERRETTA, A. A. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxylpropryl-β-cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 108, n. 1, p. 87-94, 2012.

SAHOO, S.; HARALDSDOTTIR, H. S.; FLEMING, R. M. T.; THIELE, I. Modeling effects of commonly used drugs on human metabolism. **FEBS Journal**, Oxford, v. 282, n. 2, p. 297-317, 2015.

SCIFINDER WEB, Artepillin Chemical Properties (CAS Registry Number 72944-19-5). Chemical Abstracts Service, 2015. Disponível em: <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifin derExplore.jsf>. Acessado em: 22 abr. 2015.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Fundamentals of enzyme kinetics. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. **Enzyme kinetics in drug discovery**. Springer Protocols, 2014. cap. 2, p. 9-22.

SEVRIOUKOVA, I. F.; POULOS, T. L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. **Dalton Transactions**, Cambridge, v. 42, n. 9, p. 3116-3126, 2013.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of Artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 424, n. 2, p. 181-188, 2004.

SHIMIZU, K.; DAS, S. K.; HASHIMOTO, T.; SOWA, Y.; YOSHIDA, T.; SAKAI, T.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Artepillin C in Brazilian propolis induces G_0/G_1 arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, New York, v. 44, n. 4, p. 293,299, 2005.

SHIMIZU, K.; DAS, S. K.; BABA, M.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Dietary Artepillin C suppresses the formation of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in mouse colon. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 240, n. 1, p. 135-142, 2006.

SKABA, D.; MORAWIEC, T; TANASIEWICZ, M; MERTAS, A.; BOBELA, E.; SZLISZKA, E.; SKUCHA-NOWKA, M.; DAWIEC, M.; YAMAMOTO, R.; ISHIAI, S.; MAKITA, Y.; REDZYNIA, M.; JANOSZKA B.; NIEDZIELSKA, I.; KRÓL, W. Influence of the toothpaste with Brazilian ethanol extract propolis on the oral cavity health. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2013, n. 2013, Article ID 215391, p. 1-12, 2013.

SOUSA, J. P. B.; BUENO, P. C. P.; GREGÓRIO. L. E.; FILHO, A. A. S.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, M. L.; BASTOS, J. K. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reversed phased high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 16, p. 2656-2665, 2007.

STEPAN, A. F.; MASCITII, V.; BEAUMONT, K.; KALGUTKAR, A. S. Metabolism-guided drug design. **Medicinal Chemistry Communication**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 631-652, 2013.

SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; JANOSZKA, B.; DOBOSZ, C.; KOWALCZYK-ZIOMEK, G.; KROL, W. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 38, n. 4, p. 941-953, 2011.

SZLISZKA, E.; ZYDOWICZ, G.; MIZGALA, E.; KROL, W. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induce apoptosis. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 41, n. 3, p. 818-828, 2012.

SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A. Z.; SOKÓL-LETOWSKA, A.; MERTAS, A.; CZUBA, Z.P.; KROL, W. Chemical composition and anti-inflammatory effects of ethanolic extract of Brazilian green propolis on activated J774A.1 macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2013, n. 2013, Article ID 976415, p. 1-13, 2013.

TAKEMURA, T.; URUSHISAKI, T.; FUKUOKA, M.; HOSOKAWA-MUTO, J.; HAKA, T.; OKUDA, Y.; HORI, S.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; KUWATA, K. 3,4-Dicaffeoylquinic acid, a major constituent of Brazilian propolis, increases TRAIL expression and extends the lifetimes of mice infected with Influenza A virus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2012, n. 2012, Article ID 946867, p. 1-7, 2012.

TAVARES, D. C.; MAZZARON BARCELOS, G. R.; SILVA, L. F.; CHACON TONIN, C. C.; BASTOS, J. K. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 1154-1158, 2006.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 7, n. 3, p. 307-315, 2010.

THOMSON REUTERS INTEGRITY^{SM} DATABASE. Disponível em: <https://integrity.thomson_pharma.com/integrity/xmlxsl/pk_prod_list.xml_prod_list_card_pr?p_id=251537&p_tsearch=A>. Acessado em: 09 abr. 2015.

TOLONEN, A.; TURPEINEN, M; PELKONEN, O. Liquid chromatography-mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 14, n. 3-4, p. 120-133, 2009.

TORETI, V. C.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Recent progress of propolis for its biologicals and chemical composition and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 2013, n. 2013, Article ID 697390, p. 1-13, 2013.

TRACY, T. S.; HUMMEL, M. A. Modelling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments. **Drug Metabolism Reviews**, New York,. 36, n. 2, p. 231-242, 2004.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, Y. Different extraction methods of biologically active components from propolis; a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, London, v. 1:13, p. 1-4, 2007.

UTO, Y.; HIRATA, A.; FUJITA, T.; TAKUBO, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H. First total synthesis of Artepillin C established by o,o‘-diprenylation of p-halophenols in water. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 67, n. 7, p. 2355-2357, 2002.

WAGH, V. D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, New York, v. 2013, n. 2013, Article ID 308249, p. 1-11, 2013.

WESTER, M. R.; YANO, J. K.; SCHOCH, G. A.; YANG, C.; GRIFFIN, K. J.; STOUT, C. D.; JOHNSON, E. F. The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-A resolution. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 279, n. 34, p. 35630-35637, 2004.

WU, B. Substrate inhibition kinetics in drug metabolism reactions. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 43, n. 4, p. 440-456, 2011.

WU, H.; LI, L.; SHEN, J.; WANG, Y.; LIU, K.; ZHANG, S. In vitro metabolism of cyadox in rat, chicken and swine using ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 67-68, p. 175-185, 2012.

ZHANG, J.; KONECNY, J.; GLATZ, Z.; HOOGMARTENS, J.; SCHEPDAEL, A. V.; Application of capillary electrophoresis capillary in drug metabolism studies. **Current Analytical Chemistry**, Washington, v. 3, n. 3, p. 197-217, 2007.