UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Farmacocinética populacional e ligação as proteínas
plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito
cucurbitacina I em ratos**

Giovana Maria Lanchoti Fiori

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Farmacocinética populacional e ligação as proteínas
plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito
cucurbitacina I em ratos**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Toxicologia para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Giovana Maria Lanchoti Fiori

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

**Ribeirão Preto
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Fiori, Giovana Maria Lanchoti

Farmacocinética populacional e ligação as proteínas plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em ratos, Ribeirão Preto, 2016.
94p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine

Coorientadora: Pereira, Ana Maria Soares

1. cucurbitacina E; 2. cucurbitacina I; 3. ratos; 4. farmacocinética populacional; 5. ligação as proteínas plasmáticas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Giovana Maria Lanchoti Fiori

Farmacocinética populacional e ligação as proteínas plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em ratos.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine
Lopes

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria
Soares Pereira

Aprovado em:

Banca Examinadora
Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

***A todas as pessoas que de alguma forma
contribuíram para a realização deste trabalho.***

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos

Ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), aos docentes, amigos, colegas e funcionários Jacqueline Nakau Mendonça Galiote Silva, José Carlos Tomaz e Isabel Cristina Casanova Turatti.

Em especial, Jacqueline Nakau Mendonça Galiote Silva e José Carlos Tomaz pelos auxílios constantes durante este período.

Ao Laboratório de Metabolismo e Farmacocinética, aos amigos, colegas e funcionários Dra. Adriana Rocha, Dra. Maria Paula Marques Pereira e Senhor Natalino Bocardo.

Em especial, Dra. Adriana Rocha pelos ensinamentos e auxílios constantes durante a realização deste trabalho. Ao Senhor Natalino Bocardo, pelos auxílios e simpatia contagiante, sempre contribuindo para o bom convívio no grupo.

Aos colegas Glauco Henrique Balthazar Nardotto e Leandro Francisco Pippa, pelos auxílios relacionados aos programas de computação durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Bertucci (Universidade de Bolonha, Itália) pela recepção, orientação e colaboração no trabalho durante o período de doutoramento sanduíche. A Universidade de Bolonha (Itália), funcionários, docentes e colegas Edoardo Fabini e Daniele Tedesco.

Ao Prof. Dr. Oscar Della Pasqua (University College London, Inglaterra), pela colaboração e auxílio deste trabalho.

À Unidade de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) aos docentes, amigos, colegas e funcionários em especial, Dra. Juliana da Silva Coppedee e Sarazete Izidia Vaz Pereira.

À profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotuffo pela recepção e ensinamentos durante o estágio no LOE - FMUFC (Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de

Medicina da Universidade Federal do Ceará). A todos os colegas, em especial ao Dr. Danilo Rocha.

Ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira (Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP) e ao Dr. Fernando Armani.

As funcionárias da seção de Pós-graduação, Rosana e Rosemary, pela dedicação e paciência.

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À CAPES pela concessão de bolsa de doutorado durante o mês de agosto de 2012.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio concedido através da bolsa de doutorado (Processo nº 2012/14408-9) e Bolsa de Pesquisa de Estágio no Exterior (Processo nº 2014/18095-0).

A todos que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira contribuíram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

e

À Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Pelo enriquecimento científico, profissional e pessoal, pela orientação, liberdade e compreensão durante este período.

Muito obrigada!

RESUMO

LANCHOTI FIORI, G. M. **Farmacocinética populacional e ligação as proteínas plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em ratos.** 2016. 94f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Atualmente a cucurbitacina E é considerada uma candidata a fármaco em razão de sua atividade anticâncer, reconhecimento de seus alvos moleculares e sinergismo com outros fármacos utilizados no tratamento do câncer. Porém, ainda não é possível seu uso na clínica devido a importantes lacunas na literatura relativas a ensaios de farmacocinética pré-clínicos e clínicos. A cucurbitacina E é hidrolisada a cucurbitacina I em plasma e em microsomas de fígado humano. O presente estudo visa avaliar a farmacocinética populacional e ligação as proteínas plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em plasma de ratos. O método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos foi desenvolvido utilizando LC-MS/MS. Alíquotas de 50 μ L de plasma foram desproteinizadas com acetonitrila e os resíduos reconstituídos com acetonitrila:água (1:1, v/v) e adicionados do padrão interno clobazam. Os extratos foram injetados na coluna RP-18 com fase móvel constituída por mistura de acetonitrila:água:metanol (32:35:33, v/v/v). O método é preciso e exato com linearidade no intervalo de 1-100 ng de cucurbitacina E/mL de plasma e de 0,4-200 ng de cucurbitacina I/mL de plasma. O método foi aplicado na avaliação da farmacocinética da cucurbitacina E administrada a ratos machos Wistar em dose única oral (gavagem) e intravenosa de 1mg/kg dissolvida em DMSO e tampão fosfato salino pH 7,4 (5:95, v/v). As amostras seriadas de sangue foram coletadas até 24 h após a administração oral ou intravenosa. As concentrações plasmáticas de cucurbitacina E foram quantificadas até 16 h somente após a administração intravenosa, enquanto as concentrações plasmáticas de cucurbitacina I permaneceram abaixo dos valores de LIQ seguindo a administração oral ou intravenosa. O modelo de farmacocinética populacional foi desenvolvido para a cucurbitacina E administrada por via intravenosa com o auxílio do programa NONMEM com adequada qualidade de ajuste e desempenho preditivo. O perfil farmacocinético da cucurbitacina E administrada por via intravenosa foi descrito por modelo bicompartimental com distribuição e eliminação de primeira ordem com os seguintes parâmetros farmacocinéticos: tempo de liberação (D) de 0,45 h, volume de distribuição (Vd) de 27,22 L, *clearance* (Cl) de 4,13 L/h e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) de 4,57 h. As interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I com as albuminas séricas humana (HSA) e de rato (RSA) foram investigadas utilizando biossensor óptico baseado em ressonância de plasma de superfície (SPR) e espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Os dados de ligação das cucurbitacinas a albuminas foram obtidos por experimentos de competição de CD com biliverdina. Os dados de SPR revelaram um evento de ligação inédito entre a cucurbitacina I e a HSA e as afinidades de ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I são maiores para a RSA do que para a HSA. A cucurbitacina E e a cucurbitacina I podem ser classificadas como substâncias de alta afinidade de ligação com a HSA e com a RSA. A análise de CD mostrou que a cucurbitacina E e a cucurbitacina I modificam a ligação da biliverdina as albuminas através de modulação alostérica oposta (positiva para HSA, negativa para RSA), confirmando a necessidade de cuidados na extrapolação de dados farmacocinéticos pré-clínicos para clínicos.

Palavras chaves: cucurbitacina E, cucurbitacina I, ratos, farmacocinética populacional, ligação as proteínas plasmáticas.

ABSTRACT

LANCHOTI FIORI, G. M. **Population pharmacokinetics and plasma protein binding of cucurbitacin E and its metabolite cucurbitacin I in rats.** 2016. 94f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Cucurbitacin E is currently considered a drug candidate due to its anticancer activity, recognition of its molecular targets, and synergism with other drugs used for cancer treatment. However, the use of cucurbitacin E in clinical practice is not possible because of important research gaps regarding its preclinical and clinical pharmacokinetic characteristics. Cucurbitacin E is hydrolyzed to cucurbitacin I in plasma and in human liver microsomes. The aim of this study was to evaluate the population pharmacokinetics and plasma protein binding of cucurbitacin E and of its metabolite cucurbitacin I in rats. The method for the sequential analysis of cucurbitacins E and I in rat plasma was developed using LC-MS/MS. Plasma aliquots of 50 μ L were deproteinized with acetonitrile, the residues were reconstituted in acetonitrile:water (1:1, v/v), and clobazam was added as internal standard. The extracts were injected into an RP-18 column using a mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile:water:methanol (32:35:33, v/v/v). The method was precise and accurate, showing linearities at a range of 1-100 ng cucurbitacin E/mL plasma and of 0.4-200 ng cucurbitacin I/mL plasma. The method was applied to the pharmacokinetic evaluation of cucurbitacin E administered to male Wistar rats at a single oral (gavage) or intravenous dose of 1 mg/kg dissolved in DMSO and phosphate-buffered saline, pH 7.4 (5:95, v/v). Serial blood samples were collected up to 24 h after oral or intravenous administration. The plasma concentrations of cucurbitacin E were quantified up to 16 h only after intravenous administration, while the plasma concentrations of cucurbitacin I remained below the limit of quantification after oral or intravenous administration. The population pharmacokinetic model was developed for administered intravenously cucurbitacin E using the NONMEM program, with adequate goodness of fit and predictive performance. The pharmacokinetic profile of intravenously administered cucurbitacin E was described by a two-compartment model with first-order distribution and elimination. The following pharmacokinetic parameters were obtained: release time (D) of 0.45 h, volume of distribution (Vd) of 27.22 L, clearance (Cl) of 4.13 L/h, and elimination half-life ($t_{1/2}$) of 4.57 h. The interactions of cucurbitacin E and I with human (HSA) and rat (RSA) serum albumins were investigated using an optical biosensor by surface plasmon resonance (SPR) and circular dichroism (CD) spectroscopy. The binding data of the cucurbitacins to albumins were obtained by CD competition experiments with biliverdin. The SPR data revealed an undescribed binding event between cucurbitacin I and HSA and the binding affinities of cucurbitacin E and cucurbitacin I were higher for RSA than for HSA. Cucurbitacin E and cucurbitacin I can be classified as substances with high binding affinity for HSA and RSA. CD analysis showed that cucurbitacin E and cucurbitacin I modify the binding of biliverdin to albumins through opposite allosteric modulation (positive for HSA, negative for RSA), confirming that care should be taken when extrapolating the pharmacokinetic data between species.

Keywords: cucurbitacin E, cucurbitacin I, rats, population pharmacokinetics, plasma protein binding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esqueleto básico das cucurbitacinas.....	20
Figura 2.	Estrutura química da cucurbitacina E.....	23
Figura 3.	Estruturas químicas da cucurbitacina E e cucurbitacina I.....	23
Figura 4.	Estruturas químicas da cucurbitacina E e cucurbitacina I.....	27
Figura 5.	Espectros de massas do íon desprotonado e íon produto da cucurbitacina E obtidos no modo negativo.....	40
Figura 6.	Espectros de massas do íon desprotonado e íon produto da cucurbitacina I obtidos no modo negativo.....	41
Figura 7.	Espectros de massas do íon protonado e íon produto do padrão interno clobazam obtidos no modo positivo.....	41
Figura 8.	Cromatogramas referentes à eluição da cucurbitacina E, cucurbitacina I e do padrão interno clobazam da coluna Chromolit RP-18 com fase móvel constituída por mistura de acetonitrila:água:metanol.....	42
Figura 9.	Cromatogramas referentes à análise da cucurbitacina E em plasma de ratos na concentração do LIQ. Cromatogramas referentes às análises de seis diferentes amostras de plasma branco de ratos analisadas na transição da cucurbitacina E.....	43
Figura 10.	Cromatogramas referentes à análise da cucurbitacina I em plasma de ratos na concentração do LIQ. Cromatogramas referentes às análises de seis diferentes amostras de plasma branco de ratos analisadas na transição da cucurbitacina I.....	44
Figura 11.	Cromatogramas referentes à análise do padrão interno clobazam em plasma de ratos na concentração de 12,5 ng /mL. Cromatogramas referentes as análises de seis diferentes amostras de plasma branco de ratos analisadas na transição do padrão interno clobazam.....	45
Figura 12.	Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina E obtido antes do cromatograma do LQS. Cromatograma referente à análise da cucurbitacina E em plasma de ratos na concentração do LSQ. Cromatograma referente a análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina E obtido após o cromatograma B. Cromatograma referente a análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina E obtido após o cromatograma C.....	46
Figura 13.	Cromatograma referente á análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina I obtido antes do cromatograma do LQS.	

	Cromatograma referente à análise da cucurbitacina I em plasma de ratos na concentração do LSQ. Cromatograma referente a análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina E obtido após o cromatograma B. Cromatograma referente a análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina I obtido após o cromatograma C.....	47
Figura 14.	Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição do padrão interno clobazam obtido antes do cromatograma do LQS da cucurbitacina E e do LQS da cucurbitacina I. Cromatograma referente à análise do padrão interno clobazam obtido no LQS da cucurbitacina E e da cucurbitacina I. Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição do padrão interno clobazam obtido depois do cromatograma B. Cromatograma referente a análise de plasma branco de rato na transição do padrão interno clobazam obtido depois do cromatograma C.	48
Figura 15.	Cromatogramas referentes à análise de uma amostra de plasma coletada 3 h após a administração oral de cucurbitacina E (1 mg/kg) a um rato Wistar. Cromatograma obtido na transição da cucurbitacina E. Cromatograma obtido na transição da cucurbitacina I. Cromatograma obtido na transição do padrão interno clobazam.....	53
Figura 16.	Cromatogramas referentes à análise de uma amostra de plasma coletada 3 h após a administração intravenosa de cucurbitacina E a um rato Wistar. Cromatograma obtido na transição da cucurbitacina E. Cromatograma obtido na transição da cucurbitacina I. Cromatograma obtido na transição do padrão interno clobazam.....	54
Figura 17.	Modelo de farmacocinética populacional de administração intravenosa de cucurbitacina E a ratos.	55
Figura 18.	Gráficos GOF de qualidade do ajuste do modelo populacional da cucurbitacina E administrada por via intravenosa a ratos.....	56
Figura 19.	Verificação visual preditiva.....	57
Figura 20.	Sensogramas para a cucurbitacina E e cucurbitacina I ligadas a HSA e RSA utilizando o chip de alta densidade.....	74
Figura 21.	Sinal do CD e espectro UV obtidos para a cucurbitacina E e cucurbitacina I em solução e nas interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA.....	76
Figura 22.	Efeito das concentrações crescentes de cucurbitacina E e cucurbitacina I na magnitude positiva da banda ICD para o complexo HSA-BV e negativa da banda ICD para o complexo RSA-BV.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Transições monitoradas para a cucurbitacina E e cucurbitacina I no modo MRM com ionização por eletronebulização no modo negativo.....	32
Tabela 2.	Transições monitoradas para o clobazam no modo MRM com ionização por eletronebulização no modo positivo.....	32
Tabela 3.	Concentrações dos controles de qualidade para a análise da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos.....	33
Tabela 4.	Parâmetros de validação do método de análise da cucurbitacina E em plasma de ratos.....	49
Tabela 5.	Parâmetros de validação do método de análise da cucurbitacina I em plasma de ratos.....	50
Tabela 6.	Efeito matriz na análise da cucurbitacina E em 8 diferentes lotes de plasma de ratos, sendo 6 normais e 2 hemolisados.....	51
Tabela 7.	Efeito matriz na análise da cucurbitacina I em 8 diferentes lotes de plasma de ratos, sendo 6 normais e 2 hemolisados.....	51
Tabela 8.	Estudos de estabilidade da cucurbitacina E em plasma de ratos.....	51
Tabela 9.	Estudos de estabilidade da cucurbitacina I em de plasma de ratos.....	52
Tabela 10.	Estudos de estabilidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I em metanol.....	52
Tabela 11.	Estimativas do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E administrada por via intravenosa a ratos.....	57
Tabela 12.	Constantes de equilíbrio de dissociação (K_d), razões das constantes cinéticas (K_{on} e K_{off}) e porcentagens de ligação (x_b), oriundos das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando biossensor óptico baseado em SPR.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BV	biliverdina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CD	dicroísmo circular
CI	<i>clearance</i>
CWRES	resíduos condicionais ponderados – do inglês <i>Conditional Weighted Residuals</i>
CQA	controle de qualidade de alta concentração
CQB	controle de qualidade de baixa concentração
CQBLIQ	controle de qualidade do limite inferior de quantificação
CQD	controle de qualidade de diluição
CQM	controle de qualidade de média concentração
CV	coeficiente de variação
CYP	citocromo P450
D	tempo de liberação
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EDC	etila-3-(3-dimetilaminopropila) carbodiimida
EPR	erro padrão relativo
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMN	fator de matriz normalizado por padrão interno
FOCE-I	estimação condicional de primeira ordem com a opção de interação – do inglês <i>first order conditional estimation with the interaction option</i>

GOF	ajuste de qualidade – do inglês <i>Goodness Of Fit</i>
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
HSA	albumina sérica humana
ICD	dicroísmo circular induzido
JAK2/STAT3	janus quinase 2/ transdutor de sinais e ativador da transcrição 3
K _d	constante de equilíbrio de dissociação
K _{on} e K _{off}	constantes cinéticas de associação e de dissociação
LC-MS/MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial
LIQ	limite inferior de quantificação
LSQ	limite superior de quantificação
MRM	monitoramento de reações múltiplas
NHS	N-hidroxisuccinimida
NONMEM	modelo não linear de efeitos mistos - do inglês <i>Nonlinear mixed effect modelling</i>
OFV	valor da função objetiva – do inglês <i>Objective Function Value</i>
PI	padrão interno
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
Q	<i>clearance</i> intercompartmental
r	coeficiente de correlação linear
R	resposta
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RSA	albumina sérica de ratos
RSE%	desvio padrão relativo
RU	unidade de ressonância

SPR	ressonância de plasma de superfície
UCL	University College London
UGT1A1	glicurunosiltransferase 1A1
UGT1A7	glicurunosiltransferase 1A6
UGT1A10	glicurunosiltransferase 2B17
UNIBO	Università di Bologna
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultravioleta
V _c	volume de distribuição do compartimento central
V _p	volume de distribuição do compartimento periférico
VPC	verificação visual preditiva – do inglês <i>Visual Predictive Check</i>
v/v	volume/volume
x_b	porcentagem de ligação
®	marca registrada

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas.....	v
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	vi
Introdução Geral.....	19
CAPÍTULO 1.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Desenvolvimento e validação do método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos.....	31
3.1.1 Soluções padrão e reagentes.....	31
3.1.2 Análise cromatográfica.....	31
3.1.3 Preparo das amostras.....	32
3.1.4 Validação do método de análise	33
3.1.4.1 Seletividade.....	34
3.1.4.2 Efeito residual.....	34
3.1.4.3 Efeito Matriz.....	34
3.1.4.4 Linearidade e Limite Inferior de Quantificação.....	35
3.1.4.5 Precisão e Exatidão.....	35
3.1.4.6 Estudos de estabilidade.....	36
3.2 Farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos.....	37
3.2.1 Protocolo experimental do estudo da farmacocinética da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em plasma de ratos.....	37
3.2.2 Desenvolvimento do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos.....	38
3.2.3 Validação do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Desenvolvimento do método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos.	40
4.2. Validação do método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos.....	43

4.3. Concentrações plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em amostras de plasma de ratos.....	53
4.4. Desenvolvimento e validação do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos seguindo a administração intravenosa.....	55
5. DISCUSSÃO.....	58
6. CONCLUSÃO.....	64
CAPÍTULO 2.....	65
1. INTRODUÇÃO.....	66
2. OBJETIVOS.....	68
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	69
3. 1 Padrões, reagentes e soluções tampão	69
3.2 Interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando biossensor óptico baseado em SPR.....	69
3.2.1 Instrumentação.....	69
3.2.2 Preparação e validação dos chips.....	69
3.2.3 Correção do índice de refração do solvente	70
3.2.4 Análises das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA.....	71
3.2.5 Análise dos dados.....	71
3.3 Interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando dicroísmo circular.....	72
3.3.1 Análises das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA.....	72
3.3.2 Estudos de competição das cucurbitacinas com a BV.....	72
4. RESULTADOS.....	74
4.1 Interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando biossensor óptico baseado em SPR.....	74
4.2 Interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando dicroísmo circular.....	76
4.3 Estudos de competição das cucurbitacinas com a BV.....	77
5. DISCUSSÃO.....	78
6. CONCLUSÃO.....	81
Conclusão geral.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXO.....	94

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país de grande biodiversidade com destaque especial para as plantas medicinais. O maior potencial econômico desta biodiversidade está direcionado ao desenvolvimento de novos medicamentos e fitoterápicos (BOLZANI, 2016).

Aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% obtidos a partir de plantas medicinais. Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, com destaque aos medicamentos usados no tratamento do câncer e aos antibióticos (CRAGG et al., 2014; NEWMAN & CRAGG, 2016).

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde a antiguidade, principalmente as plantas medicinais empregadas no tratamento, cura e prevenção de doenças (CALIXTO 2000; VEIGA JUNIOR et al., 2005).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) aprovada pelo Ministério da Saúde (Brasília, DF) em 2006, está completando 10 anos e tem como objetivo “garantir a população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”. A busca por tratamentos a base de plantas medicinais e fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde apresentou crescimento de 161%, entre os anos de 2013 e 2015 (PORTAL BRASIL, 2016).

O vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais no Brasil é consequente da nossa rica diversidade cultural e étnica, transmitida de geração a geração (LEAL & TELLIS, 2015).

Dentre as inúmeras plantas medicinais consagradas pelo uso popular, destaca-se a família *Cucurbitaceae*, com espécies como a “buchinha” (*Luffa operculata*) (KAWAHARA et al., 2001), a “taiuiá” (*Wilbrandia ebracteata* e/ou *Cayaponia tayuya*) (SCHENKEL et al., 1992; FARIAS et al., 1993). Essas espécies tem em comum a presença de cucurbitacinas, as quais inicialmente foram consideradas como sendo tóxicas e responsáveis pelo amargor característico destas espécies (LAVIE & GLOTTER, 1971; VALENTE, 2004).

As cucurbitacinas encontradas principalmente na família *Cucurbitaceae*, também estão presentes em outras famílias de plantas, tais como na *Begoniaceae*,

Brassicaceae, *Scrophulariaceae*, *Primulaceae*, *Polemoniaceae*, *Rosaceae*, entre outras (CHEN et al., 2005; GREIGE- GERGES et al., 2007a; VALENTE, 2004).

As cucurbitacinas (Figura 1) são triterpenos tetracíclicos oxigenados, livres ou glicosilados (LAVIE & GLOTTER, 1971). As primeiras agliconas isoladas com esqueleto cucurbitano (19(10 $\rightarrow$ 9 β)-*abeo*-10 α -lanostano) receberam como nome a palavra cucurbitacina seguida de uma letra de acordo com a cronologia do isolamento e ou elucidação (VALENTE, 2004).

Figura 1. Esqueleto básico das cucurbitacinas (CHEN et al., 2005; LAVIE & GLOTTER, 1971; VALENTE, 2004).

As cucurbitacinas são divididas em 12 categorias, denominadas em ordem alfabética de A a T. A variedade estrutural das cucurbitacinas, decorrente principalmente dos diferentes padrões de oxigenação e modificações na cadeia lateral, deu origem ao grande número de compostos conhecidos atualmente (CHEN et al., 2005; MIRÓ, 1995; VALENTE, 2004).

As cucurbitacinas exibem grande potencial farmacológico devido ao amplo espectro de atividades biológicas, tais como a antimicrobiana (MIRÓ, 1995), antiinflamatória (MIRÓ, 1995; RECIO et al., 2004), anti-HIV (WU et al., 2004), antioxidante (TANNIN-SPITZ et al., 2007), citotóxica e antitumoral (ATTARD & MARTINOLI, 2015; CHEN et al., 2012; JAYAPRAKASAM et al., 2003; MIRÓ, 1995), dentre outras.

As cucurbitacinas despertaram grande interesse da indústria farmacêutica durante a década de 60 devido a atividade anticâncer observada nos estudos *in vitro* e *in vivo* (GEISSMAN 1964; CHEN et al., 2005). No entanto, poucos estudos foram publicados nos 20 anos seguintes provavelmente devido ao baixo índice terapêutico, citotoxicidade não específica (CHEN et al., 2005) e casos de intoxicação humana

relatados para esta classe de compostos (RAIKHLIN-EISENKRAFT & BENTUR, 2000). Ressalta-se, no entanto, que muitos estudos que mostraram a toxicidade das cucurbitacinas (GEISSMAN, 1964; CHEN et al., 2005; RAIKHLIN-EISENKRAFT & BENTUR, 2000), utilizaram extratos de plantas sem a purificação adequada, não forneceram informações clínicas relevantes e não padronizaram adequadamente os métodos para estudar suas propriedades farmacológicas (LEE et al., 2010).

No final dos anos 80, o desenvolvimento dos protocolos de padronização de testes e linhagens celulares pelo *National Cancer Institute* (NCI, EUA) proporcionou um grande avanço para a pesquisa de anticancerígenos derivados de plantas, incluindo as cucurbitacinas (SHOEMAKER, 2006), bem como incentivou a pesquisa para elucidar o mecanismo de ação das cucurbitacinas ao nível molecular (LEE et al., 2010).

Atualmente, o grande interesse e estudos das cucurbitacinas estão centrados no potencial antiproliferativo e citotóxico que estas substâncias apresentam para um grande número de linhagens de células cancerosas humanas, tais como cólon, mama, fígado, pele, pulmão, sistema nervoso central, próstata, nasofaringe (ATTARD & MARTINOLI, 2015; CHEN et al., 2005; CHEN et al., 2012; CHUNG et al., 2015; DUNCAN et al., 1996; HUNG et al., 2013; JAYAPRAKASAM et al., 2003; MA et al., 2016; NAGGAR et al., 2015).

Estudos experimentais mostram efeitos sinérgicos da associação de cucurbitacinas com fármacos utilizados na terapia anticâncer como doxorrubicina, tamoxifeno e dexametasona (LIU et al., 2010; LEE et al., 2010; CHANG, et al., 2012). Como exemplo, a cucurbitacina E promove acúmulo celular de doxorrubicina devido a facilitação do influxo e prevenção do efluxo da doxorrubicina em células tumorais (SADZUKA et al., 2008).

Além disso, estão sendo identificados alvos promissores para a terapia do câncer com cucurbitacinas, tais como a inibição da via de sinalização JAK2/STAT3 (janus quinase 2/ transdutor de sinais e ativador da transcrição 3) (ALGHASHAM, 2013; BLASKOVICH et al., 2003; SARI-HASSOUN et al., 2016; QI et al., 2015) ou ruptura das redes de actina e de vimentina no citoesqueleto (ALGHASHAM, 2013; DUNCAN et al., 1996; SARI-HASSOUN et al., 2016).

Logo, as cucurbitacinas exibem alvos moleculares promissores para serem desenvolvidas como novas drogas anticâncer com atividade na inibição do crescimento de células cancerosas, indução da apoptose e aumento da resposta imune anticâncer

(ATTARD & MARTINOLI 2015; CHEN et al., 2012; CHUNG et al., 2015; MOLAVI et al., 2006; RECIO et al., 2012; SARI-HASSOUN et al., 2016).

Diversos estudos *in vitro*, *in vivo* e revisões estão disponíveis na literatura, destacando o potencial biológico das cucurbitacinas, principalmente relacionado a atividade farmacológica aplicada ao tratamento do câncer. Em especial, revisões realizadas por Chen et al. (2012) e Chung et al. (2015), abordando as atividades biológicas e potenciais alvos moleculares para cucurbitacinas com foco no câncer, destacaram os inúmeros trabalhos relacionados a este potencial, os alvos moleculares já citados e os potenciais comprovados para a cucurbitacina E e cucurbitacina I em diversas linhagens de células cancerosas. A cucurbitacina E mostra citotoxicidade para as linhagens de células do câncer do cólon, pulmão, mama, SNC, pele, leucemia aguda, próstata, pâncreas, ovário, bexiga e fígado. Já para a cucurbitacina I, existem relatos sobre propriedades anti-proliferativas em linhagens de células do câncer de cólon, pulmão, mama, SNC, pele, linfomas malignos, entre outros.

A cucurbitacina E e a cucurbitacina I exibem atividade antiproliferativa em células cancerosas através de diferentes mecanismos. A cucurbitacina I inibe a via JAK2/STAT3 (BLASKOVICH et al., 2003; SAADE et al., 2009; SARI-HASSOUN et al., 2016; QI et al., 2015), enquanto a cucurbitacina E inibe a angiogênese em tumor mediada via JAK2-STAT3 (SUN et al., 2010) e em tumor de mama suprime a migração e invasão celular (ZHANG et al., 2012). Além da atividade antiproliferativa em células cancerosas, a cucurbitacina E também exibe os efeitos anti-inflamatório (ABDELWAHAB et al., 2011; JEVTIĆ et al., 2016; QIAO et al., 2013) e neuroprotetor (ATTARD & MARTINOLI, 2015).

A cucurbitacina E (Figura 2), embora negligenciada por décadas, tem merecido a atenção especial de muitos grupos de pesquisa em função de sua promissora atividade anticâncer (ALGHASHAM, 2013; CHEN et al., 2005; HABIB et al., 2013; SARI-HASSOUN et al., 2016; MA et al., 2016). A atividade via disrupção do citoesqueleto celular e da capacidade de inibição da via JAK2-STAT3, dentre outros mecanismos, e o sinergismo com outros medicamentos utilizados na terapia do câncer, torna a cucurbitacina E uma excelente candidata para a avaliação clínica (ATTARD & MARTINOLI, 2015; CHUNG et al., 2015; LEE et al., 2010).

Figura 2. Estrutura química da cucurbitacina E (CHEN et al., 2005, CHEN et al., 2012, VALENTE et al., 2004).

Existem poucos estudos relacionados ao metabolismo da cucurbitacina E e cucurbitacina I. O primeiro estudo realizado por Lorenz et al. (2005) relatou que a cucurbitacina E e a cucurbitacina I são rapidamente metabolizadas em microsomas de fígado de rato, porém os metabólitos não foram identificados. Os estudos preliminares de metabolismo mostram que a cucurbitacina E é hidrolisada a cucurbitacina I no plasma humano através da paraoxonase (SAADE et al., 2009) e hidrolisada em microsomas de fígado humano em função da ação de carboxilesterases (ABBAS et al., 2013) (Figura 3). No entanto, a cucurbitacina E e a cucurbitacina I são hidroxiladas em baixa extensão em microsomas de fígado humano (ABBAS et al., 2013).

Figura 3. Estrutura química da cucurbitacina E (CHEN et al., 2005, CHEN et al., 2012, VALENTE et al., 2004) e cucurbitacina I (CHEN et al., 2005, CHEN et al., 2012, VALENTE et al., 2004).

A cucurbitacina E e a cucurbitacina I possuem vários grupamentos hidroxila que representam sítios potenciais de conjugação por ação de sulfotransferases e UDP-glicuronosiltransferases (UGT1A1, UGT1A7, UGT1A10). Em microssomas de fígado humano, a afinidade da cucurbitacina E ($V_{max}/K_m=5,71$) é maior do que a afinidade da cucurbitacina I ($V_{max}/K_m=0,19$) para as reações de glicuronidação (ABBAS et al., 2013).

É importante salientar que a cucurbitacina E em doses de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/kg}$, administradas por via intraperitoneal, inibe a atividade do CYP2C em ratos, pois diminui o *clearance* e prolonga a meia-vida de eliminação da warfarina, um fármaco marcador da atividade *in vivo* do CYP2C em ratos (DING et al., 2015). A administração de cucurbitacina E em doses de 50-200 $\mu\text{g/kg}$ durante três dias também reduz o *clearance* e prolonga a meia-vida de eliminação da tolbutamida, um outro fármaco marcador da atividade *in vivo* do CYP2C em ratos (LU et al., 2015).

A cucurbitacina E e a cucurbitacina I interagem de maneira diferente com a albumina do plasma humano. A cucurbitacina E interage com a albumina do plasma humano, particularmente no domínio II, resultando em aumento na ligação da bilirrubina a albumina, na forma conjugada ou não ao ácido glicurônico (GREIGE - GERGES et al., 2007a). No entanto, a cucurbitacina I não modifica a ligação da bilirrubina a albumina e provavelmente ocupa o sítio II, diminuindo a ligação do ibuprofeno (GREIGE - GERGES et al., 2007b).

Após mais de 50 anos de pesquisas com cucurbitacinas, a comunidade científica reconhece o potencial da cucurbitacina E como candidata a fármaco em razão de sua atividade anticâncer, reconhecimento de seus alvos moleculares e sinergismo com fármacos utilizados na clínica (ALGHASHAM et al., 2013; ATTARD & MARTINOLI 2015; BERNARD, S. A. & OLAYINKA, O. A, 2010; DING et al., 2015; LEE et al., 2010; SARI-HASSOUN et al., 2016). Porém, mesmo com tantos anos de pesquisas com cucurbitacinas, ainda não é possível seu uso na clínica devido a importantes lacunas na literatura relativas a ensaios de farmacocinética pré-clínicos e clínicos (CHEN et al., 2012, LEE et al., 2010; THOENNISSSEN et al., 2009). Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a farmacocinética da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em plasma de ratos, o desenvolvimento de um modelo de farmacocinética populacional para cucurbitacina E em ratos e avaliar influência da espécie na ligação da cucurbitacinas E e da cucurbitacina I a albumina do plasma humano e de ratos.

O estudo está apresentado em 2 Capítulos. O Capítulo 1 abrange o desenvolvimento e a validação do método de análise sequencial da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em plasma de ratos com aplicação em estudo de farmacocinética de dose única, assim como o desenvolvimento de um modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E e cucurbitacina I em ratos. O Capítulo 2 aborda a influência da espécie na ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I a albumina do plasma humano e de ratos.

CAPÍTULO 1

**Farmacocinética populacional da cucurbitacina E e seu
metabólito cucurbitacina I em ratos**

1. INTRODUÇÃO

A cucurbitacina E [(E,6R)-6-[(8S,9R,10R,13R,14S,16R,17R)-2,16-diidroxio-4,4,9,13,14-pentametila-3,11-dioxo-8,10,12,15,16,17-hexaidro-7H-ciclopenta[a]fenatreno-17-ila]-6-hidroxi-2-metila-5-oxoept-3-an-2-ila] acetato) e a cucurbitacina I ((8S,9R,10R,13R,14S,16R,17R)-17-[(E,2R)-2,6-diidroxio-6-metila-3-oxoept-4-an-2-ila]-2,16-diidroxio-4,4,9,13,14-pentametila-8,10,12,15,16,17-hexaidro-7H-ciclopenta[a]fenatreno -3,11-diona) (Figura 4) vem sendo amplamente avaliadas em estudos *in vitro* e *in vivo* quanto as suas propriedades farmacodinâmicas (ABDELWAHAB et al., 2011; ATTARD & CUSCHIERI, 2004; DONG et al., 2010; HUNG et al., 2013; MA et al., 2016; NAGGAR et al., 2015; QIAO et al., 2013; SUN et al., 2010; ZHANG et al., 2012), porém pouco se sabe sobre suas propriedades físico-químicas, metodologias analíticas em fluidos biológicos e propriedades farmacocinéticas.

Figura 4. Estruturas químicas da cucurbitacina E (CHEN et al., 2005, CHEN et al., 2012, VALENTE et al., 2004) e cucurbitacina I (CHEN et al., 2005, CHEN et al., 2012, VALENTE et al., 2004).

As estruturas químicas da cucurbitacina E e cucurbitacina I denotam baixa solubilidade água com maior grau maior de hidrofobicidade para a cucurbitacina E (ALGHASHAM, 2013; SAADE et al., 2009). Os métodos de análise de cucurbitacinas descritos na literatura de maneira geral referem-se a extratos de plantas (GREIGES et al., 2007b; HALAWEISH & TALLAMY, 1993; NAGGAR et al., 2015; SAADE et al., 2009; SEGER et al., 2004), soluções tampão e solventes orgânicos (HABIB et al., 2013; SAADE et al., 2009), empregando HPLC com detecção por ultravioleta. A análise de cucurbitacinas em fluidos biológicos referem-se apenas a análise da cucurbitacina B em plasma de ratos seguindo a administração de dose única oral de 20 mg/kg, realizada por UPLC-MS/MS (ZHAO et al., 2015) e a análise da cucurbitacina I em plasma de ratos seguindo a administração de dose única intravenosa de 0,4; 1 ou 1,5 mg/kg, empregando LC-MS (MOLAVI et al., 2006). No entanto, não há dados na literatura relativos ao desenvolvimento e validação de métodos de análise da cucurbitacina E em fluidos biológicos.

No desenvolvimento e pesquisa de substâncias candidatas a fármacos é de extrema importância o desenvolvimento e validação de métodos analíticos seletivos, precisos, exatos e com sensibilidade compatível com a aplicação em estudos de farmacocinética de dose única. O presente estudo relata pela primeira vez o desenvolvimento e a validação de um método analítico sequencial para análise da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos empregando LC-MS/MS. O método analítico foi aplicado nos estudos de farmacocinética em ratos da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I.

Os modelos de farmacocinética populacional apresentam como objetivo a seleção da dose através da predição da exposição ao fármaco em uma população específica (RIBBING & JONSSON, 2004).

A farmacocinética populacional empregando modelos hierárquicos não lineares de efeitos mistos foi inicialmente utilizada na análise de amostras biológicas coletadas de forma esparsa em populações heterogêneas (SHEINER et al., 1977). Atualmente, estes modelos são utilizados para gerar dados farmacocinéticos a partir de amostragens esparsas ou frequentes, em grandes ou pequenas populações e em todas as fases do desenvolvimento de fármacos (BELLANTI & PASQUA, 2011), sendo a ferramenta de análise recomendada pelo FDA (*Food and Drug Administration - Guidance for Industry Population Pharmacokinetics*, 1999), mas ainda empregada por poucos grupos de pesquisa no Brasil.

O presente estudo ainda descreve pela primeira vez o desenvolvimento do modelo da farmacocinética populacional da cucurbitacina E em ratos empregando o programa NONMEM[®] (*Nonlinear mixed effect modelling*).

Considerando a busca crescente de substâncias candidatas a fármacos oriundos de plantas medicinais, este trabalho se justifica pelo promissor potencial farmacológico da cucurbitacina E, uma vez que não existem estudos de sua farmacocinética pré-clínica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver um modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em plasma de ratos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Desenvolver e validar um método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos empregando LC-MS/MS com aplicação em estudos de farmacocinética.

2.2.2. Desenvolver o protocolo experimental para a avaliação da farmacocinética da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em estudos de administração de dose única intravenosa e oral a ratos.

2.2.3. Desenvolver e validar o modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E e cucurbitacina I em ratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Desenvolvimento e validação do método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos.

3.1.1 Soluções padrão e reagentes

A solução estoque de cucurbitacina E ($\geq 95\%$) e cucurbitacina I ($\geq 95\%$) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de metanol e diluída para a obtenção das soluções de uso nas concentrações de 2, 4, 8, 20, 40, 80, 160 e 200 ng de cucurbitacina E/mL de metanol e nas concentrações de 0,8; 1,6; 4, 10, 20, 40, 100, 160, 320 e 400 ng de cucurbitacina I/mL de metanol.

A solução de clobazam (padrão interno - PI, $\geq 98\%$, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparada na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de metanol e diluída para 500 ng/mL de metanol.

Todas as soluções foram armazenadas a -20°C até 30 dias.

Os solventes utilizados nos procedimentos de preparo da amostra, fase móvel e fase de limpeza do sistema cromatográfico foram metanol, acetonitrila (ambos da Merck, Darmstadt, Alemanha) e isopropanol (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA) grau cromatografia. A água utilizada nos experimentos foi obtida em sistema de purificação Synergy[®] UV (Millipore, Belford, MA, EUA).

3.1.2 Análise cromatográfica

As análises de cucurbitacina E e cucurbitacina I foram realizadas por LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial) utilizando o sistema *Acquity UPLC H-Class System*[®], constituído por bomba quaternária, forno de coluna e injetor automático, acoplado ao detector triplo quadrupolo *Xevo*[®] *TQ-S* (Waters, Milford, MA, EUA).

A cucurbitacina E, cucurbitacina I e o padrão interno clobazam foram separados na coluna cromatográfica Chromolit[®] RP-18, 100 x 4,6 mm com partículas de 4 μm e com pré-coluna LiChrospher[®] 100 RP-18, 4 x 4 mm, partículas de 5 μm (Merck, Darmstadt, Alemanha), mantidas a 24°C , com fase móvel constituída por mistura de acetonitrila:água:metanol (32:35:33; v/v/v), na vazão de 0,8 mL/min. A fase de limpeza do sistema cromatográfico foi constituída por mistura de metanol:isopropanol (1:1; v/v).

O espectrômetro de massas sequencial com interface por eletronebulização para a cucurbitacina E e cucurbitacina I e padrão interno operou nas seguintes condições: nitrogênio como gás de nebulização na vazão de 150 L/h e argônio como gás de colisão na vazão de 0,18 mL/min, voltagem do capilar 2,5 kV, temperatura da fonte de ionização de 150°C e temperatura de dessolvatação de 600°C.

As condições de otimização do detector MS/MS foram obtidas no modo negativo para a cucurbitacina E e cucurbitacina I (Tabela 1) e no modo positivo para o padrão interno clobazam (Tabela 2), através da infusão direta de soluções padrão na concentração de 100 ng/mL da mistura metanol:água (1:1, v/v). As análises foram executadas no modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

Tabela 1. Transições monitoradas para a cucurbitacina E e cucurbitacina I no modo MRM com ionização por eletronebulização no modo negativo.

	Transição (<i>m/z</i>)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)
cucurbitacina E	555,2>537,3	30	19
cucurbitacina I	513,4>495,3	50	17

Tabela 2. Transições monitoradas para o clobazam no modo MRM com ionização por eletronebulização no modo positivo.

	Transição (<i>m/z</i>)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (V)
clobazam (PI)	301,0>256,0	35	30

A aquisição dos dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa MassLynx versão 4,1 (Waters, Milford, EUA).

3.1.3 Preparo das amostras

Alíquotas de 50 µL de plasma de ratos foram transferidas para microtubos de 500 µL (Axygen Scientific, Union City, California, EUA) e adicionadas de 100 µL de acetonitrila para precipitação proteica. Os tubos foram agitados durante 30 s em agitador tipo *mixer* (Phoenix Luferco, modelo AP56, Araraquara, SP) e centrifugados durante 2 min a 6000 rpm, a 5°C (Novatecnica, modelo NT 825, Piracicaba, SP). Em seguida, alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram transferidas para frascos do injetor automático do sistema HPLC e adicionadas de 100 µL da mistura acetonitrila:água (1:1; v/v) e 25 µL da solução do padrão interno clobazam. Os frascos

foram agitados em agitador tipo *mixer* durante 30 s e volumes de 50 μ L foram introduzidos no sistema cromatográfico para a análise.

3.1.4 Validação do método de análise

O método de análise da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos foi validado de acordo com as recomendações da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012) para métodos bioanalíticos. Os parâmetros avaliados foram seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão, limite inferior de quantificação e estabilidade.

O método foi validado empregando como matriz biológica alíquotas de plasma branco oriundas de sangue de ratos machos Wistar não submetidos ao protocolo experimental (amostra branco). As amostras de sangue foram coletadas empregando heparina (Hepamax-S[®], Blausiegel Ind. Com. Ltda, Cotia, SP) como anticoagulante.

Os controles de qualidade foram preparados com alíquotas de plasma branco enriquecidas com soluções padrão de cucurbitacina E e cucurbitacina I. A Tabela 3 mostra os valores de concentrações plasmáticas das amostras de controle de qualidade do limite inferior de quantificação (CQLIQ), de baixa concentração (CQB), de média concentração (CQM) e de alta concentração (CQA). Ressalta-se que não foram analisados controles de qualidade de diluição (CQD), uma vez que as amostras analisadas no estudo de farmacocinética resultaram em concentrações de cucurbitacina E e cucurbitacina I abaixo do limite superior de quantificação (LSQ).

Tabela 3. Concentrações dos controles de qualidade para a análise da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos.

<i>(ng/mL de plasma)</i>	<i>cucurbitacina E</i>	<i>cucurbitacina I</i>
<i>CQLIQ</i>	1,0	0,4
<i>CQB</i>	2,0	0,8
<i>CQM</i>	40,0	80,0
<i>CQA</i>	80,0	160,0

CQLIQ-controle de qualidade do limite inferior de quantificação, CQB- controle de qualidade de baixa concentração, CQM-controle de qualidade de média concentração e CQA- controle de qualidade de alta concentração.

3.1.4.1 Seletividade

A seletividade foi determinada através da análise de 6 amostras de plasma oriundas de diferentes ratos, sendo 5 normais e 1 hemolisada. As amostras de plasma foram processadas como descrito no item 3.1.3. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos das amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ) (1,0 ng de cucurbitacina E/mL de plasma e 0,4 ng de cucurbitacina I/mL de plasma). As respostas de picos interferentes próximos aos tempos de retenção da cucurbitacina E e cucurbitacina I deverão ser inferiores a 20% da resposta da cucurbitacina E e cucurbitacina I nas amostras do LIQ, enquanto as respostas de picos interferentes próximas ao tempo de retenção do padrão interno deverão ser inferiores a 5% da resposta do padrão interno clobazam.

3.1.4.2 Efeito residual

Para a determinação do efeito residual, foram realizadas três injeções da mesma amostra de plasma branco. Uma injeção foi feita antes e duas após a injeção de uma amostra de plasma enriquecida nas concentrações do Limite Superior de Quantificação-LSQ (100 ng de cucurbitacina E/mL de plasma e 200 ng de cucurbitacina I/mL de plasma). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito deverão ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno deverão ser inferiores a 5% da resposta do padrão interno.

3.1.4.3 Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação direta das áreas dos picos da cucurbitacina E, cucurbitacina I e do padrão interno clobazam, injetados diretamente na mistura de acetonitrila:água (1:1), com as áreas dos picos obtidas de soluções padrão adicionadas a extratos de plasma branco nas mesmas concentrações das amostras de CQB e CQA. As amostras de plasma branco oriundas de 8 animais diferentes, sendo 6 amostras normais e 2 amostras hemolisadas, foram processadas como descrito no item 3.1.3 para a obtenção dos referidos extratos.

Para cada amostra foi calculado o fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN), conforme a fórmula a seguir:

$$FMN = (\text{Resposta da cucurbitacina E ou cucurbitacina I em plasma} / \text{Resposta do padrão interno clobazam em plasma}) / (\text{Resposta da cucurbitacina E ou cucurbitacina I em solução padrão} / \text{Resposta do padrão interno clobazam em solução padrão}).$$

O coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deverá ser inferior a 15%.

3.1.4.4 Linearidade e Limite Inferior de Quantificação

A linearidade foi avaliada através de três curvas de calibração, construídas com dados obtidos de análises de alíquotas de 50 µL de plasma branco de ratos enriquecidas com 25 µL de cada solução padrão de cucurbitacina E e cucurbitacina I, resultando nas concentrações de 1, 2, 4, 10, 20, 40, 80 e 100 ng de cucurbitacina E/mL de plasma e 0,4; 0,8; 2, 5; 10; 20, 50, 80, 160 e 200 ng de cucurbitacina I/mL de plasma. As análises da amostra branco (sem cucurbitacina E, sem cucurbitacina I e sem padrão interno) e da amostra zero (contendo apenas padrão interno) também foram incluídas. O LIQ foi determinado através da análise de 10 réplicas da concentração de 1,0 ng de cucurbitacina E/mL de plasma e 0,4 ng de cucurbitacina I/mL de plasma.

A curva de calibração deverá ser aprovada quando os padrões de calibração do LIQ apresentarem desvio menor ou igual a 20% em relação a concentração nominal, enquanto para os outros padrões de calibração serão aceitos valores até 15%.

3.1.4.5 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas através de estudos intracorridas e intercorridas. Os estudos foram realizados nas concentrações do LIQ, CQB, CQM e CQA para cucurbitacina E e cucurbitacina I.

Para a avaliação da precisão e da exatidão intracorrida foram analisadas 5 replicatas de cada concentração através de uma única curva de calibração. Na avaliação da precisão e da exatidão intercorridas foram analisadas 5 replicatas de cada uma das concentrações durante 3 diferentes corridas.

A avaliação da precisão intracorrida e intercorridas foi realizada através do cálculo do coeficiente de variação (CV) dos resultados obtidos. Para que o método possa ser referido como preciso, o CV deverá ser igual ou inferior a 15%, exceto para o LIQ com valor aceitável de CV de até 20%. A exatidão é expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR), conforme a equação abaixo. Para que o método possa ser referido como

exato, o EPR deverá estar dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, com valores aceitáveis na faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal.

$$\text{EPR} = (\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal} \times 100) / \text{Valor nominal}$$

3.1.4.6 Estudos de estabilidade

Foram realizados os estudos de estabilidades da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos e nas soluções padrão em metanol. Os estudos de estabilidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos consistiram em determinar a estabilidade de curta duração, pós processamento, após ciclos de congelamento e descongelamento e longa duração.

Para a avaliação da estabilidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos foram preparadas, em quintuplicatas, amostras enriquecidas nas concentrações do CQB e CQA. A avaliação da estabilidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I nas soluções padrão em metanol foi realizada nas mesmas concentrações do CQB e CQA, as quais foram preparadas e armazenadas durante 30 dias em temperatura de -20°C .

A avaliação da estabilidade de curta duração das amostras de plasma foi realizada em temperatura ambiente (23°C) durante 4 horas. Após este período, as amostras foram processadas como descrito no item 3.1.3. Para avaliação da estabilidade pós-processamento, as amostras processadas foram mantidas no auto injetor a 12°C durante 12 horas, sendo então injetadas no sistema cromatográfico. Para verificar a estabilidade após 2 ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras de plasma de ratos enriquecidas foram congeladas a -70°C durante 12 horas. Após este período, foram descongeladas e congeladas novamente por 12 horas, repetindo-se o processo até o segundo ciclo de descongelamento quando foram processadas e analisadas no sistema LC-MS/MS. Para avaliação da estabilidade de longa duração as amostras enriquecidas foram mantidas em temperatura de -70°C durante 1 mês. Após esse período, as amostras foram extraídas e analisadas.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com as amostras recém-preparadas nas mesmas concentrações e foram expressos em porcentagem de desvio.

A estabilidade em plasma é demonstrada quando o desvio das concentrações obtidas em relação aos valores nominais forem inferiores a 15%, enquanto para as soluções padrão não serão aceitos desvios superiores a 10%.

3.2. Farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos

3.2.1. Protocolo experimental do estudo da farmacocinética da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em plasma de ratos

Foram investigados ratos machos *Wistar* pesando entre 200-300 g, provenientes do Biotério de Criação/Manutenção da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, mediante aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (Processo CEUA USP 12.1.1382.53.9) (Anexo 1).

A solução de cucurbitacina E para administração via oral e via intravenosa a ratos, preparada na concentração de 0,4 mg/mL (4 mg de cucurbitacina E dissolvida em 500 μ L de dimetilsulfóxido (Sigma, St. Louis, MO, EUA), foi agitada durante 30 min em ultrassom (Ultra Sonic Cleaner, USC – 1450 Unique, São Paulo, SP). Em seguida, foram adicionados 9,5 mL de tampão fosfato salino (pH 7,4) e a solução foi agitada mais 30 minutos em ultrassom. Esta solução foi preparada imediatamente antes da administração aos ratos. O tampão fosfato salino foi constituído de 150 mM de cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 20 mM de tampão fosfato (fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico) (Merck, Darmstadt, Alemanha). O tampão fosfato com pH final igual a 7,4 foi preparado diariamente e filtrado em membrana 0,45 μ M (Milipore, São Paulo, SP, Brasil).

O estudo piloto para a definição dos tempos de amostragem das alíquotas de 200 μ L de sangue foi realizado com três animais tratados com dose única (1 mg/kg) intravenosa ou oral (gavagem) de cucurbitacina E. A administração de cucurbitacina E por gavagem foi realizada nos animais em jejum de ração durante 12 horas. As amostras seriadas de 200 μ L de sangue foram obtidas da veia caudal (3-4 amostras de cada animal) nos tempos zero a 24 horas e transferidas para tubos com heparina. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas (2 min, 6000 rpm, 5°C) e analisadas de acordo com o método descrito no item 3.1.3.

Os ratos machos *Wistar* (n= 6 para cada tempo de coleta) foram tratados com dose única (1 mg/kg) intravenosa de cucurbitacina E. As amostras de 200 μ L de sangue foram coletadas nos tempos zero, 5, 15, 30 e 45 min e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 h após a administração, de acordo com uma tabela de tempos de aleatorização. Foram realizadas 3-4 coletas de sangue de cada animal através da veia caudal, sendo a última coleta realizada através da decapitação do animal. As amostras de sangue foram transferidas para tubos contendo heparina, sendo imediatamente centrifugadas (2 min,

6000 rpm, 5°C) para a obtenção das alíquotas de plasma, as quais foram imediatamente analisadas de acordo com o método descrito no item 3.1.3.

3.2.2. Desenvolvimento do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos

O modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E foi desenvolvido na University College London (UCL), Londres, Reino Unido, em colaboração com o Prof. Oscar Della Pasqua.

A farmacocinética populacional foi avaliada por modelo não linear de efeitos mistos empregando o programa NONMEM v.7.2 (ICON Development Solutions, Ellicott City, MD, EUA), no modo de estimação condicional de primeira ordem com a opção de interação (FOCE-I; *first-order conditional estimation with the interaction option*) (BAUER, 2011) com compilador GNU Fortran 4.6 (Free Software Foundation, Inc.) e interface PsN (*Perl-speaks-NONMEM*, Universidade de Uppsala, Suécia), versão 3.5.3 (LINDBOM et al., 2004). O programa R: *A language and environment for statistical computing*, versão 3.1.2 (R foundation for statistical computing, Vienna, Áustria, 2014) foi utilizado para a reorganização do conjunto de dados, análise estatística e elaboração de gráficos de diagnóstico visual do modelo.

Os critérios de elaboração do modelo incluíram: (i) a minimização bem sucedida, (ii) valores de desvio padrão das estimativas, (iii) número de dígitos significativos, (iv) determinação bem sucedida da covariância, (v) nível de correlação entre os parâmetros do modelo e (vi) valores de gradiente da última iteração (DUFFULL et al., 2005; PIANA et al., 2014). Os termos fixos e aleatórios foram introduzidos ao modelo um a um em forma progressiva (MAITRE et al., 1991). Foram explorados modelos estruturais mono e bicompartimentais com distribuição e eliminação de zero ou primeira ordem. A variabilidade interindividual (η) foi avaliada com distribuição normal ou log-normal e o erro residual (ϵ), que compreende erros na quantificação e demais medidas, foi explorado por modelos aditivo, proporcional ou combinado (SCHOEMAKER & COHEN, 1996).

A qualidade do ajuste do modelo hierárquico aos dados foi avaliada por métodos gráficos *GOF* (*Goodness Of Fit*), incluindo as concentrações individuais e populacionais preditas *versus* as concentrações observadas e os resíduos condicionais ponderados *versus* as concentrações observadas e tempo. A comparação entre os modelos preliminares compreenderam a qualidade do ajuste, os valores da função

objetiva OFV (*Objective Function Value*) e os valores das variâncias de η (ω^2) e ε (σ^2), assumindo que esses valores diminuem a medida que a qualidade do ajuste melhora (DUFFULL et al., 2005; PIANA et al., 2014; SCHOEMAKER & COHEN, 1996).

3.2.3. Validação do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos

O modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E em ratos foi validado por verificação visual preditiva (VPC - *visual predictive check*) obtida a partir de 1000 simulações individuais de concentrações plasmáticas *versus* tempo pelo modelo desenvolvido. A mediana e o intervalo entre os percentis 5% e 95% das concentrações simuladas foram plotados juntamente com os dados observados com o objetivo de avaliar visualmente a adequação do modelo aos dados, sua precisão e o desempenho preditivo do modelo.

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento do método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos.

Os espectros de massas obtidos no modo negativo para a cucurbitacina E e cucurbitacina I estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 5, 6 e 7, as quais mostram as transições monitoradas de acordo com o critério de intensidade do íon: 555,2>537,3 para a cucurbitacina E e 513,4>495,3 para a cucurbitacina I. Os espectros de massas obtidos no modo positivo para o padrão interno clobazam, apresentados na Figura 6, mostram a transição monitorada 301>256.

Figura 5. Espectros de massas do íon desprotonado ($[M+H]^-$) (A) e íon produto (B) da cucurbitacina E obtidos no modo negativo.

Figura 6. Espectros de massas do íon desprotonado ($[M+H]^-$) (A) e íon produto (B) da cucurbitacina I obtidos no modo negativo.

Figura 7. Espectros de massas do íon protonado ($[M+H]^+$) (A) e íon produto (B) do padrão interno clobazam obtidos no modo positivo.

A Figura 8 mostra a separação cromatográfica da cucurbitacina E, cucurbitacina I e do padrão interno clobazam, respectivamente com tempos de retenção de 4,64; 3,58 e 3,66 min, totalizando uma corrida cromatográfica de 6 min.

Figura 8. Cromatogramas referentes a eluição da cucurbitacina E (40 ng/mL de metanol; tempo de retenção 4,64 min), cucurbitacina I (2 ng/mL de metanol; tempo de retenção 3,58 min) e do padrão interno clobazam (12,5 ng/mL de metanol; tempo de retenção 3,66 min) da coluna Chromolit® RP-18 com fase móvel constituída por mistura de acetonitrila:água:metanol (32:35:33, v/v/v).

4.2. Validação do método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos.

As Figuras 9, 10 e 11 apresentam, respectivamente, os cromatogramas referentes a seletividade do método de análise da cucurbitacina E e cucurbitacina I em 6 diferentes alíquotas de plasma de ratos. Os cromatogramas permitem inferir a ausência de picos interferentes próximos aos tempos de retenção da cucurbitacina E (4,64 min), cucurbitacina I (3,58 min) e do padrão interno clobazam (3,66 min).

Figura 9. (A) Cromatogramas referentes a análise da cucurbitacina E em plasma de ratos na concentração do LIQ (1 ng/mL). (B-G) Cromatogramas referentes as análises de seis diferentes amostras de plasma branco de ratos analisadas na transição da cucurbitacina E (555,2>537,3).

Figura 10. (A) Cromatogramas referentes à análise da cucurbitacina I em plasma de ratos na concentração do LIQ (0,4 ng/mL). (B-G) Cromatogramas referentes às análises de seis diferentes amostras de plasma branco de ratos analisadas na transição da cucurbitacina I (513,4>495,3).

Figura 11. (A) Cromatogramas referentes à análise do padrão interno clobazam em plasma de ratos na concentração de 12,5 ng/mL. (B-G) Cromatogramas referentes às análises de seis diferentes amostras de plasma branco de ratos analisadas na transição do padrão interno clobazam (301,0>224,0).

A Figura 12 apresenta os cromatogramas referentes à avaliação do efeito residual na análise da cucurbitacina E em plasma de ratos. Os cromatogramas referentes a análise de plasma branco, injetados após o LSQ de 100 ng/mL, permitem inferir a ausência de picos interferentes próximos ao tempo de retenção da cucurbitacina E (4,64 min).

Figura 12. (A) Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina E (555,2>537,3) obtido antes do cromatograma do LQS. (B) Cromatograma referente à análise da cucurbitacina E em plasma de ratos na concentração do LSQ (100 ng/mL). (C) Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina E obtido após o cromatograma B. (D) Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina E obtido após o cromatograma C.

A Figura 13 apresenta os cromatogramas referentes a avaliação do efeito residual da cucurbitacina I em plasma de ratos. Os cromatogramas referentes a análise de plasma branco, injetados após o LSQ de 200 ng/mL, permitem inferir a ausência de picos interferentes próximos ao tempo de retenção da cucurbitacina I (3,58 min).

Figura 13. (A) Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina I (513,4>495,3) obtido antes do cromatograma do LQS. (B) Cromatograma referente à análise da cucurbitacina I em plasma de ratos na concentração do LSQ (200 ng/mL). (C) Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina E obtido após o cromatograma B. (D) Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição da cucurbitacina I obtido após o cromatograma C.

A Figura 14 apresenta os cromatogramas referentes a avaliação do efeito residual do padrão interno clobazam em plasma de ratos. Os cromatogramas referentes a análise de plasma branco, injetados após o LSQ da cucurbitacina E e da cucurbitacina I, permitem inferir a ausência de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do padrão interno clobazam (3,66 min).

Figura 14. (A) Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição do padrão interno clobazam (301,0>224,0) obtido antes do cromatograma do LQS da cucurbitacina E (100 ng/mL) e do LQS da cucurbitacina I (200 ng/mL). (B) Cromatograma referente à análise do padrão interno clobazam obtido no LQS da cucurbitacina E e da cucurbitacina I. (C) Cromatograma referente à análise de plasma branco de rato na transição do padrão interno clobazam obtido depois do cromatograma B. (D) Cromatograma referente a análise de plasma branco de rato na transição do padrão interno clobazam obtido depois do cromatograma C.

Os resultados de linearidade, limite inferior de quantificação, precisão e exatidão obtidos na validação do método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos estão apresentados respectivamente nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Parâmetros de validação do método de análise da cucurbitacina E em plasma de ratos.

<i>Parâmetros de validação do método de</i>	<i>análise da cucurbitacina E</i>
Linearidade (ng/mL)	1,0 - 100,0
Equação da reta	$y=0,0277031x+0,0352023$
Coeficiente de correlação linear	$r=0,991606$
Limite Inferior de Quantificação	
(1,0 ng/mL)	
Precisão (CV %, n = 10)	12,40
Exatidão (Inexatidão %)	9,00
Precisão intercorridas (CV %)	
1,0 ng/mL (n=15)	12,78
2,0 ng/mL (n=15)	9,59
40,0 ng/mL (n=15)	8,71
80,0 ng/mL (n=15)	13,85
Precisão intracorrida (CV %)	
1,0 ng/mL (n=15)	7,26
2,0 ng/mL (n=15)	10,06
40,0 ng/mL (n=15)	12,20
80,0 ng/mL (n=15)	13,43
Exatidão intercorridas (EPR %)	
1,0 ng/mL (n=15)	10,66
2,0 ng/mL (n=15)	7,87
40,0 ng/mL (n=15)	4,72
80,0 ng/mL (n=15)	-5,80
Exatidão intracorrida (EPR %)	
1,0 ng/mL (n=15)	1,60
2,0 ng/mL (n=15)	3,00
40,0 ng/mL (n=15)	4,47
80,0 ng/mL (n=15)	2,10

CV= coeficiente de variação (desvio padrão/média) x 100

EPR= erro padrão relativo (média - valor nominal)/valor nominal x 100

r= coeficiente de correlação linear.

Tabela 5. Parâmetros de validação do método de análise da cucurbitacina I em plasma de ratos.

<i>Parâmetros de validação do método de análise da cucurbitacina I</i>	
Linearidade (ng/mL)	0,4 - 200,0
Equação da reta	$y=0,00202823x+0,00490914$
Coefficiente de correlação linear	$r=0,993945$
Limite Inferior de Quantificação (0,4 ng/mL)	
Precisão (CV %, n = 10)	7,57
Exatidão (Inexatidão %)	11,10
Precisão intercorridas (CV %)	
0,4 ng/mL (n=15)	9,32
0,8 ng/mL (n=15)	11,20
80,0 ng/mL (n=15)	7,90
160,0 ng/mL (n=15)	10,34
Precisão intracorrida (CV %)	
0,4 ng/mL (n=15)	12,45
0,8 ng/mL (n=15)	9,15
80,0 ng/mL (n=15)	11,30
160,00 ng/mL (n=15)	8,64
Exatidão intercorridas (EPR %)	
0,4 ng/mL (n=15)	8,65
0,8 ng/mL (n=15)	7,60
80,0 ng/mL (n=15)	10,15
160,0 ng/mL (n=15)	11,25
Exatidão intracorrida (EPR %)	
0,4 ng/mL (n=15)	8,45
0,8 ng/mL (n=15)	9,50
80,0 ng/mL (n=15)	6,80
160,0 ng/mL (n=15)	-5,40

CV= coeficiente de variação (desvio padrão/média) x 100

EPR= erro padrão relativo (média experimental - valor nominal)/valor nominal x 100

r= coeficiente de correlação linear.

As Tabelas 6 e 7, mostram respectivamente, o efeito matriz na análise da cucurbitacina E e curcubitacina I em plasma de ratos.

Tabela 6. Efeito matriz na análise da cucurbitacina E em 8 diferentes lotes de plasma de ratos, sendo 6 normais e 2 hemolisados.

Efeito Matriz (CV %)	
<i>2,0 ng/mL de plasma (CQB)</i>	<i>80,0 ng/mL de plasma (CQA)</i>
14,33	14,08

$$CV (\%) = \text{Desvio padrão}/\text{média} * 100$$

Tabela 7. Efeito matriz na análise da cucurbitacina I em 8 diferentes lotes de plasma de ratos, sendo 6 normais e 2 hemolisados.

Efeito Matriz (CV %)	
<i>0,8 ng/mL de plasma (CQB)</i>	<i>160,0 ng/mL de plasma (CQA)</i>
13,98	14,51

$$CV (\%) = \text{Desvio padrão}/\text{média} * 100$$

Os estudos de estabilidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 8 e 9. Os estudos de estabilidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I em soluções padrão em metanol, nas concentrações correspondentes ao CQB e CQA, estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 8. Estudos de estabilidade da cucurbitacina E em plasma de ratos.

Estudos de estabilidade (CV %)		
	<i>2,0 ng/mL de plasma (CQB) (n=5)</i>	<i>80,0 ng/mL de plasma (CQA) (n=5)</i>
Estabilidade após 2 ciclos de congelamento e descongelamento	13,91	12,43
Estabilidade de curta duração (4 h)	9,81	12,11
Estabilidade pós- processamento (12 h)	14,08	13,85
Estabilidade longa duração (1 mês)	12,32	9,00

$$CV (\%) = \text{Desvio padrão}/\text{média} * 100$$

Tabela 9. Estudos de estabilidade da cucurbitacina I em de plasma de ratos.

	Estudos de estabilidade (CV %)	
	<i>0,8 ng/mL de plasma (CQB) (n=5)</i>	<i>160,0 ng/mL de plasma (CQA) (n=5)</i>
Estabilidade após 2 ciclos de congelamento e descongelamento	9,82	7,45
Estabilidade de curta duração (4 h)	8,97	5,60
Estabilidade pós- processamento (12 h)	11,04	10,46
Estabilidade longa duração (1 mês)	11,76	10,20
CV (%) = Desvio padrão/média * 100		

Tabela 10. Estudos de estabilidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I em metanol.

	Estudos de estabilidade (CV %)	
	<i>4,0 ng/mL de metanol (n=5)</i>	<i>160,0 ng/mL de metanol (n=5)</i>
<i>Cucurbitacina E</i> Estabilidade do analito e PI em solução (30 dias)	9,47	8,33
<i>Cucurbitacina I</i> Estabilidade do analito e PI em solução (30 dias)	7,02	6,25
CV (%) = Desvio padrão/média * 100		

4.3. Concentrações plasmáticas da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em amostras de plasma de ratos

O estudo piloto de administração de dose única oral de 1 mg/kg de cucurbitacina E a ratos (n=3 para cada tempo de coleta) resultou em concentrações plasmáticas de cucurbitacina E e cucurbitacina I abaixo dos valores dos respectivos LIQs em todos os tempos de amostragem de sangue obtidos até 24 h após a administração. A Figura 15 mostra os cromatogramas obtidos na análise de uma alíquota de plasma coletada 3 h após a administração oral de 1 mg/kg de cucurbitacina E.

Figura 15. Cromatogramas referentes à análise de uma amostra de plasma coletada 3 h após a administração oral de cucurbitacina E (1 mg/kg) a um rato Wistar. (A) Cromatograma obtido na transição da cucurbitacina E (555,2>537,3). (B) Cromatograma obtido na transição da cucurbitacina I (513,4>495,3). (C) Cromatograma obtido na transição do padrão interno clobazam (301,0>224,0).

O estudo piloto de administração de dose única intravenosa de 1mg/kg de cucurbitacina E a ratos Wistar (n=3 para cada tempo de coleta) possibilitou a quantificação da cucurbitacina E até 16 h após a administração, enquanto a concentração da cucurbitacina I permaneceu abaixo do LIQ de 0,4 ng/mL em todas as amostras analisadas.

A Figura 16 exibe os cromatogramas referentes à análise de uma amostra de plasma obtida 3 h após a administração intravenosa de 1 mg/kg de cucurbitacina E a um rato.

Figura 16. Cromatogramas referentes à análise de uma amostra de plasma coletada 3 h após a administração intravenosa de cucurbitacina E (1 mg/kg) a um rato Wistar. (A) Cromatograma obtido na transição da cucurbitacina E (555,2>537,3). (B) Cromatograma obtido na transição da cucurbitacina I (513,4>495,3). (C) Cromatograma obtido na transição do padrão interno clobazam (301,0>224,0).

4.4. Desenvolvimento e validação do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos seguindo a administração intravenosa

O perfil farmacocinético das medianas das concentrações plasmáticas da cucurbitacina E em função do tempo foi descrito por modelo bicompartimental com distribuição e eliminação de primeira ordem, como apresentado na Figura 17, a qual apresenta os seguintes parâmetros: tempo de liberação (D), volume de distribuição do compartimento central (V_c), volume de distribuição do compartimento periférico (V_p), *clearance* (Cl) e *clearance* intercompartimental (Q). A variabilidade residual foi descrita por modelo proporcional ($Y = F + F \cdot \varepsilon$), no qual Y representa cada concentração observada por rato, F representa cada concentração predita por rato e ε representa uma variável aleatória com média zero e variância σ^2 . Apenas os parâmetros Cl e Q apresentaram variabilidade interindividual com distribuição log-normal ($\theta_i = \theta \cdot e^\eta$), na qual θ_i representa os valores individuais dos parâmetros, θ é o valor populacional característico dos parâmetros e η é uma variável aleatória com média 0 e variância ω^2 .

Figura 17. Modelo de farmacocinética populacional de administração intravenosa de cucurbitacina E a ratos.

D- tempo de liberação, V_c - volume de distribuição central, V_p - volume de distribuição periférico, Cl- *clearance*, Q- *clearance* intercompartimental.

A avaliação da qualidade de ajuste do modelo está apresentada como Gráficos GOF (*Goodness Of Fit*) na Figura 18.

Figura 18. Gráficos GOF (*Goodness Of Fit*) de qualidade do ajuste do modelo populacional da cucurbitacina E administrada por via intravenosa (1 mg/kg) a ratos.

A verificação visual preditiva (*VPC – visual predictive check*) do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E em plasma de ratos seguindo a administração intravenosa está apresentada na Figura 19. A Tabela 11 mostra os valores dos parâmetros farmacocinéticos, a variabilidade interindividual, a variabilidade residual do modelo e o desvio padrão relativo (RSE%) dessas estimativas.

Figura 19. Verificação visual preditiva (VPC – *visual predictive check*).

As concentrações plasmáticas observadas estão apresentadas como pontos, enquanto as concentrações plasmáticas estimadas como medianas estão apresentadas como linha e os intervalos de percentis 95% como área sombreada.

Tabela 11. Estimativas do modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E administrada por via intravenosa (1 mg/kg) a ratos.

	Valor típico (θ)	RSE%	IIV CV%	RSE%
Cl (L/h)	4,13	5,10%	28,8%	6,6%
Vc (L)	0,815	14,20%	--	--
Q (L/h)	110	9,70%	48,7%	9,8%
Vp (L)	26,4	6,20%	--	--
D (h)	0,452	8,60%	--	--
	σ^2			
	0,562	9,20%	--	--

Cl- *clearance*, Vc- volume de distribuição central, Q- *clearance* intercompartimental, Vp- volume de distribuição periférico, D- tempo de liberação, IIV- variabilidade interindividual (expressa como coeficiente de variação: $CV(\%) = \sqrt{\omega^2} \cdot 100$), σ^2 - variância de ε (no qual: $Y = F + F \cdot \varepsilon$), RSE%- desvio padrão relativo.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve o desenvolvimento e a validação do método de análise sequencial da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em plasma de ratos com aplicação no estudo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E administrada por via intravenosa.

Os métodos analíticos com a finalidade de quantificação de analitos em amostras biológicas e aplicação em estudos de farmacocinética requerem sensibilidade e seletividade satisfatórias, pois os analitos geralmente estão presentes em concentrações baixas nas amostras biológicas, especialmente nos estudos de administração de dose única de compostos com altos valores de volume de distribuição. Para garantir uma sensibilidade adequada, o método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos foi desenvolvido empregando LC-MS/MS.

Os estudos iniciais de desenvolvimento do método analítico foram conduzidos com o detector MS/MS operando no modo de ionização positivo, monitorando os íons da cucurbitacina E (579,4>519,3) e cucurbitacina I (536,8>372,5) coordenados ao sódio ($[M+Na]^+$), em função da maior intensidade do sinal quando comparada ao modo de ionização negativo, com diferenças de aproximadamente 25 vezes para a cucurbitacina E e de aproximadamente 10 vezes para a cucurbitacina I. Estes resultados corroboram com os dados apresentados por KRUIVE et al., 2013 que também constataram que o íon resultante da coordenação com metais resulta em aumento da sensibilidade da análise.

O método de análise da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos com o detector MS/MS operando no modo de ionização positivo resultou em valores de LIQ de 40 pg/mL de plasma e com linearidade de 40 pg a 10 ng/mL de plasma para ambas as cucurbitacinas. No entanto, a falta de precisão observada no decorrer do desenvolvimento do método analítico e análises das amostras de plasma dos animais oriundas do estudo piloto de administração de cucurbitacina E não permitiu a sua continuidade. Resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho, com relação à falta de reprodutibilidade em métodos analíticos quantitativos, nas situações de monitorização de íons coordenados ao sódio, foram também descritos por MORTIER et al., 2004 e DZIADOSZ et al., 2014. Uma maior reprodutibilidade das análises pode ser obtida a partir do estabelecimento das condições ideais de ionização no modo negativo, ao invés do modo positivo, o que evita a formação de íons coordenados ao sódio e permitem o desenvolvimento e validação de métodos analíticos quantitativos empregando LC-MS/MS com precisão e exatidão aceitáveis (KRUIVE et al., 2013).

Após as inúmeras tentativas de realizar as análises quantitativas utilizando o modo de ionização positivo devido a alta sensibilidade, o método analítico da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos foi desenvolvido utilizando o modo negativo de ionização, ou seja, monitorando os íons resultantes da desprotonação $[M+H]^-$ da cucurbitacina E e cucurbitacina I.

O método analítico desenvolvido para a cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos possibilitou analisar ambas as cucurbitacinas sequencialmente com corrida cromatográfica de 6 minutos. A sensibilidade obtida foi de 0,4 ng de cucurbitacina I e 1,0 ng de cucurbitacina E/mL de plasma, empregando alíquotas de apenas 50 μ L de plasma. Ressalta-se que a sensibilidade obtida para a cucurbitacina I foi 25 vezes maior do que a reportada na literatura de 10 ng/mL de plasma por Molavi et al. (2006). Além disso, o presente trabalho apresenta o primeiro método desenvolvido e validado por LC-MS/MS para análise da cucurbitacina E em plasma de ratos e o primeiro método de análise sequencial de uma cucurbitacina e seu metabólito por LC-MS/MS.

O método desenvolvido e validado não apresentou efeito matriz considerando que os coeficientes de variação obtidos para todos os valores de FMN foram menores que 15% (Tabela 6 e Tabela 7). A análise de diferentes amostras de plasma branco (Figura 12, Figura 13 e Figura 14) mostrou ausência da interferência de compostos endógenos com a cucurbitacina E, cucurbitacina I e o padrão interno clobazam, indicando adequada seletividade. As amostras de plasma branco analisadas imediatamente após a amostra LSQ não apresentaram efeito residual de injeções anteriores. As amostras de plasma branco e fase móvel que foram injetadas entre as análises diárias para comprovar ausência de efeito residual, também não apresentaram resíduos de injeções anteriores.

Os estudos de precisão e exatidão apresentaram coeficientes de variação e erro padrão inferiores a 15% (Tabela 4 e Tabela 5), indicando que o método foi exato e preciso.

Em complemento, os estudos de estabilidade (Tabela 8, Tabela 9 e Tabela 10) demonstraram que a cucurbitacina E e a cucurbitacina I são estáveis durante 30 dias quando preparadas em metanol (estudo de estabilidade em solução). Em relação aos estudos de estabilidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos, as amostras foram consideradas estáveis após 2 ciclos de congelamento e

descongelamento, em temperatura ambiente por até 4 horas, após o processamento durante 12 horas a 12°C e durante o armazenamento a -70°C por um período de 30 dias.

O método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos desenvolvido e validado foi aplicado na investigação da farmacocinética populacional da cucurbitacina E e seu metabólito cucurbitacina I em ratos.

O objetivo inicial do presente trabalho era avaliar a biodisponibilidade oral da cucurbitacina E em ratos através de estudos de administração de dose única oral e intravenosa. No entanto, o estudo piloto de administração de dose única oral (gavagem) de 1mg/kg de cucurbitacina E a ratos mostrou concentrações plasmáticas de cucurbitacina E e cucurbitacina I abaixo dos valores de LIQ estabelecidos no estudo de validação do método analítico. É importante salientar a impossibilidade de administrar doses maiores que 1 mg/kg em função da baixa solubilidade da cucurbitacina E e consequentemente da impossibilidade de preparar soluções em concentrações maiores do que aquela utilizada no presente estudo (0,4 mg de cucurbitacina E/ mL da mistura tampão fosfato pH 7,4 e DMSO, 95:5, v/v).

A administração de dose única intravenosa de 1mg/kg de cucurbitacina E a ratos resultou em concentrações plasmáticas de cucurbitacina E maiores que o LIQ até 16 h após a administração (Figura 19). No entanto, as concentrações plasmáticas de cucurbitacina I permaneceram abaixo do valor do LIQ (0,4 ng/mL de plasma) em todas as amostras coletadas até 24 h após a administração da cucurbitacina E.

Os estudos de metabolismo da cucurbitacina E em microssomas de fígado humano e em plasma humano mostram a formação da cucurbitacina I (ABBAS et al., 2013; SAADE et al., 2009). Saade et al. (2009) sugerem a participação da paraoxonase na reação de hidrólise da cucurbitacina E a cucurbitacina I em plasma humano. No entanto, as concentrações das esterases presentes no plasma humano diferem das concentrações das esterases presentes no plasma de ratos, por exemplo, a paraoxonase está presente em concentrações 2 vezes maiores no plasma humano do que no plasma de ratos (LI et al., 2005). Logo, é provável que o plasma de ratos não seja capaz de hidrolisar a cucurbitacina E a cucurbitacina I, justificando as concentrações plasmáticas de cucurbitacina I abaixo do LIQ no estudo de administração intravenosa de cucurbitacina E a ratos.

As diferenças entre a cucurbitacina E e a cucurbitacina I na interação com as proteínas do plasma também podem justificar a ausência da cucurbitacina I nas amostras de plasma de ratos tratados com cucurbitacina E. A cucurbitacina E apresenta forte

ligação a albumina humana, enquanto a cucurbitacina I apresenta apenas uma fraca interação (GREIGE-GERGES et al., 2007a). A influência da espécie na ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I as proteínas do plasma será discutida no Capítulo 2.

As concentrações plasmáticas de cucurbitacina E oriundas do estudo de administração de dose única intravenosa a ratos (1 mg/kg) permitiram determinar o seu perfil farmacocinético utilizando um modelo populacional desenvolvido e validado exclusivamente para essa finalidade. O modelo de farmacocinética populacional está sendo descrito pela primeira vez para a classe das cucurbitacinas, em especial para a cucurbitacina E.

O primeiro estudo de farmacocinética pré-clínica de cucurbitacinas foi reportado por Molavi et al. (2006) em plasma de ratos. Os autores avaliaram a administração de dose única intravenosa da cucurbitacina I solubilizada em 0,25% de DMSO em 5% de glicose isotônica nas doses de 1 mg/Kg (n=1) e 1,5 mg/Kg (n=1) e como formulação micelar na dose de 0,4 mg/Kg (n=1). Estes autores observaram que a formulação micelar não resultou em sinais de toxicidade, enquanto a administração da cucurbitacina I em DMSO resultou em dificuldades respiratórias e morte dos animais 2 horas após a administração. A administração intravenosa da formulação micelar de cucurbitacina I a ratos resultou em quantificação das concentrações plasmáticas até 3,5 h após a administração (LIQ=10 ng/mL), e meia-vida de eliminação estimada em 1,4 h.

O segundo estudo de farmacocinética pré-clínica de cucurbitacinas foi reportado por Zhao et al. (2015) em plasma de ratos tratados com dose única oral de cucurbitacina B (20 mg/kg) administrada como suspensão em solução aquosa contendo 0,5% de carboximetilcelulose sódica. Os autores avaliaram a farmacocinética da cucurbitacina B empregando modelo monocompartimental com relatos de concentração plasmática máxima (C_{max}) de $5,90 \pm 1,01$ ng/mL, tempo para atingir C_{max} (T_{max}) de $1,75 \pm 0,88$ h, meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) de $2,50 \pm 0,58$ h e *clearance* (Cl) de $845,99 \pm 183,70$ L/h/kg.

O presente estudo reporta pela primeira vez a farmacocinética populacional da cucurbitacina E avaliada por modelo não linear de efeitos mistos (modelo hierárquico) que se mostrou preciso e com capacidade preditiva adequada por métodos de avaliação do ajuste do modelo aos dados e validação. O modelo final foi avaliado por gráficos GOF (*Goodness Of Fit*) e validado por gráficos VPC (*Visual Predictive Check*).

A qualidade do ajuste do modelo de farmacocinética populacional desenvolvido para a cucurbitacina E administrada por via intravenosa a ratos foi avaliada por gráficos

GOF utilizando o método dos resíduos condicionais ponderados (CWRES, *Conditional Weighted Residuals*), o qual avalia a diferença ponderada entre os dados preditos pelo modelo e os dados observados (HOOKER et al., 2007). Os gráficos GOF (Figura 18) obtidos no presente estudo permitiram inferir que as concentrações plasmáticas de cucurbitacina E observadas mostram boa correlação com as concentrações plasmáticas individuais e populacionais preditas. Os gráficos GOF obtidos ainda permitem observar que os resíduos condicionais ponderados quando plotados em função do tempo ou das concentrações plasmáticas populacionais não mostram vieses importantes.

O VPC (*Visual Predictive Check*) representa uma das ferramentas de diagnóstico mais utilizada na avaliação do desempenho preditivo de um modelo de farmacocinética populacional (POST et al., 2008). O princípio do VPC, baseado na estrutura do modelo e nos dados obtidos através de múltiplas simulações com o modelo populacional, é avaliar graficamente se as simulações de um modelo de interesse são capazes de reproduzir a tendência central e a variabilidade dos dados observados quando plotados em função de uma variável independente, geralmente o tempo (BERGSTRAND et al., 2011). O VPC (Figura 19) obtido no presente estudo permite verificar que a maioria dos dados observados estão dentro do intervalo de percentis 95%, portanto, o modelo desenvolvido descreve adequadamente os dados obtidos.

O perfil farmacocinético da cucurbitacina E administrada por via intravenosa a ratos foi descrito por modelo bicompartimental com distribuição e eliminação de primeira ordem com os seguintes parâmetros farmacocinéticos: tempo de liberação (D) de 0,45 h, volume de distribuição (Vd) de 27,22 L, *clearance* (Cl) de 4,13 L/h e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) de 4,57 h (Tabela 11).

O perfil de concentrações plasmáticas da cucurbitacina E em função do tempo seguindo a administração de dose única intravenosa a ratos, apresentado na Figura 19, e o tempo de liberação (D) de 0,45 h estimado no modelo de farmacocinética populacional (Tabela 11), permitem observar que o comportamento da cucurbitacina E assemelha-se mais a um perfil de liberação controlada ou infusão do que propriamente a administração intravenosa *bolus* empregada no estudo experimental. Com base nessa observação, o modelo de farmacocinética populacional da cucurbitacina E foi desenvolvido assumindo a administração como uma infusão intravenosa.

A cucurbitacina E não é solúvel em solventes polares, exigindo solubilidade prévia em DMSO seguida de diluição com tampão fosfato. Os analitos solúveis em DMSO, quando diluídos em tampão aquoso, podem formar uma solução homogênea,

uma suspensão homogênea ou uma suspensão heterogênea quando é observado precipitação (DI et al., 2006). O comportamento da cucurbitacina E na mistura tampão fosfato e DMSO (95:5, v/v) na concentração usada no estudo de farmacocinética (0,4 mg de cucurbitacina E/ mL) assemelha-se a uma suspensão homogênea, fato que explica o tempo de liberação de 0,45 h seguindo a administração intravenosa. Ressalta-se na oportunidade que concentrações da solução maiores que 0,4 mg de cucurbitacina E/mL não foram usadas em função de alteração do comportamento de suspensão homogênea para suspensão heterogênea. A solução de cucurbitacina E foi preparada em solução com 5% de DMSO, considerando que Buggins et al. (2005) e Buggins et al. (2007) relatam que o DMSO em concentrações maiores que 5-10% pode alterar os parâmetros farmacocinéticos que caracterizam as fases da absorção, distribuição, metabolismo e excreção renal.

A solução da cucurbitacina E em DMSO foi diluída em tampão fosfato pH 7,4 em função da estabilidade da cucurbitacina E, pois Saade et al. (2009) relataram que ocorre uma rápida hidrólise da cucurbitacina E em pH ácido (pH 2) ou alcalino (pH 8,5). Os volumes da solução de cucurbitacina E na concentração de 0,4 mg/mL (preparada na mistura tampão fosfato pH 7,4 e DMSO, 95:5, v/v) administrados por via intravenosa aos ratos foram calculados de acordo com o peso do animal, sendo administrados 625 µL para um rato de 250 g. Estes valores estão de acordo com o Guia de Boas Práticas de Administração de Substâncias e Coletas de Sangue (DIEHL et al., 2001).

O estudo de farmacocinética experimental foi realizado utilizando 3-4 diferentes tempos de coleta de um mesmo animal, de acordo com uma tabela prévia de aleatorização, sendo a última coleta realizada através de decapitação. Em cada coleta foram removidos volumes aproximados de 200 µL de sangue, não ultrapassando 800 µL de sangue de cada animal, garantindo a manutenção da volemia do animal, o que também está de acordo com o Guia de Boas Práticas de Administração de Substâncias e Coletas de Sangue (DIEHL et al., 2001).

O perfil farmacocinético populacional da cucurbitacina E administrada por via intravenosa a ratos (Tabela 11) permite inferir a necessidade do desenvolvimento de formulações que resultem em solubilidade compatível com as exigências dos estudos de farmacocinética pré-clínica, assim como na necessidade de estudos de metabolismo e transportadores de membrana *in vitro* com células humanas.

6. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 1

1- O método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos empregando LC/MS-MS é preciso, exato e sensível, permitindo a aplicação em estudos de farmacocinética pré-clínica de dose única.

2- A administração de dose única oral (gavagem) de 1mg/kg de cucurbitacina E a ratos, preparada na mistura tampão fosfato pH 7,4 e DMSO (95:5, v/v) resultou em concentrações plasmáticas de cucurbitacina E e cucurbitacina I abaixo dos valores de LIQ estabelecidos no estudo de validação do método analítico.

3- A administração de dose única intravenosa de 1mg/kg de cucurbitacina E a ratos, preparada na mistura tampão fosfato pH 7,4 e DMSO (95:5, v/v), resultou em concentrações plasmáticas de cucurbitacina I abaixo dos valores de LIQ estabelecidos no estudo de validação do método analítico.

4- A administração de dose única intravenosa de 1mg/kg de cucurbitacina E a ratos, preparada na mistura tampão fosfato pH 7,4 e DMSO (95:5, v/v), resultou em concentrações plasmáticas de cucurbitacina E quantificadas até 16 h após a administração.

5- O modelo de farmacocinética populacional desenvolvido para a cucurbitacina E mostrou adequada qualidade de ajuste e adequado desempenho preditivo.

6- O perfil farmacocinético da cucurbitacina E administrada por via intravenosa a ratos foi descrito por modelo bicompartimental com distribuição e eliminação de primeira ordem com os seguintes parâmetros farmacocinéticos: tempo de liberação (D) de 0,45 h, volume de distribuição (Vd) de 27,22 L, *clearance* (Cl) de 4,13 L/h e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) de 4,57 h.

CAPÍTULO 2

Influência da espécie na ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I a albumina sérica humana e de ratos empregando biossensor óptico e dicroísmo circular

1. INTRODUÇÃO

A albumina sérica humana (HSA) é a proteína transportadora mais abundante com capacidade de ligação a diferentes classes de compostos endógenos ou exógenos, modulando as suas propriedades, tais como solubilidade, estabilidade, toxicidade e resposta farmacológica (PETERS, 1996). As propriedades da ligação dos vários compostos a HSA podem ser caracterizadas por diferentes técnicas como a espectroscopia de dicroísmo circular (CD) (ASCOLI et al., 2006; BERTUCCI et al., 2010; TEDESCO & BERTUCCI, 2015) e o biossensor óptico baseado na ressonância de plasma de superfície (SPR) (BERTUCCI et al., 2007; FORTUGNO et al., 2015; FROSTELL-KARLSSON et al., 2000; DE SIMONE et al., 2013).

O CD permite investigar as propriedades da ligação entre a proteína transportadora e o composto endógeno ou exógeno através do fenômeno do dicroísmo circular induzido (ICD) (ASCOLI et al., 2006; BERTUCCI et al., 2010; TEDESCO & BERTUCCI 2015). O ICD detecta as mudanças conformacionais induzidas pela interação entre a proteína transportadora e o composto (TEDESCO et al., 2015).

O biossensor óptico baseado em SPR tem sido utilizado nos últimos anos para elucidar as interações entre os compostos endógenos ou exógenos e as proteínas transportadoras (BERTUCCI et al., 2007; FORTUGNO et al., 2015; FROSTELL-KARLSSON et al., 2000; DE SIMONE et al., 2013). Em um experimento típico de SPR, um dos dois componentes da ligação é quimicamente ligado a superfície de um chip (ligante), enquanto o outro é livre para fluir na solução (analito) e, portanto, capaz de interagir com o ligante. A resposta (R), dada em unidades de ressonância (RU), é dependente do índice de refração da superfície do chip, o qual varia proporcionalmente com a alteração da massa devido a associação e/ou dissociação do complexo de ligação entre o ligante e o analito (COOPER et al., 2002).

Esta técnica oferece vantagens em relação às técnicas convencionais, tais como o monitoramento da interação entre as duas moléculas sem a necessidade de marcação (RICH & MYSZKA, 2000), um mesmo chip pode ser usado para várias análises com consequente aumento da capacidade da técnica (COOPER et al., 2002), assim como a capacidade do monitoramento da interação em tempo real, fornecendo informações mais detalhadas sobre as propriedades da ligação (RICH & MYSZKA, 2000).

O monitoramento da interação em tempo real é de particular importância para as interações que ocorrem em sistemas biológicos, especialmente as interações com as

proteínas transportadoras do plasma, uma vez que a cinética da ligação exerce grande influência nas propriedades farmacocinéticas dos analitos (RICH et al., 2001).

Os modelos animais são rotineiramente usados para avaliar as propriedades da ligação da albumina sérica a candidatos a fármacos com o objetivo de extrapolar dados farmacocinéticos para o homem (ZHANG et al., 2012). Embora a HSA e a albumina sérica de rato (RSA) compartilham um elevado grau de homologia nas suas sequências de aminoácidos, existem diferenças importantes nas suas propriedades de ligação (LIEN et al., 1991).

A investigação das diferenças de ligação entre as albuminas séricas de diferentes espécies torna-se de grande importância antes de extrapolar os dados de animais de experimentação para seres humanos. As avaliações das diferenças de ligação entre as albuminas séricas de diferentes espécies podem ser conduzidas empregando a versatilidade dos biossensores ópticos baseados na ressonância de plasma de superfície (FROSTELL-KARLSSON et al., 2000).

Estudos anteriores da literatura utilizando a espectroscopia de UV e fluorêscencia mostram que a cucurbitacina E e a cucurbitacina I interagem de forma diferente com a HSA. A cucurbitacina E mostra forte interação com a albumina, em contraste com a cucurbitacina I, que exibe fraca interação e não afeta a ligação de ligantes específicos (GREIGE-GERGES et al., 2007a, GREIGE-GERGES et al., 2007b).

Tendo em vista o potencial da cucurbitacina E como candidato a fármaco, os estudos de ligação com as proteínas transportadoras do plasma, e em particular com a albumina, são altamente desejáveis, a fim de melhor caracterizar sua distribuição e biodisponibilidade para os seus alvos principais, e portanto, compreender o seu comportamento farmacológico.

No presente estudo, os complexos de ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I as albuminas séricas humana e de ratos foram investigados por biossensor óptico baseado em SPR e análise espectroscópica de CD.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da espécie na ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I as HSA e RSA.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Investigar a ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA empregando biossensor óptico e dicroísmo circular.

2.2.2 Investigar a ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I a RSA empregando biossensor óptico e dicroísmo circular.

2.2.3 Determinar o percentual de ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I as HSA e RSA.

3. MATERIAS E MÉTODOS

Esta etapa da Tese de Doutorado foi realizada durante o estágio sanduíche no Departamento de Farmácia e Biotecnologia da Universidade de Bolonha (UNIBO-Itália) com a supervisão do Prof. Dr. Carlo Bertucci (Processo FAPESP: 2014/18095-0).

3.1 Padrões, reagentes e soluções tampão

Os padrões de cucurbitacina E ($\geq 95\%$) e cucurbitacina I ($\geq 95\%$) foram adquiridos da Extrasynthese (Genay, França). A HSA, RSA, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, DMSO, naproxeno de sódio, (S)-varfarina, cloridrato de biliverdina (BV), cloreto de sódio e acetato de sódio foram adquiridos da Sigma Aldrich (Milão, Itália).

Os chips CM 5 (matriz carboximetildextrano), o tampão fosfato salino (pH 7,4) e o kit de acoplamento amina composto por 1-etila-3-(3-dimetilaminopropila) carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS) e cloridrato de etanolamina foram adquiridos da GE Healthcare Bio-Sciences (Uppsala, Suécia) para uso nas análises no biossensor óptico baseado em SPR.

O tampão fosfato salino (pH 7,4) foi preparado com solução aquosa de cloreto de sódio 150 mM (Merck, Darmstadt, Alemanha), tampão fosfato de sódio 20 mM (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água destilada (sistema Millipore Elix 10, Darmstadt, Alemanha). As soluções tampão foram preparadas diariamente e filtradas em membrana 0,22 μm .

3.2 Interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando biossensor óptico baseado em SPR

3.2.1 Instrumentação

As análises no biossensor óptico baseado em SPR foram realizadas utilizando o equipamento Biacore® X100 (GE Healthcare, Bio-Sciences, Uppsala, Suécia), equipado com termostato operando a 25°C. Os dados foram analisados e processados usando o programa Biacore® X100 2,0 (GE Healthcare, Bio-Sciences, Uppsala, Suécia).

3.2.2 Preparação e validação dos chips

A solução estoque de HSA na concentração 30 $\mu\text{g/mL}$ foi preparada em tampão acetato de sódio 10 mM em valores de pH 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5. Cada solução estoque foi

injetada na superfície do chip durante 180 s, em fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, para a determinação da estabilidade do ligante com a superfície do chip. Em seguida, a linha de base foi restabelecida com a injeção de solução aquosa de hidróxido de sódio 50 mM. A solução estoque em pH 5,0 foi considerada como a de melhor estabilidade.

O tampão fosfato salino (pH 7,4) foi injetado 3 vezes consecutivas no biossensor óptico com o objetivo de estabilizar o sistema. Os chips CM 5 foram mantidos em temperatura ambiente durante 30 min antes da reação de acoplamento. A solução estoque de HSA em pH 5,0 foi imobilizada em dois diferentes chips CM 5 com reação de acoplamento amina, de acordo com os procedimentos padronizados pelo fabricante. Em resumo, os chips CM5 foram ativados através da injeção da mistura de EDC 0,4 M e NHS 0,1 M (1:1, v/v), em fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 7 min. Em seguida, a solução estoque de HSA pH 5,0 foi injetada até atingir a quantidade desejada de proteína imobilizada, ou seja, 9000 RU (Unidades de Ressonância) que foi considerado um chip de alta densidade. Os ésteres ativos remanescentes foram retirados através da injeção de cloridrato de etanolamida durante 7 min em fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. No final do procedimento, os chips foram mantidos durante 16 h em tampão fosfato salino pH 7,4.

Em relação a RSA, o chip foi preparado seguindo o mesmo protocolo descrito para a HSA, sendo que o processo de imobilização resultou em aproximadamente 8500 RU.

As afinidades do naproxeno com a HSA e da (S)-varfarina com a HSA e RSA foram avaliadas para confirmar a exatidão do processo de imobilização e validar a capacidade de ligação dos chips. As soluções estoque de (S)-varfarina e naproxeno foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em DMSO. A seguir, as soluções estoque de (S)-varfarina e naproxeno foram diluídas em tampão fosfato salino, respectivamente nas concentrações de 162 μM e 198 μM . Estas soluções foram injetadas nos chips com fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. As fases de associação da (S)-varfarina com a HSA e RSA e do naproxeno com a HSA foram monitoradas durante 60 s, enquanto as fases de dissociação foram monitoradas durante 120 s.

3.2.3 Correção do índice de refração do solvente

A correção do índice de refração do solvente foi realizada por injeções de curvas de calibração no sistema biosensor constituídas de oito diferentes concentrações de DMSO em tampão fosfato salino pH 7,4, variando de 4,5% a 5,8% (v/v).

3.2.4 Análises das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA

As soluções estoque de cucurbitacina E e cucurbitacina I foram preparadas em DMSO na concentração de 2 mg/mL, armazenadas a -20°C e diluídas em tampão fosfato salino na concentração de 50 µg/mL.

Os ensaios de afinidade para ambas as albuminas HSA e RSA foram realizados, em duplicatas, com concentrações de cucurbitacina E e cucurbitacina I variando de 0,04 a 3,0 µM. Cada solução foi injetada nos chips de alta densidade de HSA e RSA em fluxo de 30 µL/min, sendo que as fases de associação e dissociação foram monitoradas durante 60 e 120 s, respectivamente. Ressalta-se que para monitorar a estabilidade da linha de base, responsável por variações sistemáticas e aleatórias, foi realizada uma injeção de tampão fosfato salino pH 7,4 a cada três ciclos de injeção.

3.2.5 Análise dos dados

Os sensogramas resultantes da ligação da cucurbitacina E, cucurbitacina I, naproxeno e (S)-varfarina as albuminas séricas foram analisados seguindo o mesmo protocolo. As respostas obtidas foram subtraídas da média das injeções de tampão fosfato salino pH 7,4 realizadas a cada três ciclos de análise. As respostas resultantes foram ajustadas a um modelo isotérmico de ligação 1: 1, definido na Equação (1), a fim obter a constante de dissociação (K_d) do complexo ligante-analito:

$$R_{eq} = R_{max} \cdot c / (K_d + c) + R_{bulk} \quad (1)$$

onde R_{eq} é a resposta SPR da ligação do complexo ligante-analito no equilíbrio (expresso em RU), R_{max} é a resposta máxima da saturação do ligante no chip (expresso em RU), c é a concentração do analito (em M), K_d é a constante de dissociação do complexo ligante-analito expressa em M e R_{bulk} é a resposta da contribuição da massa dos analitos presentes nas amostras (expresso em RU).

A porcentagem de ligação (x_b) da cucurbitacina E e cucurbitacina I as albuminas séricas foi obtida a partir dos valores de K_d , assumindo concentração fisiológica da albumina sérica de 680 µM e dos analitos de 10 µM (RICH et al., 2001).

Os sensogramas resultantes das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA também foram ajustados a um modelo simples de interação cinética 1:1, segundo o qual o valor de K_d é obtido a partir da razão entre as constantes de associação (K_{on}) e de dissociação (K_{off}), como mostrado na Equação (2):

$$K_d = K_{off} / K_{on} \quad (2)$$

onde K_{on} é expresso como $M^{-1}s^{-1}$ e K_{off} é expresso como s^{-1} . Os valores de R_{max} , K_{on} , K_{off} foram considerados independentes da concentração injetada, e, portanto ajustados no modelo global.

3.3 Interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando dicroísmo circular

As análises de dicroísmo circular e espectroscopia de UV foram realizadas utilizando o espectropolarímetro Jasco J-810 equipado com sistema de controle de temperatura PTC-423S tipo Peltier (Tóquio, Japão). As corridas foram realizadas em triplicatas utilizando cela de quartzo de 10 mm (Hellma, Milão, Itália). Os dados foram analisados e processados usando o programa *Jasco Spectra Manager 2*.

3.3.1 Análises das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA

As soluções estoque de cucurbitacina E e cucurbitacina I foram preparadas em DMSO na concentração de 5 mM e diluídas em tampão fosfato salino pH 7,4 para a obtenção das concentrações 3,75; 7,5; 15, 30 e 60 μM . As soluções estoque de HSA (300 μM), RSA (300 μM) e BV (3 mM) foram também preparadas no tampão fosfato salino pH 7,4.

As interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I com as albuminas foram analisadas em diferentes razões molares: 0,25, 0,5, 1, 2 e 4. As soluções estoque de HSA e RSA foram preparadas em tampão fosfato salino pH 7,4 na concentração de 15 μM e adicionadas de alíquotas crescentes da solução estoque de cucurbitacina E ou cucurbitacina I.

As análises de dicroísmo circular foram realizadas no intervalo de 250-450 nm, com varredura de 50 nm/min e tempo de integração de dados de 2 segundos. O sinal do tampão fosfato salino pH 7,4 foi subtraído das amostras de cucurbitacina E e cucurbitacina I. O espectro de cada interação cucurbitacina E e cucurbitacina I com as albuminas foi corrigido através da subtração dos espectros da RSA ou HSA para avaliar o aumento do sinal ICD após a ligação.

3.3.2 Estudos de competição das cucurbitacinas com a BV

As análises de competição das cucurbitacinas com a BV foram realizadas empregando protocolos similares aos acima descritos. A solução de HSA e BV foram preparadas na razão molar de 1:1, diluídas com tampão fosfato salino pH 7,4 na

concentração 15 μM e de alíquotas crescentes da solução estoque da cucurbitacina E ou cucurbitacina I foram adicionadas com a finalidade de obter as razões molares de 0,5; 1, 1,5, 2, 3 e 5 dos complexos cucurbitacina E-HSA e cucurbitacina I-HSA.

Para os experimentos de competição com a RSA, a solução de RSA e BV foi preparada na razão molar de 1:1, diluída com tampão fosfato salino pH 7,4 na concentração 7,5 μM e alíquotas crescentes da solução estoque da cucurbitacina E ou cucurbitacina I foram adicionadas com a finalidade de obter as razões molares de 0,33; 0,67; 1; 1,33; 2; 4 e 6 dos complexos cucurbitacina E-RSA e cucurbitacina I-RSA.

As análises de dicroísmo circular e UV foram realizadas no intervalo de 250-700 nm com varredura de 100 nm/min e tempo de integração de dados de 1s. O sinal do HSA foi subtraído da interação HSA-BV e do complexo HSA-BV-cucurbitacinas, assim como o sinal do RSA foi subtraído da interação RSA-BV e do complexo RSA-BV-cucurbitacinas.

O efeito da cucurbitacina E e cucurbitacina I no sinal ICD da BV foi monitorado no comprimento máximo de absorção no UV da BV (aproximadamente 385 nm). Os sinais ICD dos complexos HSA-BV e RSA-BV (expressos em porcentagem) foram representados graficamente em função da razão molar das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I com a HSA ou RSA.

4. RESULTADOS

4.1 Interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando biossensor óptico baseado em SPR

A Figura 20 apresenta os sensogramas obtidos para as interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando o chip de alta densidade.

Figura 20. Sensogramas para a cucurbitacina E e cucurbitacina I ligadas a HSA e RSA utilizando o chip de alta densidade.

Na Figura 20 (A) estão apresentados os sensogramas e na Figura 21 (B) estão apresentados os valores de R_{eq} (resposta SPR da ligação do complexo ligante-analito no equilíbrio) ajustados ao modelo isotérmico de ligação 1:1 para a cucurbitacina E e cucurbitacina I ligadas a HSA e RSA utilizando o chip de alta densidade.

O aumento das concentrações da cucurbitacina E e cucurbitacina I estão indicados por diferentes tons de verde (de claro a escuro): 0,05; 0,09; 0,18; 0,35; 0,70; 1,40 e 2,80 μM para a interação cucurbitacina E-HSA; 0,04; 0,08; 0,17; 0,34; 0,68; 1,35 e 2,70 μM para a interação cucurbitacina I-HSA; 0,05; 0,09; 0,18; 0,35; 0,70; 1,40 e 2,80 μM para a interação cucurbitacina E-RSA e 0,04; 0,08; 0,17; 0,34; 0,68; 1,35 e 2,70 μM para a interação cucurbitacina I-RSA.

Os resultados obtidos nas interações cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando biossensor óptico baseado em SPR estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Constantes de equilíbrio de dissociação (K_d), razões das constantes cinéticas (K_{on} e K_{off}) e porcentagens de ligação (x_b), oriundos das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando biossensor óptico baseado em SPR.

	K_d (M)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	k_{off}/k_{on} (M)	x_b (%)
cuc E-HSA	$(5,0 \pm 1,0) \times 10^{-7}$	$(3,6 \pm 0,7) \times 10^5$	$(3,4 \pm 0,7) \times 10^{-1a}$	$(9,5 \pm 1,1) \times 10^{-7}$	99,3 ± 0,1
cuc E-RSA	$(2,9 \pm 1,0) \times 10^{-7}$	—	—	—	99,6 ± 0,1
cuc I-HSA	$(1,8 \pm 0,7) \times 10^{-6}$	$(4,6 \pm 2,4) \times 10^4$	$(1,5 \pm 1,2) \times 10^{-1a}$	$(3,4 \pm 1,5) \times 10^{-6}$	97,4 ± 1,0
cuc I-RSA	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	—	—	—	99,6 ± 0,1

cuc- cucurbitacina

^a Valor numérico fora da faixa ótima de trabalho do instrumento

- Não foi possível modelar os dados.

4.2 Interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA utilizando dicroísmo circular

Os espectros de UV e CD obtidos para a cucurbitacina E e cucurbitacina I e os espectros corrigidos das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA estão apresentados na Figura 21.

Figura 21. Sinal do CD e espectro UV obtidos para a cucurbitacina E e cucurbitacina I em solução e nas interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA.

Na Figura 21 (A) estão apresentados os sinais do CD e na Figura 21 (B) estão apresentados os espectros UV. As linhas sólidas representam o CD e espectro UV da cucurbitacina E e cucurbitacina I em solução, enquanto as linhas pontilhadas representam os espectros corrigidos das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA na razão molar de 2.

4.3 Estudos de competição das cucurbitacinas com a BV

A Figura 22 mostra os sinais ICD dos complexos HSA-BV e RSA-BV (expressos em porcentagem) em função da razão molar das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I com a HSA ou RSA.

Figura 22. Efeito das concentrações crescentes de cucurbitacina E e cucurbitacina I na magnitude positiva da banda ICD para o complexo HSA-BV e negativa da banda ICD para o complexo RSA-BV.

As concentrações de cucurbitacina E estão apresentadas como círculos, enquanto as concentrações de cucurbitacina I estão apresentadas como quadrados. Os complexos HSA-BV estão apresentados como linhas sólidas e os complexos RSA-BV estão apresentados como linhas pontilhadas.

5. DISCUSSÃO

O estudo da ligação da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA foi realizado utilizando uma combinação das técnicas biossensor óptico baseado em SPR e dicroísmo circular, consideradas de grande contribuição na caracterização do perfil farmacocinético de candidatos a fármacos, assim como na extrapolação de dados pré-clínicos para os estudos clínicos de fase 1.

Os sensogramas oriundos do biossensor óptico baseado em SPR permitiram a análise cinética e no estado de equilíbrio das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA.

No presente estudo, a HSA e a RSA foram ligadas covalentemente a camada de carboximetildextrano do chip CM5 através de reação de imobilização com acoplamento amina, uma estratégia amplamente utilizada nos estudos de interações de fármacos com albuminas de diferentes espécies (RICH et al., 2001).

O naproxeno e a (S)-varfarina foram utilizados como marcadores específicos de sítios de ligação a HSA. Os valores das constantes de equilíbrio de dissociação (K_d) com a HSA foram de $3,6 \times 10^{-5}$ M para o naproxeno e $6,0 \times 10^{-6}$ M para a (S)-varfarina empregando o chip de alta densidade e de $2,5 \times 10^{-5}$ para o naproxeno e $3,6 \times 10^{-6}$ M para a (S)-varfarina empregando o chip de baixa densidade. Os valores obtidos estão de acordo com os dados da literatura para a HSA, ou seja, valores de K_d na faixa de $2,6 \times 10^{-5}$ M a $3,0 \times 10^{-6}$ para o naproxeno e $1,4 \times 10^{-5}$ a $3,7 \times 10^{-6}$ M para a (S)-varfarina (FROSTELL-KARLSSON et al., 2000; RICH et al., 2001). Em relação a RSA, foi obtido um valor de K_d de $2,3 \times 10^{-5}$ M para a (S)-varfarina, um valor também de acordo com estudos prévios da literatura (HERVE et al., 1984).

Os estudos de afinidade dos complexos cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA, mostrados nos sensogramas apresentados na Figura 20, permitem observar que todos os compostos interagiram atingindo o estado de equilíbrio da reação dentro de poucos segundos e foram dissociados rapidamente da HSA e RSA.

O valor médio da constante de equilíbrio de dissociação (K_d) da cucurbitacina E a HSA, um parâmetro que denota a afinidade da ligação, foi de $5,0 \times 10^{-7}$ M, enquanto para a ligação da cucurbitacina I a HSA foi de $1,8 \times 10^{-6}$ M (Tabela 12). Ressalta-se que interação da cucurbitacina I a HSA não está descrita na literatura, pois estudos anteriores relatam que a interação é fraca e não afetada por ligantes específicos (GREIGE-GERGES et al., 2007a, GREIGE-GERGES et al., 2007b).

Os dados da interação da cucurbitacina E e da cucurbitacina I com a RSA também não estão descritos na literatura. Os valores de K_d de $2,9 \times 10^{-7}$ M e $2,8 \times 10^{-7}$ M (Tabela 12), obtidos respectivamente para as interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I com a RSA, permitem inferir que a afinidade de ambas as cucurbitacinas é maior para a RSA quando comparada a HSA.

Os valores de porcentagem de ligação da cucurbitacina E a HSA e RSA (x_b), apresentados na Tabela 12, são maiores que 99%, enquanto para a cucurbitacina I os valores de porcentagem de ligação a HSA também são maiores que 99%, mas para a ligação a RSA os valores são maiores que 97%. Os dados obtidos no presente estudo são inéditos e indicam que ambas as cucurbitacinas podem ser classificadas como substâncias de alta afinidade de ligação com a HSA e com a RSA (RICH et al., 2001).

Os parâmetros cinéticos da ligação da cucurbitacina E e da cucurbitacina I a HSA foram avaliados por modelo de interação cinética 1:1. Os valores de K_d , derivados das razões das constantes cinéticas K_{on} e K_{off} , obtidos para as interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA (respectivamente $9,5 \times 10^{-7}$ M e $3,4 \times 10^{-6}$ M) (Tabela 12) foram semelhantes aos valores obtidos no estudo de afinidade no estado de equilíbrio. As constantes cinéticas determinadas permitem sugerir que a afinidade da cucurbitacina E a HSA é maior do que a afinidade da cucurbitacina I a HSA devido ao valor da constante cinética de associação K_{on} ser oito vezes maior para a cucurbitacina E quando comparada a cucurbitacina I (valores respectivamente de $3,6 \times 10^5$ e $4,6 \times 10^4$ M⁻¹s⁻¹), Tabela 12. No entanto, o modelo de interação cinética 1:1 não permitiu a obtenção dos parâmetros cinéticos para as interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a RSA.

As análises de dicroísmo circular (CD) da cucurbitacina E e cucurbitacina I mostraram resultados semelhantes (Figura 21), considerando que a cucurbitacina E é a forma acetilada da cucurbitacina I. As bandas de CD obtidas para a cucurbitacina E e para a cucurbitacina I estão situadas em região espectral diferente das albuminas séricas, caracterizando uma situação ideal para monitorar o fenômeno de dicroísmo circular induzido (ICD); Figura 21.

As bandas de CD da cucurbitacina E e da cucurbitacina I representam uma limitação para a aplicação do CD no estudo das interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA e RSA, considerando que os marcadores de ICD (fenilbutazona e diazepam) para os sítios de alta afinidade de ligação a HSA exibem suas características espectrais entre 350 e 250 nm (TEDESCO & BERTUCCI et al., 2015; SYMONYI et al., 2012). Logo, as análises de CD foram realizadas utilizando a biliverdina (BV)

como marcador de ICD para a HSA (ZSILA, 2013). A interação da BV a HSA exibe uma banda de ICD negativa centrada em torno de 670 nm e uma banda positiva centrada em 385 nm, ou seja, ambas as bandas da interação da BV a HSA estão fora da faixa espectral de absorção da cucurbitacina E e da cucurbitacina I. A interação da BV a RSA resulta em bandas ICD no mesmo comprimento de onda observado para a interação com a HSA.

O estudo de competição realizado através da adição de cucurbitacina E ou cucurbitacina I na interação da BV a HSA, permite observar que em 385 nm, o aumento da banda ICD é muito maior com a adição da cucurbitacina I do que com a adição da cucurbitacina E (Figura 22). Ressalta-se que o aumento na intensidade da banda ICD é um indicativo de modulação alostérica positiva no local de ligação do marcador.

Em relação ao estudo de competição realizado através da adição de cucurbitacina E ou cucurbitacina I na interação da BV a RSA, é possível observar que em 385 nm, a banda de ICD diminui em intensidade com a adição de cucurbitacina E ou cucurbitacina I (Figura 22), sugerindo a existência de competição no mesmo local de ligação ou modulação alostérica negativa. Os dados disponíveis não são suficientes para discriminar diferenças entre estes dois mecanismos, embora a hipótese de modulação alostérica negativa seja mais aceita em função da limitada diminuição da banda ICD.

É importante ressaltar que os estudos de competição com a BV mostram diferenças entre a HSA e a RSA nas interações da cucurbitacina E e cucurbitacina I, confirmando a necessidade de cautela na extrapolação de dados obtidos em estudos de farmacocinética pré-clínicos para estudos clínicos.

6. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO 2

1- Os estudos da interação da cucurbitacina E e cucurbitacina I a HSA realizados por biossensor óptico baseado em SPR mostraram que a afinidade da cucurbitacina E a HSA é maior do que a afinidade da cucurbitacina I.

2- A avaliação da interação da cucurbitacina E e cucurbitacina I a RSA realizados por biossensor óptico baseado em SPR mostraram afinidade da cucurbitacina E e cucurbitacina I a RSA.

3- As análises realizadas por biossensor óptico baseado em SPR mostraram que a cucurbitacina E e a cucurbitacina I exibem maior afinidade para a RSA do que para a HSA.

4- Os experimentos realizados por biossensor óptico baseado em SPR permitem classificar a cucurbitacina E e a cucurbitacina I como ligantes de alta afinidade para a HSA e RSA com valores de ligação maiores que 97%.

5- O estudo de competição realizado através da adição de cucurbitacina E ou cucurbitacina I na interação da BV a HSA, realizado por CD, mostrou que o aumento da banda ICD é muito maior com a adição da cucurbitacina I do que com a adição da cucurbitacina E, sendo um indicativo de modulação alostérica positiva.

6- O estudo de competição realizado através da adição de cucurbitacina E ou cucurbitacina I na interação da BV a RSA, realizado por CD, mostrou redução na intensidade da banda ICD para a cucurbitacina E e cucurbitacina I, sendo um indicativo de modulação alostérica negativa.

CONCLUSÃO GERAL

1- O método de análise sequencial da cucurbitacina E e cucurbitacina I em plasma de ratos empregando LC/MS-MS é preciso, exato e sensível, permitindo a aplicação em estudos de farmacocinética pré-clínica de dose única intravenosa.

2- O perfil farmacocinético da cucurbitacina E administrada por via intravenosa a ratos apresentou comportamento semelhante a uma infusão com tempo de liberação de 0,45 h devido a baixa solubilidade da cucurbitacina E preparada na mistura tampão fosfato pH 7,4 e DMSO (95:5, v/v). O perfil farmacocinético da cucurbitacina E administrada por via intravenosa a ratos foi descrito por modelo bicompartimental com distribuição e eliminação de primeira ordem com os seguintes parâmetros farmacocinéticos: volume de distribuição (Vd) de 27,22 L, *clearance* (Cl) de 4,13 L/h e meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) de 4,57 h.

3-As concentrações plasmáticas de cucurbitacina I permaneceram abaixo do valor do LIQ em todas as amostras coletadas após a administração intravenosa da cucurbitacina E. Logo, é provável que o plasma de ratos não seja capaz de hidrolisar a cucurbitacina E a cucurbitacina I em função das diferenças das concentrações das esterases presentes no plasma humano e de ratos.

4- A administração de dose única oral de 1 mg/kg de cucurbitacina E a ratos resultou em concentrações plasmáticas de cucurbitacina E e cucurbitacina I abaixo dos valores de LIQ estabelecidos no estudo de validação do método analítico. A limitação do estudo de farmacocinética de dose única oral da cucurbitacina E em ratos foi a baixa solubilidade no fluido do trato gastrointestinal da cucurbitacina E preparada na mistura tampão fosfato pH 7,4 e DMSO (95:5, v/v), permitindo inferir a necessidade do desenvolvimento de formulações farmacotécnicas que resultem em solubilidade compatível com as exigências dos estudos de farmacocinética pré-clínica.

5- A cucurbitacina E e a cucurbitacina I são altamente ligadas a albumina plasmática de ratos com valores maiores que 97%.

6- A cucurbitacina E e a cucurbitacina I apresentam maior afinidade com a albumina plasmática de ratos do que com a albumina plasmática humana.

Concluindo, a cucurbitacina E é uma molécula que apresenta alto volume de distribuição (27,22 L) inferindo ampla distribuição para compartimentos fora do plasma, alta porcentagem de ligação as proteínas plasmáticas (maior que 99%) e alto *clearance* (4,13 L/h), sugerindo que as reações de deslocamento as proteínas

plasmáticas podem afetar o seu *clearance*. As diferenças observadas na ligação a albumina do plasma de ratos e plasma humano ainda permitem sugerir cautela na extrapolação de dados obtidos em estudos pré-clínicos para estudos clínicos.

REFERÊNCIAS

ABBAS S. et al. The cucurbitacins E, D and I: investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver. **Toxicol Lett**, Amsterdam, v. 216, p. 189–99, 2013.

ABDELWAHAB, S.I. et al. Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. *citroides*: Role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 82, p. 1190–1197, 2011.

ALGHASHAM, A. A. Cucurbitacins – A Promising Target for Cancer Therapy. **Int J Health Sci**, Qassim, v. 7, p. 77–79, 2013.

ASCOLI, G.A.; DOMENICI, E.; BERTUCCI, C. Drug binding to human serum albumin: abridged review of results obtained with high-performance liquid chromatography and circular dichroism. **Chirality**, New York, v.18, p. 667–679, 2006.

ATTARD, E.; MARTINOLI, M. G. Cucurbitacin E, An Experimental Lead Triterpenoid with Anticancer, Immunomodulatory and Novel Effects Against Degenerative Diseases. A Mini-Review. **Curr Top Med Chem**, Hilversum, v. 15, p. 1708–1713, 2015.

BAUER, R.J. **NONMEM users guide: introduction to NONMEM 7.2.0**. Ellicott City, Maryland, USA: ICON Development Solutions: 128 p. 2011.

BELLANTI F.; PASQUA, O. D. Modelling and simulation as research tools in paediatric drug development. **Eur J Clin Pharmacol**, Berlin, v. 67, Suppl 1:S75–S86, 2011.

BERGSTRAND, M. et al. Prediction-Corrected Visual Predictive Checks for Diagnosing Nonlinear Mixed-Effects Models. **AAPS J**, Arlington, v. 13, p. 143–151, 2011.

BERNARD, S. A.; OLAYINKA, O. A. Search for a novel antioxidant, antiinflammatory/analgesic or anti-proliferative drug: Cucurbitacins hold the ace. **J Med Plant Res**, Lagos, v.4, p. 2821–2826, 2010.

BERTUCCI, C.; PICCOLI, A.; PISTOLOZZI, M. Optical biosensors as a tool for early determination of absorption and distribution parameters of lead candidates and drugs. **Comb Chem High Throughput Screen**, Hilversum, v.10, p. 433–440, 2007.

BERTUCCI, C.; PISTOLOZZI, M.; DE SIMONE, A. Circular dichroism in drug discovery and development: an abridged review. **Anal Bioanal Chem**, Heidelberg, v. 398, p.155–166, 2010.

BLASKOVICH, M.A. et al. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. **Cancer Res**, Birmingham, v. 63, p. 1270–1279, 2003.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Cienc Cult**, Campinas, v. 68, p. 4–5, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 60 p., 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 27**, de 17 de maio de 2012. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em 30 jun. 2016.

BUGGINS, T.R.; DICKINSON, P.A.; DEMATAS, M.; TAYLOR, G. The effects of pharmaceutical excipients on in vivo drug metabolism. **J Pharm Pharmacol**, Oxford, v. 57, p. 104, 2005.

BUGGINS, T.R.; DICKINSON, P.A.; TAYLOR, G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. **Adv Drug Deliv Rev**, Amsterdam, v. 59, p. 1482–1503, 2007.

CALIXTO, J.B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 33, p. 179–189, 2000.

CHEN, J.C. et al. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological activities. **Nat Prod Rep**, London, v. 22, p. 386–399, 2005.

CHEN, X. et al. Biological activities and potential molecular targets of cucurbitacins: a focus on cancer. **Anticancer Drugs**, New York, v. 23, p. 777–787, 2012.

CHUNG S.; KIM Y.J.; PARK S. An updated review of Cucurbitacins and their biological and pharmacological activities. **Excli J**, Mainz, v. 5, p. 562–566, 2015.

COOPER, M.A. Optical biosensors in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, London, v. 1, p. 515–528, 2002.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads, **J Nat Prod**, Cincinnati, v. 77, p.703–723, 2014.

DE SIMONE, A. et al. Surface plasmon resonance fluorescence, and circular dichroism studies for the characterization of the binding of BACE-1 inhibitors. **Anal Bioanal Chem**, Heidelberg, v. 405, p. 827–835, 2013.

DIEHL, K.H. et al. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. **J Appl Toxicol**, New York, v. 21, p. 15–23, 2001.

DI, L. et al. High throughput microsomal stability assay for insoluble compounds. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 317, p. 54–60, 2006.

DING, T. et al. Effects of cucurbitacin e, a tetracyclic triterpene compound from Cucurbitaceae, on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, Copenhagen, v. 116, p. 385–389, 2015.

DONG, Y.M. et al. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. **Carcinogen**, Oxford, v. 31, p. 2097–2104, 2010.

DUFFULL, S.B. et al. Analysis of population pharmacokinetic data using NONMEM and WinBUGS. **J Biopharm Stat**, New York, v. 15, n. 1, p. 53-73, 2005.

DUNCAN, K.L.K. et al. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells. **Biochem Pharmacol**, Los Angeles, v. 52, p. 1553–1560, 1996.

DZIADOSZ, M. et al. Adduct supported analysis of γ -hydroxybutyrate in human serum with LC-MS/MS. **Anal Bioanal Chem**, Berlin, v. 405, p. 6595–6597, 2013.

FARIAS M. R. et al. Cucurbitacins as constituents of *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Med**, New York, v. 59, p. 272-275, 1993.

FORTUGNO, C. et al. Species-dependent binding of new synthesized bicalutamide analogues to albumin by optical biosensor analysis. **J Pharm Biomed Anal**, Oxford, v. 111, p. 324–332, 2015.

FROSTELL-KARLSSON, A. et al. Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. **J Med Chem**, Washington, v. 43, p. 1986–1992, 2000.

GEISSMAN, T.A. New substances of plant origin. **Annu Rev Pharmacol**, Palo Alto, v. 4, p. 305–316, 1964.

GREIGE-GERGES, H. et al. Effect of cucurbitacins on bilirubin–albumin binding in human plasma. **Life Sci**, Amsterdam, v. 80, 579–585, 2007a.

GREIGE-GERGES, H. et al. Cucurbitacins from *Ecballium elaterium* juice increase the binding of bilirubin and ibuprofen to albumin in human plasma. **Chem Biol Interact**, Limerick, v. 169, p. 53–62, 2007b.

HABIB, L. et al. Preparation and characterization of liposomes incorporating cucurbitacin E, a natural cytotoxic triterpene. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 448, p. 313–319, 2013.

HALAWEISH, F.T. TALLAMY, D.W. Quantitative determination of cucurbitacins by high performance liquid chromatography and high performance thin layer chromatography. **J Liq Chromatogr**, Oxford, v. 16, p. 497–511, 1993.

HERVÉ, F. et al. Drug-binding properties of rat 1-foetoprotein. Binding of warfarin, phenylbutazone, azapropazone, diazepam, digitoxin and cholic acid. **Biochem J**, London, v. 221, p. 401–406, 1984.

HOOKE, A.C.; STAATZ, C.E.; KARLSSON, M.O. Conditional weighted residuals (CWRES): A model diagnostic for the FOCE method. **Pharm Res**, New York, v. 24, p. 2187–2197, 2007.

HUNG, C.M. et al. Cucurbitacin E as inducer of cell death and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cell line SAS. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 14, p. 17147–17156, 2013.

JAYAPRAKASAM, B.; SEERAM, N.P.; NAIR, M.G. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. **Cancer Lett**, Limerick, v. 189, p. 11–16, 2003.

JEVTIĆ, B. et al. Cucurbitacin E Potently Modulates the Activity of Encephalitogenic Cells. **J Agric Food Chem**, Washington, v. 22, p. 4900–4907, 2016.

KAWAHARA N, et al. Two novel cucurbitacins, neocucurbitacins A and B, from the Brazilian folk medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and their effect on PEBP2alphaA and OCIF gene expression in a human osteoblast-like Saos-2 cell line. **Chem Pharm Bull**, Tokyo, v. 49, p. 1377–1379, 2001.

LAVIE, D., GLOTTER, E. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. *Fortschr. Chem Org Naturst*, Wien, v. 29, p. 307-362, 1971.

LEAL, L. R.; TELLIS, C. J. M. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. **Rev Fitos**, Farmanguinhos, v. 9, p. 253–303, 2015.

LEE, D.H.; IWANSKI, G.B.; THOENNISSSEN, N.H. Cucurbitacin: ancient compounds hedding new light on cancer treatment. **Sci World J**, Cairo, v. 10, p. 413–418, 2010.

LI, B. et al. O. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. **Biochem Pharmacol**, Amsterdam, v. 70, p. 1673–1684, 2005.

LIEN, E.A.; SOLHEIM, E.; UELAND, P.M. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. **Cancer Res**, Birmingham, v. 51, p. 4837–4844, 1991.

LINDBOM, L.; RIBBING, J.; JONSSON, E.N. Perl-speaks-NONMEM (PsN) - a Perl module for NONMEM related programming. **Comput Methods and Programs in Biomed**, Amsterdam, v. 75, p. 85–94, 2004.

LIU, T. et al. Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the STAT3 signaling pathway, enhance the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 641, p. 15–22, 2010.

LORENZ, P.R. et al. Pharmacotoxicological and clinical studies with colocynth pulp extracts (Extr. *Colocynthis fructus*). **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v. 55, p. 621–663, 2005.

LU, J. et al. In vitro and in vivo evaluation of cucurbitacin E on rat hepatic CYP2C11 expression and activity using LC-MS/MS. **Sci China Life Sci**, Beijing, 2015.

KRUVE, A. Sodium adduct formation efficiency in ESI source. **J. Mass Spectrom**, Hoboken, v. 48, p. 695–702, 2013.

MA, G. et al. Cucurbitacin E induces caspase-dependent apoptosis and protective autophagy mediated by ROS in lung cancer cells. **Chem Biol Interact**, Amsterdam, v. 253, p. 1–9, 2016.

MAITRE, P.O. et al. A 3-step approach combining Bayesian regression and NONMEM population analysis - application to midazolam. **J Pharmacokinetics Biopharm**, New York, v. 19, p. 377–384, 1991.

MIRÓ, M. Cucurbitacins and their pharmacological effects. **Phytother Res**, v. 9, p. 159–168, 1995.

MOLAVI, O. et al. Development of a sensitive and specific liquid chromatography/mass spectrometry method for the quantification of cucurbitacin I (JSI-124) in rat plasma. **J Pharm Pharm Sci**, Edmonton, v. 9, p. 158–164, 2006.

MORTIER, K. A. et al. Adduct Formation in Quantitative Bioanalysis: Effect of Ionization Conditions on Paclitaxel. **J Am Soc Mass Spectrom**, Berlin, v. 15, p. 585–592, 2004.

MYSZKA, D.G.; RICH, R.L. Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. **Pharm Sci Technol Today**, Oxford, v. 3, p. 310–317, 2000.

NAGGAR, E. M. B. E. et al. Hepatoprotective and proapoptotic effect of *Ecballium elaterium* on CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. **Asian Pac J Trop Med**, Haikou, v. 8, p. 526–531, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014, Cincinnati, **J Nat Prod**, Cincinnati, v. 79, p. 629–661, 2016.

PIANA, C. et al. Covariate effects and population pharmacokinetics of lamivudine in HIVinfected children. **Br J Clin Pharmacol**, London, v. 77, n. 5, p. 861–872, 2014.

PETERS, T. J. **All About Albumin**, Academic Press, San Diego, CA, 1996.

PORTAL BRASIL 22 JUN 2016. Produzido por Elza Fiuza/ Agência Brasil. **Uso de plantas medicinais e fitoterápicos sobe 161%**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/06/uso-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-sobe-161>>. Acesso em: 24 Jun. 2016.

POST, T.M. et al. Extensions to the visual predictive check to facilitate model performance evaluation. **J Pharmacokinet Pharmacodyn**, New York, v. 35, p. 185–202, 2008.

QIAO, J. et al. Cucurbitacin E exhibits anti-inflammatory effect in RAW 264.7 cells via suppression of NF-kappaB nuclear translocation. **Inflamm Res**, Auckland, v. 62, p. 461–469, 2013.

QI, J. et al. JSI-124 (Cucurbitacin I) inhibits tumor angiogenesis of human breast cancer through reduction of STAT3 phosphorylation. **Am J Chin Med**, New York, v. 43, p. 337–47, 2015.

RAIKHLIN-EISENKRAFT, B.; BENTUR, Y. *Ecballium elaterium* (squirting cucumber) - remedy or poison? **Clin Toxicol**, Philadelphia, v.38, p. 305–308, 2000.

RECIO, M.C.; ANDUJAR, I.; RIOS, J.L. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. **Curr Med Chem**, Schiphol, v. 19, p. 2088–2103, 2012.

RECIO, M.C., et al. Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. **Planta Med**, Stuttgart, v. 70, p. 414–420, 2004.

RICH, R.L.; MYSZKA, D.G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. **Curr Opin Biotechnol**, London, v.11, p. 54–61, 2000.

RICH, R.L. et al., High-resolution and high-throughput protocols for measuring drug/human serum albumin interactions using BIACORE. **Anal Biochem**, v. 296, p. 197–207, 2001.

SAADE, M. et al. Stability of Cucurbitacin E in Human Plasma: Chemical Hydrolysis and Role of Plasma Esterases. **Biopharm Drug Dispos**, Chichester, v. 30, p. 389–397, 2009.

SADZUKA, Y. et al. Screening of biochemical modulator by tumor cell permeability of doxorubicin. **Int J Pharm**, Amsterdam, v. 354, p. 63–69, 2008.

SARI-HASSOUN, M. et al. Cucurbitacin I elicits the formation of actin/phosphomyosin II co-aggregates by stimulation of the RhoA/ROCK pathway and inhibition of LIM-kinase. **Biochem Pharmacol**, Los Angeles, v. 102, p. 45–63, 2016.

SCHENKEL E. P. et al. Cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Phytochem**, Amsterdam, v. 31, p. 1329–1333, 1992.

SCHOEMAKER, R.C.; COHEN, A.F. Estimating impossible curves using NONMEM. **Br J Clin Pharmacol**, London, v. 42, p. 283–290, 1996.

SEGER, C. et al. A new cucurbitacin D related 16,23-epoxy derivative and its isomerization products. **Org Lett**, Washington, v. 6, p. 633–636, 2004.

SIMONYI, M. Probing HSA and AGP drug-binding sites by electronic circular dichroism, in: N. Berova, P.L. Polavarapu, K. Nakanishi, R.W. Woody (Eds.), *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*, **Wiley & Sons**, Hoboken, v. 2, p. 665–705, 2012.

SHEINER, L.B.; ROSENBERG, B.; MARATHE, V. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. **J Pharmacokinet Biopharm**, New York, v. 5, p. 445–479, 1977.

SHEINER, L.B.; LUDDEN, T.M. Population Pharmacokinetics/Dynamics. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, California, v.32, p. 185–209, 1992.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer*, London, v. 10, p. 813–823, 2006.

SUN, C. et al. Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. **J Canc Res Clin Oncol**, Berlin, v. 136, p. 603–610, 2010.

TANNIN-SPITZ, T. et al. Growth inhibitory activity of cucurbitacin glucosides isolated from *Citrullus colocynthis* on human breast cancer cells. **Biochem Pharmacol**, Los Angeles, v. 73, p. 56–67, 2007.

TEDESCO, D.; BERTUCCI, C. Induced circular dichroism as a tool to investigate the binding of drugs to carrier proteins: classic approaches and new trends, **J Pharm Biomed Anal**, New York, v.113, p. 34–42, 2015.

TEDESCO, D. et al. Characterization of the species-dependent ketoprofen/albumin binding modes by induced CD spectroscopy and TD-DFT calculations. **J Pharma Biomed Anal**, New York, v. 112, p. 176–180, 2015.

THOENNISSEN, N. H. et al., Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. **Cancer Res**, Birmingham, v. 69, p. 5876–84, 2009.

U.S. Department of Health and Human Services. FDA - Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Population Pharmacokinetics**, 1999. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM072137.pdf>. Acesso em 30 jun. 2016.

VALENTE, L. M. M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. **Quim Nova**, São Paulo, v. 27, p. 944–948, 2004.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim Nova**, São Paulo, v. 28, p. 519-528, 2005.

VUIGNIER, K. et al. Drug–protein binding: a critical review of analytical tools. **Anal Bioanal Chem**, Heidelberg, v. 398, p. 53–66, 2010.

WU, P.L. et al. Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. **Chem Pharm Bull**, Tokio, v. 52, p. 345-349, 2004.

ZHANG, D. et al. Pre clinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. **Acta Pharm Sin B**, Amsterdam, v.2, p. 549–561, 2012.

ZHAO, W. Development and validation of a UPLC-MS/MS method for the determination of cucurbitacin B in rat plasma and application to a pharmacokinetic study. **Biomed Chromatogr**, Amsterdam, v. 30, p. 503–507, 2015.

ZSILA, F. Subdomain IB is the third major drug binding region of human serumalbumin: toward the three-sites model. **Mol Pharm**, Bethesda, v. 10, p. 1668–1682, 2013.

ANEXO 1 – Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1382.53.9), intitulado "Disposição Cinética, Ligação às Proteínas Plasmáticas e Metabolismo *in vitro* e *in vivo* das Curcubitacinas em Ratos", de autoria de **Giovana Maria Lanchoti Fiori** e de **Norberto Peporine Lopes**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05.11.2012.

Colaboradores: Vera Lúcia Lanchote

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1382.53.9), entitled: "Disposição Cinética, Ligação às Proteínas Plasmáticas e Metabolismo *in vitro* e *in vivo* das Curcubitacinas em Ratos", by **Giovana Maria Lanchoti Fiori** and **Norberto Peporine Lopes**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, November 5, 2012.

Ribeirão Preto, 13 de novembro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro