

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo

Maíra Rosato Silveira Silvério

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Maíra Rosato Silveira
Silvério

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine
Lopes

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.

Silvério, Maíra Rosato Silveira

Estudo do metabolismo *in vitro* do partenolídeo. Ribeirão Preto, 2016.

74 p.: 25 il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine

1. Metabolismo *in vitro*
2. Partenolídeo
3. 1,10-epóxi-partenolídeo
4. Tripanocida
5. Leishmanicida

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maíra Rosato Silveira Silvério

Estudo do metabolismo *in vitro* do partenolídeo

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia,
para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Ter fé não significa estar livre de momentos difíceis, mas ter a força para os enfrentar sabendo que não estamos sozinhos.”

Papa Francisco

*Agradeço à Deus pelo dom da vida,
pela saúde e força para alcançar esta conquista.*

*Este trabalho é dedicado à minha família:
meu marido **Fabiano** e minha filha **Yasmin**, que suportaram minha
ausência com muito amor, carinho e paciência e fizeram desta
jornada uma fonte de amadurecimento, união e companheirismo.*

Aos meus pais,

***Ubaldo** e **Genoveva**, que são meus principais exemplos de vida, meus
grandes mestres e responsáveis pelo que sou.*

*Aos meus sogros, **Wagner** e **Sueli**, e à vó **Antonieta**:
pelo apoio e companheirismo e pela força para seguir em frente.*

*Aos meus sobrinhos e afilhados, **Miguel** e **Francisco**, e ao meu irmão
Mateus e à **Izabela** pelo carinho e consideração.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Beto, pela oportunidade, amizade, consideração, apoio e por entender e aceitar que meu tempo era dividido entre mestrado, trabalho e família.

À Lychnoflora, que me ofereceu a oportunidade e permitiu a realização deste trabalho. À Thais e à Elaine, por terem entendido os momentos difíceis que passei, pela disponibilidade do tempo para me dedicar à este trabalho, pela amizade, carinho e consideração. Em especial, gostaria de agradecer à Fernanda (Fer) por ter me ajudado desde a escolha do material a ser estudado, discussões (especialmente de RMN e EM), ideias, correções e apoio nos momentos difíceis; ao Daniel pela ajuda, ensaios biológicos, discussões e ideias. À Olívia, pela amizade, apoio e por ser minha grande companheira e pela ajuda nos experimentos; ao Luís (Luisera) pelas discussões, incentivo e risadas; ao Eduardo (Pompom) pela ajuda nos estudos de RMN e EM e ensaios biomiméticos; ao Wellington pelo apoio e ajuda nos experimentos; à Elídia, Rafaela, Helen pela companhia e incentivo de que tudo ia dar certo; ao Dalton e José Callegari (Zé) pela amizade e consideração.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP por ter me permitido executar este trabalho.

Aos colegas do NPPNS, pelo apoio nos experimentos, nas palavras de incentivo e também pela companhia.

Aos queridos técnicos, José Carlos Tomaz (Tomaz), Jacqueline Nakau Mendonça (Jacque) e Izabel Cristina Casanova Turatti (Cris), pela ajuda nos equipamentos, ensinamentos e pelo tempo que passamos juntos!

À Thalita (Thali) pelo tempo dedicado para execução e discussão dos ensaios de citotoxicidade e ao prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi por ter cedido os materiais e o laboratório para execução desta análise.

Ao professor Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira por ter cedido os microsomas hepáticos de ratos e o laboratório para execução do ensaios e ao Fernando Aguiar pela ajuda com os experimentos.

Ao prof. Dr. João M. Batista Jr. pela obtenção dos espectros de IV e DCV.

À prof. Dra. Denise Brentan da Silva e o prof. Antônio Eduardo Miller Crotti por terem participado da minha banca examinadora de qualificação, pelas discussões e sugestões sobre este trabalho.

Aos funcionários da FCFRP, especialmente os da pós-graduação pela ajuda e orientações.

Ao Vinicius Palaretti (DQ-FFCLRP-USP) pela obtenção dos espectros de RMN.

Às agências de fomento Fapesp, Capes e CNPq pelos auxílios concedidos.

À Yasmin, amor da minha vida, por ter sido minha companheira em vários momentos de escrita e minha inspiradora nos momentos difíceis.

Ao Fabiano, meu amor, por ter me apoiado desde o princípio e por estar sempre ao meu lado, cuidando de mim e da Yasmin para que este trabalho pudesse existir.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e acreditaram nas minhas decisões.

À todos os avós e bisã da Yasmin, por terem cuidado dela com tanto amor, carinho e dedicação para que eu pudesse ter tempo para realização deste trabalho.

Aos meus parentes, familiares e amigos, em especial Danielle (Dani), Milady e Cícero, pelo apoio e incentivo.

Aos meus avós, que apesar de não estarem presentes fisicamente, me iluminaram nas decisões tomadas e ações realizadas.

Aquele que aqui não citei, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À todos vocês

MUITO OBRIGADA!!!

**“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada não existirão resultados.”**

Mahatma Gandhi

RESUMO

SILVÉRIO, M. R. S. **Estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo**. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O partenólídeo é uma lactona sesquiterpênica do tipo germacrolídeo, considerado como marcador da espécie *Tanacetum parthenium* e responsável pela atividade biológica do extrato das folhas desta planta. O extrato padronizado é comercializado como medicamento fitoterápico de registro simplificado pela ANVISA para profilaxia de enxaqueca. Além disso, existem vários estudos recentes demonstrando diversas atividades biológicas desta substância, como atividade antineoplásica e antiparasitária. Desta maneira, surge a necessidade de conhecimento da toxicologia deste composto, como os dados farmacocinéticos, farmacodinâmicos e de toxicidade. Neste trabalho foi avaliado o estudo introdutório de metabolismo *in vitro* do partenólídeo, ou seja, a avaliação dos possíveis metabólitos formados através das reações que mimetizam a oxidação pelo sistema citocromo P-450, utilizando catalisadores biomiméticos e pela biotransformação utilizando microssomas de rato. Através do modelo biomimético foi verificada a formação de um metabólito putativo majoritário, o qual foi isolado da reação do partenólídeo com MCPBA catalisada pela metaloporfirina FeTFPPCl e caracterizado como 1(*R*),10(*R*)-epóxi-partenólídeo. A avaliação da reatividade do partenólídeo, neste modelo oxidativo, foi realizada através da variação do agente oxidante e do catalisador. Na catálise em meio biológico utilizando microssoma de rato foi detectado um único metabólito, o qual apresentou espectro de massas e tempo de retenção similar ao produto isolado da reação biomimética com FeTFPPCl e MCPBA, sugerindo desta maneira, tratar-se da mesma substância. Ainda, neste estudo, foram realizados ensaios preliminares de citotoxicidade do partenólídeo e de seu metabólito putativo, sendo ambos os compostos ativos.

Palavras-chave: Partenólídeo; metabolismo *in vitro*; 1,10-epóxi-partenólídeo, tripanocida; leishmanicida.

ABSTRACT

SILVÉRIO, M. R. S. ***In vitro* metabolism of parthenolide**. 2016. 74f. Dissertation Master. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Parthenolide is a sesquiterpene lactone (germacrolide moiety) considered as a chemical marker of *Tanacetum parthenium* species and described as responsible for the biological activity of the leaves extract. The standardized extract is presented in Brazilian market as an herbal medicine for headache preventing (simplified registration at ANVISA). Moreover, several investigations in the literature have demonstrated its antiparasitic and antineoplastic activity. However, there is a need for knowledge on its toxicology, such as pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicity evaluations. Thus, the aim of this work is the *in vitro* analysis of parthenolide biomimetic metabolism (like cytochrome P-450 system) applying organometallic catalysts and biotransformation by rat microsomes. A major putative metabolite was isolated from parthenolide biomimetic oxidative reaction with MCPBA catalyzed by metalloporphyrin FeTFPPCl and it was characterized as 1(*R*),10(*R*)-epoxy-parthenolide. The reactivity of parthenolide (at this oxidative model) was performed by varying the oxidizing agent and catalyst amounts. At rat microsome model, only a single metabolite was detected, which showed identical mass spectrum and retention time of the previously isolated putative metabolite (from the biomimetic reaction with MCPBA and FeTFPPCl). In addition, parthenolide and its putative metabolite were preliminary evaluated for the trypanocidal and leishmanicidal activity and both compounds showed significant biological activity.

Key-word: Parthenolide; *in vitro* metabolism; 1,10-epoxy-parthenolide; trypanocidal; leishmanicidal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. – Ciclo catalítico de oxidação do CYP 450.....	3
Figura 1.2. – Esquema da estrutura química da Ferroprotoporfirina IX.....	6
Figura 1.3. Estrutura química do anel porfirínico base livre.....	7
Figura 1.4. Exemplos de estruturas químicas de metaloporfirinas de primeira, segunda e terceira geração.....	8
Figura 1.5. – Estrutura química do Catalisador de Jacobsen.....	9
Figura 1.6. Esquema exemplificado para isolamento da fração microsomal do fígado para utilização em estudo de metabolismo in vitro.....	10
Figura 1.7. Gráfico ilustrativo do cálculo da taxa instantânea de reação.....	11
Figura 1.8. Estrutura química da lactona sesquiterpêncica Partenolídeo – marcador da espécie <i>Tanacetum parthenium</i>	12
Figura 4.1. Estrutura do partenolídeo.....	31
Figura 4.2. Espectro de Massas – EMAR-IES (Modo Positivo) do partenolídeo.....	31
Figura 4.3. Resultados de IV e DCV para a determinação da configuração absoluta do partenolídeo e representação da sua estrutura tridimensional.....	32
Figura 4.4. Porcentagem de redução do substrato partenolídeo no ensaio de catálise oxidativa biomimética.....	34
Figura 4.5. Cromatogramas da Reação 7 na presença (Reação) e na ausência (Controle) do catalisador – com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm.....	34
Figura 4.6. Cromatogramas das Reações 1 e 2 – com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm.....	35
Figura 4.7. Cromatogramas das Reações 3 e 4 – com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm.....	36
Figura 4.8. Cromatogramas das Reações 6 e 7 – com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm.....	37
Figura 4.9. Comparação das reações oxidativas biomiméticas nas proporções molares 1:30:30 (catalisador:substrato:agente oxidante).....	37
Figura 4.11. Metabólito putativo isolado da reação oxidativa biomimética do partenolídeo, utilizando catalisador porfirínico FeTFPPCI e agente oxidante MCBA e identificado como 1(R),10(R)-epóxi-partenolídeo	38
Figura 4.12. Espectro de massas – EMAR-IES – modo positivo do metabólito putativo isolado da reação oxidativa biomimética do partenolídeo, utilizando catalisador porfirínico FeTFPPCI e agente oxidante MCBA.....	39
Figura 4.12. Representação das conectividades do mapa de contorno do HMBC para a estrutura do metabólito putativo 1,10-epóxi-partenolídeo (H → C).....	41
Figura 4.13. Dados calculados e experimentais de IV e DCV para o confômero 4R,5R,6S,7S,1R,10R do produto oxidado e representação da estrutura tridimensional.....	42

Figura 4.14. Dados calculados de IV e DCV para o possível confômero 4R,5R,6S,7S,1S,10S do produto oxidado e representação desta estrutura tridimensional e os resultados de IV e DCV obtidos para o produto oxidado.	43
Figura 4.15. Variação da porcentagem de estabilidade do composto.	44
Figura 4.16. Cromatogramas (CLAE-EM) – modo positivo de ionização por eletrospray (BPC) do partenólídeo submetido à incubação com microssomas hepáticos de ratos.....	45
Figura 4.17. Cromatogramas (CLAE-EM) – modo positivo de ionização por eletrospray (BPC) da condição Teste do ensaio com microssoma hepático de ratos do partenólídeo e do produto oxidado 1,10-epóxi-partenólídeo.	45
Figura 4.18. Comparação dos espectros de massas (ionização por eletrospray, modo positivo) do produto com t_R de 12,2 min na reação do partenólídeo incubado com microssoma e o do produto oxidado 1,10-epóxi-partenólídeo.....	46
Figura 4.19. Comparação dos espectros de EM^2 (ionização por eletrospray, modo positivo) do produto com t_R de 12,2 min na reação do partenólídeo incubado com microssoma e o do produto oxidado 1,10-epóxi-partenólídeo.	47
Figura 4.20. Cromatogramas (CLAE-EM) – modo positivo de ionização por eletrospray (BPC) da condição Teste do ensaio com microssoma hepático de ratos do partenólídeo e do produto oxidado isolado com o gradiente exploratório.	47
Figura 4.21. Cromatograma (CLAE-EM) – modo negativo de ionização por eletrospray (BPC) da condição Teste do ensaio com microssoma hepático de ratos do partenólídeo.....	48
Figura 4.22. Gráficos da cinética das reações oxidativas do partenólídeo, avaliando a variação da concentração em função do tempo.	50
Figura 4.23. Cinética das reações de oxidação do partenólídeo com diacetato de iodobenzeno e MCPBA formando o produto 1,10-epóxi-partenólídeo.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Gradiente de fase móvel utilizado no método de CLAE-DAD no estudo do metabolismo in vitro do partenólídeo por modelo de reações oxidativas biomiméticas.....	18
Tabela 3.2. Gradiente de fase móvel utilizado no método de CLAE-DAD semi-preparativo para isolamento do metabólito putativo majoritário da reação oxidativa biomimética.	19
Tabela 3.3. Gradiente de fase móvel utilizado no método de CLAE-EM no ensaio de catálise biológica do partenólídeo utilizando microssoma hepático de ratos.	20
Tabela 3.4. Gradiente de fase móvel utilizado no método de CLAE-DAD no estudo de cinética de reações oxidativas biomiméticas do partenólídeo.	20
Tabela 3.5. Condições reacionais do metabolismo in vitro do partenólídeo por modelo de reações oxidativas biomiméticas.	22
Tabela 4.1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância partenólídeo (CDCl_3), em comparação com os dados de literatura (TIUMAN, et al, 2005).....	30
Tabela 4.2. Dados de EMAR-IES do partenólídeo.....	31
Tabela 4.3 Dados de EMAR-IES do metabólito putativo isolado.....	39
Tabela 4.4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a produto oxidado isolado (CDCl_3).	41
Tabela 4.5. Taxas instantâneas de reações oxidativas do partenólídeo.....	49
Tabela 4.6. Taxas de reações oxidativas do partenólídeo.	50
Tabela 4.7. Viabilidade celular do partenólídeo e do metabólito 1,10-epóxi-partenólídeo nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e linhagem de macrófago murino J774.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	“American Type Culture Collection”
CDCI ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Espectrometria de Massas
CV	Controle de Viabilidade
CYP/CYP450/P-450	Citocromo P-450
<i>d</i>	Dupleto
DCV	Dicroísmo Circular Vibracional
<i>dd</i>	Duplo-dupleto
<i>dl</i>	Dupleto-largo
EM	Espectrometria de Massas
EMAR-IES	Espectrometria de Massas de Alta Resolução – Ionização por eletrospray
FeTFPPCI	Cloreto de 5,10,15,20 Tetrakis(pentafluorfenil)porfirina-ferro
HMBC	“Heteronuclear multiple bond coherence”
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
HSQC	“Heteronuclear single quantum coherence”
IES	Ionização por eletrospray
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MCPBA	“ <i>meta</i> -chloroperbenzoic acid” (Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzóico)
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetilazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio
NADP	“Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate”
NADPH	“Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate”
NPPNS	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
PhI(OAc) ₂	Diacetato de iodobenzeno
PTFE	Politetrafluoretileno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	Simpleto

<i>t</i>	Tripleto
$T_{1/2}$	Tempo de meia-vida
<i>td</i>	Triplo-dupleto
<i>tl</i>	Tripleto-largo
TOF	“Time of Flight”
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Estudos de metabolismo	1
1.2 Estudo de metabolismo <i>in vitro</i> por modelo oxidativo biomimético	5
1.2.1 Metaloporfirinas	6
1.2.2 Catalisador de Jacobsen	8
1.3 Estudo de metabolismo <i>in vitro</i> por modelo de microsoma hepático	9
1.4 Cinética de Reações	10
1.5 Partenólídeo e sua importância	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos gerais	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Materiais	15
3.2 Metodologia Experimental	16
3.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	16
3.2.2 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray de alta resolução (EMAR-IES)	16
3.2.3 Dicroísmo Circular Vibracional (DCV)	16
3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	17
3.2.5 Identificação e caracterização do partenólídeo	21
3.2.6 Estudo do metabolismo <i>in vitro</i> por modelo de reação oxidativa biomiméticas	21

3.2.7	Isolamento do metabólito putativo majoritário proveniente da reação oxidativa biomimética do partenólídeo utilizando catalisador porfirínico FeTFPPCI e agente oxidante MCPBA	23
3.2.8	Caracterização do metabólito putativo majoritário proveniente da reação oxidativa biomimética do partenólídeo utilizando catalisador porfirínico FeTFPPCI e agente oxidante MCPBA	24
3.2.9	Estudo do metabolismo <i>in vitro</i> por modelo de microsossoma hepático de ratos.....	24
3.2.10	Cinética de reações oxidativas biomiméticas	25
3.2.11	Avaliação do efeito citotóxico do partenólídeo e do metabólito putativo nas formas parasitárias e celulares.....	26
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	Identificação e caracterização do partenólídeo.....	30
4.2	Estudo do metabolismo <i>in vitro</i> por modelo de reação biomimética.....	33
4.3	Isolamento e identificação do metabólito putativo majoritário	38
4.4	Estudo do metabolismo <i>in vitro</i> por modelo de microsossoma hepático.....	43
4.5	Cinética das reações oxidativas biomiméticas	48
4.6	Avaliação do efeito citotóxico do partenólídeo e do metabólito putativo nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e nas linhagens celulares de macrófago.....	52
5.	CONCLUSÕES	57
6.	REFERÊNCIAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estudos de metabolismo

O metabolismo ou biotransformação compreende uma série de reações bioquímicas catalisadas por enzimas inespecíficas, as quais promovem alterações na estrutura química da substância, dentro do organismo (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O, 2008).

As alterações na estrutura química têm como intuito a eliminação da substância do organismo, através de líquidos corpóreos, tais como bile, urina e suor. O processo de metabolização torna a substância mais polar e hidrofílica, favorecendo sua eliminação (JOSEPHY; GUENGERICH; MINERS, 2005; LAINE, 2008).

As reações de metabolização são divididas em duas fases:

- Fase I: compreendem as reações de oxidação, redução e hidrólise, as quais tornam as substâncias mais polares através da inserção de grupamentos hidroxilas, sulfidrilas, aminas ou carboxilas (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O, 2008).

- Fase II: compreendem as reações de conjugação (glicuronidação, metilação, acetilação), nas quais ocorrem a incorporação de cofatores endógenos às substâncias que já passaram pela etapa de Fase I de biotransformação (JANCOVA; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2010).

As reações de fases I e II podem ocorrer em vários tecidos do organismo, como rim, pulmão, intestino delgado e pele, entretanto, o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo no organismo (THUMMEL; KUNZE; SHEN, 1997).

Nas reações de fase I existem várias enzimas responsáveis pela biotransformação de substâncias, todavia as enzimas do sistema citocromo P-450 são as principais enzimas envolvidas nesta fase de metabolização (LOHMANN; KARST, 2008).

O citocromo P-450 é uma hemeoproteína constituída de um átomo de ferro em seu núcleo. Na forma reduzida, esta hemeoproteína reage com monóxido de carbono e forma um complexo que possui absorvância máxima no comprimento de onda de 450 nm, por isso denominado citocromo P-450 (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O, 2008). Este sistema é ainda abreviado como CYP 450, P-450 ou simplesmente CYP. Através da utilização de oxigênio molecular, as enzimas do

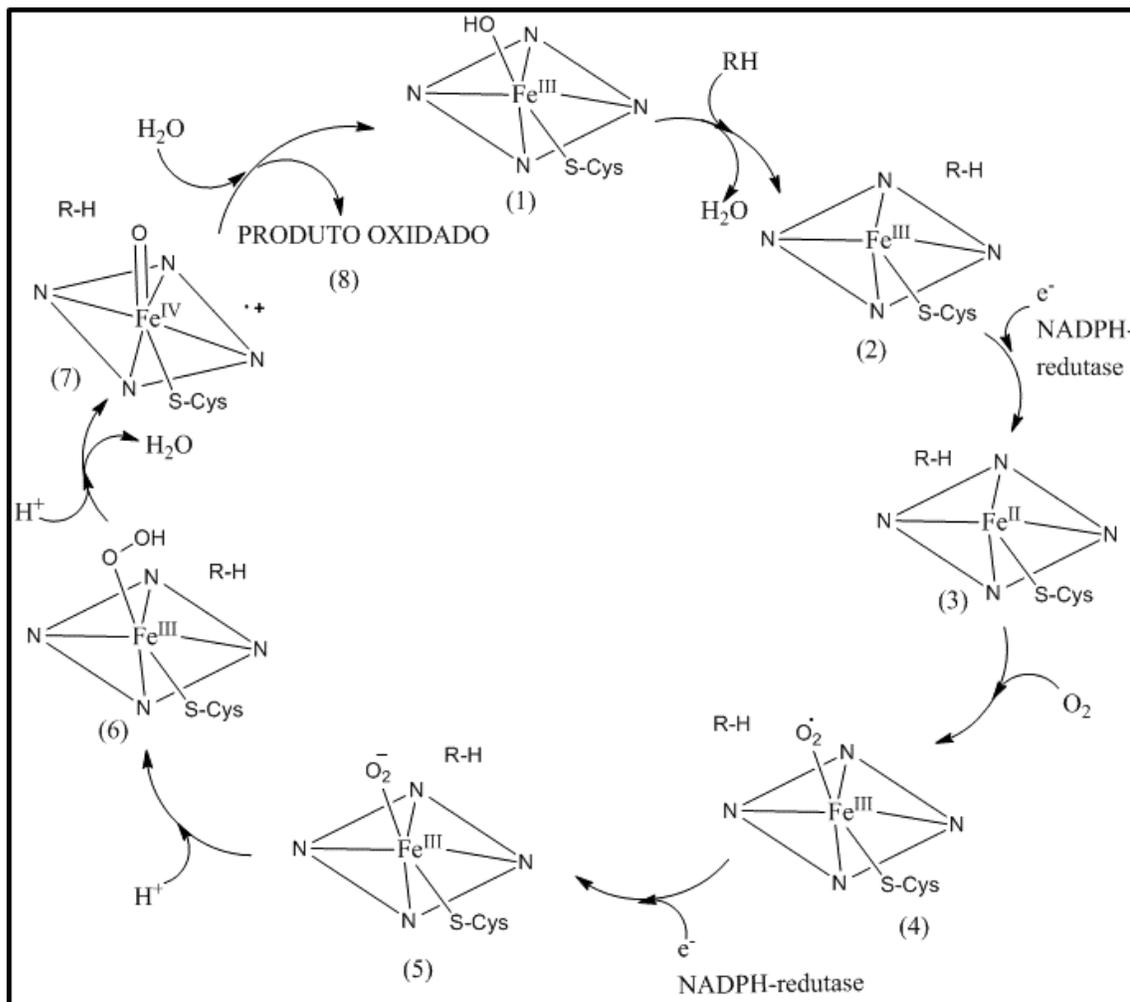
CYP 450 catalisam a inserção de um átomo de oxigênio em um substrato e a formação de água a partir do outro átomo de oxigênio (LOHMANN; KARST, 2008).

Além de participar da biotransformação, as enzimas do CYP 450 também são responsáveis pela bioativação de substâncias, as quais podem tornar-se carcinogênicas ou quimioterápicas. Participam ainda da biossíntese de hormônios esteroides e prostaglandinas (COSTAS, 2011).

A reação de oxidação realizada pelas enzimas do CYP 450 ocorre através do esquema representado na Figura 1.1, responsável pela desintoxicação de diversos xenobióticos do organismo, os quais são compostos químicos estranhos ao organismo, tais como medicamentos, pesticidas, poluentes, dentre outros (SANTOS et al, 2011). As etapas para reação de oxidação contemplam (REEDIJK; BOUWMAN, 1999; DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997):

- (1) O átomo de ferro está no estado de oxidação +3 (Fe^{3+}), com o sexto ponto de coordenação ligado a uma molécula de água.
- (2) O substrato se liga a este complexo e desloca a molécula de água, consumindo NADPH.
- (3) Ocorre a redução do ferro Fe^{3+} para Fe^{2+} .
- (4) O oxigênio molecular (O_2) se liga ao átomo de ferro, formando o radical $Fe\ III(O-O^{\bullet})$.
- (5) Através da transferência de elétron, forma-se o complexo $Fe\ III(O-O)^{\bullet-}$ superóxido.
- (6) Este complexo é protonado, originando $Fe\ III(O-OH)$.
- (7) Após segunda protonação e seguida de eliminação de água, ocorre a clivagem do oxigênio molecular, originando o complexo oxiferrilporfirina $Fe\ IVO^{*+}$. Este intermediário é considerado o responsável pela catálise de reações do CYP 450.
- (8) Na última etapa, o complexo $Fe\ IVO^{*+}$ reage com o substrato, formando o produto oxidado e água.

Figura 1.1. – Ciclo catalítico de oxidação do CYP 450.



Fonte: Adaptado de LOHMANN; KARST, 2008.

A maioria dos xenobióticos são normalmente metabolizados por mais de uma subfamília do citocromo P-450. A subfamília P-450 3A4 representa 40 % do CYP 450 hepático, além de ser a mais abundante na mucosa intestinal. Estas enzimas são responsáveis por 35 % da metabolização do sistema citocromo P 450 (LAINE, 2008). As enzimas do CYP3A4 têm papel significativo no metabolismo de primeira passagem hepático e intestinal, o qual pode gerar metabólitos importantes de serem monitorados em estudos toxicológicos (THUMMEL; KUNZE; SHEN, 1997).

As reações de fase II também são importantes para a biotransformação de substâncias endógenas e xenobióticos, as quais são responsáveis pela inativação metabólica da ação farmacológica. Além disso, nesta etapa de biotransformação, os xenobióticos normalmente tornam-se substâncias mais hidrofílicas devido à reação

de conjugação com moléculas endógenas, como ácido glicurônico e ácido sulfúrico. Consequentemente, após a conjugação, os xenobióticos são mais facilmente excretados do organismo. Entretanto, existem compostos que são convertidos pelas enzimas de fase II a intermediários altamente reativos que podem agir como substâncias químicas carcinogênicas e mutagênicas por se ligarem covalentemente ao DNA (JANCOVA; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2010).

A enzima de maior participação nas reações de fase II é a glicuroniltransferase, responsável pela conjugação do ácido glicurônico com substrato, seguida da sulfotransferase, responsável pela conjugação do ácido sulfúrico com substrato (EVANS; RELLING, 1999). Além destas enzimas, podemos citar N-acetiltransferase (acetilação) e glutathione-S-transferase (conjugação com glutathione) (JOSEPHY; GUENGERICH; MINERS, 2005).

Várias metodologias foram desenvolvidas com o objetivo de mimetizar as reações de fase I e II *in vivo* que são promovidas no fígado, sendo que os principais modelos biológicos são os microsomas hepáticos, fração citosólica de fígado e fração S9 de fígado (SINZ, 2012).

Outra metodologia utilizada para mimetizar as reações de fase I envolve a utilização de catalisadores organometálicos como metaloporfirinas e/ou catalisador de Jacobsen e de agentes oxidantes. Este modelo, denominado modelo oxidativo biomimético do sistema citocromo P-450, merece destaque, pois diversos protocolos já utilizados, demonstraram a possibilidade de obtenção de possíveis metabólitos também formados *in vivo* (LOHMANN; KARST, 2008; COSTAS, 2011).

Ensaio de metabolismo *in vitro* devem ser avaliados e estudados anteriormente aos ensaios clínicos para obtenção de dados farmacocinéticos, como distribuição, metabolismo e excreção e informações referentes às possíveis interações e atividades biológicas da substância a ser testada. Estas informações prévias são importantes para conhecimento toxicológico da substância e de seus possíveis metabólitos para verificar a viabilidade de sua utilização como medicamento e para condução adequada dos ensaios clínicos com seres humanos, os quais são normalmente longos e dispendiosos (GESEF; ANVISA, 2013).

Durante o desenvolvimento de um novo medicamento, os estudos de metabolismo podem auxiliar na identificação de grupos funcionais da estrutura do fármaco que possam ser vulneráveis às reações de metabolização, estabelecer a

identidade química e toxicidade de possíveis metabólitos, além de fornecer produtos com maior atividade do que o próprio fármaco (PEARSON; WIENKERS, 2008).

Uma ferramenta bastante útil utilizada nos estudos de metabolismo é a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (IES), pois esta técnica auxilia na identificação dos produtos formados na metabolização do xenobiótico, além de apresentar sensibilidade e especificidade. Com esta técnica é possível pesquisar na amostra analisada, compostos prováveis de ocorrerem na metabolização, como por exemplo produtos oxidados ou hidratados; realizar a identificação do metabólito através da comparação dos perfis de fragmentação e da avaliação da acurácia de massas (PRASAD et al, 2011, DEMARQUE et al 2016).

Outra ferramenta utilizada é a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, a qual pode ser aplicada para caracterização e/ou elucidação dos produtos de metabolismo (LARIVE; BARDING; MEREDITH, 2015; GOWDA; GOWDA; RAFTERY, 2014). Com esta técnica é possível obter informação detalhadas sobre a estrutura química de uma substância composta por átomos que possuem núcleos ativos à ressonância magnética nuclear, como o ^1H e o ^{13}C .

1.2 Estudo de metabolismo *in vitro* por modelo oxidativo biomimético

As reações oxidativas envolvendo o uso de metaloporfirinas e/ou ligantes de Salen como catalisadores organometálicos podem simular reações de Fase I de biotransformação catalisadas pelo CYP 450. Por esta razão são utilizadas como modelo *in vitro* para avaliação do metabolismo e denominadas de reações oxidativas biomiméticas ou modelo oxidativo biomimético (ROCHA et al, 2014; NIEHUES et al, 2012; COSTAS, 2011).

A principal vantagem deste modelo, quando comparado com o modelos biológicos, é o maior rendimento de metabólitos oxidados, o que facilita o isolamento em maior escala e a identificação estrutural. Outros pontos favoráveis deste modelo são a reprodutibilidade das reações, a redução da utilização de animais e menor custo (BERNADOU; MEUNIER, 2004).

Como o isolamento de enzimas do sistema citocromo P-450 possui um custo elevado, a utilização de modelos sintéticos, como metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen, é uma alternativa interessante para o estudo do processo de oxidação de diversos xenobióticos (SANTOS et al, 2011).

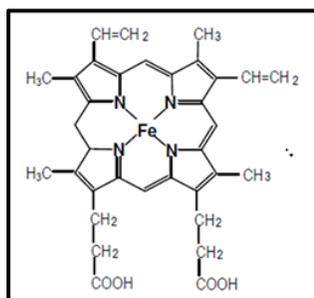
As reações oxidativas biomiméticas possuem os seguintes constituintes: o substrato (substância a ser avaliada), um agente oxidante (por exemplo, ácido cloroperbenzóico, iodosilbenzeno) e o catalisador (metaloporfirina ou ligante de Salen) (MEUNIER; BERNADOU, 2002; LOHMANN; KARST, 2008).

Estudos realizados por nosso grupo (NPPNS – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos) demonstraram correlação entre os metabólitos obtidos em diferentes ensaios *in vitro*, como modelo biomimético com metaloporfirina e ensaio de microsomas hepáticos (SANTOS; LOPES, 2008; GOUVEA, 2013), além da correlação entre metabólito obtido em ensaios *in vitro* e posteriormente em ensaio *in vivo* (NIEHUES et al., 2012; FERREIRA et al., 2012. THOMAZZINI et. al., 2016), reforçando, desta maneira, a importância da utilização de modelos *in vitro*, para avaliação da rota de metabolismo de um composto.

1.2.1 Metaloporfirinas

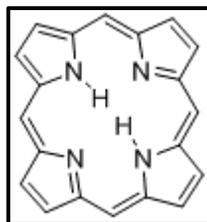
As metaloporfirinas são utilizadas nos modelos biomiméticos de reação de oxidação de xenobióticos, pois apresentam estrutura química similar à ferroportofirina IX (Figura 1.2), a qual está presente no sítio ativo das enzimas do CYP 450, local em que acontece a ligação do oxigênio molecular, posteriormente utilizado na oxidação dos xenobióticos (COSTAS, 2011; LOHMANN; KARST, 2008).

Figura 1.2. – Esquema da estrutura química da Ferroprotoporfirina IX.



As metaloporfirinas são constituídas por quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de metileno e possuem em seu centro um metal, que pode ser ferro (Fe), manganês (Mn) ou rutênio (Ru) em substituição aos dois átomos centrais de hidrogênio do anel porfirínico (Figura 1.3). O tamanho do átomo do metal influencia na conformação do anel e na estabilidade da metaloporfirina (SCHAAB, 2008).

Figura 1.3. Estrutura química do anel porfirínico base livre.



As metaloporfirinas são classificadas em primeira, segunda e terceira geração (Figura 1.4).

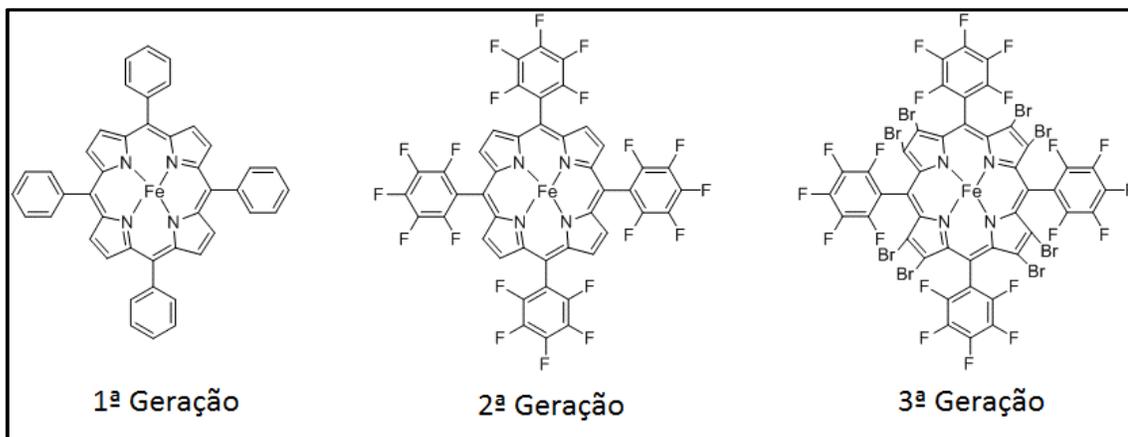
A primeira geração de metaloporfirinas possui o substituinte fenil na posição meso-arílica, representada como tetrafenil-porfirina (TPP) (GROVES et al., 1979). Entretanto, uma desvantagem destas metaloporfirinas é a rápida degradação oxidativa no meio reacional proporcionando um número limitado de sítios catalíticos para as reações (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997; LOHMANN; KARST, 2008).

A segunda geração destes catalisadores contém adicionalmente grupamentos retiradores de elétrons ou átomos eletronegativos, como cloro e flúor, ligados ao substituinte fenil das posições meso-arílicas do anel porfirínico. As substâncias meso-tetrakis (2,6-diclorofenil) manganês-porfirina (MnTDCPP) e cloreto de meso-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina-ferro (FeTFPPCI) são exemplos de metaloporfirinas de segunda geração. Esta modificação proporcionou redução da degradação destes catalisadores e aumento da sua reatividade (COSTAS, 2011).

Nas metaloporfirinas de terceira geração há ainda a inserção de átomos de halogênios nas posições β -pirrólicas como, por exemplo, meso-tetrakis (2,6-diclorofenil)-octabromo porfirina (Br8TDCPP), meso-tetrakis (2,6-diclorofenil)- β -octacloro porfirina (Cl8TDCPP) e meso-tetrakis (pentafluorofenil)-octafluor porfirina (F8TPFPP). O elevado grau de halogenação nestes catalisadores promove largas mudanças positivas no par redox Fe (III)/(II), proteção da porfirina contra danos oxidativos, além de selar a estrutura macrolítica (COSTAS, 2011).

A porfirina ferro (metaloporfirina com átomo de ferro no centro) tem papel importante como catalisador eficaz em reações de redução-oxidação. As porfirinas ferro contendo substituintes halogenados, como a metaloporfirina utilizada neste estudo – cloreto de 5,10,15,20 Tetrakis (pentafluorofenil) porfirina-ferro (FeTFPPCI), são particularmente eficientes para reações de hidroxilação e epoxidação (KACZMARZYK et al., 2014).

Figura 1.4. Exemplos de estruturas químicas de metaloporfirinas de primeira, segunda e terceira geração.



1.2.2 Catalisador de Jacobsen

O composto denominado catalisador de Jacobsen também é utilizado em modelos biomiméticos de reação de oxidação de xenobióticos. Apesar de apresentar estrutura química diferente das metaloporfirinas, é similar quanto à estrutura eletrônica e atividade catalítica (MAC LEOD, 2007).

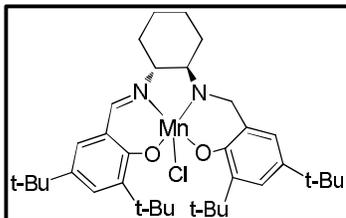
Este catalisador organometálico apresenta estrutura tetradentada e possui como ligantes dois nitrogênios e dois oxigênios. Apresenta ainda, os substituintes terc-butil nas posições 3,3' e 5,5' e cicloexil nos carbonos C1'' e C2'' (HOLBACH, WECK, 2006), conforme representado na Figura 1.5.

O fato do metal estar próximo ao centro estereogênico do complexo, possibilita que o catalisador de Jacobsen atue como um modelo para reações assimétricas, ou seja, para reações enantiosseletivas que possam gerar produtos estereoisômeros (enantiômeros e diastereoisômeros) em quantidades desiguais (VENKATARAMANAN, KUPPURAJ, RAJAGOPAL, 2005). Esta reação favorece a formação de um estereoisômero específico.

As vantagens deste catalisador quando comparado com as metaloporfirinas são estabilidade do complexo, obtenção por síntese em larga escala e de baixo custo. Este catalisador é utilizado na obtenção de epoxidação enantiosseletiva de oleofinas (HOLBACH, WECK, 2006).

A epoxidação que ocorre quando utilizado o catalisador de Jacobsen está relacionada com a estereoquímica do complexo e com a formação de um oxo complexo $MnV=O$ (MCGARRIGLE, GILHEANY, 2004). Desta maneira, a utilização deste catalisador é interessante para a obtenção de produtos epóxidos.

Figura 1.5. – Estrutura química do Catalisador de Jacobsen.



1.3 Estudo de metabolismo *in vitro* por modelo de microsossoma hepático

Além do modelo biomimético, o estudo de metabolismo *in vitro* pode ser também avaliado através da catálise biológica utilizando microsossomas hepáticos. Este estudo é realizado através da incubação do substrato com o precipitado de microsossoma ressuspendido em tampão, na presença de cofatores (BRANDON et al., 2003).

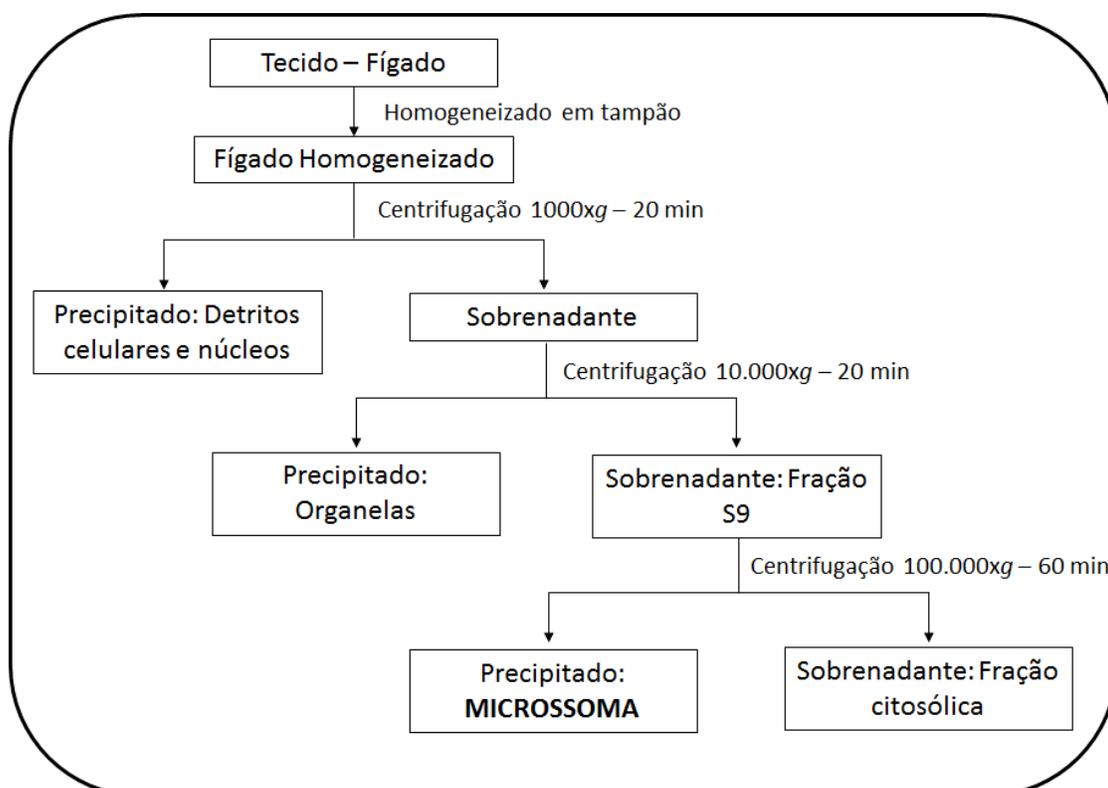
O precipitado microsossomal é obtido através da homogeneização de tecido do fígado e posterior centrifugação diferencial, conforme demonstrado na Figura 1.6. Resumidamente, inicia-se o procedimento com arrefecimento do fígado excisado com tampão, à temperatura de 4°C, para assegurar a estabilidade das enzimas. O fígado então é homogeneizado em tampão com banho de gelo e centrifugado para remoção de células inteiras, restos celulares e núcleos. Posteriormente o sobrenadante é centrifugado para separação de organelas indesejáveis, como mitocôndrias e lisossomos. Após nova centrifugação é possível obter um precipitado, correspondente à fração de microsossomas (SINZ, 2012).

O precipitado microsossomal é a fração sub-celular mais utilizada para a avaliação o metabolismo *in vitro* de fármacos, pois neste modelo há presença das enzimas envolvidas nas reações de Fase I e II, tais como as enzimas do sistema citocromo P- 450 e glicuroniltransferase (SINZ, 2012).

O modelo de microsossoma hepático é considerado um dos melhores sistemas *in vitro* para avaliação da biotransformação de fármacos, especialmente por fornecer

informações relevantes sobre os possíveis metabólitos a serem formados e avaliados em estudos *in vivo*, os quais são onerosos e demorados (BRANDON et al., 2003).

Figura 1.6. Esquema exemplificado para isolamento da fração microsomal do fígado para utilização em estudo de metabolismo *in vitro*.



Fonte: adaptado de SINZ, 2012.

1.4 Cinética de Reações

A determinação da taxa de reação, ou seja, a variação da concentração do reagente ou produto com o passar do tempo, possibilita o entendimento do comportamento da reação química (ATKINS; JONES, 1999). Esta determinação é útil nas reações oxidativas biomiméticas, pois pode-se conhecer o tempo ideal de reação (FERREIRA, 2013), entender a transformação do substrato em possíveis metabólitos putativos, a dependência do catalisador e oxidante e a velocidade da reação (PAN; NEWCOMB, 2007).

A taxa de reação é definida como a mudança da concentração $\Delta[\text{Reagente}]$ dividida pelo intervalo de tempo, Δt , na qual ela ocorre (Equação 1).

$$\text{Taxa de reação} = - \frac{\Delta [\text{Reagente}]}{(\Delta t)} \quad (1)$$

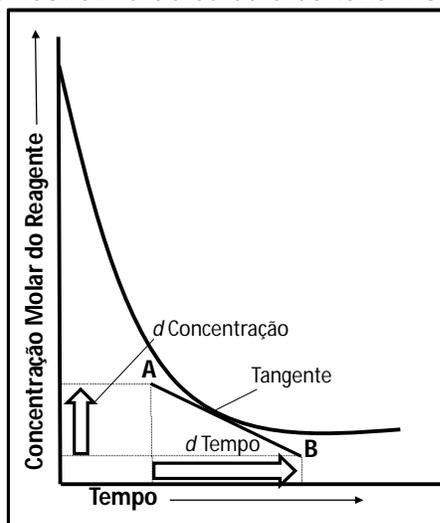
Quando a concentração do reagente diminui, ($\Delta [\text{Reagente}]$ é negativa) inclui-se o sinal negativo para representar que a substância foi consumida, ou seja, a concentração final é menor do que a inicial. Entretanto o resultado é expresso como positivo pois há o sinal negativo na equação, conforme demonstrado na equação 1. Para cálculo da taxa de reação de um produto não há o sinal negativo na equação.

Para medir a taxa de reação em um dado tempo, utiliza-se a tangente do gráfico no tempo de interesse e não a média, conforme equação 2. Após desenho da tangente utiliza-se dois pontos conhecidos de concentração e dois pontos conhecidos de tempo. Determina-se a taxa instantânea da reação através da divisão da diferença de concentração pela diferença de tempo (Figura 1.7). Esta taxa varia conforme a reação ocorre.

$$\text{Taxa instantânea de reação} = \frac{(d [\text{Reagente}])}{(d t)} \quad (2)$$

Através da avaliação cinética, utilizando as taxas de reações, é possível otimizar as condições experimentais dos parâmetros que se desejam utilizar, como por exemplo, nas reações oxidativas biomiméticas.

Figura 1.7. Gráfico ilustrativo do cálculo da taxa instantânea de reação.

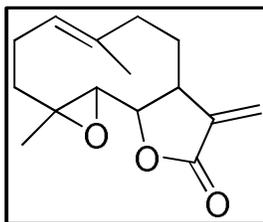


Fonte: Adaptado de ATKINS; JONES, 1999.

1.5 Partenólídeo e sua importância

O partenólídeo (ou ainda vulgarmente denominado de partenolido ou partenolídio) é uma lactona sesquiterpênica, do tipo germacrolídeo (Figura 1.8) que está presente nas folhas da espécie *Tanacetum parthenium*, sendo o principal composto bioativo e também marcador desta planta (GEORGE et al., 2012). Por ser comumente referido como partenólídeo e assim denominado na IN 2/2014 da ANVISA, neste trabalho utilizaremos o termo partenólídeo para se referir a esta substância.

Figura 1.8. Estrutura química da lactona sesquiterpêncica Partenólídeo – marcador da espécie *Tanacetum parthenium*.



A espécie *Tanacetum parthenium* está presente na Instrução Normativa nº 02 de 2014 da ANVISA, indicada como um medicamento fitoterápico de notificação simplificada para profilaxia de enxaqueca. O medicamento é administrado via oral, sendo o extrato produzido a partir das folhas da planta. A dose indicada de partenólídeo é de 0,2 a 0,6 mg por dia.

Popularmente esta espécie é ainda utilizada para aumento do fluxo menstrual, diminuição do corrimento vaginal, auxiliar no tratamento de espasmos, de desordens estomacais e da febre (CARVALHO, 2009).

Mais recentemente, os estudos sobre o partenólídeo estão voltados para sua atividade anti-inflamatória, antiparasitária e, especialmente, anticâncer (KIM et al., 2015; POPIOLEK-BARCZYK et al., 2015; NAM et al., 2015; TIUMAN et al., 2014). O partenólídeo possui em relevante efeito citotóxico, sendo portanto, promissor para utilização como fármaco antitumoral, assim como alguns de seus derivados químicos e metabólitos (KOLEV et al., 2014; KEMPEMA et al., 2015; HEXUM et al., 2015).

Desta maneira, o partenólídeo tem sido alvo de muitos estudos em relação às suas possíveis atividades biológicas, entretanto há poucos trabalhos sobre ensaios

de metabolismo, os quais são imprescindíveis tanto para a observação da atividade biológica como para o desenvolvimento de um medicamento baseado no partenólídeo e seus derivados.

Um estudo de Fase I foi realizado para verificar o efeito do tratamento de câncer utilizando extrato padronizado de *Tanacetum parthenium* contendo 500 mg de partenólídeo por cápsula. Os resultados deste estudo mostraram que não foi possível detectar partenólídeo no plasma dos voluntários, atribuído à possível baixa biodisponibilidade do ativo e à pureza inadequada do extrato utilizado no estudo, embora tenha declarado utilizar um extrato padronizado (CURRY III et al., 2003). Os resultados deste trabalho demonstram a importância dos ensaios para o estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo, pois estes testes podem sugerir as enzimas envolvidas no processo de metabolização, bem como identificar os metabólitos formados na biotransformação para monitoramento em estudos clínicos.

Recentemente, um estudo avaliou a disposição farmacocinética do partenólídeo em ratos, Os resultados deste estudo comprovaram a baixa biodisponibilidade do partenólídeo, além de curto tempo de meia-vida (ZHAO et al., 2016). O baixo valor de $T_{1/2}$ pode sugerir rápida biotransformação do partenólídeo por enzimas do CYP 450.

Em outro estudo, o metabolismo *in vitro* do partenólídeo foi avaliado pela catálise oxidativa de variantes do CYP 450 de bactéria, em que os metabólitos obtidos foram identificados pelas técnicas de espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia de raio-X, sendo dois produtos hidroxilados e um epoxidado. Posteriormente foi avaliada comparativamente a atividade antileucêmica e citotóxica do partenólídeo, destes metabólitos e seus derivados, demonstrando importante aplicabilidade de reações mediadas pelo CYP 450 para obtenção de metabólitos ativos (KOLEV et al., 2014).

Neste contexto, o estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo, por meio de catálise oxidativa, é uma estratégia interessante para conhecimento e obtenção de metabólitos oxidados. Tais metabólitos podem ser importantes para auxiliar na avaliação toxicológica do partenólídeo, visto que estudos já publicados em literatura sugerem significativa biotransformação desta lactona sesquiterpênica por meio do sistema citocromo P-450.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais deste trabalho foram os estudos do metabolismo *in vitro* da lactona sesquiterpênica partenolídeo, marcador presente nas folhas da espécie *Tanacetum parthenium*.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar reações oxidativas utilizando catalisadores biomiméticos.
- Estudar a influência dos agentes oxidantes e catalisadores na reatividade do partenolídeo.
 - Avaliar a cinética de reação oxidativa do partenolídeo na presença e ausência dos catalisadores.
 - Isolar e caracterizar o metabólito putativo majoritário proveniente da reação oxidativa biomimética do partenolídeo.
 - Avaliar a metabolização do partenolídeo utilizando microsomas hepáticos de ratos.
 - Avaliar e comparar o efeito citotóxico do partenolídeo e do metabólito putativo nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e tripomastigotas de *T. cruzi* e nas linhagens celulares de macrófago.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

- O solvente acetonitrila e modificador de fase móvel ácido fórmico utilizados nas preparações de amostras e separações cromatográficas foram grau HPLC da marca J.T.Baker®.

- O solvente acetonitrila deuterada utilizado nas análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear foram da marca Sigma Aldrich®.

- A água ultrapurificada do tipo I foi obtida dos sistemas de purificação MilliQ marca Millipore e marca Gehaka.

- O partenólídeo foi obtido da empresa Sigma-Aldrich, com pureza de 99 % (HPLC).

- Os agentes oxidantes ácido meta-cloroperbenzoico (MCPBA) e diacetato de iodobenzeno utilizados nas reações oxidativas foram da marca Sigma-Aldrich.

- Os catalisadores cloreto de 5,10,15,20 Tetrakis(pentafluorfenil)porfirina-ferro (FeTFPPCI) e cloreto de (*R,R*)-*N,N'*-bis(3,5-di-terc-butilsalicilideno)-1,2-diaminocicloexil manganês III (catalisador de Jacobsen) utilizados nas reações oxidativas foram da marca Sigma-Aldrich.

- Os microssomas hepáticos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

- As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, bem como as células da linhagem de macrófago murino J774, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

3.2 Metodologia Experimental

3.2.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais foram realizadas utilizando o espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker-Advance DRX 500 operando em 500 MHz para aquisição dos espectros de ^1H e 100 MHz para aquisição dos espectros de ^{13}C .

Os deslocamentos químicos estão apresentados em parte por milhão (ppm) relativos ao deslocamento do solvente utilizado (CDCl_3 com deslocamento de 7,24 ppm para espectros de ^1H e 77,0 ppm para espectros de ^{13}C).

As constantes de acoplamento estão apresentadas em Hertz (Hz).

3.2.2 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray de alta resolução (EMAR-IES)

A massa acurada foi obtida através da infusão direta das amostras em um espectrômetro de massas de alta resolução modelo micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics) com ionização por eletrospray (IES) no modo positivo de ionização e analisador do tipo tempo de voo (*TOF – Time of Flight*).

O preparo das amostras para a análise de EMAR-IES foi feita utilizando acetonitrila e água ultra purificada na proporção 1 : 1 (v/v) com 0,1 % de ácido fórmico.

3.2.3 Dicroísmo Circular Vibracional (DCV)

A análise de dicroísmo circular vibracional (DCV) foi realizada em parceria com o prof. Dr. João M. Batista Jr. do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

O procedimento experimental foi realizado através da obtenção dos espectros de infravermelho e de dicroísmo circular vibracional em espectrômetro DCV-TF Dual-PEM Chiral/R-2X (BioTools) utilizando resolução de 4 cm^{-1} e tempo de aquisição de 7 horas. O retardo dos dois moduladores fotoelástico ZnSe (MFEs) foi otimizado em 1400 cm^{-1} . As análises de Infravermelho (IV) e DCV foram realizadas com as substâncias dissolvidas em CDCl_3 , utilizando cela de BaF_2 com caminho óptico de $100\text{ }\mu\text{m}$. Os desvios da linha de base foram eliminados pela subtração do espectro

de DCV obtido para o solvente na mesmas condições experimentais utilizadas para as amostras. Todos os cálculos TFD foram realizados a 298 K, em fase gasosa, utilizando software Gaussian 09 (Gaussian, Inc).

Os cálculos foram realizados para configuração absoluta escolhida arbitrariamente. As buscas conformacionais foram realizadas por meio de simulações teóricas baseadas em mecânica molecular utilizando algoritmo Monte Carlo, empregando os campos de força MM⁺, incorporado no software HyperChem 8.0.10. A otimização da configuração geométrica para o confôrmero de menor energia foi realizada utilizando método FTD, no nível de teoria B3PW91/6-311G(d,p). Para a simulação dos espectros de IV e DCV foram utilizados as forças rotacionais e dipolares geradas pelo software Gaussian. As forças rotacionais foram calculadas no nível de teoria de B3PW91/6-311G e convertidas em valores de absorvidade molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Cada espectro foi plotado como a soma de bandas Lorentzianas com 6 cm^{-1} de largura a meia altura. Os números de onda calculados foram multiplicados pelo fator de 0,98 e o espectro foi plotado utilizando software Origin 8.

3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

3.2.4.1. Método analítico para avaliação das reações oxidativas biomiméticas (CLAE-DAD)

As análises das reações oxidativas biomiméticas do partenólídeo foram realizadas em CLAE-DAD (Shimadzu) equipado com duas bombas LC-20AD, detector de arranjos de diodos SPD-M20A, forno CTO-20A, auto-injetor SIL-20AHT, comunicador CBM-20A e software LCSolutions.

A coluna cromatográfica utilizada foi uma Shim-pack XR-ODS 100 mm x 3,0 mm (2,2 μm), marca Shimadzu. A fase móvel utilizada foi água ultra purificada na bomba A e acetonitrila na bomba B. A coluna foi mantida a temperatura de 40°C, o fluxo de análise foi de 0,3 mL/min e o volume de injeção de 4 μL . A detecção foi realizada na faixa de $\lambda = 200$ a 600 nm, mas os cromatogramas foram processados no comprimento de onda de 210 nm.

O gradiente de fase móvel está descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Gradiente de fase móvel utilizado no método de CLAE-DAD no estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo por modelo de reações oxidativas biomiméticas.

Tempo (min)	% B (Acetonitrila)
0 - 5	10
12 - 32	48
35 - 40	100
42	10

3.2.4.2. Método analítico para isolamento do metabólito putativo majoritário (CLAE-DAD semi-preparativo)

Inicialmente foi realizado um método analítico cromatográfico semelhante ao descrito no item 3.2.4.1 utilizando coluna analítica Shim-pack ODS 250 mm x 4,6 mm (5 μ m) da marca Shimadzu (coluna do kit analítico/semi-preparativo). Em seguida, este método foi otimizado para isolamento do metabólito putativo e posteriormente adaptado para escala semi-preparativa, cujas condições estão descritas a seguir.

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu), equipado com duas bombas modelo LC-6AD, detector de arranjos de diodos SPD-M20A, sistema injeção manual modelo 7725i (Rheodyne), comunicador CBM-20A e software LCSolutions.

A coluna cromatográfica utilizada foi uma semi-preparativa Shim-pack Prep.ODS 250 mm x 20 mm (5 μ m), marca Shimadzu. A fase móvel utilizada foi água ultra purificada na bomba A e acetonitrila na bomba B. O fluxo de fase móvel foi de 9,0 mL/min e o volume de injeção de 1 mL. A detecção foi realizada na faixa de $\lambda = 200$ a 600 nm, mas os cromatogramas foram monitorados no comprimento de onda de 210 nm.

O gradiente de fase móvel está descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Gradiente de fase móvel utilizado no método de CLAE-DAD semi-preparativo para isolamento do metabólito putativo majoritário da reação oxidativa biomimética.

Tempo (min)	% B (Acetonitrila)
0 - 10	20
22 - 42	48
46 - 52	100
55	20

3.2.4.3. Método analítico para avaliação da metabolização do partenolídeo utilizando microssomas hepáticos de ratos (CLAE-EM)

No ensaio cromatográfico para análise e avaliação dos possíveis produtos de metabolização do partenolídeo em meio microssomal foi utilizada a técnica de CLAE-EM.

O cromatógrafo líquido utilizado foi da marca Shimadzu, equipado com duas bombas modelo LC-20AD, detector de arranjos de diodos SPD-M20A, forno CTO-20A, auto-injetor SIL-20AHT, comunicador CBM-20A, acoplado a um detector de massas com analisador do tipo aprisionamento de íons (*ion trap*) e ionização por eletrospray (amaZon, Bruker). O software para análise foi o HyStar e para processamento o DataAnalysis (ambos da marca Bruker).

A coluna cromatográfica utilizada foi uma Shim-pack XR-ODS 100 mm x 3,0 mm (2,2 μ m), marca Shimadzu. A fase móvel utilizada foi água ultra purificada com 0,1% de ácido fórmico na bomba A e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico na bomba B. A coluna foi mantida a temperatura de 40°C, o fluxo de análise foi de 0,3 mL/min e o volume de injeção de 4 μ L.

O gradiente de fase móvel está descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Gradiente de fase móvel utilizado no método de CLAE-EM no ensaio de catálise biológica do partenólídeo utilizando microssoma hepático de ratos.

Tempo (min)	% B (Acetonitrila)
0	21
5 - 17	32
20 - 30	48
32	21

3.2.4.4. Método analítico para avaliação da cinética das reações oxidativas biomiméticas do partenólídeo (CLAE-DAD)

O método cromatográfico desenvolvido para avaliação da cinética das reações oxidativas biomiméticas do partenólídeo utilizando agentes oxidantes MCPBA e Diacetato de iodobenzeno e catalisadores FeTFPPCI e Jacobsen foi otimizado para separação do partenólídeo e metabólito putativo isolado no menor tempo de corrida possível.

Desta maneira, foi utilizado cromatógrafo líquido da marca Shimadzu, equipado com duas bombas modelo LC-20AD, detector de arranjos de diodos SPD-M20A, forno CTO-20A, auto-injetor SIL-20AHT, comunicador CBM-20A.

A coluna cromatográfica utilizada foi uma Shim-pack XR-ODS 100 mm x 3,0 mm (2,2 μ m), marca Shimadzu. A fase móvel utilizada foi água ultra purificada na bomba A e acetonitrila na bomba B. A coluna foi mantida a temperatura de 40°C, o fluxo de análise foi de 0,3 mL/min e o volume de injeção de 4 μ L. A detecção foi realizada na faixa de λ = 200 a 600 nm, mas os cromatogramas foram processados no comprimento de onda de 210 nm.

O gradiente de fase móvel está descrito na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Gradiente de fase móvel utilizado no método de CLAE-DAD no estudo de cinética de reações oxidativas biomiméticas do partenólídeo.

Tempo (min)	% B (Acetonitrila)
0 - 5	35
5,3 - 11	60
11,3	35

3.2.5 Identificação e caracterização do partenólídeo

Para a confirmação da identidade do partenólídeo foram utilizadas as técnicas de espectrometria de massas de alta resolução, descrita no item 3.2.216 e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, descrita no item 3.2.1.

Para a determinação da configuração absoluta do partenólídeo foi realizada análise de dicroísmo circular vibracional (item 3.2.3).

3.2.6 Estudo do metabolismo *in vitro* por modelo de reação oxidativa biomiméticas

Para o estudo de metabolismo *in vitro* do partenólídeo por reações oxidativas biomiméticas foram utilizados os agentes oxidantes ácido meta-cloroperbenzoico (MCPBA) e diacetato de iodobenzeno ($\text{PhI}(\text{OAc})_2$) e os catalisadores cloreto de 5,10,15,20 Tetrakis(pentafluorfenil)porfirina-ferro (FeTFPPCl) e cloreto de (R,R)-N,N'-bis(3,5-di-terc-butilsalicilideno)-1,2-diaminocicloexil manganês III (catalisador de Jacobsen).

Os solventes utilizados foram acetonitrila e mistura de acetonitrila e clorofórmio na proporção (1:1) (v/v).

As reações foram realizadas em frasco âmbar de 5 mL, com batoque e tampa rosqueável. Foi empregada agitação magnética à temperatura ambiente (de 20 a 25°C), sob atmosfera de ar, com tempo de reação de 24 horas. O volume final de reação foi de 1 mL. As condições reacionais estão descritas na Tabela 3.5.

As reações oxidativas da condição controle foram realizadas sem a presença do catalisador e a condição branco foi feita apenas com o partenólídeo.

Ao final da reação, o volume de 100 μL de meio reacional foi seco sob atmosfera de ar, solubilizado em 1 mL de acetonitrila e posteriormente filtrado em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,22 μm . As análises foram realizadas de acordo com as condições cromatográficas do item 3.2.4.1.

Tabela 3.5. Condições reacionais do metabolismo *in vitro* do partenólídeo por modelo de reações oxidativas biomiméticas.

Reação	Proporção Molar Catalisador:Substrato:Oxidante	Catalisador	Oxidante	Solvente
1	1 : 30 : 30	FeTFPPCl	MCPBA	ACN:CHCl ₃ (1:1)
2	1 : 30 : 30			ACN
3	1 : 60 : 15			
4	1 : 60 : 15		PhI(OAc) ₂	
5	1 : 30 : 30			
6	1 : 30 : 30	Jacobsen	MCPBA	ACN
7	1 : 30 : 30		PhI(OAc) ₂	

Para a avaliação da reatividade do substrato partenólídeo foram utilizadas duas equações, as quais estão demonstradas abaixo (equações 3.1 e 3.2). Estas equações consideram os resultados das análises cromatográficas (CLAE-DAD) com detecção ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 210 nm (item 3.2.4.1).

Na equação 3.1 foi avaliada a redução da concentração do partenólídeo, ou seja, o quanto o substrato reagiu com o agente oxidante, na presença do catalisador, para formação dos metabólitos putativos. Desta maneira, quanto maior for o valor da porcentagem de redução do partenólídeo, mais eficaz a reação.

Já na equação 3.2 foi avaliada a formação do metabólito putativo majoritário (substância oxidada formada em maior quantidade, justificado pelas porcentagens de área dos sinais), com tempo de retenção de aproximadamente 13,5 min – 13,8 min. Nesta equação foi utilizada a relação das áreas dos sinais da substância oxidada e do substrato. Portanto, quanto maior for esta relação, maior a quantidade de metabólito putativo formado.

$$\% \text{ Redução Partenólídeo} = \frac{(\text{Área do Branco} - \text{Área da Reação}) \times 100}{\text{Área do Branco}} \quad (3.1)$$

Em que:

Área do Branco = Área do partenólídeo no cromatograma do Branco no comprimento de onda de 210 nm

Área da Reação = Área do partenólídeo no cromatograma da Reação oxidativa no comprimento de onda de 210 nm

$$\text{Relação Metabólito Majoritário e Substrato} = \frac{\text{Área do Metabólito Majoritário}}{\text{Área do Substrato}} \quad (3.2)$$

Em que:

Área do Metabólito Majoritário = Área do metabólito putativo com tr de cerca de 13,5 – 13,8 minutos no cromatograma da Reação oxidativa no comprimento de onda de 210 nm

Área do Substrato = Área do partenólídeo no cromatograma da Reação oxidativa no comprimento de onda de 210 nm

3.2.7 Isolamento do metabólito putativo majoritário proveniente da reação oxidativa biomimética do partenólídeo utilizando catalisador porfirínico FeTFPPCl e agente oxidante MCPBA

O isolamento do metabólito putativo majoritário, proveniente da reação oxidativa biomimética do partenólídeo utilizando FeTFPPCl e MCPBA, foi realizado através da técnica de CLAE-DAD semi-preparativo.

As reações foram realizadas em 30 frascos âmbar de 5 mL, com batoque e tampa rosqueável. Foi empregada agitação magnética à temperatura ambiente (de 20 a 25°C), sob atmosfera de ar, com tempo de reação de 24 horas. O solvente utilizado foi acetonitrila, sendo o volume final de reação foi de 2 mL. A proporção molar utilizada foi de 1 : 30 : 30 (Catalisador : Substrato : Oxidante), sendo as concentrações finais, em cada frasco, de 0,12 mM de FeTFPPCl, 3,6 mM de partenólídeo e 3,6 mM de MCPBA.

Decorrido o tempo da reação, o meio reacional foi reunido, resultando em 5 frações. O solvente foi evaporado em atmosfera de ar e, imediatamente antes da injeção no cromatógrafo, o meio reacional de cada fração foi solubilizado em 1 mL de acetonitrila e filtrado em membrana de PTFE de 0,45 µm. As condições cromatográficas estão descritas no item 3.2.4.2.

A fase móvel contendo o analito correspondente ao metabólito putativo majoritário (sinal com tempo de retenção de aproximadamente 16,0 min) foi coletada a cada corrida cromatográfica e, posteriormente, reunida em balão de fundo redondo. A fase móvel (solvente) foi evaporada com auxílio de rotaevaporador (modelo 801, marca Fisatom) sem aquecimento, sendo esta fração posteriormente submetida a secagem por liofilização (modelo FreeZone 2.5, marca LabConco).

3.2.8 Caracterização do metabólito putativo majoritário proveniente da reação oxidativa biomimética do partenólídeo utilizando catalisador porfirínico FeTFPPCl e agente oxidante MCPBA

Para a caracterização do metabólito putativo isolado na reação oxidativa biomimética do partenólídeo utilizando FeTFPPCl e MCPBA foram utilizadas as técnicas de espectrometria de massas de alta resolução, descrita no item 3.2.2 e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, descrita no item 3.2.1.

Baseada na configuração absoluta determinada para o partenólídeo, foi determinada a configuração absoluta do produto oxidado, através da técnica de DCV (item 3.2.3).

3.2.9 Estudo do metabolismo *in vitro* por modelo de microsossoma hepático de ratos

O estudo *in vitro* do metabolismo do partenólídeo utilizando microsossoma hepático de ratos foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira do Depto de Química da FFCLRP-USP.

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio, sendo divididos em Teste, Controle e Branco. O volume final de reação foi de 500 μL .

Nos tubos Teste foram adicionados os cofatores, sendo 50 μL NADP (concentração no meio reacional de 2,5 mM), 50 μL de Glicose-6-Fosfato (concentração no meio reacional de 5 mM) e 25 μL de Enzima 6-Fosfato desidrogenase (concentração no meio reacional de 0,5 uni/mL); 50 μL de Microsossoma (concentração no meio reacional de 1,0 mg/mL); 10 μL de Substrato Partenólídeo (concentração no meio reacional de 7,0 $\mu\text{g/mL}$) e 315 μL de Tampão Fosfato de potássio pH 7,4 (250 mM). O meio microsossomal foi pré-incubado à 37°C por 5 minutos. Após sua adição, os tubos também foram incubados a 37°C por 60 minutos em banho metabólito (Dubnoff-SL157, Solab). Decorrido o tempo, a reação foi interrompida com adição de 1 mL de acetato de etila. A mistura foi submetida à agitação por 10 minutos em vórtex a 1200 rpm (Vibrax VXR, Ika) para extração dos compostos para a fase orgânica e posteriormente centrifugada por 12 minutos, a 4000 rpm e à temperatura de 6°C. A fração orgânica foi reunida e seca sob atmosfera de nitrogênio

Ao tubo controle não foram adicionados os cofatores e ao tubo branco não foi adicionado o substrato.

As amostras foram solubilizadas em acetonitrila, filtradas em membrana de PTFE 0,22 μm e analisadas de acordo com as condições cromatográficas do item 3.2.4.3.

O metabolito putativo isolado na reação oxidativa biomimética do partenolídeo utilizando FeTFPPCI e MCPBA também foi submetido à análise (item 3.2.4.3) para comparação com possível produto formado na biotransformação do partenolídeo utilizando microssoma hepático de rato.

3.2.10 Cinética de reações oxidativas biomiméticas

A cinética das reações oxidativas biomiméticas foi realizada com os mesmos agentes oxidantes e catalisadores utilizados no estudo oxidativo biomimético do partenolídeo (item 3.2.6).

As reações foram divididas de acordo com o agente oxidante utilizado: (A) Diacetato de iodobenzeno e (B) MCPBA. Para cada agente oxidante foram utilizados 3 condições, sendo Reação 1 na presença do catalisador porfirínico de segunda geração FeTFPPCI, Reação 2 na presença do catalisador de Jacobsen e Controle na ausência de catalisador. As proporções molares utilizadas foram 0,06 mM de catalisador, 1,8 mM de substrato e 1,8 mM de agente oxidante.

Os tempos de análise foram: 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas e as amostras analisadas conforme condições cromatográficas do item 3.2.4.4.

Pode-se estimar a taxa de consumo do partenolídeo para formação do metabolito putativo majoritário, através da concentração do substrato em uma série de tempos após o início da reação.

Desta maneira, a cada tempo de análise, a concentração do partenolídeo foi determinada pela equação 3.3. A área do partenolídeo é obtida nos cromatogramas das reações e controle, com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm, conforme condições descritas no item 3.2.4.4.

$$\text{Concentração Partenolídeo (mM)} = \frac{\text{Conc}_i \times A_f}{A_i} \quad (3.3)$$

Sendo:

- Conc_i = Concentração inicial de partenólídeo, em mM
 A_r = Área de partenólídeo no tempo de reação a ser determinada a concentração
 A_i = Área de partenólídeo no Controle no tempo inicial de reação (0 h)

A taxa da reação de oxidação do partenólídeo foi estimada pela equação 3.4.

$$\text{Taxa de reação (mM/h)} = -\frac{\Delta [PTN]}{(\Delta t)} \quad (3.4)$$

Sendo:

- $\Delta [PTN]$ = Variação da concentração do partenólídeo, em mM, nos tempos 0 e 24 h
 Δt = Intervalo do tempo de reação, em horas (24 h)

A taxa da reação instantânea de oxidação do partenólídeo foi estimada pela equação 3.5.

$$\text{Taxa instantânea de reação (mM/h)} = -\frac{d [PTN]}{d t} \quad (3.5)$$

Sendo:

- $d [PTN]$ = Variação da concentração do partenólídeo, em mM, nos tempos a ser determinada a taxa instantânea
 $d t$ = Intervalo do tempo a determinada a taxa instantânea, em horas

3.2.11 Avaliação do efeito citotóxico do partenólídeo e do metabólito putativo nas formas parasitárias e celulares

A avaliação do efeito citotóxico do partenólídeo e do metabólito putativo, isolado da reação oxidativa biomimética do partenólídeo com MCPBA na presença da FeTFPPCI, foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi da FCFRP-USP e da Dra Thalita Bachelli Riul.

3.2.11.1 Condições de cultivo dos parasitas

Os parasitas *L. amazonenses* foram cultivados em meio Schneider suplementado com 20 % de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 2% de urina masculina, 50 µg/mL de gentamicina ou 100 U de penicilina e 0,1 mg/mL de

estreptomicina em solução estabilizada. A cultura de parasitas foi mantida à temperatura de 24 °C em garrafas de 25 ou 75 cm². Os meios de cultura foram submetidos ao sistema de filtração a vácuo com membrana de 0,22 µm. A urina masculina utilizada como suplemento do meio de cultivo de parasitas foi esterilizada através de filtros com membrana de 0,22 µm acoplados à seringas de 10 mL.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y, foram cultivadas em culturas de células LLC-MK2 (American Type Culture Collection, ATCC, CCL7.1). Garrafas de cultura de 75 cm², com culturas sub-confluentes de células LLC-MK2 foram infectadas com cerca de 10⁶ tripomastigotas recém-separadas de sangue de camundongos em fase aguda da infecção com *T. cruzi*. A cultura foi então mantida em meio RPMI 1640; suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-Glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 100 U de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina em solução estabilizada, a 37°C e 5% de gás carbônico. A separação dos tripomastigotas da cultura foi feita através de centrifugação do sobrenadante a 1000 x g por 30 minutos a 4°C.

3.2.11.2 Condições de cultivo das células J774

A avaliação da citotoxicidade dos compostos em células de mamíferos foi realizada na linhagem celular J774 (linhagem celular de macrófagos de camundongo). O cultivo desta linhagem foi realizado em meio RPMI 1640; suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-Glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 100 U de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina em solução estabilizada. As células foram mantidas a 37°C com 5 % de gás carbônico em garrafas de 25 ou 75 cm².

3.2.11.3 Ensaio de citotoxicidade por redução do MTT (*L. amazonensis* e linhagem J774)

O ensaio utilizado para avaliação da citotoxicidade induzida pelo partenólídeo e do metabólito gerado no parasita *L. amazonensis* e na linhagem J774 foi o ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT: brometo de 3-[4,5-dimetilazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio).

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (1x10⁶ células por poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações do partenólídeo e do metabólito putativo (0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µM)

por 24 horas. Após o tempo de incubação, a placa foi centrifugada por 15 minutos a 900 x g. Após a remoção dos sobrenadantes, foram adicionados 200 µL de uma solução 5 mg/mL de MTT em cada poço e deixado em reação por 3 horas. Decorrido este tempo de incubação, a placa de cultura foi novamente centrifugada a 900 x g por 15 minutos, os sobrenadantes foram removidos e adicionados 200 µL de DMSO em cada poço para a solubilização dos cristais de formazan de cor azul. Como controle de morte celular para as formas promastigotas foi utilizada a Anfotericina B.

A leitura colorimétrica foi realizada no comprimento de onda de 492 nm com auxílio de um espectrofotômetro de placas (SpectraMax Plus, Molecular Devices). Os dados foram processados pelo programa Softmax® e os resultados expressos em porcentagem (%) de células capazes de reduzir o MTT e/ou produtoras de formazan em relação ao controle de viabilidade (CV – 100% de viabilidade celular).

A avaliação da citotoxicidade do partenólídeo e do metabólito putativo na linhagem J774 também foi realizado pelo ensaio de MTT com procedimento semelhante ao realizado nas formas promastigotas. As células foram transferidas para placas de 96 poços (1×10^5 células por poço), cultivadas em RPMI completo a 37 °C com 5 % de CO₂ e tratadas com diferentes concentrações do partenólídeo e do metabólito (0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µM) por 24 horas. Após o tempo de tratamento, o sobrenadante das células foi removido e adicionado 200 µL de uma solução 5 mg/mL de MTT e deixado em reação por 3 horas. Os sobrenadantes foram novamente removidos e a cada poço da placa de cultura foram adicionados 200 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan.

As absorbâncias foram medidas utilizando em espectrofotômetro de placas (SpectraMax Plus, Molecular Devices) no comprimento de onda de 492 nm. Os dados foram processados pelo programa Softmax® e os resultados expressos em porcentagem (%) de células capazes de reduzir o MTT e/ou produtoras de formazan em relação ao controle de viabilidade (CV – 100% de viabilidade celular).

3.2.11.4 Ensaio de citotoxicidade por rezasurina (*T. cruzi*)

A viabilidade celular foi realizada utilizando o método de resazurina. Formas tripamastigotas de *T. cruzi* (1×10^6 células por poço) foram adicionadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações do partenólídeo e do metabólito putativo (0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 µM) por 24 horas em meio de cultura em RPMI completo a 37 °C com 5 % de CO₂. Após o tempo de

tratamento, 5 μ L de resazurina a 1 mg/mL foram adicionados a cada poço e as placas mantidas a 37°C com 5 % de CO₂ durante 18 h.

As absorbâncias foram medidas utilizando em espectrofotômetro de placas (SpectraMax Plus, Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, para o cálculo de viabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e caracterização do partenólídeo

O partenólídeo utilizado neste trabalho foi obtido comercialmente da empresa Sigma Aldrich®, com pureza de 99% (HPLC). Ainda que o fornecedor tenha identificado o material pela técnica de RMN de próton (SIGMA-ALDRICH, 2014), foi realizada a identificação pelas técnicas de RMN e EMAR-IES. Para a determinação da configuração absoluta foi utilizada a técnica de DCV.

Como esperado, os resultados das análises de RMN e EMAR-IES, permitiram a confirmação da estrutura do partenólídeo, servindo de referência para o estudo posterior do metabólito putativo. Os dados de RMN estão listados na Tabela 4.1, em comparação com dados de literatura (TIUMAN et al, 2005). Os respectivos espectros estão no Anexo 1 deste documento. Os dados de EMAR-IES estão listados na Tabela 4.2.

A estrutura numerada do partenólídeo está ilustrada na Figura 4.1.

Tabela 4.1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância partenólídeo (CDCl_3), em comparação com os dados de literatura (TIUMAN et al, 2005).

Posição	Partenólídeo deste trabalho		Literatura	
	^1H 500 MHz δ (ppm), [integral; multiplicidade; J (Hz)]	^{13}C 100 MHz δ (ppm)	^1H 300 MHz δ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]	^{13}C 75,5 MHz δ (ppm)
1	5,20 [1H; <i>dt</i> ; 12,0]	125,4	5,21 [1H; <i>dt</i> ; 2,7, 12,0]	125,3
2	2,40 [1H; <i>m</i>]	24,3	2,32 – 2,49 [1H; <i>m</i>]	24,1
	2,19 [1H; <i>m</i>]		2,11 – 2,21 [1H; <i>m</i>]	
3	2,13 [1H; <i>m</i>]	36,5	2,11 – 2,21 [1H; <i>m</i>]	36,3
	1,24 [1H; <i>td</i> ; 5,8, 12,9]		1,20 – 1,28 [1H; <i>m</i>]	
4	-	61,67	-	61,5
5	2,77 [1H; <i>d</i> ; 8,8]	66,5	2,79 [1H; <i>d</i> ; 9,0]	66,4
6	3,85 [1H; <i>tt</i> ; 8,6]	82,6	3,86 [1H; <i>t</i> ; 8,4]	82,4
7	2,78 [1H; <i>m</i>]	47,8	2,74 – 2,82 [1H; <i>m</i>]	47,7
8	2,12 [1H; <i>m</i>]	30,8	2,11 – 2,21 [1H; <i>m</i>]	30,6
	1,73 [1H; <i>m</i>]		1,70 – 1,77 [1H; <i>m</i>]	
9	2,37 [1H; <i>m</i>]	41,4	2,32 – 2,44 [1H; <i>m</i>]	41,2
	2,16 [1H; <i>m</i>]		2,11 – 2,21 [1H; <i>m</i>]	
10	-	134,7	-	134,6
11	-	139,5	-	139,2
12	-	169,3	-	169,3
13	6,32 [1H; <i>d</i> ; 3,6]	121,2	6,34 [1H; <i>d</i> ; 3,6]	121,3
	5,61 [1H; <i>d</i> ; 3,2]		5,62 [1H; <i>d</i> ; 3,0]	
14	1,70 [3H; <i>s</i>]	17,1	1,72 [3H; <i>s</i>]	16,9
15	1,30 [3H; <i>s</i>]	17,4	1,31 [3H; <i>s</i>]	17,3

Na análise de espectrometria de massas com ionização por eletrospray de alta resolução (EMAR-IES) no modo positivo, por infusão direta, foi observado o íon m/z $[M+Na]^+$ 271,1309, com erro de 1,47 ppm em relação à massa exata calculada para o partenólídeo sodiado, confirmando a fórmula molecular como $C_{15}H_{20}O_3$ e principalmente sugerindo o melhor íon para ser monitorado na análise do metabólito. Estes dados estão demonstrados na Figura 4.2 e Tabela 4.2.

Figura 4.1. Estrutura do partenólídeo.

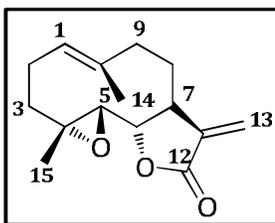
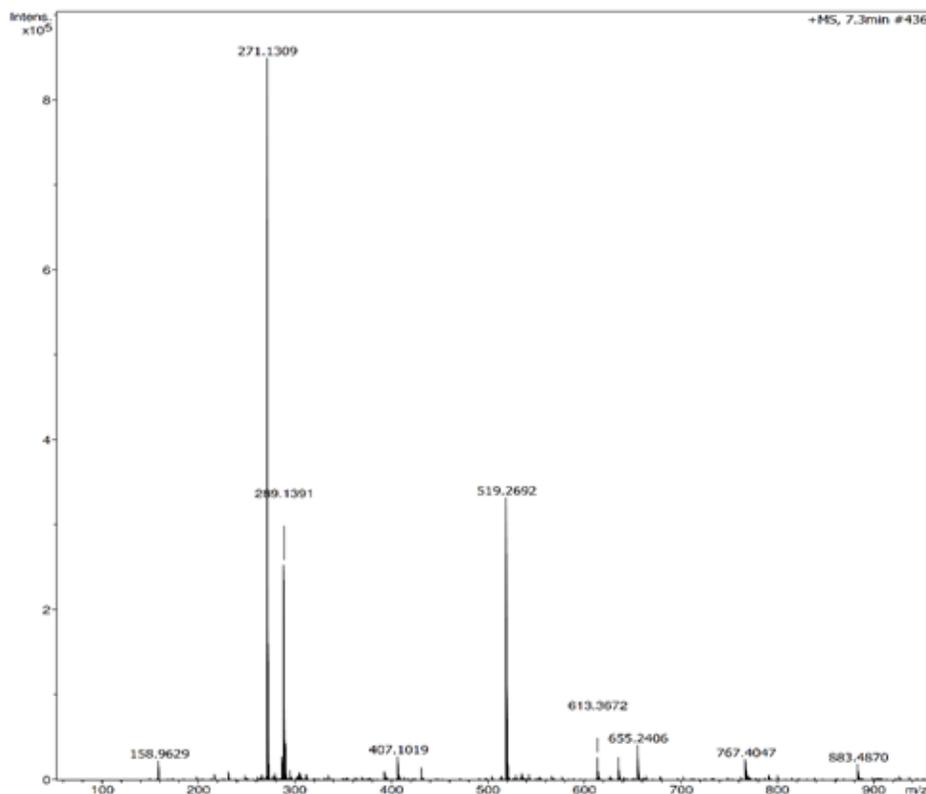


Tabela 4.2. Dados de EMAR-IES do partenólídeo.

Substância	Fórmula Molecular	Massa Molecular teórica $[M+Na]^+$	Massa Molecular experimental $[M+Na]^+$	Erro (ppm)
Partenólídeo	$C_{15}H_{20}O_3$	271,1305	271,1309	1,47

Figura 4.2. Espectro de Massas – EMAR-IES (Modo Positivo) do partenólídeo.

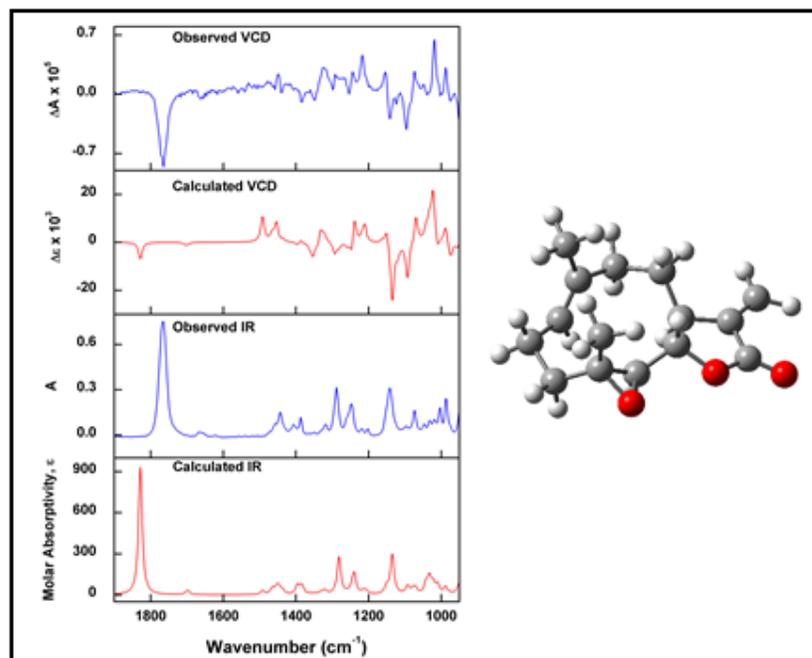


A análise de DCV para a determinação da configuração absoluta do partenolídeo e, posteriormente do metabólito, é importante, pois determina o arranjo tridimensional dos átomos e grupos nos centros de quiralidade. Esta informação é relevante pois os estereoisômeros comumente apresentam propriedades diferentes, especialmente propriedades farmacológicas.

O partenolídeo possui 4 centros quirais e os resultados de sua análise de DCV são referência para a determinação da configuração absoluta do produto oxidado. A configuração determinada para os 4 centros quirais já existentes no partenolídeo não mudam para o metabólito, pois os ligantes aos carbonos assimétricos das posições 4, 5, 6 e 7 permaneceram os mesmos, conforme apresentado no item 4.3.

A configuração relativa do partenolídeo foi previamente determinada utilizando cristalografia de raio-X. Posteriormente, foram estabelecidas duas possibilidades de configuração absoluta: (4*R*,5*R*,6*S*,7*S*) e (4*S*,5*S*,6*R*,7*R*). A excelente concordância entre os espectros de IV e de DCV calculados e experimentais [B3PW91/6-311G(d,p)], confirmaram então, a configuração absoluta do partenolídeo como 4*R*,5*R*,6*S*,7*S*, conforme demonstrado na Figura 4.3.

Figura 4.3. Resultados de IV e DCV para a determinação da configuração absoluta do partenolídeo e representação da sua estrutura tridimensional.



Legenda: À esquerda a comparação entre os espectros de IV e de DCV experimentais e calculados [B3PW91/6-311G(d,p)] para a configuração (4*R*,5*R*,6*S*,7*S*). À direita a estrutura otimizada de menor energia para o confômero identificado como (4*R*,5*R*,6*S*,7*S*) [B3PW91/6-311G(d,p)].

4.2 Estudo do metabolismo *in vitro* por modelo de reação biomimética

Conforme descrito no item 3.2.6 foram utilizados dois catalisadores (metaloporfirina FeTFPPCI e catalisador de Jacobsen) e dois agente oxidantes (MCPBA e diacetato de iodobenzeno) no modelo biomimético para oxidação do partenolídeo.

Neste estudo oxidativo foram utilizadas diferentes proporções molares de catalisadores, substrato e agentes oxidantes, para verificar a possível formação de metabólitos putativos nas variadas condições de reação de oxidação.

Vários estudos da literatura mostraram que a técnica de CLAE-DAD foi utilizada para a identificação e quantificação do partenolídeo, com baixos limites de quantificação e detecção (AVULA et al, 2005; CHAVES, DA COSTA, 2008; JIN; MADIEH; AUGSBURGER, 2008).

Desta maneira, as reações oxidativas biomiméticas foram avaliadas por análises em cromatógrafo líquido com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm, conforme descrito no item 3.2.4.1. As condições cromatográficas foram definidas após avaliação de variação de gradiente, proporções e tipos de fase móvel, sendo obtido limite de detecção de cerca de 0,5 µg de partenolídeo por mL de diluente.

De acordo com o item 3.2.6, a reatividade do partenolídeo foi avaliada através da porcentagem de redução do substrato e formação do metabólito putativo majoritário.

Conforme demonstrado nas figuras a seguir (Figura 4.4 a Figura 4.9) é possível verificar que o partenolídeo é um substrato bastante reativo para reações de oxidação, com formação de um mesmo metabólito putativo majoritário, para todas as condições testadas.

A Figura 4.4 demonstra a reatividade do partenolídeo através da porcentagem de redução de área do substrato. Na presença do catalisador a amostra foi identificada como Reação e na ausência do catalisador identificada como Controle. Cada condição reacional apresentou perfil cromatográfico semelhante na presença e na ausência do catalisador, conforme exemplificado na Figura 4.5 para a reação 7, entretanto o partenolídeo reage de forma mais eficaz na presença do catalisador. A utilização do catalisador possibilita a régio e estéreo seletividade para as reações,

da mesma forma como atuam as enzimas dos sistemas biológicos, justificando desta maneira sua utilização neste trabalho.

Figura 4.4. Porcentagem de redução do substrato partenolídeo no ensaio de catálise oxidativa biomimética.

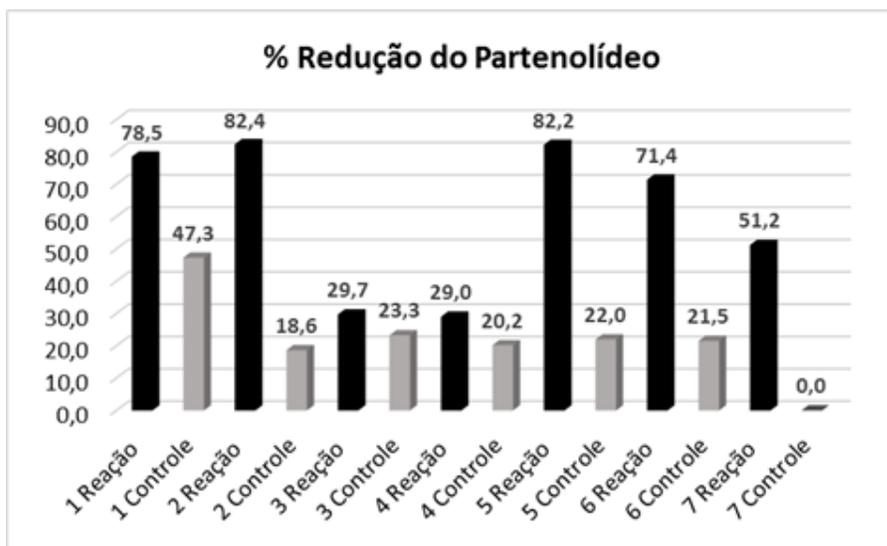
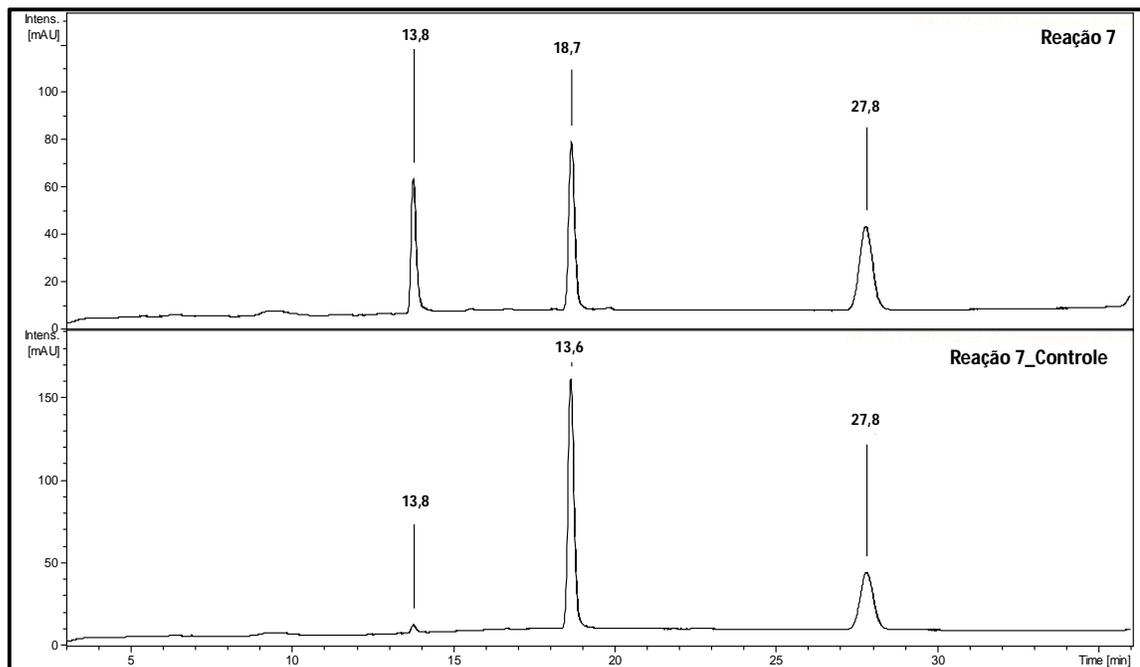


Figura 4.5. Cromatogramas da Reação 7 na presença (Reação) e na ausência (Controle) do catalisador – com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm.

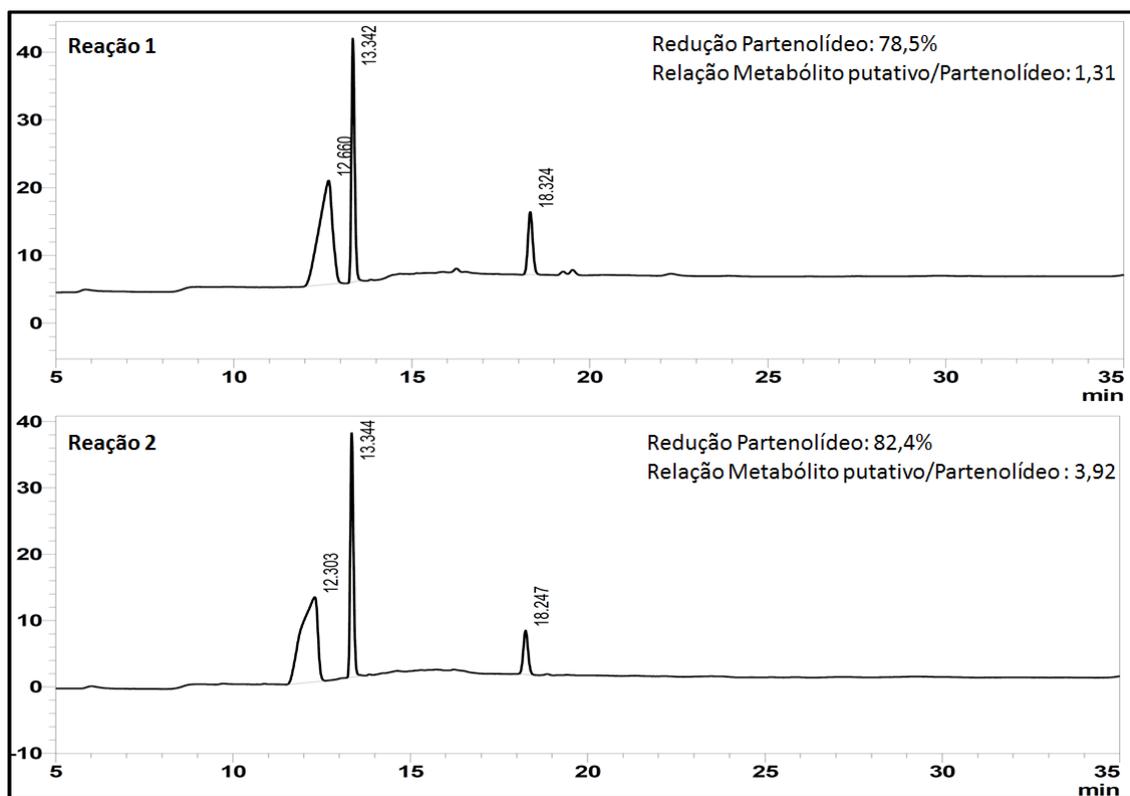


Legenda: Sinal com t_R 13,8 min corresponde ao metabólito putativo majoritário; sinal com t_R 18,6 min corresponde ao partenolídeo e sinal com t_R 27,8 min corresponde ao agente oxidante (diacetato de iodobenzeno).

O catalisador porfirínico FeTFPPCl foi utilizado nas reações 1 a 5 e o catalisador de Jacobsen nas reações 6 e 7.

Comparando-se os meios reacionais acetonitrila : clorofórmio 1:1 (Reação 1) e acetonitrila (Reação 2) é possível verificar que o meio contendo apenas acetonitrila possibilitou maior oxidação do substrato, formando maior quantidade do metabólito putativo majoritário (Figura 4.6).

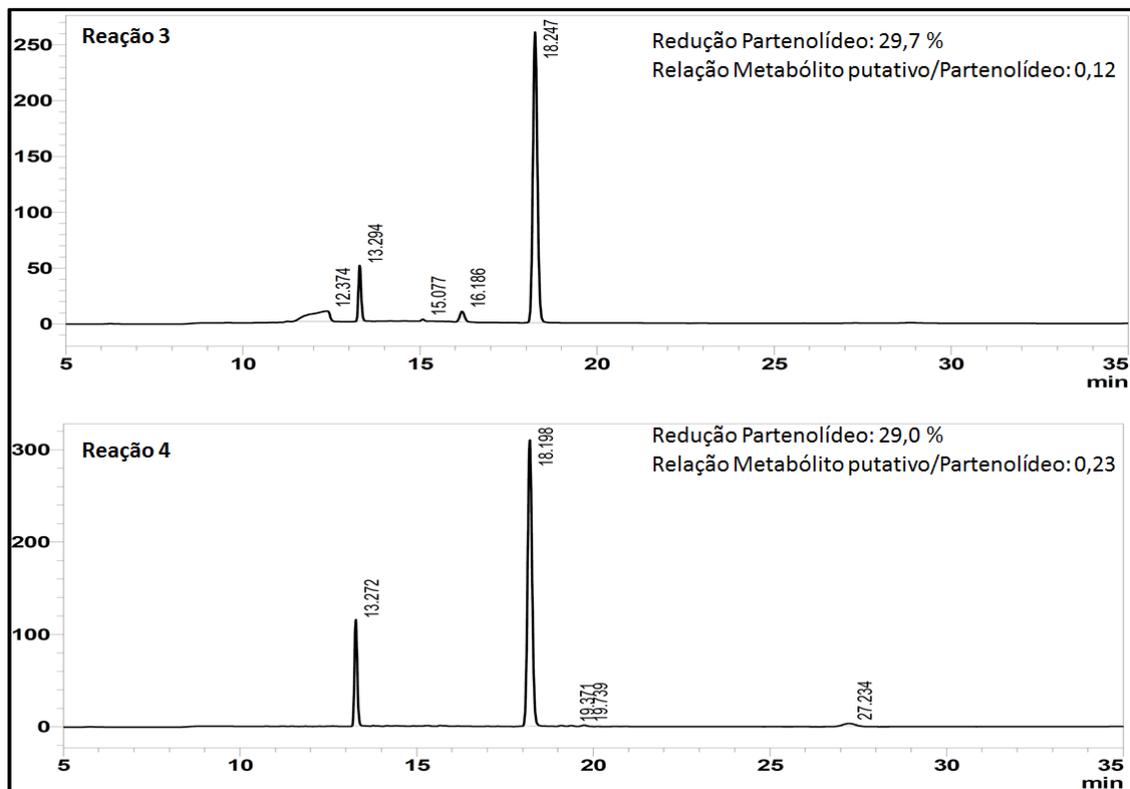
Figura 4.6. Cromatogramas das Reações 1 e 2 – com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm.



Legenda: o Sinal com t_R . 12,4 min corresponde ao agente oxidante (MCPBA); o sinal com t_R . 13,3 min corresponde ao metabólito putativo majoritário; sinal com t_R 18,3 min corresponde ao partenolídeo.

Em relação aos agentes oxidantes, a porcentagem de redução do substrato foi bastante semelhante frente ao MCPBA (Reação 3) e ao diacetato de iodobenzeno (Reação 4), entretanto a oxidação com diacetato de iodobezeno resultou em uma maior quantidade do metabólito putativo majoritário (Figura 4.7).

Figura 4.7. Cromatogramas das Reações 3 e 4 – com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm.

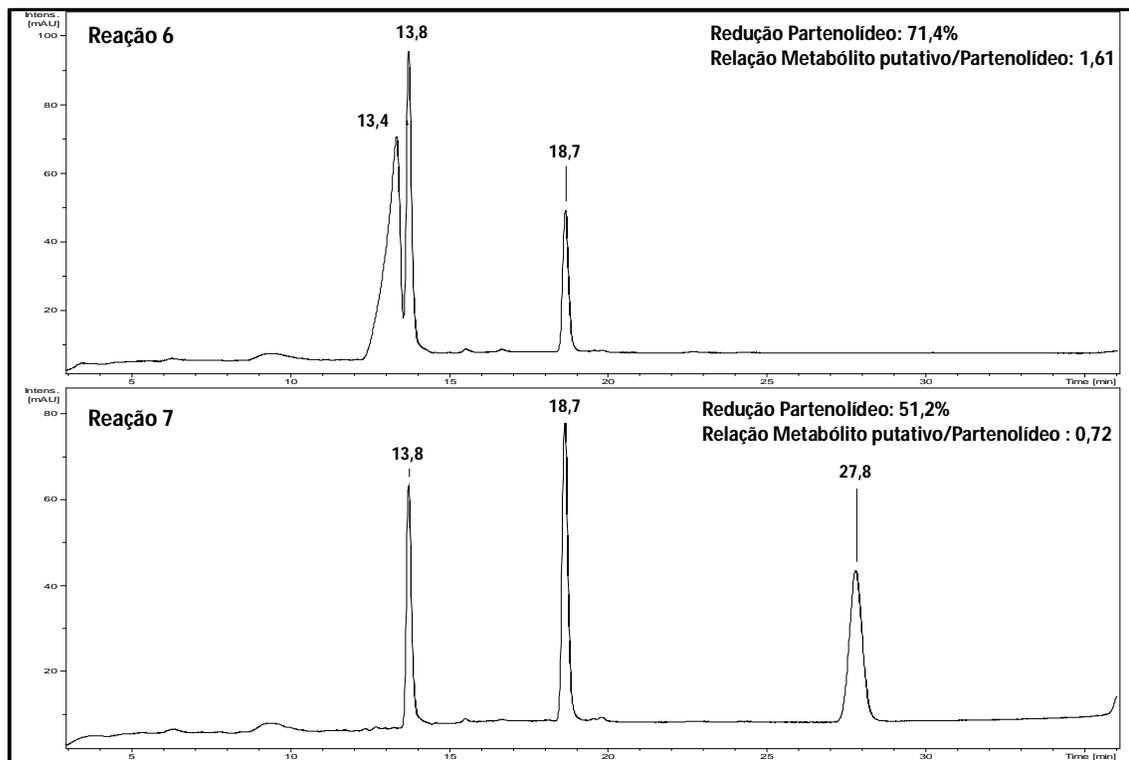


Legenda: o sinal com t_R 12,4 min corresponde ao MCPBA; o sinal com t_R 13,3 min corresponde ao metabólito putativo majoritário; sinal com t_R 18,3 min corresponde ao partenólídeo e sinal com t_R 27,2 min corresponde ao diacetato de iodobenzeno.

Na presença do catalisador de Jacobsen, a reatividade do partenólídeo foi mais eficaz com o oxidante MCPBA (Reação 6), tanto na redução do substrato quanto na formação do metabólito putativo majoritário, conforme demonstrado na Figura 4.8.

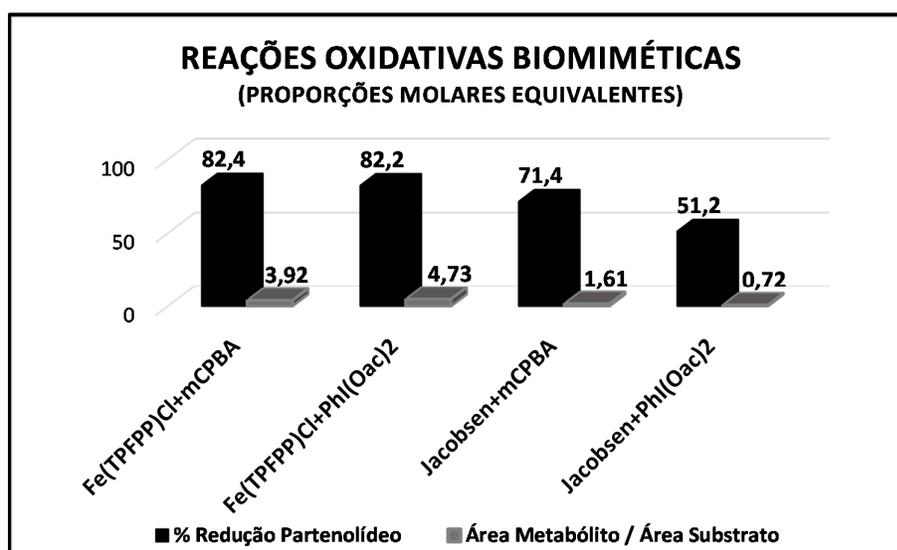
Quando comparamos as reações com as mesmas proporções molares, ou seja, 1 mol catalisador, 30 mols substrato e 30 mols agente oxidante, podemos inferir que os melhores resultados para reatividade do partenólídeo foi com o catalisador porfirínico de segunda geração FeTFPPCI, conforme demonstrado na Figura 4.9. Ambos os agente oxidantes utilizados foram eficazes na formação do metabólito putativo majoritário, todavia o diacetato de iodobenzeno aparenta ser mais eficiente. Estes resultados foram reavaliados e confirmados no estudo de cinética (item 4.5), com o intuito de otimizar as condições reacionais da catálise oxidativa biomimética, as quais podem ser utilizadas, por exemplo, para isolamento do metabólito putativo majoritário e posterior utilização em estudos farmacocinéticos e biológicos.

Figura 4.8. Cromatogramas das Reações 6 e 7 – com detecção UV no comprimento de onda de 210 nm.



Legenda: o sinal com t_R 13,4 min corresponde ao MCPBA; o sinal com t_R 13,8 min corresponde ao metabólito putativo majoritário; sinal com t_R 18,7 min corresponde ao partenolídeo e sinal com t_R 27,8 min corresponde ao diacetato de iodobenzeno.

Figura 4.9. Comparação das reações oxidativas biomiméticas nas proporções molares 1:30:30 (catalisador:substrato:agente oxidante).



4.3 Isolamento e identificação do metabólito putativo majoritário

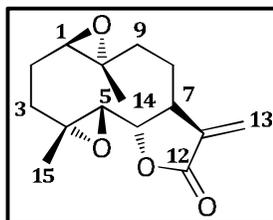
Conforme descrito no item 4.2, o partenólídeo demonstrou ser um substrato bastante suscetível à oxidação, com formação de um metabólito putativo majoritário. Devido as vantagens do modelo biomimético com metaloporfirina ser escalonável, conforme já apresentado no item 1.2, este metabólito putativo foi isolado pela técnica de CLAE-DAD semi-preparativo (item 3.2.4.2).

Por ser uma técnica robusta e aplicável ao processo de purificação de amostras, a cromatografia líquida de fase reversa com detecção UV em escala semi-preparativa foi utilizada para o isolamento do metabólito putativo majoritário

Para a completa caracterização estrutural do produto oxidado foram utilizadas as técnicas de RMN, EMAR-IES e DCV, sendo sua estrutura demonstrada na Figura 4.10.

A reação 2 (FeTFPPCl : Partenólídeo : MCPBA 1 : 30 : 30) foi a escolhida para escalonamento, pois apresentou alto rendimento na formação da substância de interesse e grande porcentagem de redução do substrato, conforme demonstrado na Figura 4.9.

Figura 4.10. Metabólito putativo isolado da reação oxidativa biomimética do partenólídeo, utilizando catalisador porfirínico FeTFPPCl e agente oxidante MCBA e identificado como **1(R),10(R)-epóxi-partenólídeo**.



4.3.1 Espectrometria de massas em alta resolução (EMAR-IES)

O espectro de massas em alta resolução, no modo positivo (Figura 4.11 e Tabela 4.3) estabeleceu fórmula molecular como $C_{15}H_{20}O_4$ [m/z $[M+Na]^+$ 287,1265 (calculada para $C_{15}H_{20}O_4Na$, 287,1254, erro de 3,83 ppm)].

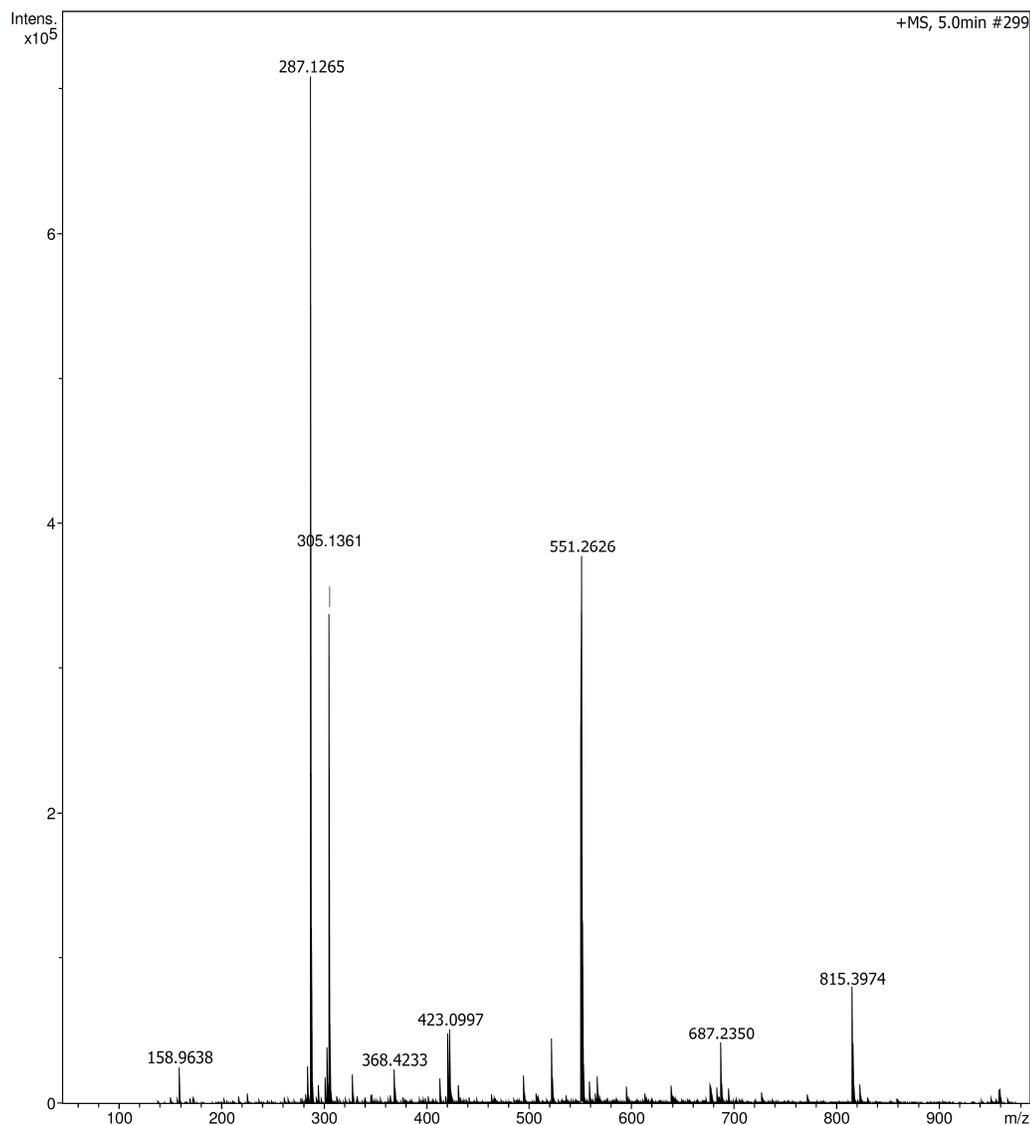
Comparando as tabelas de dados de espectrometria de massas em alta resolução do substrato e do produto isolado (Tabela 4.2 e Tabela 4.3) pode-se verificar que houve adição de 16 u na massa molecular do partenólídeo, sugerindo a adição de um átomo de oxigênio na molécula. A literatura mostra que as

metaloporfirinas favorecem a formação de epóxidos em duplas ligações, quando utilizadas como catalisadores de reações oxidativas (BERNADOU; MEUNIER, 2004). O partenolídeo possui dois sítios para que ocorra esta reação (posições 1,10 e 11,13).

Tabela 4.3 Dados de EMAR-IES do metabólito putativo isolado.

Substância	Fórmula Molecular	Massa Molecular teórica [M+Na] ⁺	Massa Molecular experimental [M+Na] ⁺	Erro (ppm)
Metabólito putativo isolado	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	287,1265	287,1254	3,83

Figura 4.11. Espectro de massas – EMAR-IES – modo positivo do metabólito putativo isolado da reação oxidativa biomimética do partenolídeo, utilizando catalisador porfirínico FeTFPPCl e agente oxidante MCBA.



4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear

Para a identificação por RMN, foram analisados os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e mapas de contorno de HSQC e HMBC, cujos dados estão descritos na Tabela 4.4 e os espectros e mapas de contorno no Anexo 2.

As análises dos espectros de RMN de ^{13}C e de ^1H revelaram a presença de 15 carbonos e 20 hidrogênios, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C , bem como no mapa de contorno de HSQC, foram observados quatro sinais de carbonos não hidrogenados, incluindo um grupo carbonila em δ 168,8, sugestivo da função éster, um carbono em δ 138,8, sugestivo de carbono insaturado (sp^2) e dois carbonos em δ 60,7 e 60,5, sugerindo ligação à átomo eletronegativo; cinco sinais de carbonos metilênicos, sendo um da função alceno ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6,36; 5,63 / 121,3); quatro sinais de carbonos metínicos, sendo três desblindados ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,95 / 81,8; 2,93 / 64,6 e 2,86 / 63,7), sugerindo ligação à átomo eletronegativo e dois sinais de carbonos metílicos ($\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 1,40 / 17,1 e 1,35 / 17,5).

Os experimentos de RMN de ^1H permitiram a identificação de dois hidrogênios vinila em δ 6,35 (1H; *d*; $J = 3,6$ Hz) e δ 5,63 (1H; *d*; $J = 3,2$ Hz); quatro hidrogênios metínicos desblindados em δ 3,95 (1H; *tt*; $J = 8,9$ Hz), δ 2,93 (1H; *d*; $J = 8,9$ Hz); δ 2,86 (1H; *dd*; $J = 1,3$ e 11,0 Hz) e δ 2,74 (1H; *m*); quatro hidrogênios metilênicos e dois hidrogênios metílicos.

Atribuições detalhadas dos sinais de hidrogênios e carbonos foram sequencialmente atribuídas por combinações de técnicas bidimensionais de HSQC e HMBC.

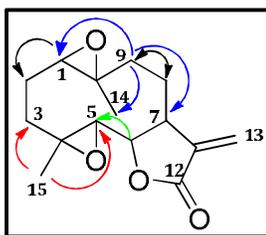
As conectividades foram estabelecidas pelas correlações no mapa de contorno do HMBC, representado na Figura 4.12.

Os hidrogênios metilênicos da posição 9 apresentaram correlação com os carbonos metínicos da posição 1 e 7 e carbono metílico da posição 14, bem como o carbono metilênico da posição 8. O hidrogênio metínico da posição 1 apresentou correlação com o carbono metilênico da posição 2 e o hidrogênio metínico da posição 6 com o carbono metínico da posição 5. Ainda, os hidrogênios metílicos da posição 15 apresentaram correlação com os carbonos metínicos da posição 5 e metilênico da posição 3.

Tabela 4.4. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a produto oxidado isolado (CDCl_3).

Metabólito putativo isolado		
Posição	^1H 500 MHz δ (ppm), [integral; multiplicidade; J (Hz)]	^{13}C 100 MHz δ (ppm)
1	2,86 [1H; <i>dd</i> ; 1,3, 11,0]	63,9
2	2,19 [1H; <i>m</i>]	24,3
	1,52 [1H; <i>m</i>]	
3	2,28 [1H; <i>m</i>]	35,3
	1,42 [1H; <i>m</i>]	
4	-	60,7
5	2,91 [1H; <i>d</i> ; 8,9]	64,7
6	3,95 [1H; <i>tt</i> ; 8,8]	81,9
7	2,74 [1H; <i>m</i>]	47,9
8	2,22 [1H; <i>m</i>]	26,2
	1,62 [1H; <i>m</i>]	
9	2,48 [1H; <i>dd</i> ; 7,6, 14,2]	40,3
	1,24 [1H; <i>tt</i> ; 13,3]	
10	-	60,8
11	-	138,9
12	-	168,9
13	6,35 [1H; <i>d</i> ; 3,6]	121,5
	5,63 [1H; <i>d</i> ; 3,2]	
14	1,40 [3H; <i>s</i>]	17,2
15	1,35 [3H; <i>s</i>]	17,6

Figura 4.12. Representação das conectividades do mapa de contorno do HMBC para a estrutura do metabólito putativo 1,10-epóxi-partenolídeo ($\text{H} \rightarrow \text{C}$).



4.3.3 Dicroísmo Circular Vibracional

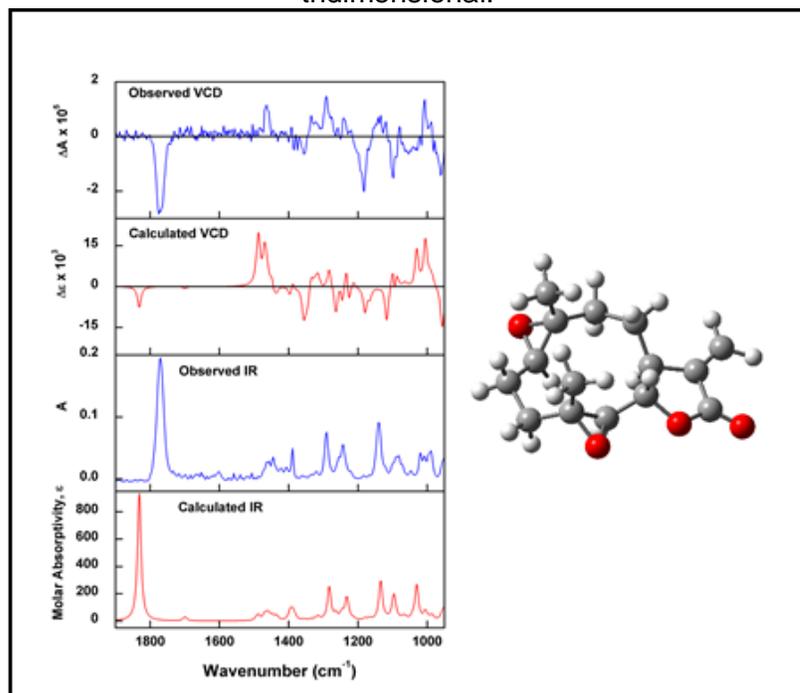
Para a completa caracterização estrutural do metabólito putativo foi realizada a análise de DCV a fim de definir a configuração absoluta do produto 1,10-epóxi-partenolídeo. Para isto, foi utilizada como base, a configuração absoluta do partenolídeo, conforme descrito no item 4.1. Para este produto foi definida a estereoquímica absoluta do epóxido adicional dos carbonos das posições 1 e 10.

Os espectros de IV e DCV foram calculados para os possíveis diastereoisômeros: (*4R,5R,6S,7S,1R,10R*) e (*4R,5R,6S,7S,1S,10S*). Observou-se, no

geral, uma melhor concordância entre os dados experimentais e calculados para a configuração (4*R*,5*R*,6*S*,7*S*,1*R*,10*R*) [B3PW91/6-311G(d,p)], conforme Figuras 4.13 e 4.14. A diferença mais importante foi observada nas bandas dos números de onda de 1000 a 1100 cm^{-1} , provenientes das vibrações dos estiramentos carbono-carbono que envolvem a maior parte da estrutura molecular da substância, bem como os modos de deformação dos grupos metila. Por conseguinte, a configuração absoluta do metabólito putativo 1,10-epóxi-partenolídeo foi atribuída como 4*R*,5*R*,6*S*,7*S*,1*R*,10*R*.

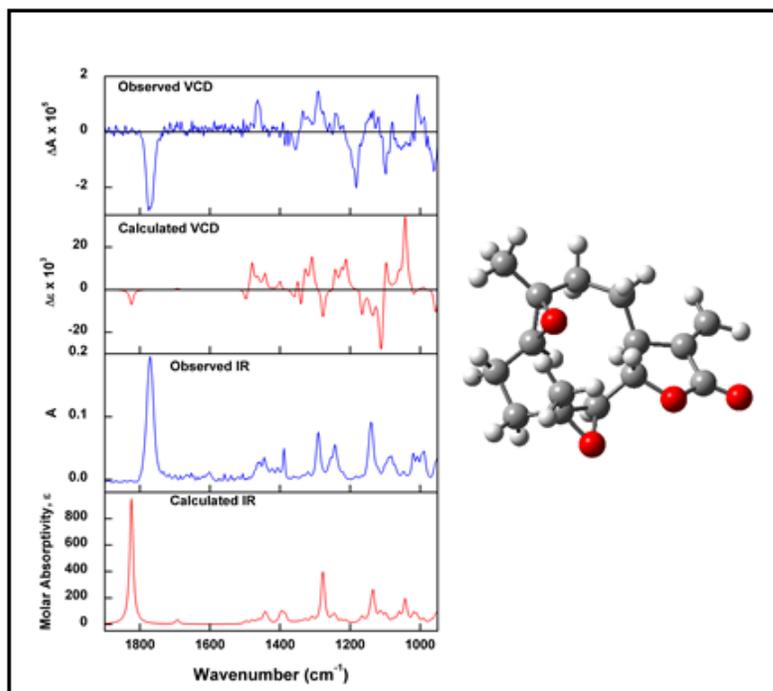
A configuração absoluta do metabólito putativo 1,10-epóxi-partenolídeo, determinada neste estudo, é a mesma do metabólito majoritário da biotransformação do partenolídeo utilizando CYP 450 de bactéria, demonstrado no trabalho de KOLEV et al, 2014. Estes dados sugerem que a posição 1,10 do partenolideo possa ser um sítio alvo para o ataque das enzimas do CYP 450 e que o metabólito putativo 1(*R*),10(*R*)-epóxi-partenolídeo, identificado neste estudo, possa ser o mesmo formado durante a biotransformação nos seres humanos. Desta maneira, estudos de metabolismo *in vivo* são necessários para comprovação desta hipótese.

Figura 4.13. Dados calculados e experimentais de IV e DCV para o confômero 4*R*,5*R*,6*S*,7*S*,1*R*,10*R* do produto oxidado e representação da sua estrutura tridimensional.



Legenda: à esquerda a comparação entre espectros de IV e de DCV experimentais e calculados [B3PW91/6-311G(d,p)]. À direita a estrutura otimizada de menor energia [B3PW91/6-311G(d,p)].

Figura 4.14. Dados calculados de IV e DCV para o possível confômero 4*R*,5*R*,6*S*,7*S*,1*S*,10*S* do produto oxidado e representação desta estrutura tridimensional e os resultados de IV e DCV obtidos para o produto oxidado.



Legenda: à esquerda a comparação entre espectros de IV e de DCV experimentais e calculados [B3PW91/6-311G(d,p)]. À direita a estrutura otimizada de menor energia [B3PW91/6-311G(d,p)].

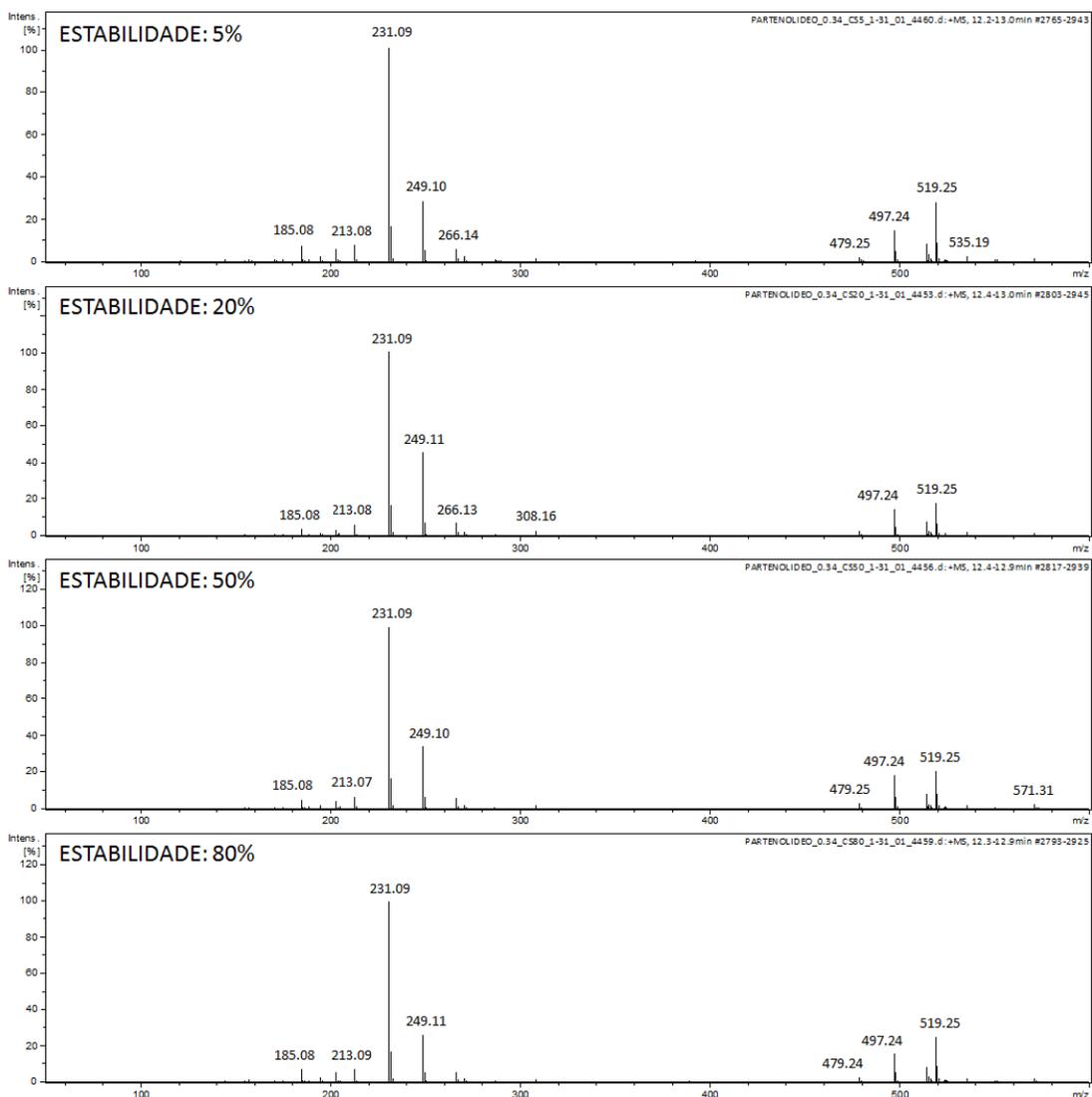
4.4 Estudo do metabolismo *in vitro* por modelo de microsossoma hepático

O partenólídeo foi submetido à metabolização utilizando microsossomas hepáticos isolados de fígado de ratos, a fim de estabelecer correlação entre produtos de oxidação formados nas reações biomiméticas, especialmente do produto isolado e caracterizado 1,10-epóxi-partenólídeo, com as reações de biotransformação mediada pelo CYP 450.

Durante o desenvolvimento do método cromatográfico de CLAE-EM, para posterior avaliação do ensaio de metabolismo *in vitro* com microsossoma, verificou-se que o partenólídeo apresentou fragmentação na fonte no espectro de massas ionizados por eletrospray. O íon m/z 231, correspondente à perda de água da molécula do partenólídeo, apresentou-se mais intenso do que o íon percussor m/z 249 ($[M+H]^+$). Foi realizada variação na energia do capilar e da porcentagem de estabilidade do composto “*compound stability*” no espectrômetro de massas. Entretanto, mesmo alterando a estabilidade do composto, não foi possível obter

espectro de massas sem fragmentação na fonte (Figura 4.15), demonstrando a baixa energia para esta reação.

Figura 4.15. Variação da porcentagem de estabilidade do composto.



Para avaliação da formação do produto 1,10-epóxi-partenolídeo na reação com microssoma, o metabólito putativo isolado também foi analisado nas mesmas condições cromatográficas, a fim de comparação do tempo de retenção e do espectro de EM e EM/EM.

Os cromatogramas das condições teste, branco e controle estão demonstrados na Figura 4.16. É possível verificar que há formação de um produto, com tempo de retenção de 12,2 min apenas na condição teste, não sendo observado na condição

controle. Sugere-se tratar do produto 1,10-epóxi-partenolídeo, pois apresentou mesmo tempo de retenção (Figura 4.17) e espectros de massas (Figura 4.18 e Figura 4.19) similares aos do produto isolado da reação oxidativa biomimética do partenolídeo com MCPBA e FeTFPPCl.

Figura 4.16. Cromatogramas (CLAE-EM) – modo positivo de ionização por eletrospray (*BPC*) do partenolídeo submetido à incubação com microsomas hepáticos de ratos.

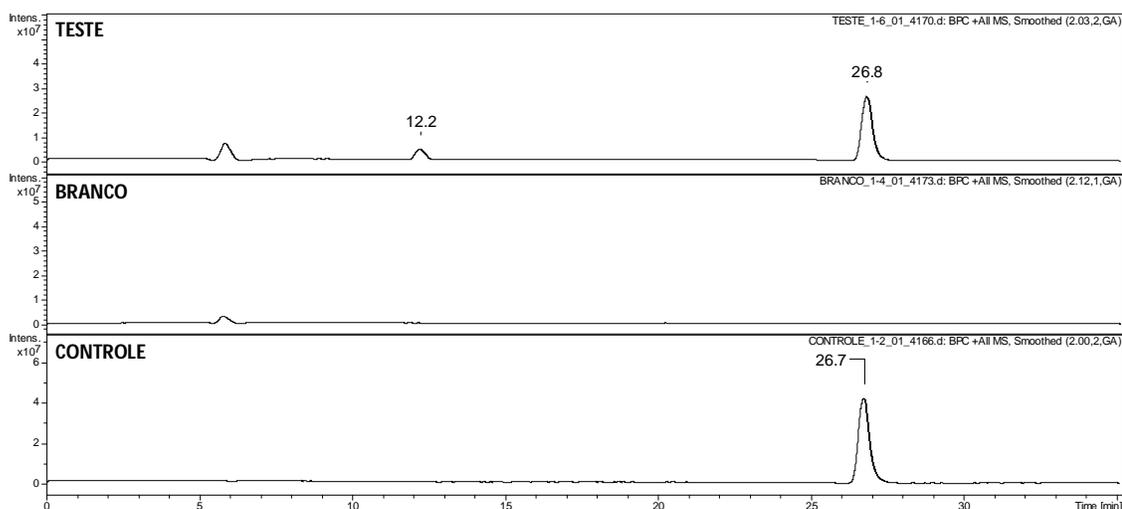


Figura 4.17. Cromatogramas (CLAE-EM) – modo positivo de ionização por eletrospray (*BPC*) da condição Teste do ensaio com microsoma hepático de ratos do partenolídeo e do produto oxidado 1,10-epóxi-partenolídeo.

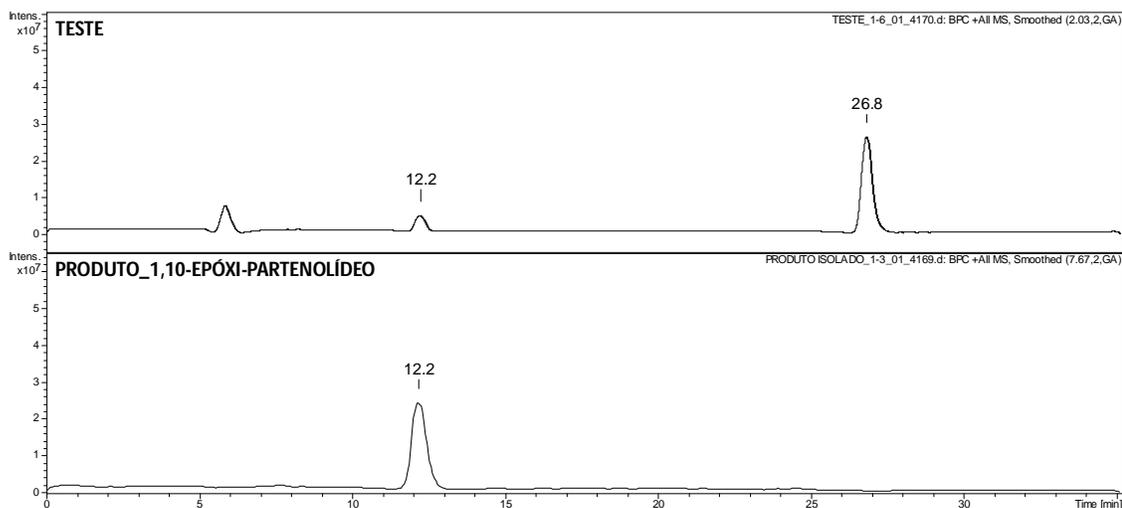
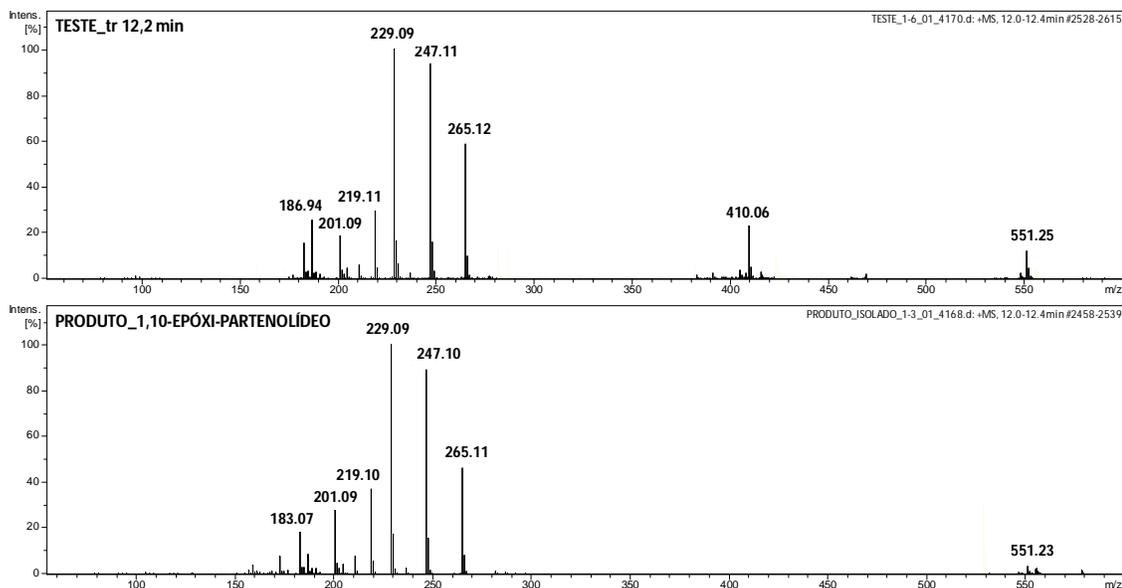


Figura 4.18. Comparação dos espectros de massas (ionização por eletrospray, modo positivo) do produto com t_R de 12,2 min na reação do partenólídeo incubado com microssoma e o do produto oxidado 1,10-epóxi-partenólídeo.



No espectro de massas (Figura 4.18), do produto isolado 1,10-epóxi-partenólídeo e do produto com tempo de retenção de 12,2 min da reação do partenólídeo incubado com microssoma, observa-se o íon precursor de m/z 265, correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$. Houve fragmentação na fonte, conforme já havia sido observado para o partenólídeo, gerando os íons m/z 247 e 229 em grande intensidade no espectro, que corresponde à eliminações sucessivas de H_2O . Esta eliminação de 18 u e/ou 36 u ocorre facilmente devido à presença de grupos epóxidos na molécula, os quais são lábeis na fonte de IES.

No espectro de fragmentação (Figura 4.19), do íon precursor m/z 265 foi observado íon fragmento relativo à perda de H_2O (m/z 247), através da possível abertura do anel epóxido e seguido da eliminação de CO (íon com m/z 219). Observa-se ainda o íon fragmento correspondente a perda consecutiva de duas moléculas de H_2O (m/z 229) a partir do íon precursor, seguido da eliminação de CO (íon com m/z 201).

Para avaliar a possível formação de mais produtos de metabolização por microssomas hepáticos de ratos, utilizou-se método cromatográfico com gradiente exploratório de fase móvel (Figura 4.20) e avaliação do cromatograma (CLAE-EM)

no modo negativo de ionização (Figura 4.21). Não foi observado nenhum sinal adicional nos cromatogramas.

Figura 4.19. Comparação dos espectros de EM² (ionização por eletrospray, modo positivo) do produto com t_R de 12,2 min na reação do partenolídeo incubado com microssoma e o do produto oxidado 1,10-epóxi-partenolídeo.

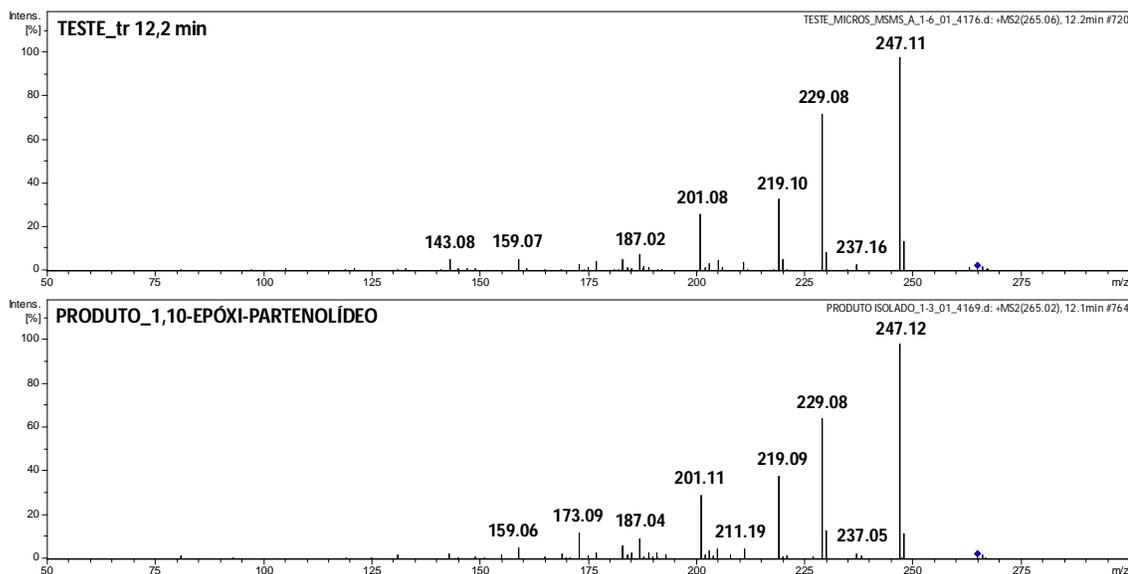
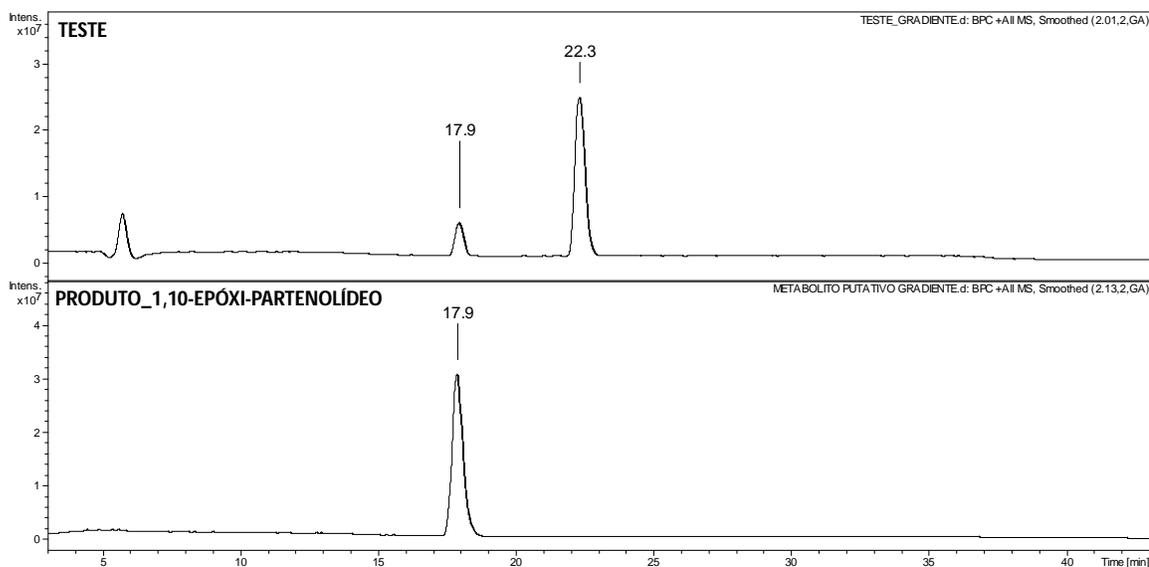
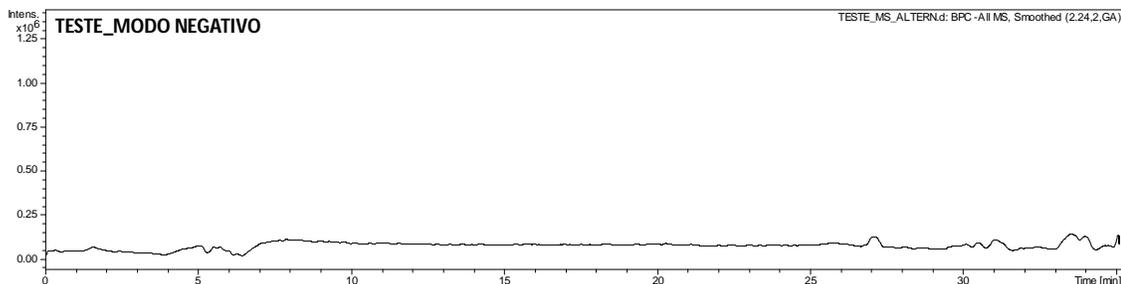


Figura 4.20. Cromatogramas (CLAE-EM) – modo positivo de ionização por eletrospray (BPC) da condição Teste do ensaio com microssoma hepático de ratos do partenolídeo e do produto oxidado isolado com o gradiente exploratório.



Legenda: a variação do solvente orgânico (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) foi de 5 a 100% em 45 minutos de análise cromatográfica.

Figura 4.21. Cromatograma (CLAE-EM) – modo negativo de ionização por eletrospray (BPC) da condição Teste do ensaio com microssoma hepático de ratos do partenólídeo.



4.5 Cinética das reações oxidativas biomiméticas

A realização da cinética das reações oxidativas biomiméticas do partenólídeo teve como objetivos a avaliação da influência do catalisador na reação de oxidação do substrato, a velocidade de reação de oxidação do partenólídeo com os diferentes oxidantes, a reatividade do partenólídeo e a formação do produto oxidado 1,10-epóxi-partenólídeo. Além disso, este ensaio pode fornecer dados para a otimização dos parâmetros das reações para obtenção do 1,10-epóxi-partenólídeo.

O estudo foi realizado utilizando os agentes oxidante MCPBA e diacetato de iodobezeno na presença e na ausência dos catalisadores FeTFPPCI e Catalisador de Jacobsen.

Para fins de comparação entre as reações realizadas neste trabalho, foram utilizadas as equações descritas no item 3.2.10, as quais foram baseadas nas equações de taxa de reação (velocidade média) e taxa instantânea de reação (velocidade instantânea). A taxa de reação avalia a reação como um todo, ou seja, avalia o comportamento do substrato frente ao oxidante, na presença e ausência de catalisador, baseado nas concentrações dos tempos final e inicial. Já a taxa instantânea de reação avalia a concentração em discretos intervalos de tempo, ou seja, como o substrato reage com o oxidante, na presença e ausência do catalisador, ao longo da reação oxidativa. A taxa de reação é única para cada reação, já a taxa instantânea varia conforme o substrato reage com o reagente.

Através do gráfico de cinética das reações oxidativas (Figura 4.22) e da tabela de taxas instantâneas de reações oxidativas (Tabela 4.5) é possível verificar que o partenólídeo reage mais rapidamente com o agente oxidante MCPBA, diminuindo

rapidamente sua concentração na presença do catalisador FeTFPPCl. Com cerca de 15 minutos, ocorre praticamente toda a reação do substrato com o MCPBA. Foi verificado este mesmo perfil para o controle, ou seja, na ausência de catalisador, entretanto com menor consumo do substrato. Por outro lado, na presença do catalisador de Jacobsen a reação ocorre de maneira mais lenta no início, tendendo à estabilização somente após de 6 horas de reação. A reação do partenólídeo com o agente oxidante diacetato de iodobenzeno, ao longo do tempo, ocorreu mais lentamente na presença do catalisador FeTFPPCl, quando comparado ao MCPBA, entretanto o rendimento final desta reação é maior, pois a concentração do substrato ao final é menor. Na presença do catalisador de Jacobsen a reação é ainda mais lenta e com menor consumo do substrato.

A reatividade do partenólídeo com os agentes oxidantes é menor na ausência de catalisadores, pois há pequena variação na concentração do substrato até cerca de 15 minutos de reação. Após este período, a concentração do substrato permanece praticamente a mesma durante as próximas 24 horas.

Assim, de acordo com estes resultados, é possível concluir que a presença do catalisador aumenta significativamente a taxa de reação, ou seja, na presença de catalisadores a reação oxidativa do partenólídeo ocorre mais rapidamente, além de proporcionar um consumo consideravelmente maior do substrato.

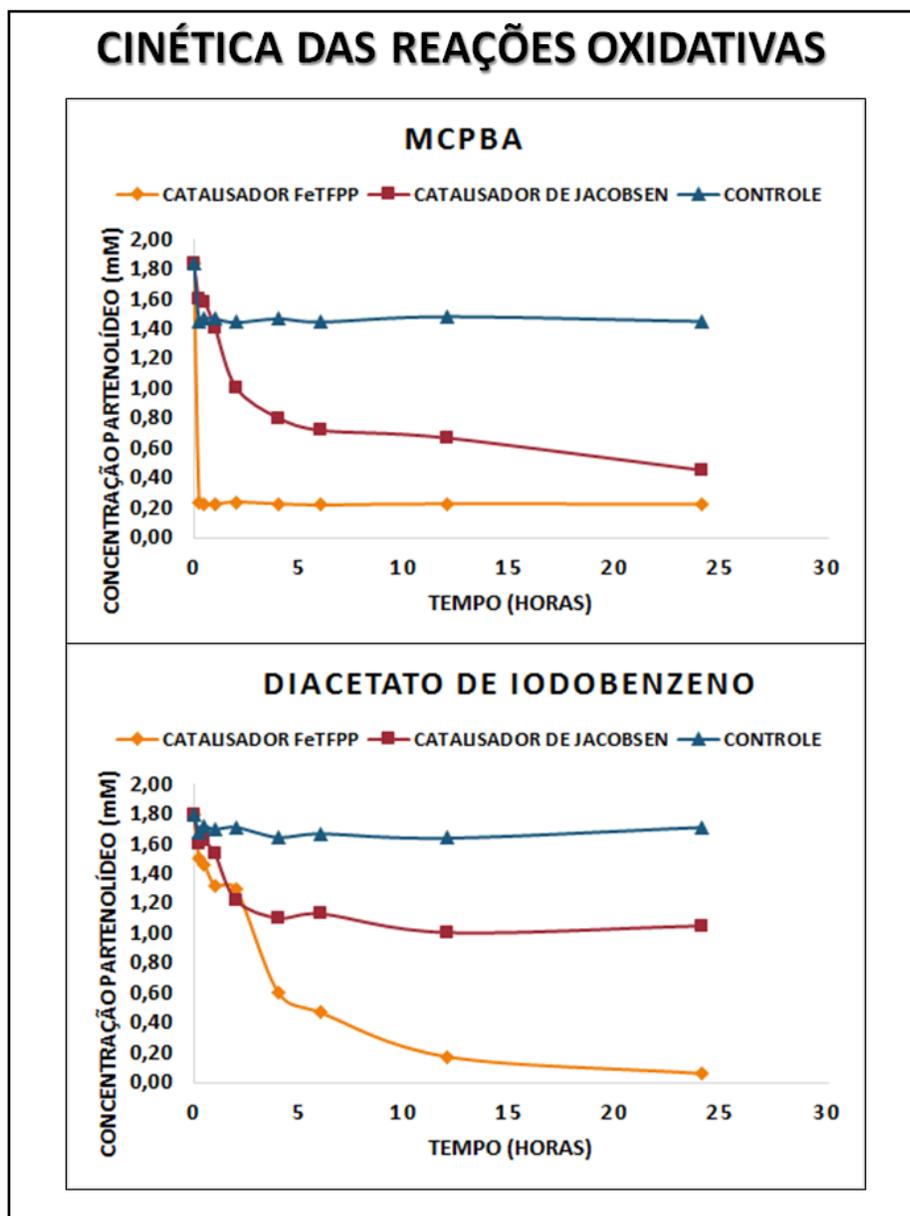
Tabela 4.5. Taxas instantâneas de reações oxidativas do partenólídeo.

Taxa instantânea de reação (mM/h)	MCPBA			DIACETATO DE IODOBENZENO		
	FeTFPPCl	Jacobsen	Controle	FeTFPPCl	Jacobsen	Controle
0,25 h	3,217	0,505	0,722	0,659	0,351	0,150
1 h	0,012	0,382	0,019	0,109	0,264	0,005
2 h	0,000	0,201	0,000	0,239	0,143	0,018
6 h	0,000	0,017	0,002	0,054	0,012	0,001
12 h	0,000	0,015	0,000	0,023	0,005	0,002

Tabela 4.6. Taxas de reações oxidativas do partenolídeo.

	MCPBA			DIACETATO DE IODOBENZENO		
	FeTFPPCI	Jacobsen	Controle	FeTFPPCI	Jacobsen	Controle
Taxa de reação (mM/h)	0,067	0,057	0,016	0,072	0,031	0,003

Figura 4.22. Gráficos da cinética das reações oxidativas do partenolídeo, avaliando a variação da concentração em função do tempo.



Legenda: no gráfico superior as reações com o agente oxidante MCPBA e no gráfico inferior as reações com o agente oxidante diacetato de iodobenzeno.

Os resultados ainda foram expressos de maneira a comparar o consumo do partenólídeo com a formação do produto oxidado. Portanto, os gráficos foram plotados utilizando as áreas (ao invés da concentração) versus os tempos de reação (Figura 4.23).

Conforme já discutido anteriormente, a redução de área do partenólídeo ocorre mais rapidamente no início da reação do que no final. Ao final das reações, na presença do catalisador porfirínico, quase todo o partenólídeo foi consumido, especialmente na reação com o diacetato de iodobenzeno. De maneira similar e proporcional, é observada a formação do metabólito putativo.

Na presença do catalisador de Jacobsen, o consumo do partenólídeo foi menor, especialmente na reação com o diacetato de iodobenzeno.

Dentre os agentes oxidantes utilizados o diacetato de iodobenzeno foi mais eficaz, pois proporcionou maior consumo do substrato (diminuição da área do partenólídeo) e maior formação do produto oxidado (aumento da área do metabólito putativo).

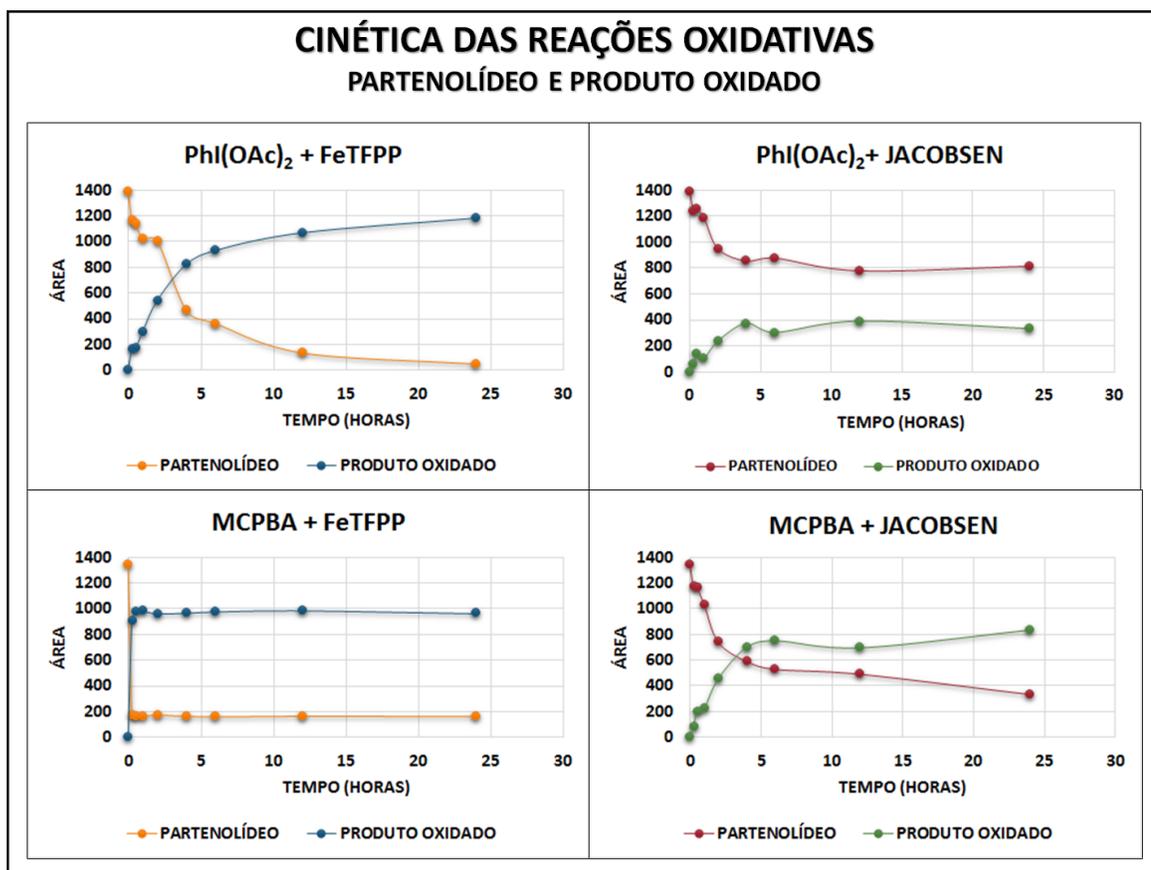
Dentre os catalisadores utilizados verificamos que a metaloporfirina FeTFPPCI foi mais eficiente, pois possibilitou a reação com o agente oxidante diacetato de iodobenzeno de maneira mais eficiente, ocasionando portanto, maior consumo do substrato e maior formação do produto.

Estes resultados estão em concordância com os ensaios prévios de reações oxidativas biomiméticas descritos no item 4.2.

Ainda, pode-se verificar que o tempo ótimo de reação oxidativa do partenólídeo, com os agentes oxidantes e catalisadores testados, é de cerca de 12 horas, exceto para a condição com o MCPBA e FeTFPPCI. Neste caso, em apenas 30 minutos observa-se a estabilização no consumo do substrato e consequente formação do metabólito putativo, demonstrando ser uma condição interessante para obtenção rápida deste produto.

Estes dados de cinética são importantes para a otimização das condições experimentais das reações oxidativas biomiméticas para isolamento do metabólito putativo 1,10-epóxi-partenólídeo, o qual pode ser utilizado em estudos de farmacocinética e avaliação da atividade biológica do partenólídeo, conforme descrito no item 4.6.

Figura 4.23. Cinética das reações de oxidação do partenólídeo com diacetato de iodobenzeno e MCPBA formando o produto 1,10-epóxi-partenólídeo.



Legenda: à esquerda as reações na presença do catalisador porfirínico de segunda geração FeTFPPCI e à direita as reações na presença do catalisador de Jacobsen.

4.6 Avaliação do efeito citotóxico do partenólídeo e do metabólito putativo nas formas promastigotas de *L. amazonensis* e tripomastigotas de *T. cruzi* e nas linhagens celulares de macrófago

O ensaio utilizado para avaliação da citotoxicidade induzida pelo partenólídeo e do metabólito 1,10-epóxi-partenólídeo no parasita *L. amazonensis* e na linhagem J774 foi o ensaio de redução do sal de tetrazólio – MTT (brometo de 3-[4,5-dimetilazol-2il]-2,5-difeniltetrazólio) e o ensaio utilizado no parasita *T. cruzi* foi o de resazurina.

O ensaio de redução do MTT é amplamente utilizado para verificar a morte celular em diferentes tipos celulares, inclusive de parasitas para o *screening* de drogas. O mecanismo da redução do MTT em cristais de formazan é complexo e pode estar associado à integridade funcional das mitocôndrias, à eficiência dos

processos de endocitose/exocitose e à participação do compartimento endosomal/lisosomal das células analisadas. Tais eventos biológicos são dependentes de ATP e de fundamental importância para a maioria das células vivas. Assim, o uso do ensaio de redução do MTT é válido para investigar a viabilidade celular (LIU et al., 1997).

O método de resazurina é um ensaio colorimétrico quantitativo que tem sido utilizado para avaliar a citotoxicidade de compostos contra o parasita *T. cruzi*, devido a capacidade do indicador resazurina oxidar e reduzir. A resazurina é considerada um indicador para a função metabólica celular, também sendo utilizada na avaliação de viabilidade celular (PERROT et al., 2003, ROLÓN et al., 2006).

Vários estudos em literatura têm demonstrado o efeito citotóxico do partenólídeo em linhagem de células neoplásicas (KOLEV et al, 2014; AL-FATLAWI et al., 2015; GEORGE; KUMAR; KUMAR, 2016). Existem também estudos relacionados com a atividade antiparasitária do partenólídeo, os quais demonstram a atividade de redução da viabilidade celular das formas parasitárias em *L. amazonensis* e *Tripanossoma cruzi* (TIUMAN et al, 2005; KARIN et al, 2010).

Neste trabalho, a avaliação do potencial citotóxico e da atividade antiparasitária do partenólídeo foi realizado por ensaios *in vitro*. Os resultados destes ensaios associados aos resultados de estudos de literatura sugerem que o partenólídeo possa ser considerado um composto modelo para desenvolvimento de medicamentos.

Para a realização de estudos de farmacodinâmica *in vivo* é necessário considerar os resultados de farmacocinética e biotransformação, pois durante o processo de biotransformação podem ser gerados metabólitos ativos e relevantes para a atividade biológica avaliada em questão.

Neste sentido, foi avaliado se o metabólito putativo 1,10-epóxi-partenólídeo, isolado da catálise oxidativa biomimética e também formado no metabolismo do partenólídeo utilizando microssomas de ratos, ainda possui atividade citotóxica relatada para o partenólídeo, em formas parasitárias e de células de mamíferos. Desta maneira, foi avaliado o efeito de viabilidade celular nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, nas formas tripomastigotas de *Tripanossoma cruzi* e na linhagem de macrófago murino J774 para ambos os compostos. A linhagem J774 foi utilizada, pois representa uma célula alvo para a infecção de *L. amazonensis*.

Os resultados do efeito do partenólídeo e do metabólito 1,10-epóxi-partenólídeo na viabilidade celular estão representados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Viabilidade celular do partenólídeo e do metabólito 1,10-epóxi-partenólídeo nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, tripomastigotas de *T. cruzi* e linhagem de macrófago murino J774.

	Partenólídeo	1,10-epóxi-partenólídeo	Anfotericina B	Benzonidazol
<i>Leishmania amazonensis</i> (IC ₅₀ µM)	16,47	43,03	1,64	-
<i>Tripanossoma cruzi</i> (IC ₅₀ µM)	2,42	4,13	-	497,4
Linhagem J774 (CC ₅₀ µM)	14,84	16,05	-	-
SI <i>L. amazonensis</i>	0,90	0,37	-	-
SI <i>T. cruzi</i>	6,13	3,88	-	-

É possível verificar que o partenólídeo e o metabólito apresentaram uma significativa atividade citotóxica tanto nas formas celulares de parasitas como nas de mamíferos. Estes resultados estão de acordo com outros estudos da literatura (TIUMAN et al 2005; KARIN et al., 2010; KOLEV et al, 2014).

O metabólito 1,10-epóxi-partenólídeo apresentou uma redução do efeito citotóxico do partenólídeo em todas as linhagens, principalmente em *L. amazonensis*. É interessante observar que o efeito citotóxico tanto do metabólito como do partenólídeo foi mais seletivo para as linhagens parasitárias de *Tripanossoma cruzi*, o que é demonstrado pelo maior valor do índice de seletividade (SI). Além disso, as IC₅₀ apresentadas tanto pelo partenólídeo como pelo metabólito para as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram inferiores ao controle de morte celular, representado pelo Benzonidazol, o que sugere a possibilidade de utilização destes compostos no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da Doença de Chagas. É importante notar que o efeito citotóxico do metabólito para as formas promastigotas de *L. amazonensis* apresentou uma significativa redução da atividade em relação ao partenólídeo, sugerindo que as alterações estruturais induzidas pelas reações oxidativas são críticas para o efeito antiparasitário em *Leishmania amazonensis*. Este dado pode ser importante para a investigação de

alvos terapêuticos e na definição de formas farmacêuticas visando o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da leishmaniose.

Os resultados obtidos sugerem que o metabolismo ou biotransformação do partenólídeo pode gerar compostos com significativa atividade biológica, como a atividade citotóxica, que pode influenciar nos resultados dos modelos experimentais *in vivo*. Além disso observa-se que, para a atividade tripanocida, o sítio ativo de oxidação do partenólídeo para formação do produto 1,10-epóxi-partenólídeo (posição 1,10), pode não ser tão importante para a esta ação, pois os índices de seletividade estão próximos para ambos os compostos. Entretanto, esta modificação apresentou efeito significativo para o efeito leishmanicida.

Alguns metabólitos originados de metabolismo *in vitro* do partenólídeo, utilizando enzimas do CYP450 de bactéria também foram avaliados quanto a atividade biológica, neste caso, antitumoral (KOLEV et al, 2014). Desta maneira, ressalta-se a importância da determinação dos possíveis metabólitos do partenólídeo para avaliação dos parâmetros farmacocinéticos e a investigação do efeito do partenólídeo em modelos de patologia *in vivo*, como por exemplo, nos modelos de doença de chagas, leishmaniose cutânea e até de neoplasias.

Em um estudo recente foi realizado o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a quantificação do partenólídeo em plasma para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos em ratos, sendo tempo de meia vida de aproximadamente 1,38 h para o tratamento oral e baixa biodisponibilidade (7,78%) (ZHAO et al., 2016). Estes dados confirmam a importância dos estudos *in vitro* antes da realização dos ensaios de farmacocinética, pois os dados de baixa biodisponibilidade e de $T_{1/2}$ podem estar associados a uma rápida biotransformação do partenólídeo, gerando metabólitos tais como o obtido neste estudo.

Outro dado que reforça a importância dos estudos de metabolismo *in vitro* e do monitoramento do possível metabolito na avaliação farmacocinética do partenólídeo foi o estudo de Fase I realizado com extratos padronizados de *Tanacetum parthenium*, no qual, os voluntários eram tratados por via oral com 4 mg de partenólídeo por dia (CURRY III, et al., 2003). Os resultados deste estudo mostraram que o partenólídeo não foi detectado nas amostras de plasma de pacientes mesmo após o tratamento de 28 dias. Os autores relatam a necessidade de purificação do extrato para aumentar a dose do partenólídeo. Entretanto pode-se sugerir que a não detecção do partenólídeo no plasma seja devido ao metabolismo

de primeira passagem, visto que o extrato foi administrado via oral e há estudos que demonstram a metabolização do partenólídeo por CYP 450 de bactéria originando majoritariamente o metabólito epoxidado (KOLEV et al, 2014) e sua alta afinidade pelas enzimas do CYP3A4, as quais estão presentes em abundância na mucosa intestinal (BUDZINSKI, et al, 2000).

A formação de produtos de biotransformação devido ao metabolismo pré-sistêmico já foi relatada e demonstrada para o midazolam, o qual é praticamente todo eliminado (>97%) pela biotransformação oxidativa catalisada quase que exclusivamente pela subfamília CYP3A, gerando principalmente o metabólito 1'-hidroxi-midazolam. O midazolam apresenta biodisponibilidade de cerca de 30% com efeito de primeira passagem no fígado e intestino. O metabólito 1'-hidroxi-midazolam é utilizado para monitoramento do midazolam no plasma (THUMMEL; KUNZE; SHEN, 1997). Assim, pode-se sugerir a importância da monitorização do metabólito do partenólídeo, semelhante ao que ocorre para o midazolam.

Portanto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que um provável metabólito *in vivo* do partenólídeo seja o 1,10-epóxi-partenólídeo, pois foi o metabólito putativo majoritário das reações oxidativas biomiméticas e o único metabólito detectado na biotransformação utilizando microsoma de rato. Além disso, este metabólito, com mesma configuração absoluta, foi também majoritário no ensaio de metabolismo *in vitro* de variantes do CYP 450 de bactéria *B. megaterium* realizado por KOLEV et al., 2014. Desta maneira, este trabalho suscita a necessidade de avaliação do metabólito 1,10-epóxi-partenólídeo nos estudos toxicológicos envolvendo o partenólídeo ou extratos de *T. parthenium*. Ainda, este metabólito torna-se relevante nos estudos para desenvolvimento de novos medicamentos, principalmente para Doença de Chagas e leishmaniose.

5. CONCLUSÕES

Através deste trabalho foi possível concluir que:

- a) o partenólídeo é um substrato reativo para o modelo oxidativo biomimético e através do estudo cinético, verificou-se que o MCPBA é o oxidante que reage mais rapidamente com o substrato e o diacetato de iodobenzeno é o oxidante que possibilita maior formação do metabólito putativo majoritário, ambos na presença do catalisador porfirínico FeTFPPCI.
- b) o escalonamento da reação do partenólídeo com FeTFPPCI e MCPBA possibilitou a caracterização do metabólito putativo majoritário como 1,10-epóxi-partenólídeo, através das técnicas de RMN e EMAR-IES.
- c) a análise de DCV juntamente com cálculos teóricos, possibilitou a determinação da configuração absoluta do metabólito putativo como 1(*R*),10(*R*)-epóxi-partenólídeo.
- d) na metabolização do partenólídeo por microsossoma hepático de rato foi detectado apenas um metabólito, o qual sugere tratar-se do produto 1,10-epóxi-partenólídeo.
- e) os ensaios realizados de citotoxicidade sugerem que o metabólito 1(*R*),10(*R*)-epóxi-partenólídeo apresenta efeito semelhante ao partenólídeo para o modelo testado de atividade tripanocida, entretanto redução do efeito leishmanicida. Estes resultados, reforçam a necessidade de avaliação deste metabólito nos estudos farmacológicos e toxicológicos do partenólídeo.

6. REFERÊNCIAS

AL-FATLAWI, A.A.; et al. Effect os parthenolide on growth and apoptosis regulatory genes of human cancer cell lines. **Pharmaceutical Biology**. v. 53, n. 1, p. 104-109, 2014.

AVULA, B., et al. Quantification of parthenolide in *Tanacetum* species by LC-UV/LC-MS and microscopic comparison of Mexican/US feverfew samples. **Pharmazie**. v. 61. p. 590-594, 2006.

BERNADOU, J., MEUNIER, B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. **Advanced Synthesis & Catalysis**. v. 346, n. 2-3, p. 171-184, 2004.

BRANDON, E.F.A. et al. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 189, p. 233-246, 2003.

CARVALHO, L.M. Documentos 144 – Artemísia. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 1-17, 2009.

CHAVES, J.S.; COSTA, F.B. A proposal for the quality controlo of *Tanacetum parthenium* (feverfew) and its hydroalcoholic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3, 2008.

COSTAS, M. Selective C-H oxidation catalysed by metalloporphyrins. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 255, p. 2912-2932, 2011.

CURRY III, E.A., et al. Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with câncer. **Investigational New Drugs**. v. 22, p. 299-305, 2004.

DEMARQUE, D.P., et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: na importante tool for the sctructural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**. v. 33, p. 432-455, 2016.

DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T.G.; XIE, L.Y. Polyhaloporphyrins: unusual ligands for metals and metal-catalyzed oxidations. **Accounts of Chemical Research**. v. 30, n. 6, p. 251-259, 1997.

EVANS, W.E.; RELLING, M.V.; Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. **Science**. v. 286, p. 487 – 491, 1999.

FERREIRA, L.S., et al. *In vitro* metabolismo of grandisin, a lignan with anti-chagasic activity. **Planta Medica**. v. 78, p. 1939-1941, 2012.

FERREIRA, L.S. **Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

GEORGE, V.C, et al. A review on the therapeutic potentials of parthenolide: a sesquiterpene lactone. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 3, n. 2, p. 69-73, 2012.

GEORGE, V.C; KUMAR, D.R.N.; KUMAR, R.A. Relative *in vitro* potentials of parthenolide to induce apoptosis and cell cycle arrest in skin câncer cells. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2016.

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

GOWDA, G.A.N.; GOWDA, Y.N.; RAFTERY, D. Expanding the Limits of Human Blood Metabolite Quantitation Using NMR Spectroscopy. **Analytical Chemistry**. v. 87, p. 706-715, 2015.

McGARRIGLE, E.M.; GILHEANY, D.G. Chromium- and manganese-salen promoted epoxidation of alkenes. **Chemical Reviews**. v. 105, n. 5, p. 1564-1598, 2005.

GOUVEA, D.R. **Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart.**

(Asteracea: Vernoniae). Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

HEXUM, J.K., et al. Parthenolide prodrug LC-1 slows growth of intracranial glioma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 25, n. 12, p. 2493-2495, 2015.

INSTRUÇÃO NORMATIVA n02. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, mai. 2014.

JANCOVA, P.; ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Phase II drug metabolizing enzymes. **Biomedical Papers**. v. 154, n. 2., p. 103-116, 2010.

JIN, P.; MADIEH, S.; AUGSBURGER, L.L. Selected physical and chemical properties of feverfew (*Tanacetum parthenium*) extracts importante for formulated product quality and performance. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.9, n. 1, p. 22-30, 2008.

JOSEPHY, P.D.; GUENGERICH, F.P.; MINERS, J.O. "Phase I" and "Phase II" drug metabolismo: terminology that we should phase out?. **Drug Metabolism Review**. v. 37, p. 575-580, 2005.

KACZMARZYK, T., et al. Mössbauer study of a tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin iron (III) chloride in comparison with the fluorine unsubstituted analogue. **Nukleonika**. v. 60, n. 1, p. 57-61, 2015.

KARIN, J.P-R., et al. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**. v. 18, n. 1, p. 36-39, 2010.

KEMPEMA, A.M., et al. Synthesis and antileukemic activities of C1-C10 modified parthenolide analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 23, n. 15, p. 4737-4645, 2015.

KIM, S-L., et al. Parthenolide enhances sensitivity of colorectal cancer cells to TRAIL by inducing death receptor 5 and promotes TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**. v. 46, p. 1121-1130, 2015.

KOLEV, J.N., et al. Discovery of potente parthenolide-based antileukemic agentes enable by late-stage P450-mediated C-H functionalization. **ACS Chemical Biology**. v. 9, n. 1, p. 164-173, 2014.

LAINE, R. Metabolic stability: main enzymes involved and best tools to assess it. **Current Drug Metabolism**. v. 9, n. 9, p. 921-927, 2008.

LARIVE, C.K.; BARDING, G.A.; MEREDITH, M.D. NMR spectroscopy for metabolomics and metbolic profiling. **Analytical Chemistry**. v. 87, n. 1, p. 133-146, 2015.

LIU, Y., et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, n. 2, p. 581-593,1997.

LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 391, n. 1, p. 79-96, 2008.

MAC LEOD, T.C.O., et al. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v. 273, n. 1-2, p. 259-264, 2007.

MEUNIER, B.; BERNADOU, J. Metal-oxo species in P450 enzymes and biomimetic models. Oxo-hydroxo tautomerism with water-soluble metalloporphyrins. **Topics in Catalysis**. v. 21, n. 1-3, p. 47-54, 2002.

NAM, Y.J., et al. Sesquiterpene lactone parthenolide attenuates production of inflammatory mediators by suppressing the Toll-like receptor-4-mediated activation of the Akt, mTOR, and NK- κ B pathways. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 388, p. 921-930, 2015.

NIEHUES, M., et al. Biomimetic *in vitro* oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the *in vivo* phase I metabolismo of bioactive compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 54, p. 804-812, 2012.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ed. Atheneu Editora São Paulo LTDA, 2008.

PAN, Z.; NEWCOMB, M. Kinetics and mechanism of oxidation reactions of porphyrin-iron(IV)-oxo intermediates. **Inorganic Chemistry**. v. 46, n. 16, p. 6767-6774, 2007.

PEARSON, P.G.; WIENKERS, L.C. **Handbook of Drug Metabolism**. 2ed. Informa Healthcare USA, 2008.

PERROT, S., et al. Resazurin metabolismo assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. **Toxicological Sciences**. v. 72, n. 1, p. 122-129, 2003.

POPIOLEK-BARCZYK, K., et al. Parthenolide relieves pain and promotes M2 microglia/macrophage polarization in rat modelo f neuropathy. **Neural Plasticity**. v. 2015, p- 1-15, 2015.

PRASAD, B., et al. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 30, n. 2, p. 360-337, 2011.

REEDIJK, J.; BOUWMAN, E. **Bioinorganic Catalysis**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 1999.

ROCHA, B. A., et al. Jacobsen catalyst as a cytochrome P450 biomimetic model for the metabolismo of a monensin A. **BioMed Research International**. v. 2014, p.1-8, 2014.

ROLÓN, M., et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanossoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**. v.99, n. 2, p. 103-107, 2006.

SANTOS, J.S., et al. Biomimetic simazine oxidation catalyzed by metalloporphyrins. **Applied Catalysis A: General**. v. 408, n. 1-2p. 163-170, 2011.

SANTOS, M.D.; LOPES, N.P. HPLC-ESI-MS/MS analysis of oxidized di-caffeoylquinic acids generated by metalloporphyrin-catalyzed reactions. **Química Nova**. v. 31, n. 4, p. 767-770, 2008.

SCHAAB, E.H. **Estudos oxidativos biomiméticos com os produtos naturais piperina e pipartina**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2008.

SIGMA-ALDRICH. Certificate of Analysis – Parthenolide (Product Number: P0667 Batch Number: MKBS4351V). Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/COFA/P0/P0667/P0667-BULK_MKBS4351V_.pdf>. Acesso em: 20 outubro 2014.

SINZ, M.A. *In vitro* and *in vivo* models of drug metabolism. In LYUBIMOV, A.V. **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. 1 ed, John Wiley & Sons, 2012.

THUMMEL, K.E.; KUNZE, K.L.; SHEN, D.D. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 27, p. 99-127, 1997.

TIUMAN, T.S., et al. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**. v. 49, n. 1, p. 176-182, 2005.

TIUMAN, T.S., et al. Cell death in amastigote forms of *Leishmania amazonensis* induced by parthenolide. **BMC Microbiology**. v. 14, p. 152, 2014.

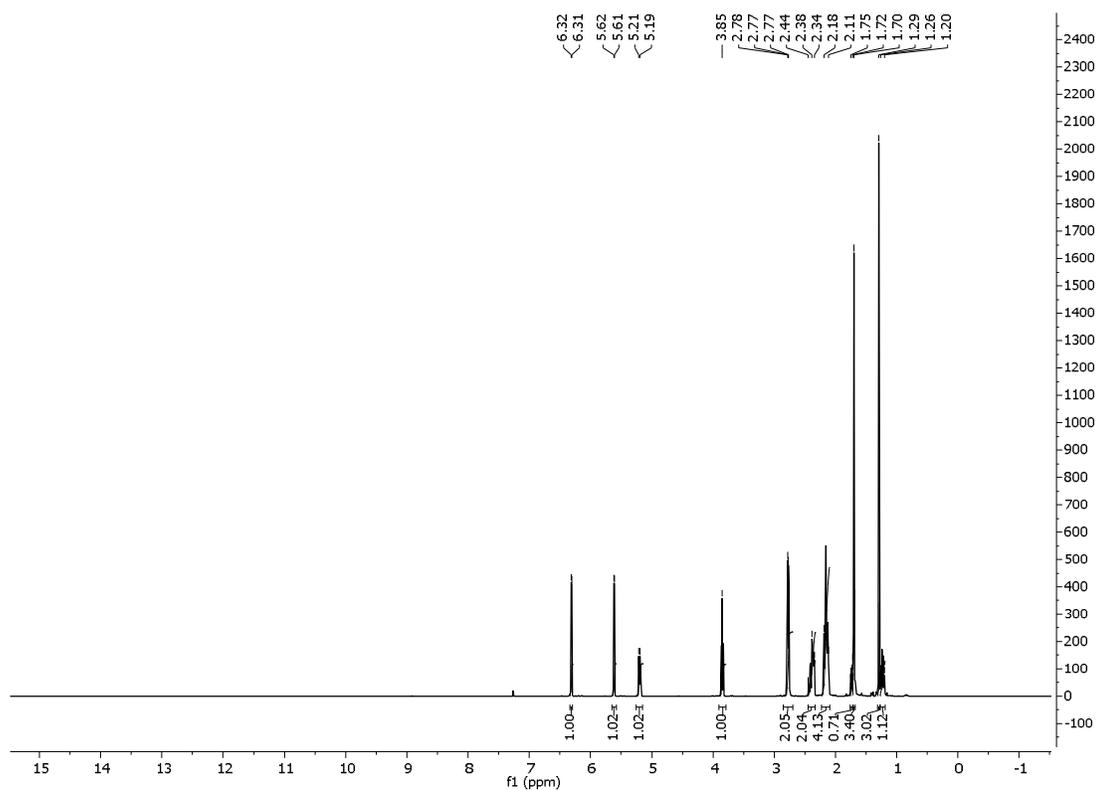
THOMAZZI, S.M., et al. Formation of a predominant metabolite of hydroxydihydrocarvone evaluated by a biomimetic oxidative model and in rat liver microsomes. **Planta Medica Letters**. v. 2, p. e61-e64, 2015.

VENKATARAMANAN, N.S.; KUPPURAJ, G.; RAJAPOGAL, S. Metal–salen complexes as efficient catalysts for the oxygenation of heteroatom containing organic compounds—synthetic and mechanistic aspects. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 249, p. 1249-1268, 2005.

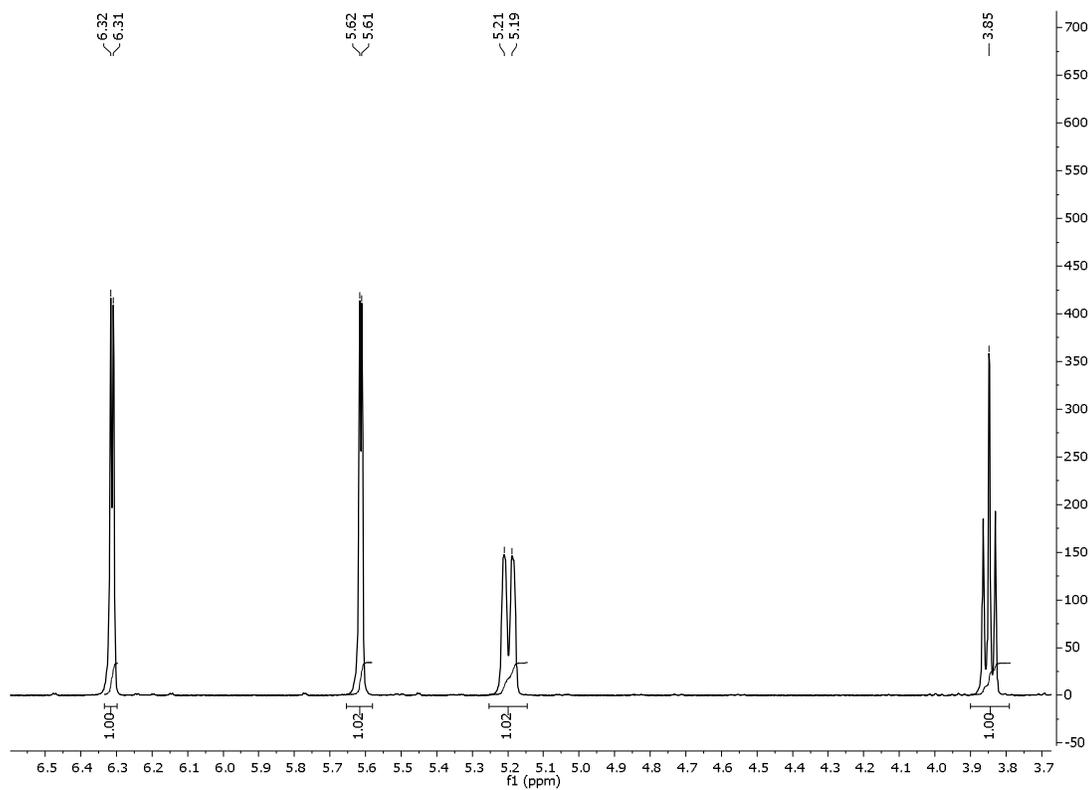
HOLBACH, M.; WECK, M. Modular approach for the development of supported, monofunctionalized, Salen catalysts. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 71, n. 5, p. 1825-1836, 2006.

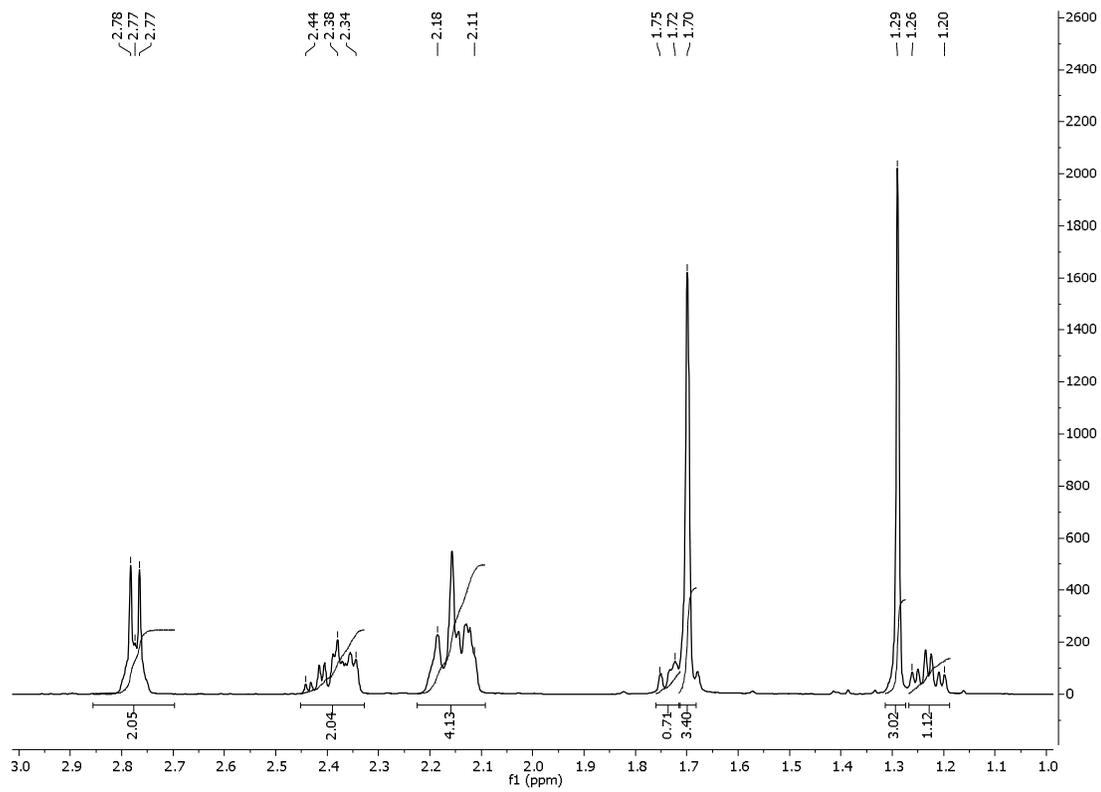
ZHAO, A-Q., et al. Determination of parthenolide in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 119, n. , p. 99-103, 2016.

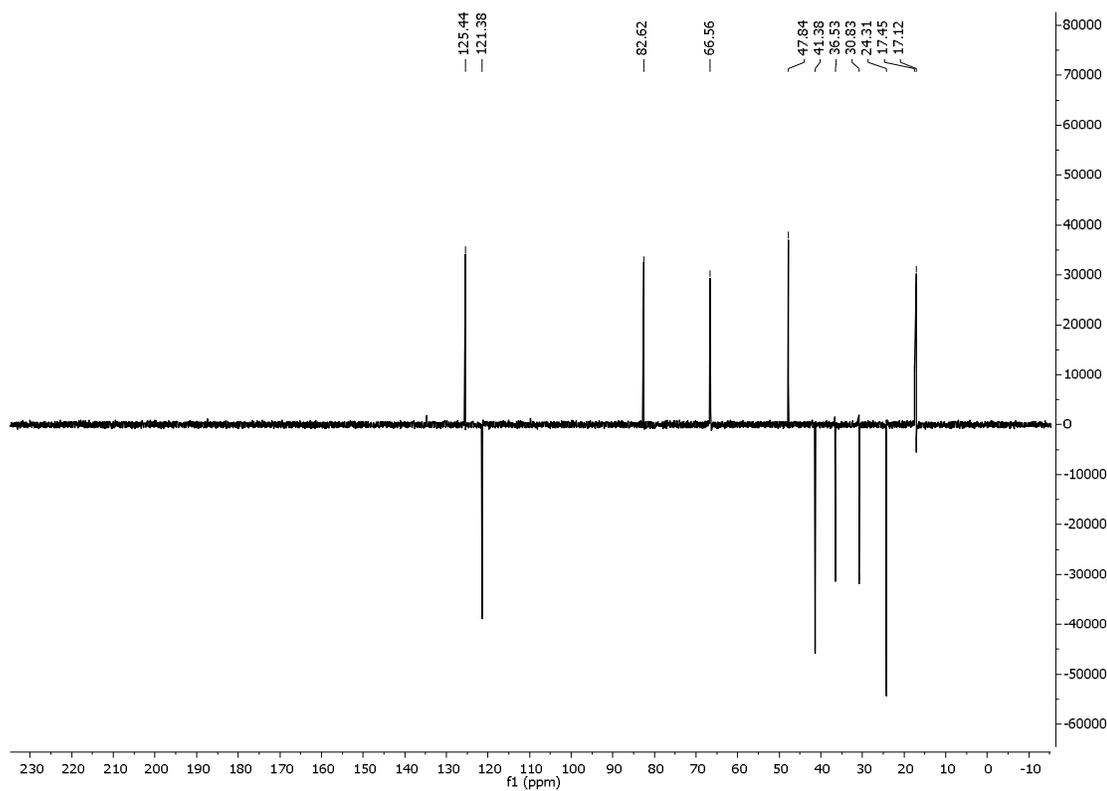
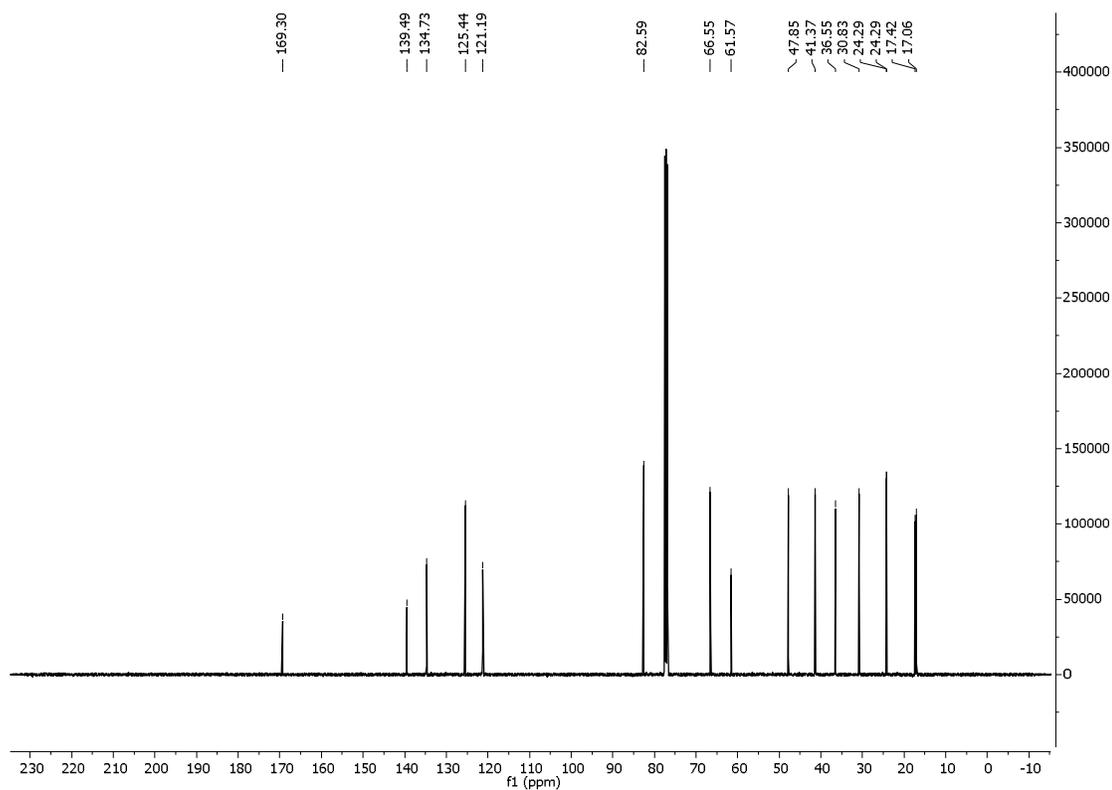
ANEXO 1
ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
DO PARTENOLÍDEO

ANEXO 1A – ESPECTROS DE ^1H 

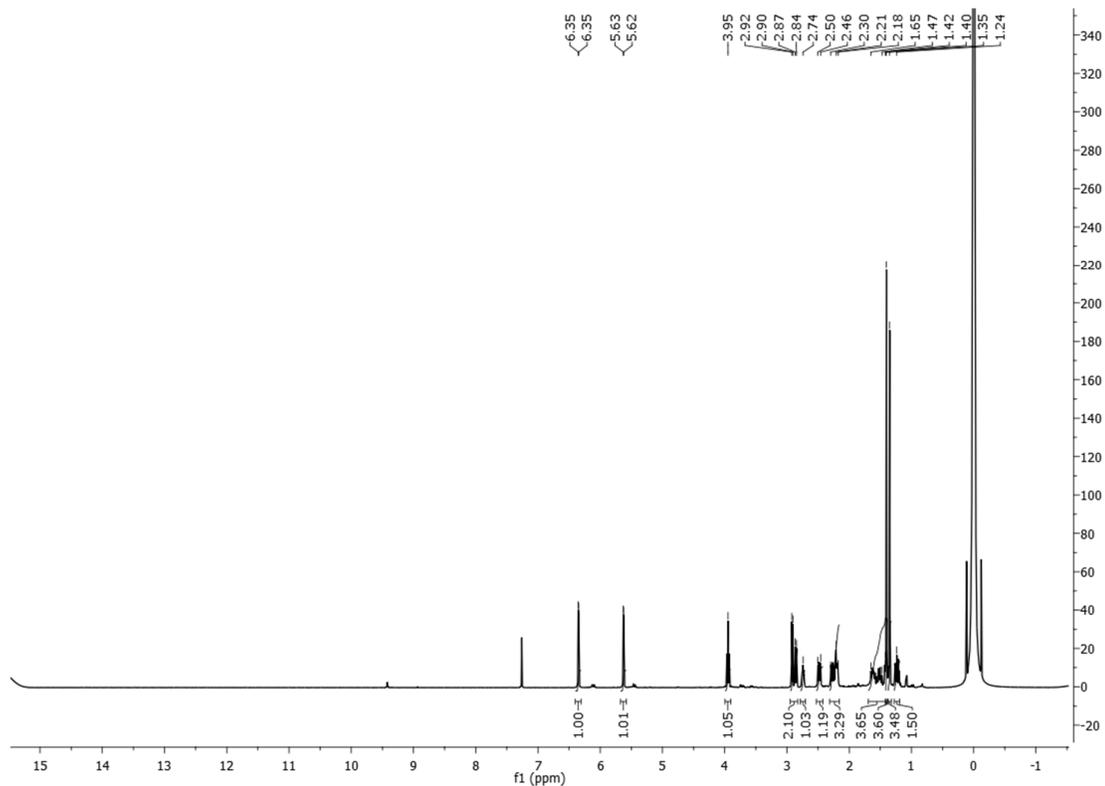
ZOOM 1 (3,7 – 6,5 ppm)



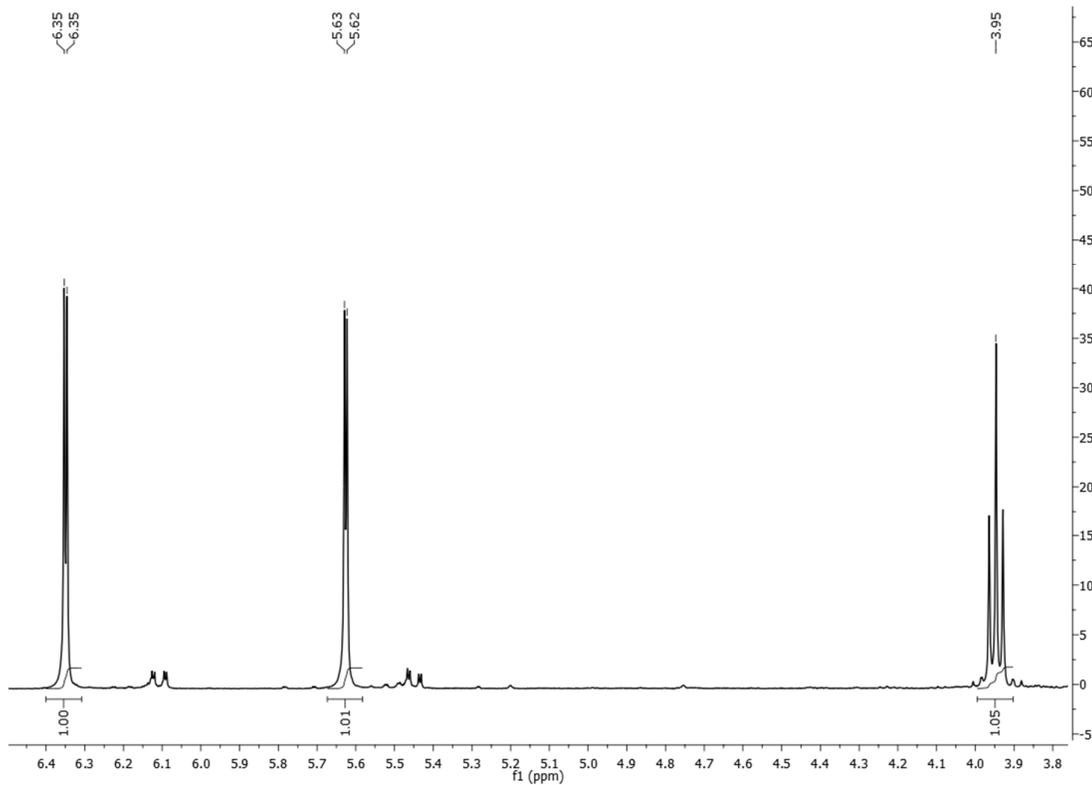
ZOOM 2 (1,0 – 3,0 ppm)

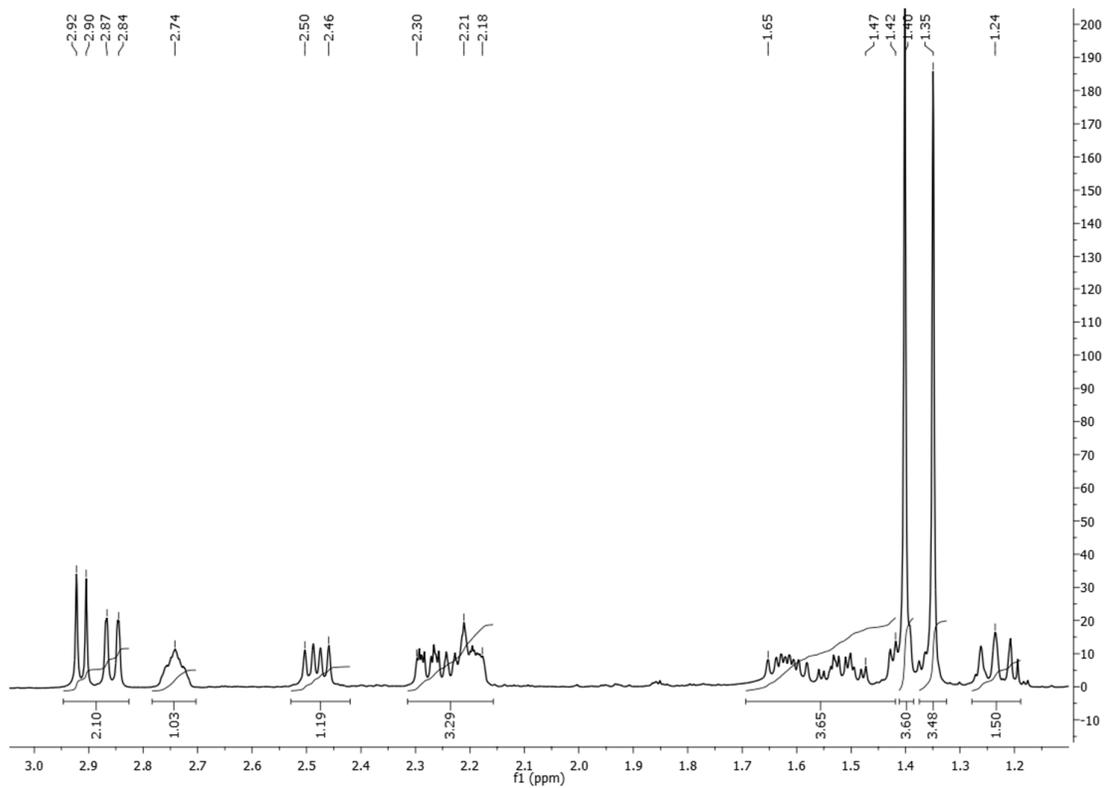
ANEXO 1B – ESPECTROS DE ^{13}C E DEPT-135

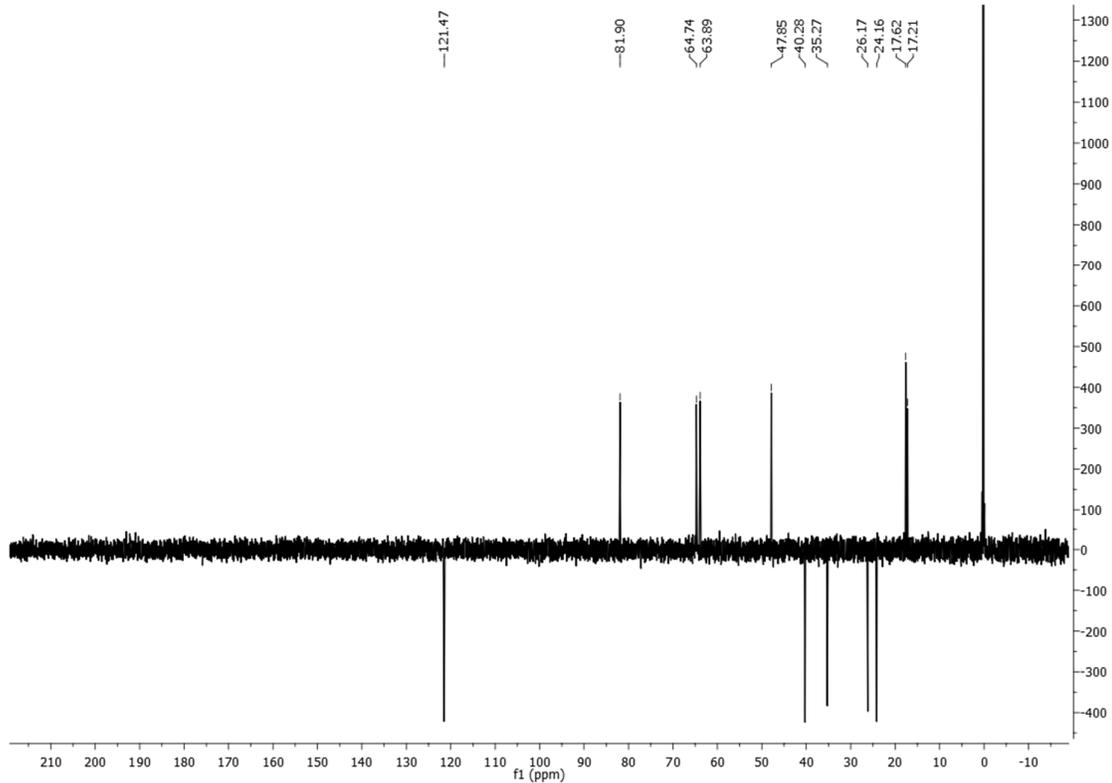
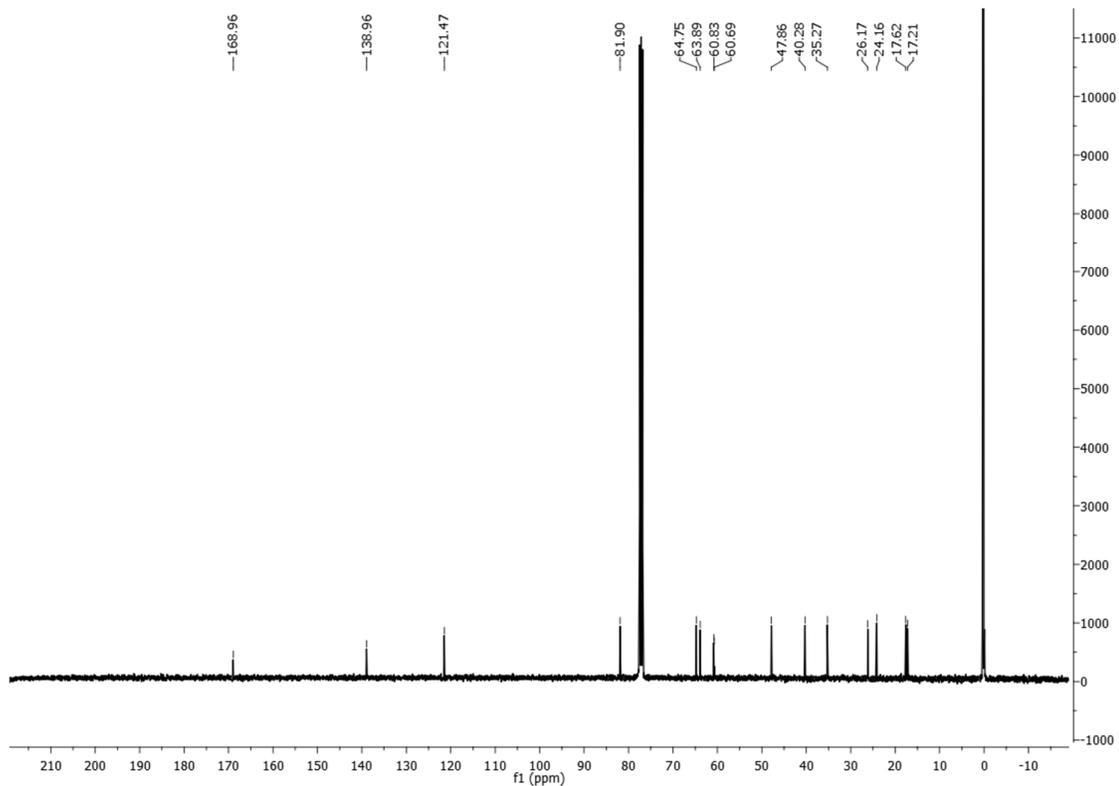
ANEXO 2
ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
DO METABÓLITO 1,10-EPÓXI-PARTENOLÍDEO

ANEXO 2A – ESPECTROS DE ^1H 

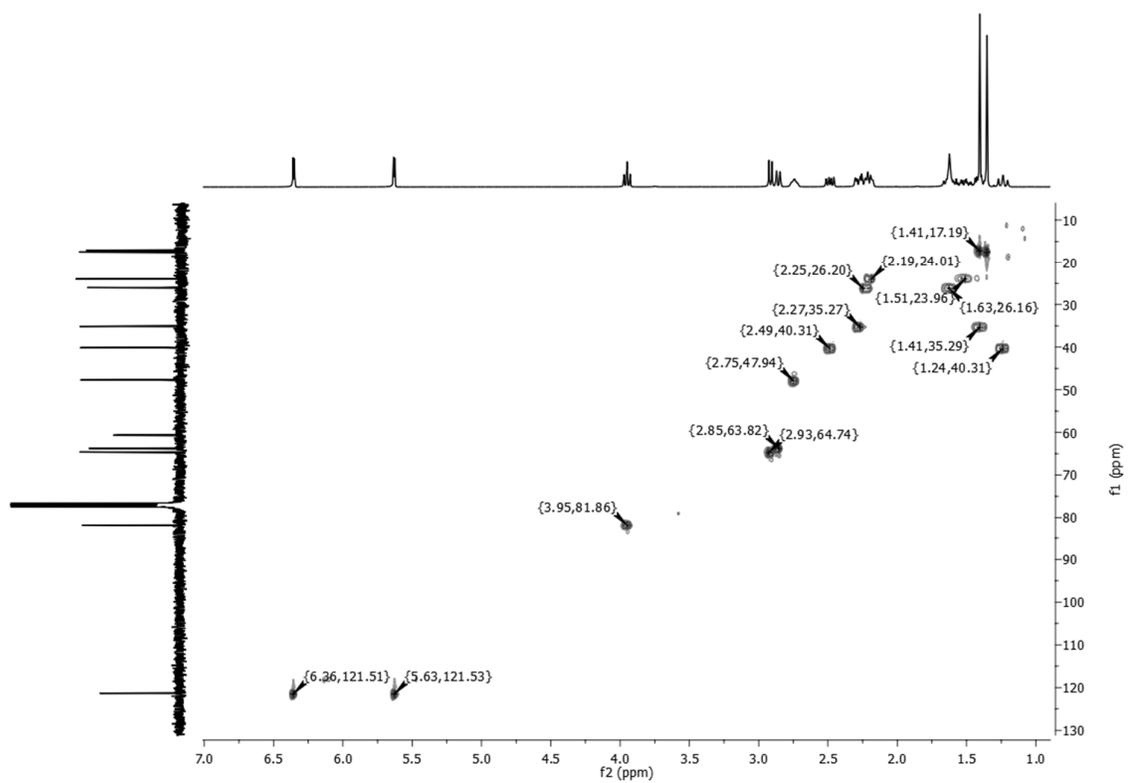
ZOOM 1 (3,7 – 6,5 ppm)



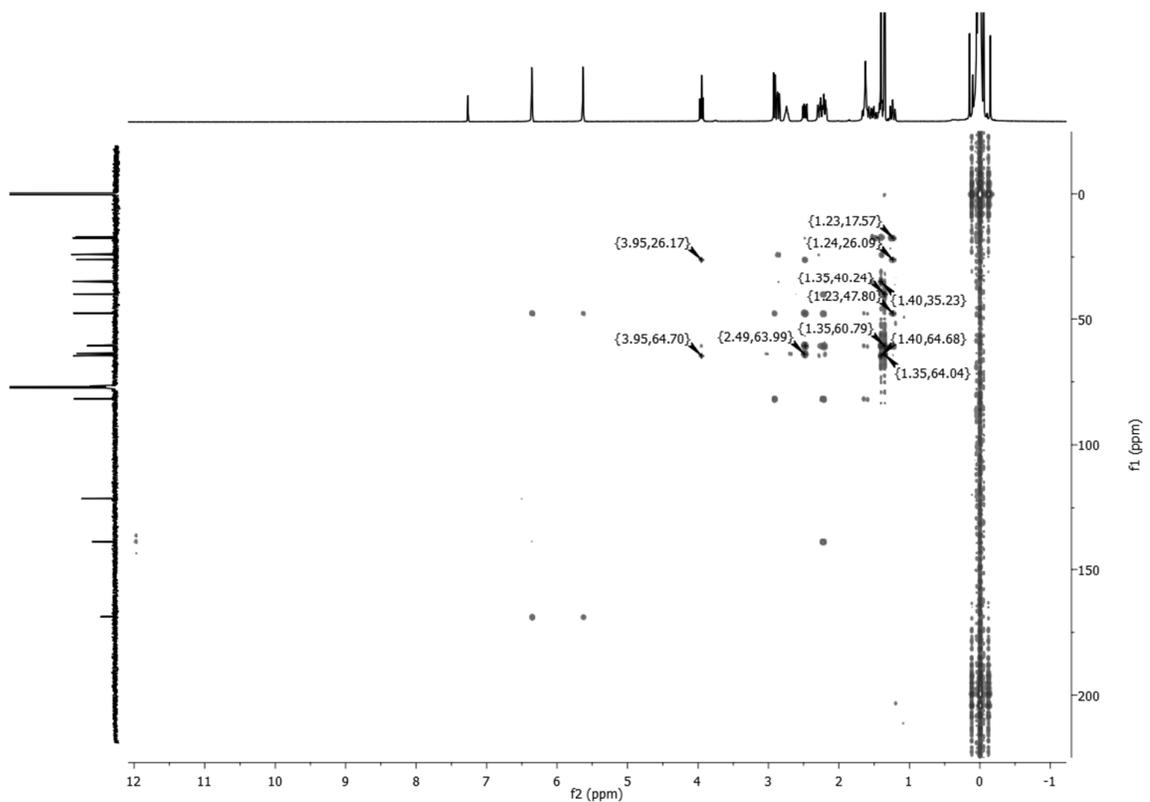
ZOOM 2 (1,0 – 3,0 ppm)

ANEXO 2B – ESPECTROS DE ^{13}C E DEPT-135

ANEXO 3B – MAPA DE CONTORNO DE HSQC



ANEXO 4B – MAPA DE CONTORNO DE HMBC



ZOOM 1

