UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X

Rodrigo Moreira da Silva

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Rodrigo Moreira da Silva
Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani
Coorientador: Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 14/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

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.

Moreira da Silva, Rodrigo
Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X. Ribeirão Preto, 2016.
120 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.
Orientadora: Gaitani, Cristiane Masetto.

1. casearina X. 2. Metabolismo in vitro. 3. Microssomas. 4. Permeabilidade in vitro. 5. Caco-2.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo Moreira da Silva
Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr_____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição: _____ Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a minha orientadora Profa. Dra. **Cristiane Masetto de Gaitani** por me receber como aluno, pela orientação neste trabalho e na vida profissional, pelos ensinamentos, conselhos, incentivo, paciência e atenção, que foram essenciais para minha formação. Obrigado pela confiança, especialmente pela liberdade de poder tentar e errar e investigar e descobrir.

Ao meu coorientador Prof. Dr. **Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira** pela orientação e amizade. Obrigado pela parceria, pelo incentivo, apoio e aprendizado durante esses anos. Sempre me lembrarei do seu exemplo como orientador, profissional e amigo.

Ao Prof. Dr. **Norberto Peporine Lopez** pela colaboração no projeto, pelo apoio e incentivo. Obrigado por me ajudar a trilhar novos caminhos e pelas portas sempre abertas. Ao Prof. Dr. **Alberto José Cavalheiro**, da UNESP por ter cedido a casearina X para a nossa pesquisa.

À minha orientadora no doutorado sanduíche na Suíça, Profa. Dra. **Veronika Butterweck**, pela oportunidade de me aventurar em outras esferas da ciência, pelas nossas discussões e descobertas que transformaram as dificuldades em um desafio intrigante. Agradeço também ao Prof. Dr. **Georgios Imanidis** pela troca de experiências, atenção e disponibilidade em ajudar.

A todos os professores que tive no doutorado, pela excelência nos ensinamentos em aula e pelo exemplo de docência. Um agradecimento especial às minhas supervisoras no Programa de Aprimoramento de Ensino na Toxicologia, Prof. Dr. **Regina Helena Costa Queiroz** e Prof. Dra. **Vera Lúcia Lanchote**.

A todos os colegas do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos, da FCFRP. Um agradecimento especial a **Aline Ishikawa** e **Luiza Saldanha** pela parceria e amizade. Obrigado **Fernando Armani**, **Jennifer Yokoya**, **Letícia Schiave** e **Luciana Lourenço** pelo ótimo convívio e pela amizade, dentro e fora do lab. Muito obrigado **Mariana Barbieri**, pelo cuidado e atenção, pela amizade e pela sua alegria. Você é especial.

A todos os colegas do Laboratório de Metabolismo In Vitro e Técnicas de Separação, da FFCLRP. Agradeço especialmente aos amigos **Bruno Rocha**, **Daniel Carrão**, **Nayara Albuquerque** e **Simone Fortes**, pelo apoio no trabalho e parceria na vida. Admiro muito vocês e me sinto honrado pela nossa amizade. Muito obrigado caro **Lucas Maciel**, pela amizade, apoio e auxílio práticos nas técnicas de MS.

Aos funcionários da FCFRP, pelo excelente trabalho que realizam e pelo cuidado e atenção altruísta que dispensam a nós. Um agradecimento especial à **Rosemary Ioshimine** da Pós-Graduação, **David Vieira** e **Karina Stefani** do Apoio Acadêmico e aos técnicos **Luís Fernando**, **Tiago Cavassani**, **Jacqueline Mendonça** e **José Carlos Tomaz**.

A todos os colegas do *Institut für Pharmatechnologie, Fachhochschule Nordwestschweiz*, em especial aos amigos **Alexandra Machado**, **Andreas Halsteen**, **Barbora Durciova**, **Camille Adler, David Hilber**, **Elisabetta Corradi**, **Jonas Wedler**, **Katerina Simková**, **Kira Nultsch**, **Martin Novak**, **Sheela Verjee**, **Tarik Cheema** e **Wiebke Kirchmeyer**. Foi maravilhoso fazer parte dessa equipe multicultural. Vielen dank!

Aos amigos **Priscila Jordt Evangelista** e **Wolfram Schwarz**, que participaram da minha fase fora do Brasil, me acolheram e tornaram minha estadia na Suíça mais do que especial. Muito obrigado pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos amigos de Ouro Preto que reencontrei em Ribeirão Preto. Obrigado **Ivanildes Vasconcelos**, por me "trazer" para a USP e pela amizade; **Juju Neves**, **Fillipe Leotardo**, **Lu Marcelino** pela amizade e união, pelos *rocks* em casa, sempre os melhores. Especialmente **Paty Goto**, que também me "trouxe" para a USP, amiga para sempre; obrigado pelo cuidado, carinho, preocupação, pelas alegrias, risadas e os melhores momentos em Ribeirão Preto. Obrigado pelo nosso Tufão e por tudo o que compartilhamos no dia a dia.

À minha família, meu pilar e razão de viver: meus pais, **Marília** e **Itamar**, meus irmãos **Renata** e **Rogério**, meus sobrinhos **Raphaela** e **Vitor** e à **Vanilda**. Obrigado pelo amor e apoio incondicional. Aos amigos do peito **Hélcio** e **Cris**, pelo incentivo, apoio e carinho. À **Regina** e **João**, sempre preocupados comigo, **Val**, irmã pra sempre, **William**, grande amigo, **Pablo**, meu afilhado mais legal, ainda vou te roubar pra mim, **Joãozinho**, uma vitória em forma de bebê, **Vanessa** e **Gabriel**, **Fernanda**, **Felipe** e **Francisco**. Aos velhos amigos **Marlon**, **Marcos**, **Well**, **Sula, Flávia, André** e **Milene**, para a vida inteira. Aos novos amigos, em especial ao **Felipe Miguel**. Aos eternos **Wal** e **Marquinho**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar este trabalho.

À **FAPESP**, principal financiadora do projeto (processo n. 2012/03446-7), à **CAPES**, **CNPq** e Pró-reitora de Pós-Graduação da **USP** pelo suporte financeiro e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (**PDSE**), pelo financiamento do estágio realizado na Suíça.

RESUMO

MOREIRA DA SILVA, R. **Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X**. 2016. 120f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As principais propriedades farmacológicas da *Casearia sylvestris*, uma espécie de árvore cujas folhas são utilizadas na medicina popular, já foram descritas na literatura. Recentemente foi demonstrada a potente atividade citotóxica in vitro da casearina X (CAS X), o diterpeno clerodânico majoritário isolado das folhas de *C. sylvestris*, contra linhagens de células tumorais humanas. Apesar dos resultados promissores, sua potente atividade citotóxica in vitro não pode ser extrapolada para uma potente atividade in vivo, a menos que possua boa biodisponibilidade e duração desejável do seu efeito. Tendo em vista que o avanço nas pesquisas de produtos naturais requer a avaliação pré-clínica de propriedades farmacocinéticas, no presente trabalho foi realizada a caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da CAS X, com o objetivo de prever sua biodisponibilidade in vivo. Para os estudos de metabolismo in vitro, foi utilizado o modelo microssomal hepático de ratos e de humanos. Foi desenvolvido um método analítico para a quantificação da CAS X em microssomas, empregando a precipitação de proteínas com acetonitrila no preparo das amostras e a cromatografia líquida de alta eficiência para as análises. O método foi validado de acordo com os guias oficiais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e da *European Medicine Agency* (EMA). A CAS X demonstrou ser substrato para as reações de hidrólise mediada pelas carboxilesterases (CES) e apresentou um perfil cinético de Michaelis-Menten. Foram estimados os parâmetros de V_{max} e K_M, demonstrando que o *clearance* intrínseco em microssomas hepático de humanos foi 1,7 vezes maior que o de ratos. O *clearance* hepático foi estimado por extrapolação in vitro-in vivo, resultando em mais de 90% do fluxo sanguíneo hepático em ambas as espécies. Um estudo qualitativo para a pesquisa de metabólitos foi feito utilizando espectrometria de massas, pelo qual foi possível sugerir a formação da casearina X dialdeído como produto de metabolismo. Nos estudos de absorção intestinal in vitro foi utilizado o modelo de monocamadas de células Caco-2. Um método analítico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi desenvolvido e validado de acordo com o EMA, para as etapas de quantificação da CAS X no sistema de células. Os parâmetros cinéticos de permeabilidade aparente absortiva e secretória da CAS X foram estimados em um sistema celular, no qual a atividade hidrolítica da CES foi inibida. Assim, a CAS X foi capaz de permear a monocamada de células Caco-2, provavelmente por transporte ativo, sem a ocorrência de efluxo, mas com significativa retenção do composto dentro das células. Em conjunto, os ensaios in vitro realizados demonstraram a susceptibilidade da CAS X ao metabolismo de primeira passagem, como substrato para as CES específicas expressas no fígado e intestino.

Palavras-chave: casearina X, metabolismo in vitro, microssomas hepáticos, permeabilidade in vitro, Caco-2

ABSTRACT

MOREIRA DA SILVA, R. ***In vitro* characterization of metabolism and intestinal absorption of casearin X**. 2016. 120p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Casearia sylvstris leaves are commonly used by folk medicine and its main pharmacological properties were already described in the literature. Casearin X (CAS X) is the major clerodane diterpene isolated from the leaves of *C. sylvestris*. Recently, the *in vitro* cytotoxic activity of the CAS X was demonstrated against human tumor cells lineages. Despite promising results, the CAS X *in vitro* cytotoxic activity cannot be extrapolated to an *in vivo* activity, unless the compound has good bioavailability and desirable duration of its effect. The advance in natural products research requires a pharmacokinetic preclinical assessment to justify a therapeutic indication. Thereby, this present work aims to predict the CAS X *in vivo* bioavailability, by the *in vitro* characterization of the metabolism and intestinal absorption. The rat and human hepatic microsomal model was used for *in vitro* metabolism studies. An analytical method for quantification of CAS X in microsomes was developed, employing protein precipitation with acetonitrile for sample preparation and High Performance Liquid Chromatography for analysis. This method was validated in according to *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* and European Medicine Agency guidelines (EMA). CAS X demonstrated to be substrate for carboxylesterases (CES) by hydrolysis reaction, with a Michaelis-Menten kinetic profile. The parameters V_{max} and K_M was estimated and the intrinsic clearance was 1.7-fold higher in humans than rats. The hepatic clearance was estimated by in vitro-in vivo extrapolation, resulting in more than 90% of the hepatic blood flow for both species. A qualitative study was carried out for the metabolite identification, using Mass Spectrometry, suggesting the formation of casearin X dialdehyde as metabolism product. Monolayer of Caco-2 cells was used for the *in vitro* intestinal absorption studies. An analytical method by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry was developed and validated, according to EMA, for the quantification of CAS X in cells systems. The apparent permeability was estimated in both, absorptive and secretory directions, using cells monolayers with inhibited CES hydrolysis. CAS X was able to cross the Caco-2 cells monolayer, probably by active transport, with no significant efflux, but with a high retention of the compound inside the cells. These findings demonstrated that CAS X is susceptible to first-pass metabolism, as substrate for specific CES expressed in both, liver and intestine.

Keywords: casearin X, in vitro metabolism, hepatic microsomes, in vitro permeability, Caco-2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substituintes das casearinas A–X. 4

Figura 2. Estrutura química da CAS X..... 14

Figura 3. Delineamento experimental para determinar as condições de ensaio da CAS X em meio microssomal..... 16

Figura 4. Condições cromatográficas para análise da CAS X por HPLC. 21

Figura 5. Cromatograma referente à análise da CAS X na concentração de 25 µg/mL. Condições cromatográficas: vide **Figura 4**. 21

Figura 6. Avaliação da estabilidade de CAS X à 37 ºC. Média (DP), n = 3. 22

Figura 7. Solubilidade da CAS X (100 µg/mL) em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 com e sem adição de agentes solubilizantes. 23

Figura 8. Estrutura química da licarina-A 25

Figura 9. Cromatograma referente à análise da CAS X e o PI licarina-A, na concentração de 10 e 15 µg/mL, respectivamente. Condições cromatográficas: vide **Figura 4**. 26

Figura 10. Perfis de metabolismo *in vitro* da CAS X em microssomas hepático de (A) ratos e (B) humanos, na presença e na ausência de cofatores (NADPH), ou com adição do inibidor enzimático de esterases NaF. 26

Figura 11. Porcentagem de erro padrão relativo (EPR%) *versus* concentração obtida para os modelos de regressão linear dos mínimos quadrados (A) não ponderado e (B) ponderado com peso 1/x. 33

Figura 12. Curva de calibração do método analítico, referente à linearidade, para quantificação da CAS X em microssomas hepático de ratos. 34

Figura 13. Cromatogramas superpostos referentes às análises de meio microssomal branco comparado ao perfil cromatográfico da CAS X no LIQ (0,10 µg/mL) e PI (15,0 µg/mL) em meio microssomal. 35

Figura 14. Curva de calibração do método analítico, referente à linearidade, para quantificação da CAS X em microssomas hepático humano. 37

Figura 15. Gráfico representativo de uma reação enzimática segundo a cinética de Michaelis-Menten. V_{max}, velocidade máxima; [S], concentração de substrato; K_M, constante de Michaelis-Menten. 45

Figura 16. Otimização do tempo de incubação de (A) 1µg/mL, (C) 10 µg/mL e (E) 100 µg/mL de CAS X com microssomas hepáticos de ratos e (B) 1 µg/mL, (D) 10 µg/mL e (F) 100 µg/mL de CAS X com microssomas hepático de humanos (n = 3). 51

Figura 17. Otimização da concentração de proteínas microssomais hepática de ratos com (A) 1 µg/mL, (C) 10 µg/mL e (E) 100 µg/mL de CAS X e otimização da concentração de proteínas microssomais hepática de humanos com (B) 1 µg/mL, (D) 10 µg/mL e (F) 100 µg/mL de CAS X (n = 3). 53

Figura 18. Representação gráfica das curvas de Michaelis-Menten para a cinética enzimática da CAS X com microssoma hepático de (A) ratos e (B) humanos (n = 3). 54

Figura 19. Cromatogramas superpostos referente às análises de uma amostra de metabolismo in vitro da CAS X com microssomas hepático de ratos, uma amostra controle e uma amostra branca, extraídas com acetato de etila. 62

Figura 20. Espectro de massas do produto de metabolismo da CAS X, obtido na ionização por *electrospray* e analisador *ion trap* (LC-ESI-MS-IT). 63

Figura 21. Reação de degradação da CAS X (A) com formação da casearina X dialdeído (B) na presença de clorofórmio (Santos et al., 2010). 63

Figura 22. Espectro de massas MS^2 (*ion trap*) do produto de metabolismo in vitro da CAS X (ESI, 0,6 V, modo positivo). 64

Figura 23. Proposta da rota de fragmentação do metabólito da CAS X obtido no metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos. 64

Figura 24. Espectro de massas de alta resolução do produto de metabolismo in vitro da CAS X com microssomas hepático de ratos (MS-ESI-Q-TOF, modo positivo). 65

Figura 25. Representação esquemática do sistema para avaliação da permeabilidade in vitro em monocamada de células Caco-2. 70

Figura 26. Citotoxicidade dose-dependente da CAS X em células Caco-2 após 5 h de incubação a 37 ºC. Significância estatística: *** $p < 0,05$ vs. controle; n = 18. 78

Figura 27. Cromatograma de íons extraídos referente a análise da CAS X na concentração de 2 µM, obtido por ionização por *electrospray* e analisador quadrupolo. Condições de análise: vide item **2.7**. 80

Figura 28. Distribuição da CAS X em diferentes compartimentos dos sistemas de monocamadas de células Caco-2 (A) intactas e (B) tratadas com BNPP, dos ensaios de transporte absortivo (n = 3). 82

Figura 29. Perfis de permeabilidade absortiva da CAS X (2 µM) em (A) monocamadas de células Caco-2 intactas e (B) tratadas com 200 µM de BNPP (n = 3). 83

Figura 30. Distribuição da CAS X em diferentes compartimentos dos sistemas de monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com BNPP nos ensaios de transporte secretório (n = 3). 84

Figura 31. Perfis de permeabilidade secretório da CAS X (2 µM) em monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com 200 µM de BNPP (n = 3). 85

Figura 32. Perfil de hidrólise da CAS X incubada com a isoforma hCE-2 de carboxilesterase a 37 ºC por 30 minutos (n = 3). 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da CAS X 15

Tabela 2. Porcentagens de recuperação da ELL e PP no preparo das amostras microssomais hepática de ratos contendo CAS X. Média (DP), n = 3. 25

Tabela 3. Definição das condições de ensaio da CAS X para os estudos de metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos e de humanos. 27

Tabela 4. Concentrações de CAS X em meio microssomal. 30

Tabela 5. Parâmetros da curva de calibração e a respectiva soma de erro padrão relativo obtido para cada peso de ponderação da regressão linear (n = 24). 33

Tabela 6. ANOVA unilateral para o modelo linear dos mínimos quadrados ponderado e para o teste da falta de ajuste (*Lack of Fit*), com nível de significância *p* = 0,05. 34

Tabela 7. Precisão e exatidão intra e inter-corrida (n = 5). 35

Tabela 8. Precisão e exatidão intra-corrida obtidas em meio microssomal hepático humano (n = 5). 37

Tabela 9. Efeito de inibidores de esterases no metabolismo in vitro da CAS X (10 μM) incubada com microssomas hepático de ratos (0,5 mg/mL) e humano (0,25 mg/mL) por 5 min à 37 ºC. Média (DP), n = 3. 41

Tabela 10. Valores de concentração em μM e μg/mL de CAS X utilizadas nos experimentos de cinética enzimática com microssomas hepático de ratos e de humanos. 48

Tabela 11. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos para a extrapolação in vitro-in vivo dos dados de Cl_{int} in vitro da CAS X. 49

Tabela 12. Parâmetros cinéticos de metabolismo *in vitro* da CAS X com microssomas hepático de ratos e humanos. Média (DP), n = 3. 54

Tabela 13. *Clearance* hepático da CAS X obtido por extrapolação in vitro-in vivo pelo modelo farmacocinético "*well-stirred*", sem correção para ligações proteicas (Obach et al., 1997) e porcentagem de fluxo sanguíneo hepático correspondente. 57

Tabela 14. Dados de massa exata observadas no espectro de massas da CAS X e seu metabólito obtido in vitro com microssomas hepático de ratos (MS-ESI-Q-TOF, modo positivo). 65

Tabela 15. Relação estrutura-atividade citotóxica da CAS X e casearina X dialdeído. 66

Tabela 16. Parâmetros de validação do método para quantificação da CAS X nas diferentes soluções tampão de transporte usados nos experimentos de permeabilidade in vitro com células Caco-2. 79

Tabela 17. Valores de TEER ($\Omega \cdot cm^2$) das monocamadas de células Caco-2 no tempo zero e após 2 h de incubação com a CAS X. Média (DP), n = 3. 81

Tabela 18. Recuperação total da CAS X (%) obtida nos ensaios de transporte absortivo realizados com monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com inibidor de CES. 82

Tabela 19. Recuperação total da CAS X obtida nos ensaios de transporte secretório realizados com monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com BNPP. Média (DP), n = 3. 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	adenosina trifosfato
CAS X	casearina X
Cef	coeficiente de efluxo
CES	carboxilesterases
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
$CHCl_3$	Clorofórmio
Cl_{int}	*clearance* intrínseco
Cl_H	*clearance* hepático
CQB	controle de qualidade de concentração baixa
CQM	controle de qualidade de concentração média
CQA	controle de qualidade de concentração alta
CV	coeficiente de variação
CYP 450	citocromo P450
DAD	detector por arranjo de diodos
DE_{50}	dose efetiva média
DL_{50}	dose letal média
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
E	Enzima
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELL	extração líquido-líquido
EMA	Agência Europeia de Medicamento (do inglês: *European Medicine Agency*)
EPR	erro padrão relativo
ES	complexo enzima-substrato
ESI	ionização por *electrospray*
FBS	soro fetal bovino (do inglês: *fetal bovine serum*)
FDA	Administração de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos (do inglês: *Food and Drug Administration*)

HBSS	solução salina balanceada de Hank (do inglês: *Hank´s Balanced Salt Solution*)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*)
hCE-1	carboxilesterase tipo 1
hCE-2	carboxilesterase tipo 2
IC_{50}	concentração inibitória média (do inglês: *half maximal inhibitory concentration*)
K_M	constante de Michaelis-Menten
Ks	constante de equilíbrio
Kp	constante de catálise
LC-ESI-MS-IT	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com ionização por *electrospray* e analisador sequencial *ion trap*
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês: *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*)
LIQ	limite inferior de quantificação
LSQ	limite superior de quantificação
MEM	solução de aminoácidos não essenciais (do inglês: *minimum essential medium*)
MS	Espectrometria de Massas (do inglês: *Mass Spectrometry*)
MS-ESI-Q-TOF	Espectrometria de Massas com ionização por *electrospray* e analisador do tipo quadrupolo - tempo de voo
MTBE	éter metil-terc-butílico
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
m/z	razão massa carga
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina
P	Produto
P_{app}	permeabilidade aparente
PBS	solução tampão fosfato salina (do inglês: *phosphate buffered saline*)
P-gp	glicoproteína P
PI	padrão interno
PP	precipitação de proteínas
Q-TOF	analisador de massas do tipo quadrupolo – tempo de voo
r	coeficiente de correlação
r^2	coeficiente de determinação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Substrato

[s]	concentração do substrato
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SIM	monitoramento de íon seletivo (do inglês: *selective ion monitoring*)
TEER	resistência elétrica transepitelial (do inglês: *transendothelial electrical resistance*)
TOF	analisador de massas tipo tempo de voo
v	velocidade da reação enzimática
V_0	velocidade inicial
V_{max}	velocidade máxima da reação enzimática
WHO	Organização Mundial de Saúde (do inglês: *World Heath Organization*)

SUMÁRIO

RESUMO.....i

ABSTRACT ii

LISTA DE FIGURAS.....iii

LISTA DE TABELAS.....v

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS vi

INTRODUÇÃO 1

1. Estudos farmacológicos e toxicológicos da *Casearia sylvestris* e da casearina X.....2
2. Estudos farmacocinéticos de moléculas bioativas 6
   2.1. Estudos de metabolismo in vitro.....7
   2.2. Estudos de absorção intestinal in vitro.....8

OBJETIVOS 11

1. Objetivo geral.....12
2. Objetivos específicos.....12

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA CASEARINA X POR HPLC E DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA OS ESTUDOS DE METABOLISMO IN VITRO EM MODELO MICROSSOMAL

1. INTRODUÇÃO 14

2. MATERIAL E MÉTODOS 16

   2.1. Definição das condições para análise da CAS X por HPLC 16
   2.2. Avaliação da estabilidade da CAS X a 37 ^{0}C.....17
   2.3. Avaliação da solubilidade da CAS X em meio fisiológico.....17
   2.4. Microssomas hepático de ratos 18
   2.5. Microssomas hepático humano.....19
   2.6. Procedimento de preparo das amostras.....19
      2.6.1. Extração líquido-líquido (ELL).....19
      2.6.2. Precipitação de proteínas (PP).....20
   2.7. Avaliação preliminar de metabolismo in vitro.....20

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 21

3.1. Definição das condições de análise da CAS X por HPLC 21
3.2. Avaliação da estabilidade da CAS X à 37 ºC 22
3.3. Avaliação da solubilidade da CAS X em meio fisiológico 22
3.4. Procedimento de preparo da amostra 23
3.5. Avaliação preliminar de metabolismo in vitro 26

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DA CASEARINA X EM MEIO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS E DE HUMANOS

1. INTRODUÇÃO 29

2. MATERIAL E MÉTODOS 29

2.1. Validação do método para quantificação da CAS X em microssomas hepático de ratos 29
2.1.1. Linearidade 30
2.1.2. Seletividade e efeito residual 30
2.1.3. Precisão e exatidão 31
2.1.4. Estabilidade 31
2.2. Validação parcial do método para quantificação da CAS X em microssomas hepático humano 32

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 32

3.1. Validação do método para quantificação da CAS X em microssomas hepático de ratos 32
3.1.1. Linearidade 32
3.1.2. Seletividade e efeito residual 35
3.1.3. Precisão e exatidão 35
3.1.4. Estabilidade 36
3.2. Validação parcial do método para quantificação da CAS X em microssomas hepático humano 36

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO IN VITRO DA CASEARINA X PELO SISTEMA MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS E DE HUMANOS

1. INTRODUÇÃO 39

2. MATERIAL E MÉTODOS 40

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

CAPÍTULO 4

CINÉTICA ENZIMÁTICA DO METABOLISMO IN VITRO DA CASEARINA X COM MICROSSOMAS HEPÁTICO DE RATOS E DE HUMANOS

1. INTRODUÇÃO 44

2. MATERIAL E MÉTODOS 46

2.1. Otimização do tempo de incubação 47
2.2. Otimização da concentração de proteínas microssomais 47
2.3. Cinética enzimática da CAS X 48
2.4. Extrapolação in vitro-in vivo 49

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 50

3.1. Otimização do tempo de incubação 50
3.2. Otimização da concentração de proteínas 52
3.3. Cinética enzimática da CAS X 54
3.4. Extrapolação in vitro-in vivo 56

CAPÍTULO 5

PESQUISA DE METABÓLITOS DA CASEARINA X EM MEIO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS E DE HUMANOS

1. INTRODUÇÃO 59

2. MATERIAL E MÉTODOS 60

2.1. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS-IT) 61
2.2. Análise por espectrometria de massas de alta resolução (MS-ESI-Q-TOF) 62

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 62

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL IN VITRO DA CASEARINA X EM CÉLULAS CACO-2

1. INTRODUÇÃO 69

2. MATERIAL E MÉTODOS 71

2.1. Cultura de células Caco-2 71
2.2. Ensaio de toxicidade celular 71
2.3. Tratamento das células Caco-2 com inibidor de carboxilesterases 73

2.4. Ensaios de Permeabilidade in vitro 73
2.5. Balanço de massas 74
2.6. Ensaios de hidrólise enzimática 76
2.7. Análise por LC-MS 76
2.8. Análise estatística 77

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 77

3.1. Ensaio de toxicidade celular 77
3.2. Análise por LC-MS e validação 79
3.3. Ensaios de permeabilidade in vitro 80
3.3.1. Transporte absortivo da CAS X 81
3.3.2. Transporte secretório da CAS X 84
3.4. Ensaio de hidrólise enzimática 86

CONCLUSÃO 89

REFERÊNCIAS 91

INTRODUÇÃO

O gênero *Casearia* é composto por cerca de 180 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, incluindo África, Ásia, Austrália, América do Norte, América do Sul e Ilhas do Pacífico (Xia et al., 2014). Até 2006, já haviam sido descritas cerca de 70 espécies como pertencentes ao continente americano, da quais 37 estão presentes no Brasil (Carvalho, 2006).

A *Casearia sylvestris* Swartz (*Salicaceae*) é a principal espécie encontrada em diferentes ecossistemas da América do Sul, tais como a Floresta Amazônica Equatorial, a Mata Atlântica e o Cerrado. Conhecida no Brasil como "guaçatonga" e "erva de bugre" nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, ou como "café bravo" no Ceará e Paraná (Carvalho, 2006), a utilização da *C. sylvestris* na medicina popular brasileira está relacionada ao tratamento de várias doenças, mais notadamente para curar feridas dérmicas, úlceras gástricas, para promover anestesia local e como antisséptico (Hoehne, 1939; Correa, 1975; Junges; Schenkel; Simões, 1985). Foi incluída na 1º Farmacopéia do Brasil como uma espécie em destaque, com preparação à base de extrato hidroalcoólico ($EtOH/H_2O$, 1:2, v/v) obtido por percolação (1:1, m/v) (Brasil, 1926).

O relato mais antigo encontrado na literatura sobre o uso popular da *C. sylvestris* é datado de 1877 (Santos, 2008). Também há citações da sua utilização em obras clássicas brasileiras como em "Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais" (Hoeme, 1939), "O Jardim Botânico de São Paulo" (Hoeme; Kuhlmann; Handro, 1941), "Notas de Fitoterapia" (Coimbra, 1958) e no "Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas" (Correa, 1975). Com o passar dos anos, as propriedades medicinais da guaçatonga ficaram mais conhecidas e passou a ser divulgada também pela imprensa (Estadão, 2004). Hoje, é possível encontrar produtos à base de guaçatonga à venda como fitoterápico em farmácias, ervanárias, feiras e até pela internet.

1. Estudos farmacológicos e toxicológicos da *Casearia sylvestris* e da casearina X

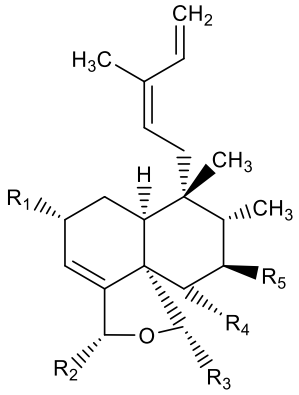
A literatura científica confirma várias atividades terapêuticas da *C. sylvestris* por estudos farmacológicos de extratos das suas folhas. Por exemplo, o óleo essencial administrado por via oral e intraperitoneal em ratos demonstrou excelentes propriedades anti-inflamatórias. (Basile et al., 1990; Ruppelt et al., 1991; Esteves et al., 2005; Napolitano et al., 2005). O extrato hidroalcoólico bruto das folhas da *C. sylvestris* administrados em camundongos por via oral demonstrou efeito antinociceptivo e revelou o seu potencial terapêutico no tratamento de

condições associadas com a dor inflamatória (Mattos et al., 2007). O extrato metanólico demonstrou efeito anti-hiperlipidêmico, com a inibição da síntese de triglicerídeos em camundongos tratados por via oral (Schoenfelder et al., 2008). Com o extrato hexânico, obtido de diferentes partes da planta (folhas, caules, raízes e frutos), foi demonstrada uma potente ação antiprotozoária, especificamente contra o agente etiológico da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*, e contra o agente etiológico da Leishmaniose, *Leishmania donovani* (Espindola et al., 2004; Mesquita et al., 2005).

Já o extrato aquoso (chá), que é a preparação mais comumente empregada na medicina popular, demonstrou ser um poderoso neutralizante de veneno de serpentes, como o da jararaca e de outras espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesia* (Borges et al., 2000; Raslan et al., 2002; Cavalcante et al., 2007). De fato, há relatos de populações indígenas da Amazônia que por muito tempo utilizaram o chá das folhas de *C. sylvestris* para o tratamento de picadas de cobras (Ruppelt et al., 1991; Mors et al., 2000). A própria etimologia da palavra "guaçatonga" é oriunda do tupi-guarani, o que reforça a hipótese do uso empírico da planta em comunidades indígenas.

O chá da guaçatonga também é muito utilizado na medicina popular para o tratamento de ulcerações estomacais. Estudos pré-clínicos demonstraram ação protetora e curativa do extrato etanólico sobre lesão gástrica aguda induzida em ratos, sem alteração do pH estomacal e da secreção de ácido clorídrico, o que representa uma enorme vantagem do uso do extrato em relação a medicamentos comumente empregados na clínica (Basile et al., 1990; Sertiè; Carvalho; Panizza, 2000).

Investigações fitoquímicas dos extratos da *C. sylvestris* mostraram a presença de uma série de substâncias de interesse, como flavonoides, fenilpropanoides, lignanas e terpenoides. Entre esses compostos, predominam os diterpenos clerodânicos tricíclicos oxigenados que podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero devido às suas características estruturais específicas. Mais de 120 diterpenos do tipo clerodânico já foram isolados de diferentes órgãos da planta, como as casearinas, casearvestrinas e caseargrevinas. As casearinas ocorrem de forma majoritária nas folhas da *C. sylvestris*, havendo relatos da existência de pelo menos 23 variantes (**Figura 1**) (Itokawa et al., 1988; Morita et al., 1991; Oberlies et al., 2002; Santos et al., 2007; Carvalho; Santos; Cavalheiro, 2009; Vieira Júnior et al., 2011; Xia et al., 2014).



casearinas (CAS)	R1	R2	R3	R4	R5
CAS A	OMe	OAc	OAc	OH	Bu
CAS B	OMe	OAc	OAc	OAc	Bu
CAS C	OH	OAc	OAc	OAc	Dc
CAS D	OH	Bu	OAc	OH	Bu
CAS E	OH	OEt	OAc	OH	Dc
CAS F	OH	OEt	OAc	OH	Bu
CAS G	OMe	OAc	OAc	H	Bu
CAS H	OH	OAc	OAc	H	Bu
CAS I	OH	OAc	Bu	H	Bu
CAS J	OMe	Bu	OAc	OH	Bu
CAS K	OAc	OAc	OAc	OH	Bu
CAS L	OMe	Bu	OAc	OAc	OH
CAS M	OH	Bu	Bu	OAc	OH
CAS N	OMe	OAc	Bu	OAc	Bu
CAS O	OMe	Bu	OAc	OAc	Bu
CAS P	OMe	OAc	OAc	OAc	OAc
CAS Q	OH	OAc	OAc	OAc	Bu
CAS R	= O	OAc	OAc	OH	Bu
CAS X	Bu	Bu	OAc	OH	H

OMe: grupo OCH_3 (metoxila); OEt: grupo OC_2H_5 (etoxila) OAc: grupo CH_3CO_2 (acetato); Bu: grupo n-$C_3H_7CO_2$; Dc: grupo n-$C_9H_{19}CO_2$; = O: grupo C=O (carbonila); OH: grupo O-H (hidroxila).

Figura 1. Substituintes das casearinas A–X (Carvalho et al., 1998; Itokawa et al., 1990; Morita et al., 1991; Oberlies et al., 2002; Wang et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Santos et al., 2010).

O potencial farmacológico destacado das casearinas é devido à ação citotóxica observada em baixas concentrações (Itokawa et al., 1999). No primeiro estudo realizado com células V-79 (fibroblastos pulmonares) de camundongos chineses transgênicos, foram observados valores de IC_{50} entre 0,2 e 29 μmol/L para as casearinas A–R (Itokawa et al., 1990).

Mais recentemente, estudos realizados com as casearinas B, D, L, O e X em células de leucemia (MOLT-4), melanoma (MDA/MB-435), células de câncer do sistema nervoso (SF-295) e de câncer de cólon (HCT-8), demonstraram que a casearina X (CAS X) exibiu o melhor efeito antiproliferativo, com valores de $IC_{50} < 1$ μM. Além disso, foi demonstrada sua baixa citotoxicidade contra células normais (fibroblastos L-929), indicando a possibilidade de ação seletiva em células cancerígenas (Santos et al., 2010).

Posteriormente, as casearinas L, O e X foram avaliadas em 3 linhagens de células de leucemia (CEM, HL-60 e K-562) e, mais uma vez, a CAS X apresentou o maior poder citotóxico contra as células CEM e HL-60, com valores de IC_{50} de 0,4 μM para ambas as linhagens. Os principais mecanismos de ação citotóxico da CAS X são a fragmentação do núcleo celular, externalização da fosfatidilserina (um marcador da membrana plasmática celular), ativação do efeito das caspases (proteases relacionadas à morte celular programada) e despolarização mitocondrial (Ferreira et al., 2010). Esses eventos são evidências diretas de morte celular por apoptose. Assim, dentre todas as casearinas identificadas, a CAS X, majoritária em *C. sylvestris*, apresentou os melhores resultados quanto ao potencial efeito antitumoral.

Em relação aos aspectos toxicológicos, são poucos os estudos realizados com os extratos da *C. sylvestris* ou com as casearinas isoladas. Estudos de toxicidade aguda realizados pela administração oral em ratos demonstraram o alto índice terapêutico dos extratos aquoso e hidroalcoólico, devido aos baixos valores de dose efetiva média (DE_{50}) para a ação antiulcerogênica, que foi 32 vezes menor que a dose letal média (DL_{50}) (Silva et al., 1988; Basile et al., 1990). Estudos de toxicidade subcrônica em ratos submetidos ao tratamento de longa duração (30 dias, via oral) demonstraram que não houve alterações macroscópicas no fígado, rins e baço (Basile et al., 1990). Além disso, não houve alteração na histopatologia da medula óssea, no hemograma, nos níveis de glicose, colesterol total, albumina, ureia, ácido úrico e proteínas totais, nem nos parâmetros bioquímicos séricos das aminotransferases (Ameni, 2011). Outros estudos demonstraram que não há riscos de efeito hemolítico (Ferreira et al., 2006), nem genotóxico (Maistro; Carvalho; Mantovani, 2004).

Por outro lado, um estudo realizado em ratos adultos tratados pela via oral com a fração rica em casearinas durante 7 dias demonstrou sinais de toxicidade. As análises histopatológicas apresentaram lesões neuronais na área do hipocampo, caracterizadas por vacuolização nuclear, fragmentação da cromatina nuclear (núcleos picnóticos), hipercromasia, desorganização dos axônios e vacuolização na área do corpo estriado. Curiosamente, esses resultados foram

observados nos animais tratados com as doses menores (2,5 e 5,0 mg/mL) e não nos animais tratados com as doses maiores (10 e 25 mg/mL). A fração rica em casearinas, obtida do extrato etanólico, possui um percentual de casearinas totais de 56,5%, sendo a caseargrevina F e a CAS X os principais constituintes, com teor de 9,9 e 14,2%, respectivamente (Araújo, 2013).

Esse relato reforça a importância da avaliação sistemática dos aspectos toxicológicos da *C. sylvestris* e suas preparações populares para fins medicinais, uma vez que os extratos possuem grande variabilidade qualitativa e quantitativa de constituintes químicos, com diferentes mecanismos de ação farmacológica e/ou toxicológica. Além disso, ainda há necessidade de novas investigações toxicológicas das casearinas isoladas, especialmente da CAS X, para avaliar a influência de suas propriedades farmacocinéticas na segurança e eficácia da sua utilização, justificando uma possível indicação terapêutica.

2. **Estudos farmacocinéticos de moléculas bioativas**

O desenvolvimento de fármacos a partir de uma nova molécula bioativa se inicia com uma fase de descobrimento, seguida por fases de desenvolvimento pré-clínico e clínico. Na fase de descobrimento, um candidato é selecionado com base na sua capacidade de interação com um alvo molecular, muitas vezes determinado por valores de IC_{50}. As características que afetam seu subsequente desenvolvimento, como solubilidade, estabilidade química e facilidade de obtenção, também são usadas na seleção do candidato. Já na fase de estudos pré-clínicos, o que mais influencia no processo de seleção de um candidato são os resultados dos estudos de biodisponibilidade (estabilidade metabólica e absorção) e de toxicidade (formação de metabólitos reativos, efeitos em órgãos alvo e potencial interação com outros compostos). Esses ensaios focam necessariamente na obtenção do máximo de informações que permitirão, ou não, conduzir o primeiro estudo em humanos (Kerns; Di, 2008).

Atualmente, é bem reconhecido que um candidato a fármaco deve ser selecionado com base em um balanço entre potência, segurança e propriedades farmacocinéticas favoráveis. Tradicionalmente, a farmacocinética de uma nova entidade química é estudada *in vivo* no estágio final de desenvolvimento pré-clínico, quando essas informações são requeridas pelas agências regulatórias para o avanço nas pesquisas clínicas. Na fase inicial, o grande número de animais necessário, associado a pouca disponibilidade do composto, principalmente quando obtido de fonte natural, limita a capacidade de obter dados representativos de uma população.

Assim, por razões éticas e econômicas, a farmacocinética devem ser estudados primeiramente in vitro (Lin; Lu, 1997).

Devido à simplicidade e à grande utilidade, o uso de sistemas in vitro para avaliação da biodisponibilidade de novos compostos ativos tem expandido muito. Os estudos in vitro da cinética de metabolismo e absorção, em conjunto com o avanço das técnicas analíticas que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massas (MS), permitem a obtenção de importantes informações para o planejamento de futuros estudos pré-clínicos in vivo e clínicos.

2.1. Estudos de metabolismo in vitro

O conhecimento da etapa farmacocinética do metabolismo é um fator crucial no processo de desenvolvimento de novos fármacos. A obtenção destas informações no início da fase de desenvolvimento tem se tornado cada vez mais importante para orientar se a substância candidata deve ser submetida às próximas etapas (Nassar; Talaat, 2004). Por esse motivo, a Organização Mundial de Saúde determinou que estudos de metabolismo fossem adotados nos ensaios pré-clínicos de novos fármacos como um princípio de segurança (WHO, 1996).

Os estudos de metabolismo in vitro podem ser utilizados para investigar as vias de metabolismo, determinar os metabólitos que provavelmente serão formados in vivo, identificar se o principal metabólito circulante trata-se de um composto farmacologicamente ativo ou tóxico, determinar os parâmetros cinéticos enzimáticos e o *clearance* intrínseco de eliminação, e avaliar os efeitos da inibição e/ou indução enzimática. A grande vantagem de realizar estes estudos in vitro é a capacidade de isolar o metabolismo a partir da multiplicidade de outros processos envolvidos na administração de um fármaco (Jia; Liu, 2007). Devido à capacidade de diferenciar o metabolismo de fase I e de fase II, é possível realizar um rastreamento inicial, excluindo vias metabólicas errôneas que levariam à realização de ensaios in vivo desnecessários. Dessa forma, os estudos de metabolismo in vitro podem auxiliar no planejamento e na interpretação de estudos toxicológicos e clínicos, orientando na elaboração de protocolos de estudo mais lógicos (FDA, 1997).

Outras vantagens de utilizar sistemas in vitro para o estudo do metabolismo incluem menor custo financeiro, rapidez na obtenção dos resultados e capacidade de comparar dados obtidos de diferentes espécies de animais com humanos (Jia; Liu, 2007). Apesar de existirem

diferenças no perfil enzimático de animais e humanos, os ensaios pré-clínicos toxicológicos ainda são realizados, obrigatoriamente, em animais (Parasuraman, 2011).

O metabolismo de uma substância pode ocorrer em diversos tecidos, como rins, pele, pulmões e intestino. No entanto, o fígado é considerado o principal órgão envolvido no metabolismo sistêmico (Brandon et al., 2003). Os modelos utilizados para a avaliação do metabolismo in vitro hepático incluem enzimas recombinantes (por exemplo, CYP e UDP-glicuronosiltransferases), frações subcelulares (por exemplo, microssomas, fração citosólica e fração S-9) além de cultura de hepatócitos, amostras de tecido hepático e fígado perfundido (Fasinu; Bouic; Rosenkranz, 2012; Asha; Vidyavathi, 2010).

Frações subcelulares (microssomas) são utilizadas há décadas em estudos de metabolismo de xenobióticos. Estas preparações apresentam bom rendimento metabólico, são relativamente estáveis ao longo do tempo e oferecem um bom meio de isolar um grupo de enzimas. Além disso, as frações celulares contém proteínas auxiliares biologicamente relevantes, incluindo aquelas que podem estar relacionadas com a ligação do substrato. Os microssomas hepático, normalmente separado dos outros constituíntes da célula por ultracentrifugação diferencial, consistem principalmente de enzimas associadas com o retículo endoplasmático liso. As principais enzimas microssomais são as do citocromo P450 (CYP 450), as esterases, flavinas mono-oxigenases e glutationa S-transferases. Mesmo havendo uma variedade de rotas metabólicas, é possível avaliar o metabolismo mediado por uma enzima específica pela utilização de inibidores seletivos (Lipscomb; Poet, 2008).

Em conjunto, a identificação das enzimas da via metabólica, a determinação dos parâmetros enzimáticos e a identificação de metabólitos, permitem conhecer o perfil metabólico de uma substância biologicamente ativa e prever a influência desses parâmetros na sua biodisponiblidade. No entanto, além do metabolismo, os parâmetros cinéticos de absorção também influenciam diretamente na biodisponibilidade de uma substância e devem, portanto, ser levados em consideração para o sucesso do efeito terapêutico esperado.

2.2. Estudos de absorção intestinal in vitro

A via oral é aceita como a mais conveniente para a administração de fármacos. No entanto, o pré-requisito para que um fármaco administrado por via oral exerça seu efeito terapêutico é que ele seja absorvido pelo trato gastrointestinal. Assim, a quantidade do fármaco

absorvido vai determinar sua biodisponibilidade e a exposição sistêmica do organismo. Por isso, a absorção é um importante passo que pode limitar a ação farmacológica de um composto (Abrahamsson; Lennernas, 2005).

Geralmente, nos estágios iniciais de desenvolvimento, os compostos ainda não são bem caracterizados. A avaliação da absorção intestinal de xenobióticos in vivo só pode ser realizada com compostos bem conhecidos, a fim de evitar efeitos prejudiciais aos voluntários. Esses estudos também poderiam ser realizados em animais. Ainda assim, questões éticas e econômicas são fatores limitantes da capacidade desses estudos.

Para uma rápida avaliação da permeabilidade de novos compostos, muitos métodos in vitro foram desenvolvidos, com diferentes níveis de complexidade e sofisticação. Esses modelos permitem estudar a permeabilidade de compostos em diferentes órgãos do corpo humano, como a absorção intestinal, a permeabilidade pela barreira hematoencefálica, o transporte e metabolismo hepático e o transporte renal. Entre os modelos in vitro para estudo de absorção intestinal estão os baseados em sistemas lipídicos artificiais (PAMPA, *parallel artificial membrane permeability assay*), tecidos de animal (segmentos intestinais de porco e intestino de ratos invertido) e culturas celulares (Caco-2, TC-7, MDCK e 2/4/A1) (Awortwe; Fasinu; Rosenkranz, 2014).

O modelo celular mais frequentemente usado para a determinação da permeabilidade intestinal de novos compostos é a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2, que emprega monocamadas dispostas em suportes com filtros semipermeáveis. Essas células se diferenciam espontaneamente em enterócitos com uma permeabilidade paracelular semelhante ao cólon humano. Além disso, muitas proteínas transportadoras normalmente encontradas em enterócitos estão presentes. Uma grande vantagem do uso dessa linhagem celular é que rotas paralelas de transporte, passiva e ativa, podem ser estudadas no mesmo modelo, permitindo a elucidação dos diferentes passos da absorção do composto avaliado (Artursson, 1990).

O modelo de células Caco-2 permite realizar uma avaliação geral da permeabilidade de um composto (Artursson; Palm; Luthman, 2001), incluindo o desenvolvimento de relações estrutura-permeabilidade (Chen et al., 2006) e de correlações in vitro/in vivo (Yee, 1997), a identificação de transportadores de influxo e efluxo envolvidos (Tran et al., 2005), o estudo da cinética de transporte (Usansky; Sinko, 2005) e das relações entre transporte e metabolismo (Benet; Cummins; Wu, 2004), além da avaliação de interações entre fármacos (Rautio et al., 2006) e efeitos de formulações (Kapitza et al., 2006).

No entanto, o sistema de monocamadas de células Caco-2 requer sua manutenção por um período de três semanas de cultura sobre os filtros semipermeáveis antes de serem utilizados nos experimentos de permeabilidade. Cuidados são necessários devido à variabilidade nos resultados obtidos entre diferentes laboratórios e entre diferentes partidas de experimentos, dependendo do protocolo adotado, da passagem celular, da seleção dos clones e das condições de cultura (Behrens; Kissel, 2003; Behrens et al., 2004, Giacomini et al., 2010). Ademais, artefatos como adsorção às superfícies do aparato e/ou acúmulo intracelular podem resultar em erros nas estimativas de permeabilidade, levando a baixa recuperação dos compostos e falhas no balanço de massas dos experimentos (Balimane; Chong, 2005).

Portanto, a escolha do sistema in vitro mais adequado para realizar, tanto os estudos de metabolismo, como de absorção, depende de vários fatores, como semelhança in vivo, custo, disponibilidade do modelo, considerações éticas e finalidade da aplicação dos resultados. No caso da CAS X, a obtenção de dados que sejam válidos e que possam ser extrapolados de forma realística é fundamental para o avanço nas pesquisas. Apesar dos resultados promissores das atividades farmacológicas já descritas para a CAS X, sua potente atividade citotóxica in vitro não pode ser extrapolada para uma potente atividade in vivo a menos que possua boa biodisponibilidade e desejável duração do seu efeito. Assim, por ser um produto de origem natural com interessantes propriedades terapêuticas em potencial para o tratamento humano, a CAS X foi selecionada como objeto de estudo deste trabalho, que visa prever sua biodisponibilidade por meio de estudos in vitro de metabolismo e de absorção.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Caracterizar o metabolismo in vitro da CAS X, empregando o modelo microssomal hepático de ratos e de humanos, e a sua absorção intestinal in vitro, empregando o modelo de monocamadas de células Caco-2.

2. Objetivos específicos

2.1. Desenvolver um método analítico para a quantificação da CAS X por HPLC e estabelecer as condições de ensaio para os estudos de metabolismo in vitro em modelo microssomal hepático de ratos e de humanos;

2.2. Validar o método analítico para a quantificação da CAS X em meio microssomal hepático de ratos e de humanos;

2.3. Identificar as isoformas enzimáticas responsáveis pelo metabolismo da CAS X empregando microssomas hepático de ratos e de humanos;

2.4. Caracterizar os parâmetros cinéticos enzimáticos de metabolismo in vitro da CAS X empregando microssomas hepático de ratos e de humanos e prever o *clearance* hepático por extrapolação in vitro-in vivo;

2.5. Propor a estrutura do metabólito da CAS X formado pelo metabolismo in vitro em microssomas de ratos e de humanos;

2.6. Desenvolver e validar um método analítico para a quantificação da CAS X no sistema in vitro de monocamadas de células Caco-2;

2.7. Caracterizar os parâmetros cinéticos in vitro de permeabilidade intestinal da CAS X no modelo de células Caco-2 e prever os mecanismos de absorção envolvidos.

CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA CASEARINA X POR HPLC E DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ENSAIO PARA OS ESTUDOS DE METABOLISMO IN VITRO EM MODELO MICROSSOMAL

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos envolve a avaliação de diversas condições, que inclui as etapas de preparo da amostra, separação cromatográfica, identificação e quantificação. Esse desenvolvimento se baseia em fatores relacionados ao tipo, quantidade e grau de pureza da amostra, finalidade da análise e, especialmente, na estrutura e características físico-químicas do analito.

A CAS X é formada por um sistema decalínico (Anéis A e B), com grupos metila em C8 (C17) e C9 (C20), uma ligação dupla em C3 e uma cadeia lateral em C9 (C11–C16) com um dieno conjugado terminal. Um terceiro anel (C) diacetálico possui substituintes oxigenados de éster formados a partir de C18 (butanoato) e 19 (acetato). Outros substituintes oxigenados estão presentes no carbono 2 (butanoato) e no carbono 6 (hidroxila) (Carvalho; Santos; Cavalheiro, 2009) (**Figura 2**).

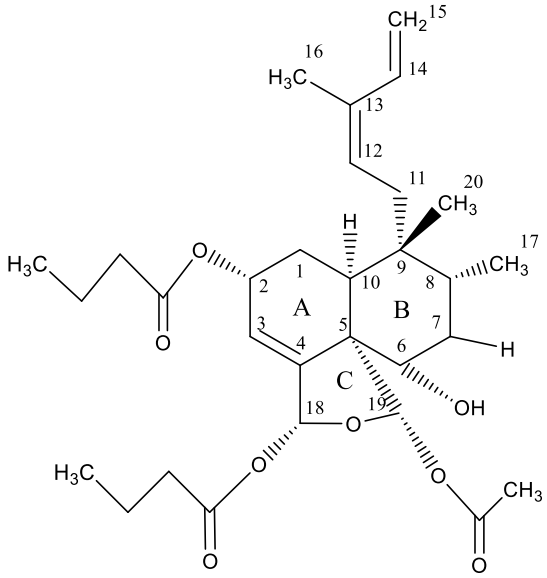


Figura 2. Estrutura química da CAS X

O nome químico da CAS X é ácido butanoico, 1,1’-[(1S,3R,5R,6aS,7R,8R,10S,10aS)-1-(acetiloxi)-3,5,6,6a,7,8,9,10-octahidro-10-hidroxi-7,8-dimetil-7-[(2Z)-3-metil-2,4-pentadien -1-il]-1H-naftol[1,8a-c]furano-3,5-diil]ester. A sua configuração relativa é dextrorrotatória, tendo sido relatados valores de rotação ótica específica de +54,3° e de +50,3° (Santos, 2008; Passareli, 2010).

As maioria das propriedades físico-químicas da CAS X ainda não foram determinadas experimentalmente. Valores teóricos ainda são as únicas informações disponíveis até o momento (**Tabela 1**).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da CAS X

Massa Molar (g/mol)	Log P	Solubilidade (g/L)	Solubilidade Molar (mol/L)	pKa	Área polar superficial ($Å^2$)[a]
532,67	5,672	0,014	$2,6 \times 10^{-5}$	13,84	108

[a] $Å^2$: Ångström, 1 Å = 0.1 nm
Valores previstos pelo software *Advanced Chemistry Development* (ACD/Labs), V11.02 (fonte: SciFinder® / *American Chemical Society*)

A literatura descreve os procedimentos de separação e isolamento da CAS X das demais casearinas e de outros compostos presentes no extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris*. Na etapa final de isolamento, a fração de interesse é submetida à HPLC empregando uma coluna preparativa de fase reversa (C_{18}), com misturas de metanol e água na composição da fase móvel (Santos et al., 2010).

No entanto, não há relatos de preparo de amostras biológicas contendo a CAS X. Em estudos de metabolismo in vitro, a etapa analítica realizada em matriz biológica requer um pré-tratamento da amostra, devido à existência de proteínas e outros componentes incompatíveis com as colunas cromatográficas. O procedimento de preparo da amostra pode ser executado por diferentes técnicas, como a extração líquido-líquido (ELL) e a precipitação de proteínas (PP), além de outras. Porém, independente da técnica, o objetivo final do preparo de amostra é a obtenção da amostra com o menor número de interferentes e com recuperação do analito adequada ao propósito da análise (Majors, 2011).

Durante o desenvolvimento de um método analítico para estudos de metabolismo é necessário realizar ensaios preliminares para o estabelecimento das condições de ensaio da substância de interesse em um modelo de estudo in vitro. No caso de microssomas hepático, é importante avaliar a estabilidade do analito na temperatura de incubação empregada nos ensaios, bem como sua solubilidade em solução fisiológica. Esse conhecimento prévio é essencial para a correta quantificação do analito na matriz microssomal hepática. Além disso, uma vez que os microssomas contem diferentes sistemas enzimáticos, é muito importante avaliar como o substrato interage com as enzimas microssomais. Dependendo do sistema enzimático envolvido, a reação metabólica pode requerer a adição de cofatores, como no caso

das enzimas do CYP 450 (Barr; Flora; Iwuchukwu, 2014). Portanto, uma etapa primordial para a boa condução dos estudos, é determinar se o metabolismo do substrato em questão é dependente de cofatores.

Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um método analítico para a quantificação da CAS X por HPLC e estabelecer as condições de ensaio para os estudos de metabolismo in vitro em modelo microssomal hepático de ratos e de humanos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar as condições nas quais a CAS X deve ser submetida aos ensaios de metabolismo in vitro e ser quantificada em meio microssomal hepático, foi adotado um plano de trabalho, conforme o delineamento experimental descrito na **Figura 3**.

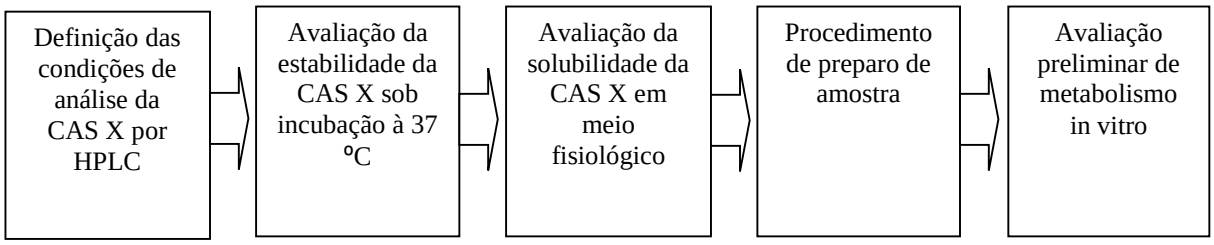


Figura 3. Delineamento experimental para determinar as condições de ensaio da CAS X em meio microssomal.

2.1. Definição das condições para análise da CAS X por HPLC

A CAS X foi extraída, isolada e purificada pelo Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NUBBE), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara/SP, sob supervisão do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro.

Água ultra pura foi obtida no Sistema Direct-Q 3 MilliQ, Millipore (Massachusetts, EUA). Metanol e acetonitrila, grau cromatografia, foram obtidos da Merk (Darmstadt, Alemanha).

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de HPLC da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo Prominence, composto por bomba LC-20AT, degaseificador *online* DGU-20A5, injetor automático de amostras SIL-10AF, forno de coluna CTO-20A e detector por

arranjo de diodos (DAD), de 190-800 nm SPD-M20A. Foi utilizada uma coluna analítica Ascentis Express Fused Core C_{18}, (100 mm x 4,6 mm x 2,7 μm) e coluna de guarda Ascentis Express C_{18} (3,0 mm x 4,6 mm 2,7 μm) da Supelco (Pensilvânia, EUA).

A CAS X foi pesada em balança analítica Sartorius, modelo CPA225D (Goettingen, Alemanha). Foi utilizado um agitador de tubos tipo *vortex* Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, Brasil) para a homogeneização das soluções.

Para a definição da fase móvel foram realizados testes utilizando misturas de água, metanol e/ou acetonitrila, em diferentes proporções. Para a detecção foi realizada varredura no espectro do ultravioleta na faixa de 235 a 254 nm, cujas bandas de absorção no UV são características do dieno conjugado na cadeia lateral das casearinas (Santos et al., 2010). Foram avaliados o volume de injeção e a temperatura do forno da coluna. A combinação dos parâmetros que resultou em melhor eficiência foi escolhida com base no número de pratos fornecidos pelo software do sistema cromatógrafico.

2.2. Avaliação da estabilidade da CAS X a 37 ºC

Para avaliar a estabilidade da CAS X na temperatura de incubação empregada nos ensaios de metabolismo in vitro, as amostras foram preparadas na concentração de 10 μg/mL, em tubos de vidro, com 200 μL de solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4. Triplicata de amostras foram incubadas a 37 ºC, sob agitação, em banho-maria da marca Marconi, modelo MA093 (São Paulo, Brasil). Ao final dos tempos de 0, 30, 60 e 90 minutos, foram adicionados 200 μL de acetonitrila. As amostras foram agitadas em *vortex* por 5 segundos e analisadas por HPLC.

2.3. Avaliação da solubilidade da CAS X em meio fisiológico

Para avaliar a solubilidade da CAS X na solução tampão empregada nos ensaios de metabolismo in vitro, foi realizado um estudo de solubilidade para garantir a ação das enzimas microssomais nas maiores concentrações da CAS X. Assim, 5 μL de CAS X na concentração de 100 μg/mL, previamente dissolvida em acetonitrila, foram adicionados em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4, contendo 0,1% dos tensoativos polisorbato 80 (Tween 80) ou cremofor EL, ou contendo 1% de glicerina como cosolvente, em triplicata. As amostras foram

agitadas em *vortex* por 1 minuto e analisadas diretamente por HPLC. Os resultados foram comparados com soluções de CAS X, na mesma concentração, preparadas em acetonitrila, na qual o analito apresenta 100% de solubilidade.

2.4. Microssomas hepático de ratos

Para as análises da CAS X em meio microssomal hepático de ratos foram utilizados 6 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso entre 180 e 220 g, obtidos do Biotério Geral da Coordenadoria do Campus Administrativo de Ribeirão Preto (USP) e mantidos em ambiente controlado com ciclos regulares de luz e temperatura de 23 (± 2) °C. O projeto para o estudo de metabolismo in vitro da CAS X foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo CEUA n° 12.1.228.53.6).

Os animais foram mantidos em jejum na noite anterior aos experimentos. O fígado foi retirado, após decapitação do animal, fracionado em pequenos pedaços e lavado em solução tampão tris-HCl 50 mM / KCl 0,15 M, pH 7,4. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 20 mL desta solução tampão e o fígado foi triturado em homogeneizador do tipo *Potter*, da marca Marconi MA181 (São Paulo, Brasil), em 9 ciclos de um minuto de trituração, na velocidade de 1000 rpm. O homogeneizado foi centrifugado (6.300 × *g* / 4 °C / 15 min) em centrífuga Hitachi HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão). O sobrenadante foi coletado e ultracentrifugado (10.1000 × *g* / 4 °C / 60 min) em ultracentrífuga Beckman XL-70 (Califórnia, EUA). Os *pellets* obtidos foram ressuspendidos em solução Hepes-HCl 10 mM / KCl 0,15 M / EDTA 1 mM / glicerol 20% (LAKE, 1987) e estocados em nitrogênio líquido até a sua utilização.

Os reagentes empregados no preparo das soluções tampão foram pesados em balança analítica Ohaus, modelo Adventurer (Nova Jersey, EUA). Para a medida do pH, foi utilizado o potenciostato modelo PHS-3B da PHTek (São Paulo, Brasil).

A concentração de proteínas do *pool* de microssomas obtido foi determinada pelo método do biureto, usando o kit para dosagem de proteínas totais da Labtest® (Belo Horizonte, Brasil), conforme o procedimento descrito pelo fabricante. Após o preparo das amostras para dosagem de proteínas, estas foram homogeneizadas e mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos para a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV-Vis Spectronic 20 Genesys (Massachusetts, EUA) em 545 nm.

A concentração das proteínas foi calculada segundo as Equações 1 e 2:

$$Fc = \frac{Cp}{Ap} \qquad \textbf{(Equação 1)}$$

$$Ct = Fc \times At \times 10 \qquad \textbf{(Equação 2)}$$

onde Fc corresponde ao fator de correção, Cp à concentração de proteínas do padrão (mg/mL), Ap à absorbância do padrão, Ct à concentração de proteínas do teste (mg/mL) e At à absorbância do teste.

2.5. Microssomas hepático humano

Para as análises da CAS X em meio microssomal hepático humano, *pool* de microssomas de fígados humanos de ambos os sexos foram adquiridos da XenoTech, LLC (Lenexa, EUA).

2.6. Procedimento de preparo das amostras

O meio microssomal foi composto por 5 µL de CAS X, preparada em acetonitrila (10 µg/mL), que foram transferidos para tubos de vidro contendo 175 µL de solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 e 20 µL de microssomas de ratos (0,5 mg/mL), totalizando 200 µL de meio microssomal. Tanto a ELL quanto a PP foram avaliadas como técnicas de preparo das amostras. As amostras foram homogeneizadas e imediatamente submetidas ao preparo.

2.6.1. Extração líquido-líquido (ELL)

Na ELL foram avaliados diferentes solventes extratores, como hexano, diclorometano, éter metil terc-butílico (MTBE) e acetato de etila. Em cada caso foi acrescentado 400 µL do solvente extrator contendo a licarina-A, empregada como padrão interno (PI), na concentração de 15 µg/mL. A licarina-A foi sintetizada, caracterizada e gentilmente cedida pelo Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NPPNS), Departamento de Física e Química, Faculdade de

Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), sob supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. As amostras foram agitadas por 15 minutos em agitador do tipo *vibrax* VXR basic IKA da Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Alemanha), a 1.000 rpm e centrifugadas a 2.300 × *g* por 10 minutos. Em seguida, 300 µL da fase orgânica foram transferidos para tubos cônicos e o solvente evaporado sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram ressuspensos em 100 µL de fase móvel e agitados em *vortex* por 10 segundos. Foram injetados 4 µL no sistema de HPLC e a porcentagem de recuperação foi calculada comparando as áreas obtidas da solução padrão de CAS X em fase móvel com as amostras submetidas à extração, corrigidas de acordo com o volume coletado. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

2.6.2. Precipitação de proteínas (PP)

Para avaliação da técnica de PP, foram adicionados ao meio microssomal 200 µL de acetonitrila gelada, contendo a licarina-A (15 µg/mL). Em seguida, os tubos foram agitados por 1 minuto em *vibrax* a 1.000 rpm e centrifugadas a 2.300 × *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para *vials*, dos quais 4 µL foram injetados no sistema de HPLC.

A porcentagem de recuperação da CAS X foi calculada comparando a área da amostra submetida à precipitação de proteínas e a área obtida com a solução padrão preparada em fase móvel, na mesma concentração e em triplicata.

2.7. Avaliação preliminar de metabolismo in vitro

Foram realizados ensaios preliminares de metabolismo *in vitro* para determinar se a CAS X é substrato para enzimas microssomais, nas quais as reações são dependentes de cofatores ou não. Para isso, os microssomas hepático de ratos (0,5 mg/mL) ou humano (0,25 mg/mL) foram pré incubados por 5 minutos à 37 °C, sob agitação, em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4, na presença dos cofatores do sistema regenerador de NADPH (fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina). Este sistema de cofatores contem $NADP^+$ 0,25 mM, glicose-6-fosfato 5 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 0,5 U/L. Controles do metabolismo não dependente de cofatores foram avaliados em meio microssomal de ratos e de humanos preparados na ausência do sistema de regeneração do NADPH ou com a adição do inibidor enzimático fluoreto de sódio (NaF) 200 mM, pré incubado por 10 minutos no meio

microssomal. Em todos os casos, o volume reacional foi de 200 µL. As reações foram iniciadas com a adição da CAS X (10 µg/mL) e foram avaliados os tempos de incubação (37 °C) de 0, 5, 10, 15, 20 e 30 minutos, em triplicata. Em seguida, as reações foram encerradas e as amostras foram preparadas pela técnica de PP (item ***2.6.2***) e analisas por HPLC. A ocorrência de metabolismo in vitro foi avaliada pela análise da depleção do substrato presente no meio microssomal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Definição das condições de análise da CAS X por HPLC

A condição cromatográfica que proporcionou resultados satisfatórios para a análise da CAS X está descrita na **Figura 4**. Nessas condições, o perfil cromatográfico de análise da CAS X apresentou um sinal com tempo de retenção em 6,7 minutos (**Figura 5**).

Coluna cromatográfica	C_{18} Ascentis Express (100 x 4,6 mm x 2,7 µm)
Coluna de guarda	C_{18} Ascentis Express (3 x 4,6 mm x 2,7 µm)
Fase móvel	acetonitrila:água, 65:35 (v/v)
Volume de injeção	4 µL
Temperatura	32 ^{0}C
Vazão	1 mL/min
Detecção em UV	235 nm

Figura 4. Condições cromatográficas para análise da CAS X por HPLC.

Figura 5. Cromatograma referente à análise da CAS X na concentração de 25 µg/mL. Condições cromatográficas: vide **Figura 4**.

3.2. Avaliação da estabilidade da CAS X à 37 ºC

Amostras de CAS X (10 µg/mL) preparadas em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 foram incubadas a 37 ^{0}C e analisadas a cada 30 minutos, durante 1,5 h. Foi observado que a concentração de CAS X não alterou significativamente em nenhuma das amostras analisadas nos diferentes tempos avaliados. Esse resultado demonstrou que a CAS X não perdeu a sua estabilidade quando foi incubada à 37 °C, por um período de até 90 minutos (**Figura 6**).

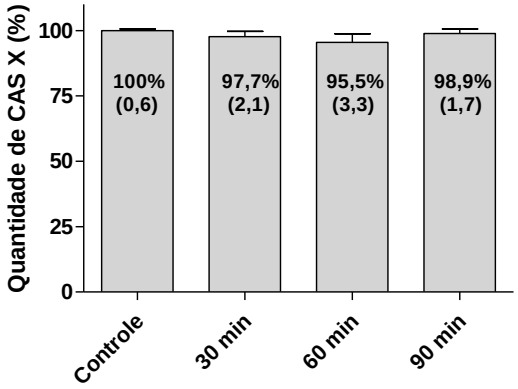


Figura 6. Avaliação da estabilidade de CAS X à 37 ºC. Média (DP), n = 3.

3.3. Avaliação da solubilidade da CAS X em meio fisiológico

A CAS X é um composto altamente lipofílico. O valor de solubilidade previsto por cálculos teóricos realizados com o modelo computacional *Advanced Chemistry Development – ACD/Labs* (versão 11.02) é de 14 µg/mL (**Tabela 1**). Portanto, foi necessário o emprego de um agente solubilizante adequado para garantir que as maiores concentrações de CAS X empregadas nos ensaios de cinética enzimática estejam solúveis, a fim de evitar potenciais erros bioanalíticos nos ensaios de metabolismo.

Foi observado que a concentração de 100 µg/mL de CAS X apresentou solubilidade de apenas 23% na solução tampão usada para o preparo do meio microssomal (NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4) em relação ao controle (acetonitrila). No entanto, com a adição de 0,1% dos tensoativos cremofor EL e tween 80, a solubilidade foi aumentada para 60,5 e 72,7%, respectivamente. A maior solubilidade observada na solução tampão do meio microssomal foi de 96%, como resultado da adição de 1% de glicerina como cosolvente (**Figura 7**).

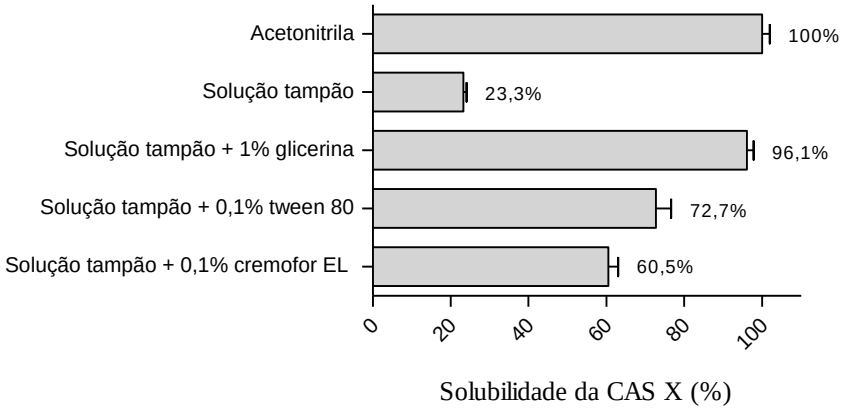


Figura 7. Solubilidade da CAS X (100 μg/mL) em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 com e sem adição de agentes solubilizantes.

O uso de solventes orgânicos ou tensoativos é normalmente empregado em ensaios in vitro para aumentar a solubilidade de compostos lipofílicos em soluções fisiológicas. No entanto, o uso de tais agentes solubilizantes requer cuidado, pois apesar de favorecer a solubilidade, podem exercer efeitos significativos sobre a atividade catalítica das enzimas.

Já foi demonstrado que o cremofor EL e o tween 80, na concentração de 0,1% apresentam a melhor combinação entre solubilidade e manutenção da atividade enzimática do sistema CYP 450 (Randall; Cheng; Kotchevar, 2011). Por esse motivo, esta concentração de tensoativos foi adotada nos experimentos de solubilidade. Já para a glicerina, foi demonstrado que a concentração de 500 μM, correspondente a 18,3%, não alterou significativamente a atividade enzimática das esterases, também presente como sistema enzimático em microssomas hepáticos (Zhang et al., 2014). No presente estudo, o uso de 1% de glicerina como cosolvente foi suficiente para a maior solubilização da CAS X (100 mg/mL) na solução tampão empregada para os estudos de metabolismo in vitro. No entanto, a escolha do agente solubilizante mais adequado para compor o meio microssomal hepático depende do sistema enzimático envolvido no metabolismo da CAS X, que pode ser previsto por ensaios preliminares de metabolismo in vitro (item **3.5**).

3.4. Procedimento de preparo da amostra

A fração microssomal hepática de ratos, que contém as enzimas responsáveis pelo metabolismo, foi isolada de fígado de ratos e submetida à dosagem de proteínas totais, resultando

numa concentração de 25 mg/mL. Já os microssomas hepático de humanos foi adquirido na forma de um *pool* de amostras obtido de diferentes pacientes, no qual a concentração de proteínas definidas pela empresa produtora foi de 20 mg/mL.

Para que as amostras experimentais empregadas nos estudos de metabolismo *in vitro* pudessem ser analisadas com o menor número de interferentes e com detectabilidade adequada para a quantificação da CAS X, foram avaliadas a ELL e a PP como técnicas de preparo das amostras. A eficiência da ELL depende da afinidade do soluto pelo solvente extrator, da razão entre as fases orgânica e aquosa e do número de extrações. A ELL apresenta as vantagens de ser simples, além de poder utilizar um número grande de solventes puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, eliminando a contaminação da coluna cromatográfica. Por outro lado, esta técnica possui algumas desvantagens, tais como: as amostras com alta afinidade pela água são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico; se houver impurezas no solvente, estas são concentradas junto com a amostra e o consumo de solventes orgânicos é relativamente grande (Queiroz; Collins; Jardim, 2001).

A técnica de PP tem a vantagem de ser de fácil operação, possui um grande número de agentes precipitantes disponíveis e apresenta menor volume de resíduo gerado no processo. No entanto, apresenta como desvantagem a impossibilidade de pré-concentração do analito. Ela pode ser realizada através da redução da solubilidade das proteínas pela adição de sais (por exemplo, sulfato de amônio) em altas concentrações, solventes orgânicos (etanol, metanol, éter, acetona, acetonitrila) e polímeros não iônicos (polietilenoglicol) ou por alterações de carga das proteínas (adição de ácidos e bases como precipitantes aniônicos ou catiônicos). Em todos os casos, ocorre modificação da estrutura tridimensional da molécula da proteína, cuja solubilidade em meio aquoso se dá devido à distribuição dos seus resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos de superfície. Quando se emprega solventes como agente precipitante, o principal efeito é a diminuição da constante dielétrica do meio, que resulta na agregação das proteínas por interações eletrostáticas entre superfícies com cargas de sinal oposto, ocasionando a perda de solubilidade (Nelson; Cox, 2004).

A **Tabela 2** resume as porcentagens de recuperação obtidas na ELL, com a utilização dos diferentes solventes extratores, e na PP. Entre os solventes extratores avaliados na ELL, aquele que apresentou melhor recuperação da CAS X do meio microssomal foi o acetato de etila. Em relação à PP utilizando acetonitrila gelada como solvente de precipitação, foi possível obter uma porcentagem de recuperação semelhante à ELL usando acetato de etila. Entretanto, foi

selecionada a PP como técnica de preparo de amostra para os estudos de metabolismo in vitro devido à sua simplicidade de execução, rapidez, pouca geração de resíduos e esta ter proporcionado detectabilidade adequada para a finalidade do estudo.

Tabela 2. Porcentagens de recuperação da ELL e PP no preparo das amostras microssomais hepática de ratos contendo CAS X. Média (DP), n = 3.

	Porcentagens de Recuperação				
	ELL				**PP**
	Acetato de etila	**Hexano**	**Diclorometano**	**MTBE**	**Acetonitrila**
CAS X	95% (2,8)	54% (2,9)	23% (3,6)	11% (1,4)	99% (3,2)
PI	93% (3,3)	49% (3,6)	27% (2,1)	14% (2,9)	98% (3,4)

Em relação ao PI, a sua utilização durante o desenvolvimento de métodos cromatográficos possibilita um melhor monitoramento das condições de recuperação e quantificação do analito a partir da matriz biológica. Sendo assim, o PI deve ser uma substância com propriedades físico-químicas semelhantes ao analito para o qual se desenvolve um método, sendo adicionado em todas as amostras antes que elas sejam submetidas à etapa de pré-tratamento. Para determinar a concentração do analito aplica-se a razão entre a resposta cromatográfica deste com a do PI. Este artifício matemático é extremamente útil, pois possibilita minimizar os erros durante as etapas de preparo das amostras (Ribani et al., 2004).

Por se tratar de um produto natural, a dificuldade de encontrar um PI com características semelhantes à CAS X limita o número de substâncias comercialmente disponíveis para tal finalidade. Assim, foi utilizada a licarina-A (**Figura 8**), uma substância também isolada de fonte natural, que apresentou um perfil cromatográfico adequado para ser utilizada como PI.

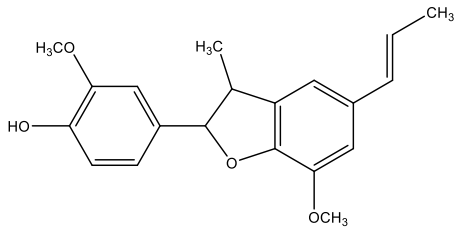


Figura 8. Estrutura química da licarina-A

Pelos resultados apresentados na **Tabela 2** é possível observar que as porcentagens de recuperação do PI foram muito semelhantes às da CAS X. Isso demonstra que o PI escolhido

de fato apresenta algumas características semelhantes ao analito. Com a técnica de PP foi possível obter 98% de eficiência para o PI e usando as condições cromatográficas previamente definidas para a CAS X, o tempo de retenção do PI foi de 3,2 minutos, enquanto a CAS X se manteve em 6,7 minutos (**Figura 9)**.

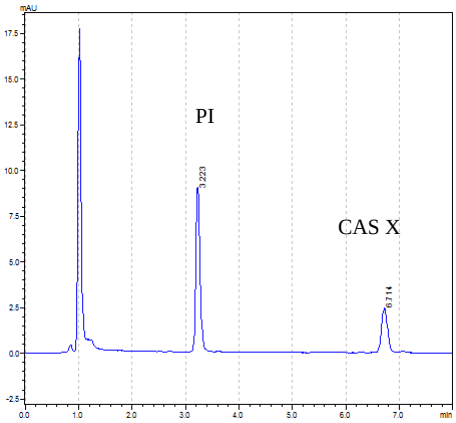


Figura 9. Cromatograma referente à análise da CAS X e o PI licarina-A, na concentração de 10 e 15 µg/mL, respectivamente. Condições cromatográficas: vide **Figura 4**.

3.5. Avaliação preliminar de metabolismo in vitro

Para saber se a CAS X é metabolizada por reações dependentes de cofatores, foi realizada uma avaliação preliminar de metabolismo in vitro na presença e na ausência dos cofatores contidos no sistema de regeneração do NADPH. Os perfis de metabolismo in vitro da CAS X obtidos com microssomas hepático de ratos e de humanos ilustrados na **Figura 10.**

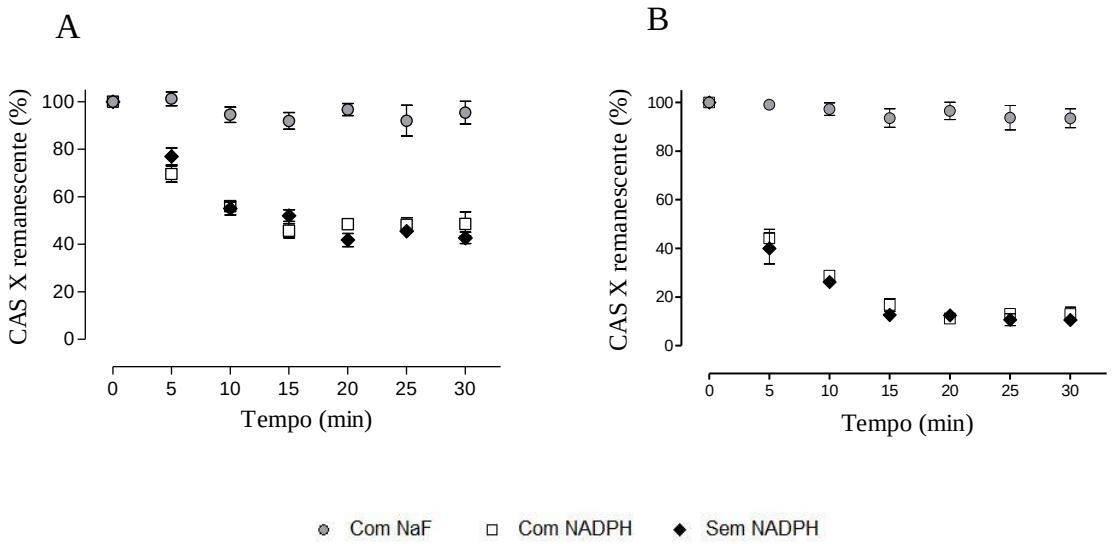


Figura 10. Perfis de metabolismo *in vitro* da CAS X em microssomas hepático de (A) ratos e (B) humanos, na presença e na ausência de cofatores (NADPH), ou com adição do inibidor enzimático de esterases NaF.

Tanto no metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos, quanto de humanos, foi observada uma diminuição progressiva na concentração da CAS X até 15 minutos de incubação à 37 ^{0}C. Isso indica que a CAS X é de fato substrato para as reações metabólicas microssomais e que o modelo in vitro de microssomas hepáticos é adequado para os estudos de metabolismo.

Foi observado também que os perfis de depleção da CAS X em microssomas de ratos e de humanos foram muito semelhantes entre os ensaios de metabolismo in vitro contendo, ou não, os cofatores do sistema de regeneração do NADPH. Para a ocorrência do metabolismo in vitro mediado pelas enzimas do CYP 450, a presença do NADPH é indispensável para a transferência de elétrons que ocorrem nas reações de oxidação (Asha; Vidyavathi, 2010). Assim, os resultados obtidos indicam que o metabolismo in vitro da CAS X não é mediado pelo sistema enzimático CYP 450.

Por outro lado, a pré-incubação das amostras com NaF, um inibidor enzimático de esterases (Zhang et al., 1999; Liu et al., 2006), resultou na manutenção da concentração da CAS X em torno de 100% em ambos os experimentos (ratos e humanos), durante todo o período de incubação. Esse resultado indica que a via metabólica enzimática da CAS X é governada pelas esterases microssomais. No entanto, estudos de metabolismo in vitro empregando inibidores enzimáticos específicos são necessários para confirmar esse resultado. A identificação das isoformas enzimáticas responsáveis pelo metabolismo da CAS X foi realizada e encontra-se descrita no **Capítulo 3**.

Assim, tendo sido definidas as condições de ensaio para os estudos de metabolismo in vitro da CAS X em microssomas hepático (**Tabela 3**), o método analítico pode ser validado com a finalidade de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos posteriormente.

Tabela 3. Definição das condições de ensaio da CAS X para os estudos de metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos e de humanos.

Condições de ensaio da CAS X em meio microssomal hepático	
Parâmetros avaliados	**Condições estabelecidas**
Estabilidade da CAS X à 37 °C em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4	Incubação pelo tempo máximo de 90 minutos
Solubilidade em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4	Adição de 1% de glicerina ao meio microssomal
Uso de cofatores (NADPH)	Sem adição de cofatores ao meio microssomal
Manutenção da concentração de CAS X em meio microssomal hepático de ratos e de humanos	Adição de NaF 200 μM ao meio microssomal

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DA CASEARINA X EM MEIO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS E DE HUMANOS

1. INTRODUÇÃO

A validação de métodos analíticos é um passo obrigatório para avaliar a eficiência do método desenvolvido em prover resultados precisos na aplicação a qual se destina (Rozet et al., 2011). Para tanto, órgãos reguladores no Brasil e no mundo têm estabelecido documentos oficiais com diretrizes a serem adotadas no processo de validação.

Para que os resultados obtidos nos estudos de metabolismo possam ser interpretados de maneira correta na investigação toxicológica, deve-se garantir, por avaliações experimentais, que o método empregado atenda às exigências das aplicações analíticas. Para alcançar as exigências de uma validação é necessário que o método apresente os parâmetros adequados à análise, como seletividade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade, garantindo que o método pode ser utilizado com confiabilidade e segurança nos resultados (ANVISA, 2012).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma vez que a literatura não disponibiliza um guia oficial de validação de métodos para estudos de metabolismo in vitro, foram avaliados os parâmetros de validação contidos nas recomendações do *Guideline on bioanalytical method validation* (EMA, 2011) e da Resolução RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA (ANVISA, 2012) para análise de fármacos em fluidos biológicos.

Com exceção dos parâmetros que não foram aplicáveis ao método, foi realizada a validação total para a quantificação da CAS X em microssomas hepático de ratos. A quantificação em microssomas hepático humano foi validada parcialmente, por se tratar da mesma matriz biológica (microssomas) obtida de espécie diferente.

2.1. Validação do método para quantificação da CAS X em microssomas hepático de ratos

Uma solução estoque de CAS X 4 mg/mL foi preparada pela sua dissolução em acetonitrila. Soluções de trabalho nas concentrações de 4, 10, 40, 400, 1000, 2000 e 3000 µg/mL foram preparadas por diluição da solução estoque em acetonitrila e estocadas a –20 °C. Para os ensaios de validação, 5 µL de solução de trabalho de CAS X, foram adicionadas ao meio

microssomal, contendo 20 µL de microssomas (0,5 mg/mL) em 175 µL de solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 com 1% de glicerina e com a atividade das esterases microssomais inativadas pela pré incubação com 200 mM de NaF durante 10 minutos. O volume final de meio microssomal obtido foi de 200 µL, no qual as concentrações de CAS X estão descritas na **Tabela 4**. Após 3 segundos de agitação em *vortex* para homogeneização, as amostras foram preparadas conforme descrito no item ***2.6.2*** e analisadas por HPLC.

Tabela 4. Concentrações de CAS X em meio microssomal.

Concentração (µg/mL)	Definições
0,10	**LIQ** – Limite inferior de quantificação
0,25	**CQB** – Controle de qualidade de concentração baixa
1,00	
10,0	
25,0	
50,0	**CQM** – Controle de qualidade de concentração média
75,0	**CQA** – Controle de qualidade de concentração alta
100,0	**LSQ** – Limite superior de quantificação

2.1.1. Linearidade

Uma curva de calibração foi construída pela análise das amostras de meio microssomal contendo a CAS X em 8 níveis de concentração, conforme descrito na **Tabela 4**, em triplicata.

A correlação linear entre as concentrações nominais e as respectivas razões de área do sinal cromatográfico da CAS X pelo padrão interno (PI) licarina-A foi avaliada por análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados, para calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação (r). Devido à ampla faixa de concentração da curva de calibração, foi necessário aplicar um modelo de regressão linear ponderada. A adequação deste modelo foi avaliada pela análise de variância ANOVA *lack of fit*, calculando os valores de F e *p*, para um nível de confiança de 95% e graus de liberdade n–1. Os cálculos estatísticos foram realizados empregando o programa MINITAB Release versão 14.1.

2.1.2. Seletividade e efeito residual

A seletividade do método foi avaliada pela análise de seis amostras brancas distintas. Essas foram compostas por amostras de meio microssomal processadas sem analito e sem PI.

O efeito residual (*carryover*) foi avaliado pela injeção de três amostras brancas, sendo uma antes e duas depois da injeção de uma amostra processada do LSQ. Admitiu-se como aceitável até 20% e 5% de interferentes nos mesmos tempos de retenção para a CAS X e o PI, respectivamente, em comparação com amostras processadas do LIQ (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

2.1.3. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão intra-corridas foram determinadas pela análise, em quintuplicata, de amostras do meio microssomal fortificadas com a CAS X nas concentrações de 0,10 (LIQ), 0,25 (CQB), 50,0 (CQM) e 75,0 µg/mL (CQA), além do PI (15 µg/mL), no período de um dia. Para a precisão e exatidão inter-corridas, quintuplicata das amostras do LIQ, CQB, CQM e CQA, adicionadas de PI, foram avaliadas em três dias consecutivos. Os resultados obtidos foram expressos como coeficiente de variação (CV) para a determinação da precisão e como erro padrão relativo (EPR) para a determinação da exatidão do método.

2.1.4. Estabilidade

Para avaliar a estabilidade das soluções estoque de CAS X e de PI preparadas em acetonitrila, estas foram armazenadas em freezer à temperatura de –20 °C e analisadas após 1, 3 e 6 meses. Amostras de cada solução originalmente preparadas foram diluídas, em triplicata, para a concentração de 50 e 15 µg/mL de CAS X e PI, respectivamente. Foi também avaliada a estabilidade da solução de trabalho na menor concentração (LIQ). A média das respostas instrumentais das soluções em estudo foi comparada com a das soluções recém-preparadas e o resultado foi expresso como EPR.

A estabilidade pós-processamento (amostras processadas e mantidas no auto-injetor por 24 horas), conforme previsto nos guias de validação adotados, também foi avaliada em triplicata empregando amostras de CQB e CQA. Foram considerados aceitáveis os desvios de até 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal (EPR).

2.2. Validação parcial do método para quantificação da CAS X em microssomas hepático humano

De acordo com o *Guideline on bioanalytical method validation* (EMA, 2011) e a Resolução RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA (ANVISA, 2012), sempre que ocorrerem modificações no método bioanalítico já validado, deve ser realizada a validação parcial ou total, de acordo com a relevância da modificação. Validação parcial é definida como sendo a realização de parte dos ensaios da validação total, visando demonstrar a manutenção do desempenho e confiabilidade do método modificado (ANVISA, 2012). Por se tratar de um método para quantificação, a validação parcial requer, no mínimo, a determinção da precisão e exatidão intra-corrida (Tiwari; Tiwari, 2010; EMA, 2011). Assim, a validação parcial do método para a quantificação da CAS X em microssomas hepático de humanos foi realizada pela determinação dos parâmetros de linearidade e da precisão e exatidão intra-corrida, sendo realizadas nas mesmas condições anteriormente descritas para microssomas hepático de ratos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação do método para quantificação da CAS X em microssomas hepático de ratos

3.1.1. Linearidade

Foram utilizadas amostras de meio microssomal hepático de ratos contendo a CAS X na faixa de concentração de 0,1 a 100 µg/mL, em triplicata. Devido à falta de ajuste do modelo linear decorrente de uma ampla faixa de concentração da curva de calibração, foi aplicado um modelo de regressão ponderada. Essa ferramenta matemática consiste em dar maior peso aos dados com pouca variância e menor peso para os dados com elevada variância (Almeida; Castel-Branco; Falcão, 2002). Foram testados os pesos de $1/x$, $1/x^2$, $1/x^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$ e $1/y^{1/2}$. Posteriormente, foram calculados os coeficientes da curva de calibração (a, b e r^2) e a soma das porcentagens de erro padrão relativo (Σ EPR) obtidas em um teste de precisão intra-corrida realizado em todos os níveis de concentração de CAS X (0,1–100 µg/mL) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Parâmetros da curva de calibração e a respectiva soma de erro padrão relativo obtido para cada peso de ponderação da regressão linear (n = 24).

Peso	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)	Coeficiente de determinação (r^2)	Σ EPR (%)[a]
1[b]	0,0385	– 0,00239	0,9990	– 299,6
1/x	0,0384	– 0,00019	0,9994	0,0
$1/x^2$	0,0375	– 0,00026	0,9989	0,0
$1/x^{1/2}$	0,0384	– 0,00084	0,9993	74,2
1/y	0,0383	– 0,00025	0,9994	8,0
$1/y^2$	0,0374	– 0,00024	0,9987	12,3
$1/y^{1/2}$	0,3845	– 0,00089	0,9993	81,4

[a] Σ EPR (%) obtidas por avaliação da precisão intra-corrida com todos os níveis de concentração de CAS X usados na curva de calibração, expresso em porcentagem;
[b] Peso 1: regressão linear pelo método dos mínimos quadrados não ponderada.

Os pesos que apresentaram os menores valores de Σ EPR foram 1/x e $1/x^2$. Foi escolhida a ponderação com o peso de 1/x, pois este apresentou o maior valor de r^2. O ajuste da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderado, com peso 1/x, apresentou melhor distribuição de EPR, comparado ao modelo de regressão linear não ponderado, que excedeu 20% nas concentrações mais baixas, próximo ao LIQ (**Figura 11**). Isso ocorre quando a variância nas concentrações mais baixas é muito diferente das concentrações mais altas, muito comum em métodos bioanalíticos com amplas faixas de concentração. A aplicação adequada da ponderação ajusta a dispersão dos dados e proporciona uma aproximação mais adequada da variância entre as diferentes concentrações da curva de calibração (Almeida; Castel-Branco; Falcão, 2002).

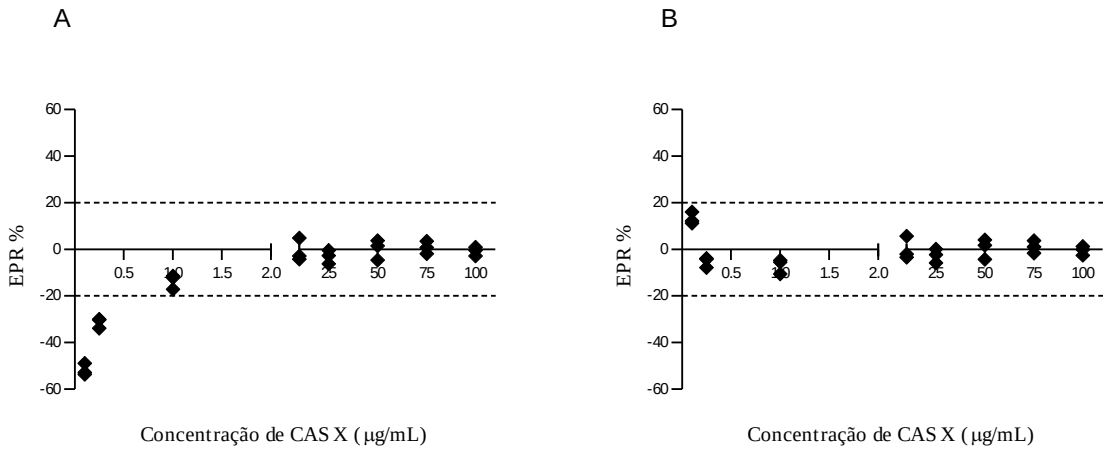


Figura 11. Porcentagem de erro padrão relativo (EPR%) *versus* concentração obtida para os modelos de regressão linear dos mínimos quadrados (A) não ponderado e (B) ponderado com peso 1/x.

A correlação linear obtida entre as concentrações nominais e a razão das áreas do sinal analítico da CAS X e do PI, com coeficiente de correlação (r) de 0,9997 está ilustrada na **Figura 12**.

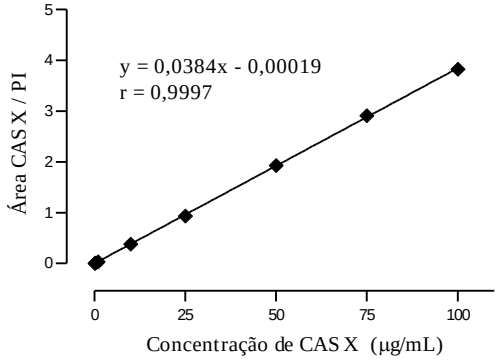


Figura 12. Curva de calibração do método analítico, referente à linearidade, para quantificação da CAS X em microssomas hepático de ratos.

A **Tabela 6** mostra os resultados da análise de variância (ANOVA) unilateral para o modelo dos mínimos quadrados ponderado, que apresentou o valor de F calculado para o modelo linear (22157,04) maior que o F tabelado (4,30). Esse resultado indica que o modelo de regressão linear ponderado foi estatisticamente significativo dentro do intervalo de confiança. Além disso, o adequado ajuste da equação linear foi apoiado pelo valor de F calculado do teste *Lack of Fit* (0,42), que foi menor que o valor de F tabelado (2,74), confirmando que não há falta de ajuste e que o modelo ponderado descreve adequadamente os dados experimentais.

Tabela 6. ANOVA unilateral para o modelo linear dos mínimos quadrados ponderado e para o teste da falta de ajuste (*Lack of Fit*), com nível de significância $p = 0,05$.

	Soma quadrática	**Graus de liberdade**	**Média quadrática**	**F Calculado**	**F Tabelado**	***P* valor**
Modelo linear	45,834	1	45,834	22157,04	4,30	0,0001[a]
Resíduos	0,046	22	0,002			
Falta de ajuste	0,006	6	0,001	0,42	2,74	0,8530[b]
Erro Puro	0,039	16	0,002			

[a] valor de $p < 0,05$ rejeita a hipótese nula (aceita o modelo linear)
[b] valor de $p > 0,05$ aceita a hipótese nula (rejeita a falta de ajuste)

3.1.2. Seletividade e efeito residual

Seis amostras distintas do meio de incubação microssomal na ausência de CAS X e uma amostra do LIQ foram processadas e comparadas. Não foram observados interferentes do meio microssomal em relação aos sinais cromatográficos da CAS X e do PI. Também não foi observado efeito residual quando foi realizada a análise de uma amostra branca posteriormente à injeção de uma amostra processada no LSQ **(Figura 13)**.

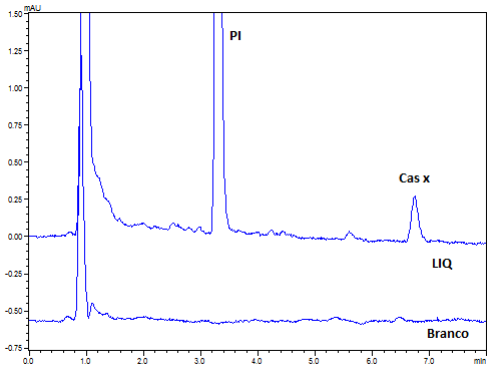


Figura 13. Cromatogramas superpostos referentes às análises de meio microssomal branco comparado ao perfil cromatográfico da CAS X no LIQ (0,10 µg/mL) e PI (15,0 µg/mL) em meio microssomal.

3.1.3. Precisão e exatidão

A **Tabela 7** mostra que os valores para precisão e exatidão intra-corrida e os valores médios da precisão e exatidão inter-corrida estão dentro dos limites de ± 20 e ± 15% do valor nominal para as amostras do LIQ e para as amostras dos controles de qualidade, respectivamente (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

Tabela 7. Precisão e exatidão intra e inter-corrida (n = 5).

		INTRA-CORRIDA			**INTER-CORRIDA**		
	Concentração nominal (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	**Precisão** CV (%)	**Exatidão** EPR (%)	Concentração obtida (µg/mL)	**Precisão** CV (%)	**Exatidão** EPR (%)
LIQ	0,10	0,11	1,9	14,1	0,11	6,0	12,7
CQB	0,25	0,24	2,5	–3,8	0,24	6,0	–1,7
CQM	50,0	50,20	2,8	0,4	51,51	2,9	3,0
CQA	75,0	75,72	1,7	1,0	78,49	7,4	4,7

CV (%): Coeficiente de variação expresso em porcentagem;
EPR (%): Erro relativo padrão expresso em porcentagem.

3.1.4. Estabilidade

A solução estoque de CAS X em acetonitrila foi avaliada juntamente com o PI, em triplicata, e apresentou estabilidade por até 6 meses quando estocada à temperatura de –20 °C, cuja média da porcentagem de EPR foi de –8,1 e –3,9% para a CAS X e o PI, respectivamente. A solução de trabalho de menor concentração (LIQ) de CAS X também apresentou estabilidade durante o mesmo período de 6 meses à –20 °C, com ERP de –7,3%.

Na avaliação da estabilidade pós-processamento (amostras mantidas no auto-injetor pelo período de 24 horas), as amostras do CQA e do CQB apresentaram EPR médio de 8,1 e 7,4%, respectivamente.

Quanto à estabilidade de longa duração e a estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento, apesar de serem exigidas pelos guias de validação para métodos bioanalíticos, não se aplicam aos estudos de metabolismo in vitro, uma vez que as amostras submetidas aos ensaios enzimáticos são analisadas imediatamente após o tempo de incubação.

3.2. Validação parcial do método para quantificação da CAS X em microssomas hepático humano

A validação parcial deve ser realizada quando métodos bioanalíticos já validados sofrem modificações que não necessariamente requerem uma validação total. As mudanças em métodos bioanalíticos que entram nessa categoria, mas não se limitam a tais, incluem transferência de métodos entre laboratórios e analistas, mudanças na instrumentação, sistemas de detecção e/ou softwares utilizados, além de mudança na espécie estudada (com a mesma matriz) e mudança na matriz avaliada (com a mesma espécie) (Tiwari; Tiwari, 2010; EMA, 2011). A validação parcial do método de quantificação da CAS X em meio microssomal hepático humano foi demonstrada pelos parâmetros de linearidade e de precisão e exatidão intra-corrida.

De maneira semelhante à validação em meio microssomal hepático de ratos, foi aplicado um modelo de regressão ponderado (peso 1/x) na avaliação da linearidade da curva de calibração em matriz microssomal humana. Assim, o método demonstrou linearidade em toda faixa de concentração da CAS X (0,10–100 μg/mL), com um coeficiente de correlação (r) de

0,9996 (**Figura 14**). O valor de F calculado (0,063) do teste *Lack of fit* foi menor que o tabelado (2,741), demonstrando o adequado ajuste do modelo (p >0,05).

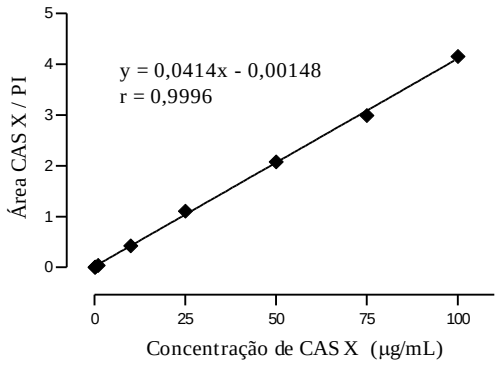


Figura 14. Curva de calibração do método analítico, referente à linearidade, para quantificação da CAS X em microssomas hepático humano.

Na avaliação da precisão e exatidão intra-corrida foram obtidos valores dentro dos limites de 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações de controle de qualidade, como recomendado pelos guias oficiais adotados (EMA, 2011; ANVISA, 2012) (**Tabela 8**).

Tabela 8. Precisão e exatidão intra-corrida obtidas em meio microssomal hepático humano (n = 5).

	Concentração nominal (µg/mL)	Concentração obtida (µg/mL)	**Precisão** CV (%)	**Exatidão** EPR (%)
LIQ	0,10	0,11	9,8	11,7
CQB	0,25	0,26	2,6	2,8
CQM	50,0	54,16	4,9	8,3
CQA	75,0	77,91	3,9	3,9

CV (%): Coeficiente de variação expresso em porcentagem;
EPR (%): Erro relativo padrão expresso em porcentagem.

Tendo sido validado o método analítico para quantificação da CAS X em microssomas hepático de ratos e de humanos, este foi aplicado nas próximas etapas dos estudos de metabolismo in vitro para a identificação das enzimas envolvidas no metabolismo da CAS X e a determinação dos parâmetros enzimáticos.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO IN VITRO DA CASEARINA X PELO SISTEMA MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS E DE HUMANOS

1. INTRODUÇÃO

A identificação da(s) enzima (s) responsável (eis) pela metabolização de uma nova entidade química é conhecida como reação de fenotipagem ou mapeamento enzimático (Zhang et al., 2007). Um dos principais objetivos de conhecer as enzimas que estão envolvidas no metabolismo de um candidato a fármaco é determinar seu potencial de causar efeitos adversos. A diminuição no metabolismo de um fármaco pela sua via enzimática, seja devido à deficiência genética ou à inibição por outro fármaco administrado concomitantemente, resulta na redução do seu *clearance*, com um correspondente aumento na exposição a esse fármaco (Lin; Lu, 1997).

Recentes estudos de metabolismo in vitro de produtos naturais realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que os compostos artepelin C, monensina A, piplartina, grandisina e alfa e beta amirinas são metabolizados principalmente pelas isoformas das enzimas do CYP 450 (Carrão, 2015; Rocha et al., 2014; Marques et al., 2014; Messiano et al., 2013; Moreira et al., 2013). Apesar da maioria dos substratos de origem natural ou sintética ser metabolizados por reações de oxidação mediadas pelo CYP 450, o metabolismo de fase I inclui também reações de hidrólise, uma vez que a fração microssomal extraída de hepatócitos é rica em diferentes isoformas de esterases. As esterases são enzimas associadas ao retículo endoplasmático localizado na porção luminal das células hepáticas, envolvidos na detoxificação de substratos endógenos e xenobióticos (Robbi; Beaufay, 1983; 1987). As principais esterases responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos incluem esterases-A (paraoxonases / arilesterases), carboxilesterases e colinesterases (Yang et al., 2011).

Tendo em vista que as enzimas da classe das esterases são abundantes no fígado, estas devem ser as responsáveis pelo metabolismo da CAS X. Estruturalmente, a maioria dos substituintes presentes no esqueleto clerodânico da CAS X é constituída por grupos do tipo éster, extremamente passível de sofrer hidrólise espontânea em meio aquoso ácido ou básico. Experimentos prévios demonstraram que o metabolismo da CAS X é independente de NADPH (**Capítulo 1**), um cofator necessário na cadeia de transporte de elétrons das reações de oxidação. Além disso, só foi possível manter constante as concentrações da CAS X em meio microssomal após o enriquecimento do meio com NaF, um potente inibidor de esterases plasmáticas e hepáticas (Zhang et al., 1999; Fandiño; Toennes; Kauert, 2002; Weil et al.; 2013).

Diante de tais observações experimentais, o objetivo dessa parte do trabalho foi confirmar a hipótese de que o metabolismo da CAS X deve compreender essencialmente reações de hidrólise e determinar a identidade da(s) esterase(s) envolvida(s), empregando inibidores químicos seletivos para suas diferentes isoformas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A identificação das esterases responsáveis pelo metabolismo hidrolítico da CAS X foi realizada empregando microssomas hepático de ratos e de humanos para comparar a contribuição da via hidrolítica de metabolismo entre as espécies. Os meios microssomais (ratos: 0,5 mg/mL / humano: 0,25 mg/mL) preparados em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 com 1% de glicerina foram pré-incubados (37 ºC, 10 min) com diferentes inibidores seletivos de esterases : fluoreto de sódio [NaF] (200 μM), fosfato de bis-*p*-nitrofenil [BNPP] (200 μM), cloreto de cálcio [$CaCl_2$] (1000 μM), EDTA (3000 μM), cloreto de magnésio [$MgCl_2$] (1000 μM), cloreto de mercúrio [$HgCl_2$] (200 μM), dibucaína (100 μM) ou quinidina (100 μM), seguido de 5 min de incubação com a CAS X (10 μM). As concentrações de cada inibidor foi adotada a partir de estudos de seus efeitos inibitórios sob a esterase alvo (Lee et al. 2014). O volume do meio microssomal foi sempre de 200 μL.

Após a incubação, as amostras foram preparadas e analisadas conforme o método validado para a quantificação da CAS X por HPLC. Controles contendo a CAS X na ausência de microssomas foram avaliados para os cálculos de atividade enzimática, expressas em μM de CAS X metabolizada, por minuto, por concentração de proteínas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. A porcentagem de inibição foi determinada pela diferença entre as quantidades metabolizadas de CAS X na presença e ausência de inibidor, dividida pela quantidade metabolizada na ausência de inibidor. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para caracterizar a classe de esterases (esterases-A, carboxilesterases e colinesterases) envolvidas no metabolismo da CAS X, foi realizado um estudo de inibição enzimática usando

uma variedade de inibidores específicos das isoformas de esterases presentes em microssomas. O efeito dos inibidores das esterases sobre o metabolismo in vitro da CAS X estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9. Efeito de inibidores de esterases no metabolismo in vitro da CAS X (10 µM) incubada com microssomas hepático de ratos (0,5 mg/mL) e humano (0,25 mg/mL) por 5 min à 37 ºC. Média (DP), n = 3.

Inibidor	Esterase alvo	Concentração (µM)	**Atividade específica** (µM/min/mg proteína)		**Inibição** (%)	
			Ratos	**Humanos**	**Ratos**	**Humanos**
Controle			2,35 (0,18)	4,77 (0,40)		
NaF	Esterases gerais	200	0,09 (0,11)*	0,22 (0,20)*	96,1	95,4
$HgCl_2$	Esterases gerais	200	0,02 (0,05)*	0,16 (0,23)*	99,1	96,7
$CaCl_2$**	Esterases-A	1000	2,37 (0,06)	4,61 (0,19)	0,0	3,2
EDTA	Esterases-A	3000	2,28 (0,29)	4,79 (0,70)	3,1	0,0
$MgCl_2$	Esterases-A	1000	2,23 (0,35)	4,82 (0,57)	5,1	0,0
Dibucaína	Colinesterases	100	2,39 (0,29)	4,62 (0,22)	0,0	3,1
Quinidina	Colinesterases	100	2,46 (0,07)	4,72 (0,38)	0,0	1,0
BNPP	Carboxilesterases	100	0,06 (0,09)*	0,09 (0,07)*	97,2	98,2

** Ativador de Esterases-A;
* Significância estatística: $p < 0,05$ vs. Controle;
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;
BNPP: fosfato de bis-*p*-nitrofenil.

O NaF e $HgCl_2$ são capazes de inibir todas as esterases, pois eles alteram a estrutura tridimensional, atuando sobre o grupo sulfidrila (SH) no centro ativo das esterases (Gonzalvo et al., 1997; Ali et al., 1985). A adição de NaF e $HgCl_2$ ao meio de incubação contendo microssomas hepático de ratos ou humano inibiu completamente a hidrólise da CAS X, confirmando que as esterases realmente estão envolvidas no seu metabolismo.

A atividade das esterases microssomais de ratos e de humanos não foi afetada por Ca^{2+} (ativador de esterases-A), Mg^{2+} (inibidor de esterases-A) ou EDTA (inibidor de esterases-A), devido à quelação com íons cálcio (Tang; Chambers, 1999), sugerindo que as esterases-A não estão envolvidas na catálise da hidrólise da CAS X. Inibição de hidrólise pela dibucaína e quinidina, que são inibidores específicos de colinesterases, também não foi observada.

Entretanto, a incubação do meio microssomal hepático de ratos ou humanos com BNPP inibiu completamente a hidrólise da CAS X, praticamente anulando a atividade enzimática. Esses resultados confirmam que o mecanismo primário de metabolismo hepático da CAS X

ocorre por hidrólise, na qual as isoformas responsáveis pela catálise da reação são as carboxilesterases microssomais.

Recentemente, um estudo investigou as diferenças na hidrólise hepática e extra-hepática em diferentes sistemas in vitro (hepatócitos, fração S9 hepática, intestinal, renal e plasma) de diferentes espécies (humanos, macacos, cães e ratos) e demonstrou que 10 entre os 11 pró-fármacos avaliados foram predominantemente hidrolisados por carboxilesterases (Nishimuta; Houston; Galentin, 2014).

As carboxilesterases (CES) são membros da superfamília de esterases serina hidrolase e podem catalisar, com grande eficiência, a hidrólise de uma variedade de ésteres, amidas e carbamatos (Satoh; Hosokawa, 2001). Elas possuem três resíduos de aminoácidos (serina, histidina e ácido glutâmico) que são essenciais para sua atividade. Uma mutação em qualquer um desses três resíduos resulta na formação de uma enzima não funcional.

As CES tem uma ampla especificidade de substrato e são abundantemente expressas em fígado de mamíferos. Duas principais isoformas de CES foram identificadas em fígado humano, designadas carboxilesterases tipo 1 (hCE-1) e carboxilesterases tipo 2 (hCE-2) (Brzezinski et al., 1994; Pindel et al., 1997), que apresentam diferença em quase 50% na sequência de aminoácidos (Redinbo; Potter, 2005). O principal papel das CES no metabolismo de xenobióticos é converter ésteres ou amidas apolares em seus respectivos produtos mais solúveis: ácido, álcool ou amina. Assim, elas atuam como uma efetiva barreira biológica que limita a absorção e/ou distribuição de substratos que podem ser tóxicos, facilitando sua eliminação do organismo (Yang et al., 2011). Por outro lado, as CES também estão envolvidas na ativação de vários pró-fármacos antirretrovirais, antitumorais e antibióticos (Yang et al., 2011).

O maior conteúdo de CES é encontrado na fração microssomal hepática, com predomínio de hCE-1 (Laizure et al., 2013). Assim, o metabolismo microssomal hepático da CAS X, observado na ausência de inibidores seletivos das CES, indica que ela é substrato para hCE-1. No entanto, a atividade de CES microssomais intestinais também precisa ser levada em consideração para melhor previsão in vitro da biodisponibilidade. Antes disso, a determinação dos parâmetros enzimáticos e a identificação de metabólitos também são necessários para caracterizar o metabolismo in vitro da CAS X.

CAPÍTULO 4

CINÉTICA ENZIMÁTICA DO METABOLISMO IN VITRO DA CASEARINA X COM MICROSSOMAS HEPÁTICO DE RATOS E DE HUMANOS

1. INTRODUÇÃO

A catálise envolvida nas reações de metabolismo pelas enzimas microssomais hepática obedece ao esquema cinético típico, mostrado na **Equação 3**:

$$E + S \underset{}{\overset{Ks}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{Kp} E + P \qquad \textbf{(Equação 3)}$$

onde, teoricamente, todas as ligações são reversíveis, e um complexo ES (enzima-substrato) deve ser formado antes da formação do produto (P). Nesse caso, Ks é a constante de equilíbrio para a formação ou dissociação do complexo ES e Kp é a constante de catálise, ou capacidade do complexo ES gerar o produto (Bezerra; Fraga; Dias, 2013).

A formação do complexo ES na primeira etapa é uma reação rápida. Em baixas concentrações do substrato, a enzima permanece em equilíbrio entre a forma livre (E) e o complexo ES. Ao aumentar a concentração do substrato, o equilíbrio se desloca para a direita e aumenta a concentração do complexo ES. Quando o complexo ES atinge a maior concentração e permanece constante é atingido o estado estacionário, o que significa que há disponibilidade de substrato suficiente para ocupar o sítio catalítico de todas as enzimas do sistema. Nessas condições de saturação é possível medir a velocidade máxima da reação enzimática, dada pela constante da segunda etapa da reação, designada Kp ou *turnover*, que converte o complexo ES em E + P (Seibert; Tracy, 2014).

Baseado nesse conceito, Victor Henri (1903), iniciou o desenvolvimento de um modelo que demonstrou como a velocidade inicial de uma reação enzimática é diretamente proporcional à concentração da enzima, mas que aumenta de maneira não linear com o aumento da concentração do substrato, até atingir um limite máximo (Segel, 1975). Dez anos depois, Leonor Michaelis e Maud Menten (1913) confirmaram o trabalho experimental de Henri e apresentaram um modelo adaptando as constantes para uma situação na qual a velocidade máxima da reação pode ser observada no estado estacionário, conforme a **Equação 4**:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \qquad \textbf{(Equação 4)}$$

onde V_0 é a velocidade inicial da reação (ou velocidade no estado estacionário), [S] é a concentração do substrato, V_{max} é a velocidade máxima da reação e K_M é a constante de Michaelis-Menten.

Assim, o efeito que se tem sob a velocidade de uma reação, ao variar a concentração do substrato, assume forma de hipérbole, quando plotado em duas dimensões, com a velocidade da reação no eixo y e a concentração do substrato no eixo x (**Figura 15**).

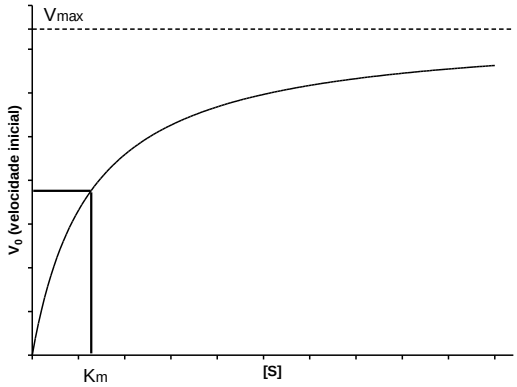


Figura 15. Gráfico representativo de uma reação enzimática segundo a cinética de Michaelis-Menten. V_{max}, velocidade máxima; [S], concentração de substrato; K_M, constante de Michaelis-Menten.

Os ensaios in vitro para estudos de metabolismo de fármacos são realizados pela incubação do fármaco de interesse com microssomas hepático em condições nas quais a concentração do fármaco e das enzimas microssomais precisam estar bem definidas. Além disso, o meio reacional, pH, temperatura, força iônica e tempo de incubação devem ser padronizados. Dessa forma, é possível determinar a cinética enzimática do metabolismo com base nos dois parâmetros cinéticos principais, V_{max} e K_M.

A V_{max} é uma estimativa da velocidade máxima da reação, ou seja, a taxa máxima de conversão do substrato em produto no estado de saturação da enzima. Esse parâmetro indica a capacidade de depuração do sistema biológico para um dado fármaco. Quanto maior for a velocidade observada, maior será essa capacidade (Tracy, 2008). Como o valor da V_{max} é um índice proporcional que representa o *turnover* enzimático por unidade de tempo, a linearidade em relação ao tempo de incubação deve ser determinada como um pré-requisito para calcular os valores de K_M e V_{max}. Além disso, a V_{max} é geralmente normalizada pela concentração proteica. Assim, a linearidade em relação à concentração de proteínas microssomais também deve ser estabelecida (Seibert; Tracy, 2014).

O valor de K_M é equivalente à concentração de substrato na qual a velocidade da reação é igual à metade da V_{max}. Esse parâmetro estima a afinidade de uma enzima pelo seu substrato, nos casos em que a reação enzimática opera em condições de estado estacionário de equilíbrio rápido, ou seja, quando a concentração do complexo ES permanece constante tão logo tenha sido iniciada a reação. Nesse caso, o valor de K_M se aproxima da constante de dissociação do complexo ES e indica que, quanto menor for o seu valor, maior será a afinidade da enzima pelo substrato na formação do complexo (Zhang; Kaminsky, 2008).

Com esses dois parâmetros cinéticos (V_{max} e K_M) é possível determinar o *clearance* intrínseco (Cl_{int}) de eliminação do substrato. In vivo, o Cl_{int} é definido como a habilidade do fígado, como principal órgão metabolizador, de depurar um xenobiótico, se as limitações de ligação às proteínas e de fluxo sanguíneo hepático não forem consideradas (Rane; Wilkinson; Shand, 1997). Um dos principais parâmetros que pode se previsto com os dados de Cl_{int} é o *clearance* hepático (Cl_H). Para isso, um modelo farmacocinético que descreve a concentração de um fármaco ou xenobiótico no fígado deve ser aplicado para a extrapolação in vitro-in vivo.

Os principais modelos preditivos de Cl_H incluem o modelo de compartimento bem agitado ("*well-stirred*"), modelo dos tubos paralelos, modelo distribuído e modelo de dispersão (Zhang; Kaminsky, 2008). Com o auxílio desses modelos, os dados cinéticos das reações enzimáticas de metabolismo in vitro podem ser usados como uma importante ferramenta para a previsão farmacocinética do *clearance* in vivo, desde que todos os pressupostos relativos ao mecanismo de depuração (metabolismo e/ou excreção renal ou biliar), os órgãos responsáveis pela mesma (fígado ou depuração extra hepática) e tipos de metabolismo (hidrólise, oxidação ou outros) sejam considerados (Houston, 1994; Iwatsubo et al., 1997).

Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi determinar as condições da reação de metabolismo in vitro da CAS X em estado estacionário, determinar os parâmetros enzimáticos V_{max}, K_M e Cl_{int}, e estimar o Cl_H com a aplicação de um modelo adequado de extrapolação in vivo-in vitro, comparando os resultados obtidos nas espécies estudadas (ratos e humano).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos de otimização e de metabolismo in vitro da CAS X foram realizados primeiramente com microssomas hepático de ratos e, posteriormente, com

microssomas hepático humano. No entanto, os procedimentos serão descritos simultaneamente para facilitar a comparação entre as espécies.

2.1. Otimização do tempo de incubação

Para a definição da faixa linear de depleção da CAS X em função do tempo de incubação, as amostras foram preparadas em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4, com 1% de glicerina e com a concentração de proteínas microssomais de 0,5 e 0,25 mg/mL para os ensaios com microssomas hepático de ratos e de humanos, respectivamente. O volume do meio microssomal foi sempre de 200 µL. A CAS X foi avaliada em três níveis de concentração (baixa, média e alta): 1 mg/mL (1,9 µM), 10 mg/mL (18,8 µM) e 100 mg/mL (187,7 µM), em triplicata.

Após pré-incubação do meio microssomal a 37 ºC por 5 minutos, a reação foi iniciada pela adição da CAS X. As amostras foram mantidas sob agitação e foram avaliados os tempos de 0; 2,5; 5; 7,5; 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de incubação. As reações foram encerradas pela adição de 200 µL de acetonitrila gelada e as amostras foram preparadas e analisadas conforme o método validado para a quantificação da CAS X por HPLC.

2.2. Otimização da concentração de proteínas microssomais

Para a definição da faixa linear de depleção da CAS X em função da concentração de proteínas microssomais, as amostras foram preparadas em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4, com 1% de glicerina e com adição de concentrações crescentes da fração microssomal hepática (ratos ou humanos). As concentrações de proteínas microssomais de ratos avaliadas foram 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 e 2,00 mg/mL. As concentrações de proteínas microssomais de humanos avaliadas foram 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,80 e 1,00 mg/mL.

Após pré-incubação do meio microssomal a 37° C durante 5 minutos, as reações foram iniciadas com a adição da CAS X. Os ensaios foram realizados sob agitação, com o tempo de incubação fixo em 5 minutos e em três níveis de concentração da CAS X (baixa, média e alta): 1 mg/mL (1,9 µM), 10 mg/mL (18,8 µM) e 100 mg/mL (187,7 µM), em triplicata. As reações

foram encerradas pela adição de 200 µL de acetonitrila gelada e as amostras foram preparadas e analisadas conforme o método validado para a quantificação da CAS X por HPLC.

2.3. Cinética enzimática da CAS X

Após a otimização do metabolismo in vitro da CAS X nas condições de velocidade inicial (V_0), ou de estado estacionário, os valores de concentração de proteínas microssomais e os tempos de incubação definidos com microssomas hepático de ratos e humanos foram aplicados nos experimentos de cinética enzimática. Os parâmetros cinéticos foram obtidos pela depleção da CAS X como substrato das enzimas microssomais, em função das concentrações adicionadas no início da reação, conforme descrito na **Tabela 10**.

Tabela 10. Valores de concentração em µM e µg/mL de CAS X utilizadas nos experimentos de cinética enzimática com microssomas hepático de ratos e de humanos.

Concentrações de CAS X	
µM	**µg/mL**
0,9	0,5
1,9	1,0
3,8	2,0
7,5	4,0
11,3	6,0
15,0	8,0
18,8	10,0
28,2	15,0
37,5	20,0
56,3	30,0
75,1	40,0
93,9	50,0
112,6	60,0
131,4	70,0
150,2	80,0
169,0	90,0
187,7	100,0

Os experimentos de cinética enzimática da CAS X com microssomas hepático de ratos ou humano foram realizados em triplicata. As amostras foram analisadas por HPLC e quantificadas baseadas em uma curva de calibração analítica preparada no mesmo dia. As concentrações de CAS X metabolizadas foram calculadas subtraindo as concentrações remanescentes do metabolismo de suas respectivas concentrações nominais. A velocidade da reação enzimática foi determinada após a normalização da concentração metabolizada pela concentração de proteínas microssomais e tempo de incubação. Os dados obtidos foram tratados

por regressão não linear, empregando o programa GraphPad Prism 5, para a determinação dos parâmetros cinéticos V_{max} e K_M. O Cl_{int} da CAS X foi determinado pelo cálculo da razão entre os parâmetros V_{max} e K_M.

2.4. Extrapolação in vitro-in vivo

Para prever o Cl_H in vivo da CAS X em ratos e humanos, foi usado um método de extrapolação in vitro-in vivo com os dados de Cl_{int}, no qual a quantidade de proteínas microssomais presente nos ensaios in vitro é redimensionada em relação ao peso do fígado e ao peso corporal (**Equação 5**), com subsequente aplicação do modelo farmacocinético "*well-stirred*", sem correção para ligações proteicas (Obach et al., 1997) (**Equação 6**).

$$Cl'_{\text{int}} = Cl_{\text{int}} \times \frac{\text{g de peso do fígado}}{\text{kg de peso corporal}} \times \frac{\text{mg de proteínas microssomais}}{\text{g de peso do fígado}} \qquad \textbf{(Equação 5)}$$

$$Cl_H = \frac{Q \times Cl'_{\text{int}}}{Q + Cl'_{\text{int}}} \qquad \textbf{(Equação 6)}$$

Nas equações acima, Cl'_{int} é o *clearance* intrínseco obtido por extrapolação, Cl_H é o *clearance* hepático, e Q é o fluxo sanguíneo. Os parâmetros fisiológicos e bioquímicos adotados na extrapolação in vitro-in vivo estão descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos para a extrapolação in vitro-in vivo dos dados de Cl_{int} in vitro da CAS X.

Parâmetros	Valores dos parâmetros	
	Rato	**Humano**
Peso do fígado / kg de peso corporal	44 g	20 g
Conteúdo de proteínas microssomais / g de fígado	44,8 mg	45 mg
Fluxo sanguíneo hepático	58,8 mL/min/kg	20 mL/min/kg
Referências	Houston et al., 1994; Nakamori et al., 2011.	Obach et al., 1997; Kang; Lee, 2011.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização do tempo de incubação

O intervalo linear de depleção do substrato foi avaliado pela medida da porcentagem de concentração remanescente de CAS X nos diferentes tempos de incubação, abrangendo a faixa de 0–30 minutos. Três concentrações de substrato foram avaliadas (1, 10 e 100 μg/mL), mantendo a concentração de proteínas microssomais fixa em 0,50 e 0,25 mg/mL para microssomas hepático de ratos e de humanos, respectivamente.

Foi observada a depleção linear da CAS X até 10 minutos de incubação, em ambas as espécies estudadas, conforme ilustrado na **Figura 16**.

Um pressuposto da cinética de Michaelis-Menten é que as condições de estado estacionário, ou linearidade, sejam alcançadas. Assim, as condições de reação dentro do intervalo linear podem ser escolhidas (Seibert; Tracy, 2014). Considerando que a faixa linear de depleção da CAS X no metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos e de humanos corresponde ao intervalo de tempo de 0–10 minutos, optou-se por definir o tempo de incubação médio de 5 minutos para aplicação nos ensaios de cinética enzimática.

A depleção linear da CAS X observada nesse intervalo de tempo demonstra que o sistema encontra-se em estado estacionário. O termo estado estacionário se refere a um processo no qual as taxas de formação e consumo do intermediário reativo são idênticas (Seibert; Tracy, 2014). Assim, dentro da faixa linear, mesmo que uma fração considerável do substrato tenha sido metabolizada, o sistema permanece com disponibilidade de substrato suficiente para a manutenção da concentração do complexo ES. Portanto, com 5 minutos de incubação, a concentração de CAS X ainda mantém todas as enzimas saturadas, possibilitando determinar seus parâmetros cinéticos de metabolismo no estado estacionário.

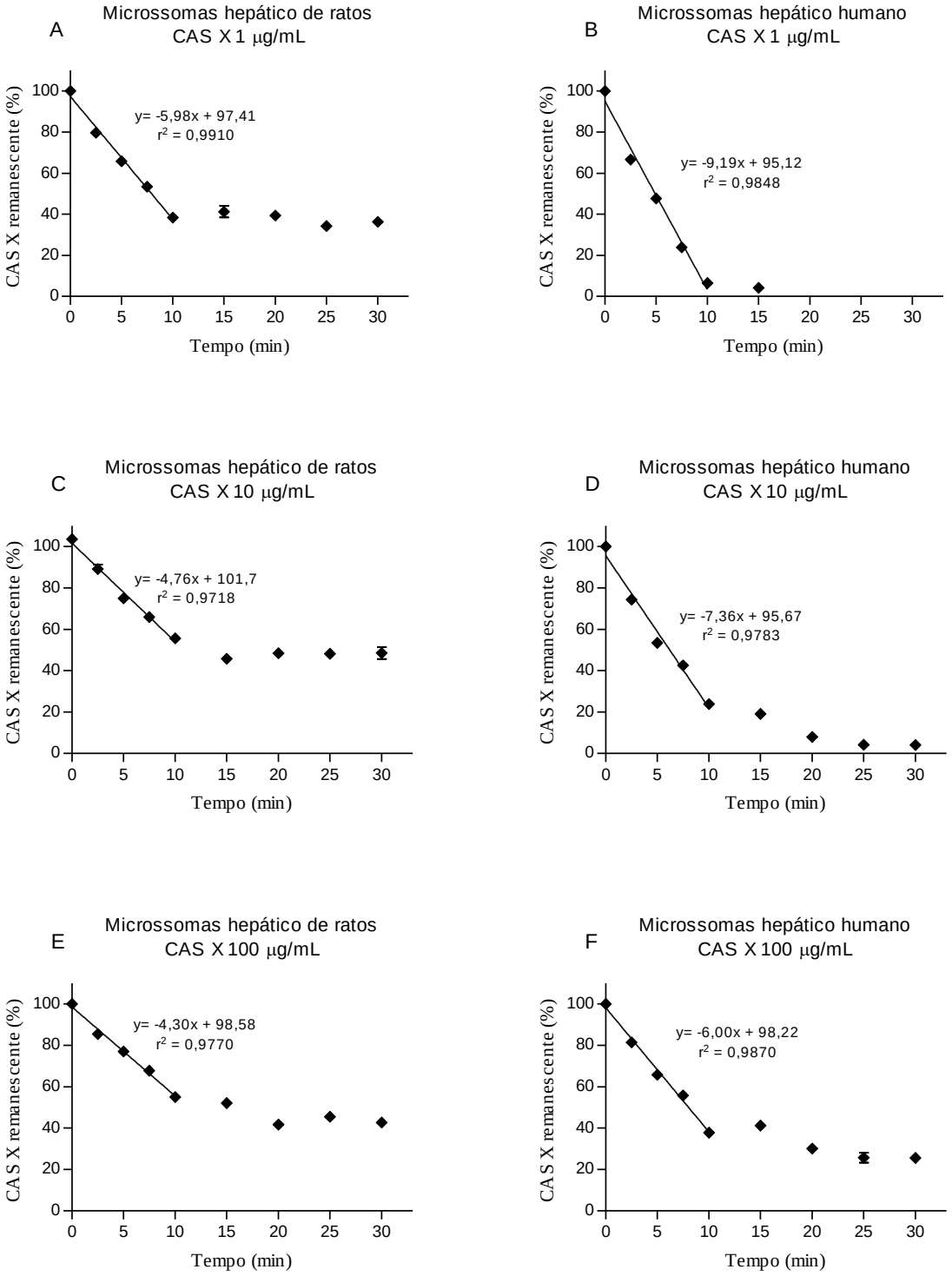


Figura 16. Otimização do tempo de incubação de (A) 1μg/mL, (C) 10 μg/mL e (E) 100 μg/mL de CAS X com microssomas hepáticos de ratos e (B) 1 μg/mL, (D) 10 μg/mL e (F) 100 μg/mL de CAS X com microssomas hepático de humanos (n = 3).

3.2. Otimização da concentração de proteínas

A literatura prevê que a velocidade de metabolismo normalmente apresenta comportamento linear quando se emprega uma concentração de proteínas microssomais na faixa de 0,2–2,0 mg/mL, sendo estes valores um indicativo da concentração de enzimas presente no *pool* de microssomas (Zhang; Kaminsky, 2008).

A **Figura 17** mostra os resultados da otimização da concentração de proteínas, nos quais a faixa linear de depleção da CAS X foi de 0–0,75 mg/mL no metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos e de 0–0,4 mg/mL no metabolismo in vitro com microssomas hepático de humanos, em todos os níveis de concentração de CAS X avaliados.

Considerando que a faixa linear de depleção da CAS X no metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos corresponde à faixa de concentração de proteínas de 0–0,75 mg/mL, optou-se por definir a concentração intermediária de proteínas de 0,4 mg/mL para aplicação nos ensaios de cinética enzimática. No caso do metabolismo in vitro da CAS X com microssomas hepático humano, a faixa linear de depleção do substrato foi observada com a concentração de proteínas de 0–0,4 mg/mL. Foi, portanto, definida a concentração intermediária de proteínas microssomais de humanos de 0,2 mg/mL para a estimativa dos parâmetros cinéticos de metabolismo.

O emprego de uma concentração de proteínas intermediária dentro da faixa linear observada na otimização do metabolismo in vitro, indica que o sistema enzimático encontra-se em estado de velocidade inicial. Dessa forma, mesmo que a CAS X esteja sendo metabolizada, a linearidade demonstra que há disponibilidade de substrato suficiente para a manutenção da concentração do complexo ES em estado estacionário.

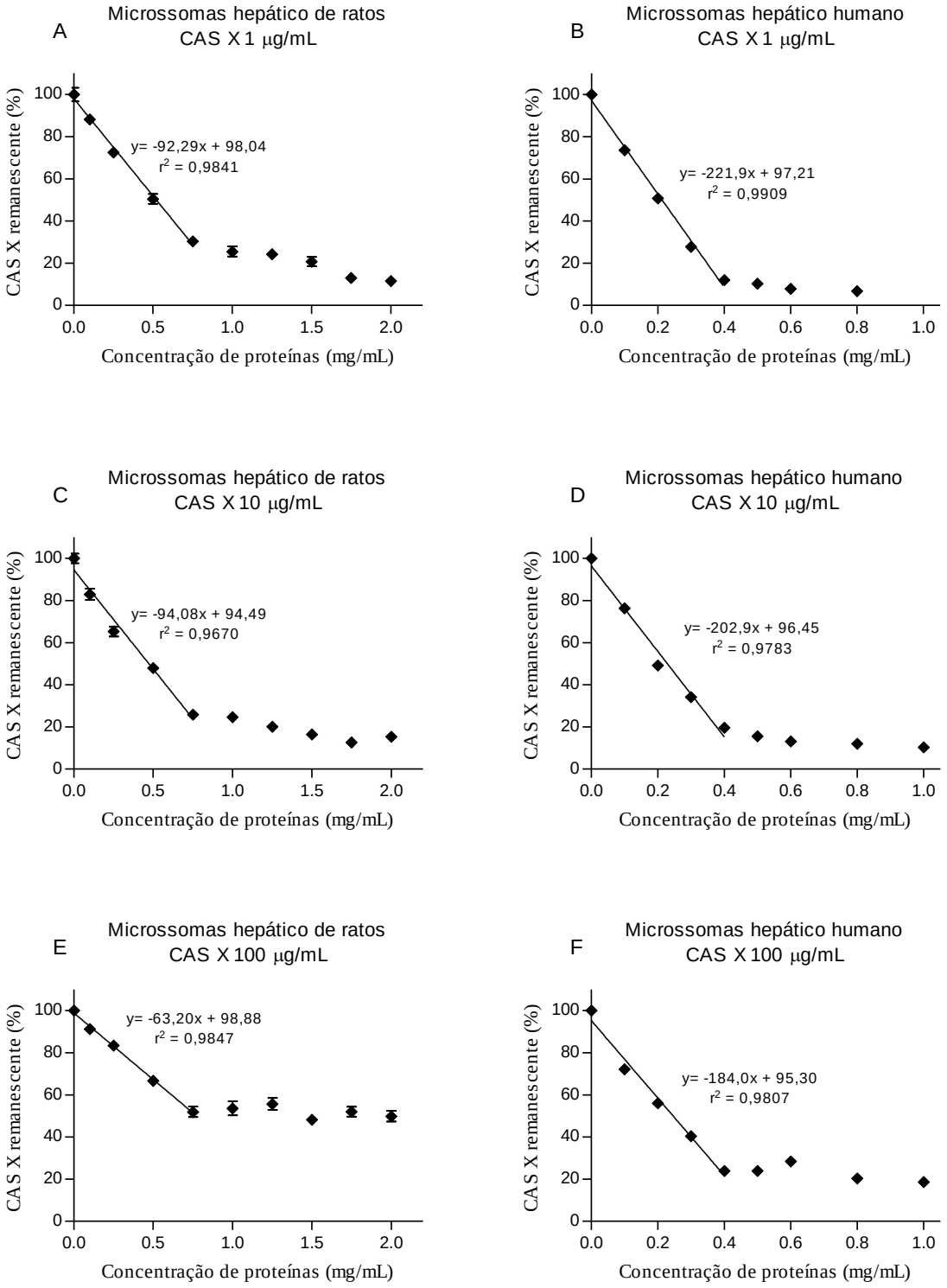


Figura 17. Otimização da concentração de proteínas microssomais hepática de ratos com (A) 1 μg/mL, (C) 10 μg/mL e (E) 100 μg/mL de CAS X e otimização da concentração de proteínas microssomais hepática de humanos com (B) 1 μg/mL, (D) 10 μg/mL e (F) 100 μg/mL de CAS X (n = 3).

3.3. Cinética enzimática da CAS X

A cinética enzimática da CAS X no metabolismo in vitro com microssomas hepático foi caracterizada empregando as condições de estado estacionário, ou velocidade inicial, para o tempo de incubação e para a concentração de proteínas microssomais. A quantidade de proteínas microssomais de ratos e de humanos foram de 0,4 e 0,2 mg/mL, respectivamente, e o tempo de incubação foi de 5 minutos para ambas as espécies. A **Figura 18** mostra o comportamento cinético da CAS X, descrito como uma relação hiperbólica entre a velocidade inicial (V_0) e a concentração de substrato, característica do modelo enzimático de Michaelis-Menten. A estimativa dos parâmetros cinéticos foi realizada pelo ajuste não linear das curvas obtidas com a variação da concentração de CAS X na faixa de 1,0–187,7 μM e estão descritas na **Tabela 12**.

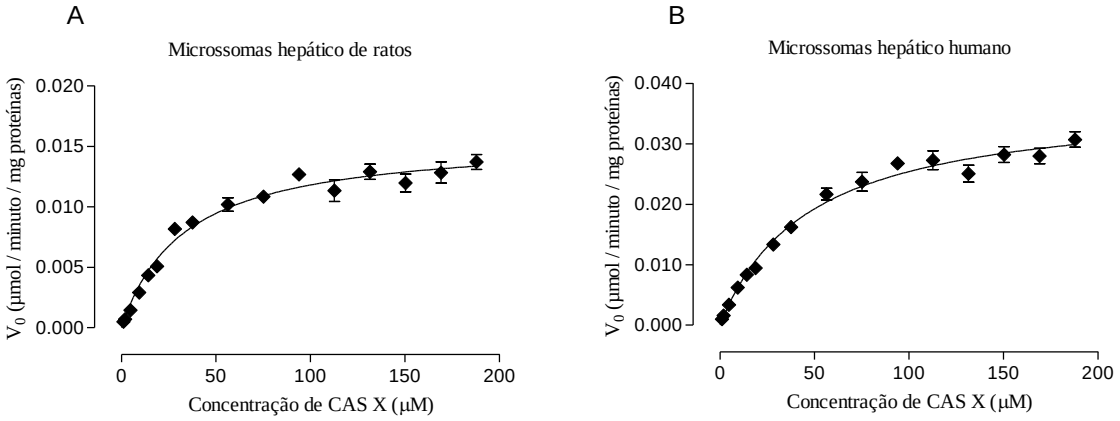


Figura 18. Representação gráfica das curvas de Michaelis-Menten para a cinética enzimática da CAS X com microssoma hepático de (A) ratos e (B) humanos (n = 3).

Tabela 12. Parâmetros cinéticos de metabolismo *in vitro* da CAS X com microssomas hepático de ratos e humanos. Média (DP), n = 3.

Microssomas hepático	**V_{max} (μmol/min/mg de proteínas)**	**K_M (μM)**	**Cl_{int} (mL/min/mg de proteínas)**
Ratos	0,0157 (0,0005)	33,1 (3,3)	0,47 (0,04)
Humanos	0,0374 (0,0012)	47,0 (4,2)	0,80 (0,03)

Os resultados obtidos nos experimentos de cinética enzimática mostraram que a V_{max} do metabolismo in vitro da CAS X com microssomas hepático de humanos é 2,4 vezes maior que

em microssomas hepático de ratos. Também é possível observar que há diferença na afinidade da CAS X pelas esterases presentes na matriz microssomal hepática de ratos e humana, devido aos diferentes valores de K_M obtidos, que foi maior no modelo humano.

A estimativa das constantes V_{max} e K_M têm importantes aplicações nos estudos pré-clínico, pois a velocidade de uma reação enzimática é equivalente ao produto entre o Cl_{int} e a concentração do substrato. Como o Cl_{int} é análogo ao *clearance* do metabolismo in vivo, esses dados podem estimar a capacidade das enzimas hepáticas de metabolizar um fármaco na ausência de restrições relacionadas ao fluxo sanguíneo e ligação às proteínas plasmáticas, de acordo com a **Equação 7**:

$$Cl_{\text{int}} = \frac{V_{\max}}{K_m} = \frac{v}{[s]} \qquad \textbf{(Equação 7)}$$

onde v é a velocidade inicial da reação e $[s]$ é a concentração do substrato.

As estimativas do Cl_{int} da CAS X empregando microssomas hepático de ratos e de humanos resultaram nos valores de 0,47 e 0,80 mL/min/mg de proteínas, respectivamente. Estes resultados demonstram que o metabolismo in vitro da CAS X empregando microssomas hepático de humanos é 1,7 vezes maior que o metabolismo empregando microssomas hepático de ratos. Essa diferença de valores de Cl_{int} entre as espécies, resultante da atividade hidrolítica microssomal, pode ser devido à diferença no padrão de expressão das isoenzimas de CES hepáticas. A literatura relata que microssomas hepático de ratos contém apenas a isoforma hCE-1, enquanto microssomas hepático humano apresentam ambas as isoformas, hCE-1 e hCE-2 (Imai, 2006; Taketani et al., 2007).

A investigação das diferenças no metabolismo entre espécies ajuda a correlacionar dados de farmacocinética e toxicologia entre os modelos animal e humano, permitindo uma boa previsão da biodisponibilidade já nas etapas pré-clínicas (King, 2009). Além disso, é desejável que a comparação do metabolismo entre animais e humanos seja realizada para fornecer informações sobre a espécie animal apropriada para estudos de toxicidade. Assim, é muito importante selecionar a espécie animal que tem um perfil metabólico similar ao de humanos (Lin; Lu, 1997).

3.4. Extrapolação in vitro-in vivo

Os valores de Cl_{int} são limitados às condições das reações in vitro e representa apenas o que acontece no meio microssomal. Para que esses valores sejam levados em consideração na previsão do metabolismo de um órgão (no caso, do fígado), é necessário redimensionar o conteúdo de proteínas microssomais no órgão e a massa do órgão. Dessa forma, o Cl_{int} é convertido em Cl_H pela aplicação de um modelo de correlação in vitro-in vivo. A previsão do Cl_H por dados de metabolismo in vitro foi proposta por Houston (1994). Entre os diferentes modelos farmacocinéticos conhecidos, o modelo "*well-stirred*" é o mais comumente empregado, devido à simplicidade matemática. Este modelo considera o fígado como um compartimento isolado com taxa de perfusão homogênea, assumindo que a distribuição do fármaco pelo órgão é rápida, que a concentração do fármaco no tecido está em equilíbrio com a concentração no sangue e que a distribuição das enzimas metabólicas no fígado é homogênea.

Geralmente, para aumentar a capacidade de previsão in vivo, os modelos de extrapolação requerem a determinação de outras características dependentes do fármaco, como as ligações às proteínas plasmáticas e microssomais, na qual a fração livre do fármaco é considerada nos cálculos de Cl_H. Em nossos estudos, não foi possível determinar essas propriedades empregando os métodos tradicionais de ensaios de ligação (ultrafiltração e ultracentrifugação) devido às características lipofílicas da CAS X, que resultou em ligações não específicas por adsorção aos aparatos e impossibilitou a quantificação exata e precisa das frações livre e ligada às proteínas. Neste caso, excluir os dados de ligação às proteínas não diminui o poder de previsão do *clearance*, como já demonstrado por Obach e cols. (1997) ao compararem o modelo "*well-stirred*" com e sem a correção para ligações proteicas, além de outros diferentes modelos de extrapolação in vitro-in vivo. Segundo eles, ensaios in vitro com compostos muito lipofílicos resultam em altos valores de ligação às proteínas, tanto plasmáticas quanto microssomais. Como o efeito da ligação às proteínas microssomais na determinação do Cl_{int} é oposto ao efeito da ligação às proteínas plasmáticas na determinação do Cl_H, os termos referentes à fração livre se cancelam. Assim, foi adotado o modelo de extrapolação descrito acima, excluindo os dados de ligação às proteínas, de acordo com a abordagem normalmente empregada nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (Emoto et al., 2010). Os valores de Cl_H da CAS X em ratos e humanos, obtidos com a aplicação desse modelo, e as porcentagens de fluxo sanguíneo hepático correspondente estão descritas na **Tabela 13**.

Tabela 13. *Clearance* hepático da CAS X obtido por extrapolação in vitro-in vivo pelo modelo farmacocinético "*well-stirred*", sem correção para ligações proteicas (Obach et al., 1997) e porcentagem de fluxo sanguíneo hepático correspondente.

Espécie	**Cl_H** [a] (mL/min/kg)	**FSH** [b] (mL/min/kg)	**FSH:Cl_H** [c] (%)
Rato	55,3	58,8	94,0
Humano	19,5	20	97,3

[a] Cl_H, *clearance* hepático;
[b] FSH, fluxo sanguíneo hepático;
[c] FSH:Cl_H (%), porcentagem do fluxo sanguíneo hepático correspondente ao Cl_H.

Foram observados altos valores de Cl_H da CAS X, sendo de 55,3 e 19,5 mL/min/kg em ratos e humanos, respectivamente, o que corresponde, em média, a 95,7% do fluxo sanguíneo hepático descrito para as espécies. Estes valores previsto para o Cl_H in vivo indica que a CAS X é extremamente susceptível a hidrólise enzimática metabólica. Uma vez que sua taxa de extração hepática parece ser dependente do fluxo sanguíneo, esse resultado sugere que a CAS X é quase completamente eliminada na sua passagem pelo fígado.

Embora a atividade enzimática das CES seja diferente entre ratos e humanos, resultando em diferenças na velocidade das reações de metabolismo, foi demonstrado que a CAS X é substrato de vias metabólicas comuns e que o Cl_H previsto por extrapolação in vitro-in vivo em ambas as espécies foram semelhantes em porcentagem de fluxo sanguíneo. Desse ponto de vista, o rato realmente parece ser um bom modelo para o estudo do metabolismo hepático humano da CAS X.

As agências regulatórias requerem a demonstração de que a exposição sistêmica a um fármaco e seus principais metabólitos na espécie animal usada em estudos de toxicidade exceda aquela esperada em humanos, a fim de garantir uma margem de segurança (FDA, 2012). Por isso, além dos parâmetros cinéticos que auxiliam na previsão do Cl_H e, consequentemente, na definição da primeira dose a ser administrada in vivo, é de extrema importância o conhecimento prévio do metabólito que é formado. A identificação de metabólitos é necessária para a interpretação adequada dos altos valores de Cl_H obtidos, uma vez que a via de metabolismo pode exercer função de ativação ou inativação (eliminação) do substrato. Assim, a próxima etapa do trabalho consistiu em investigar o metabólito da CAS X formado in vitro com microssomas hepático de ratos e humano.

CAPÍTULO 5

PESQUISA DE METABÓLITOS DA CASEARINA X EM MEIO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS E DE HUMANOS

1. INTRODUÇÃO

Conhecer a estrutura do metabólito de um candidato a fármaco na fase de estudos pré-clínicos é de grande utilidade, não somente para a identificação de produtos potencialmente ativos ou tóxicos, mas também para identificar a parte da molécula susceptível ao metabolismo. Entretanto, não há uma padronização para este tipo de estudo, pois cada composto exibe um perfil metabólico único que depende da sua estrutura, da espécie empregada no estudo de metabolismo e da matriz selecionada para a avaliação do metabólito (Cox, 2005).

Em relação à espécie, todos os mamíferos exibem diferenças bioquímicas entre si, particularmente na estrutura e atividade das enzimas metabolizadoras (Martignoni; Groothuis; Kanter, 2006). Em relação ao modelo de estudo do metabolismo, sistemas in vitro como microssomas, hepatócitos e fragmentos de fígado fornecem matrizes biológicas com diferentes características na distribuição de enzimas. Uma vez que cada modelo de metabolismo é único, torna-se difícil desenvolver uma metodologia analítica rápida e genérica para caracterizar adequadamente todas as possíveis rotas metabólicas que ocorrem in vivo (Elkins et al., 2000).

Na fase de estudos pré-clínicos, em geral, há poucas quantidades disponíveis da substância estudada, especialmente se isolada de fonte natural. Entretanto, avanços na tecnologia analítica permitem a obtenção de informações sobre o metabolismo, mesmo utilizando pequenas quantidades do analito. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas é uma técnica analítica adequada para caracterização de metabólitos. O sistema cromatográfico separa os metabólitos dos interferentes da matriz biológica e a espectrometria de massas confere detectabilidade suficiente para quantificar traços de possíveis metabólitos. Assim, visando monitorar os íons de determinado metabólito, pode-se buscar aqueles que, ao serem fragmentados, apresentam a diferença de massa característica de determinada via de biotransformação (Cox, 2005).

Frequentemente, esse tipo de estudo é realizado em analisadores de massa de baixa resolução, como os triplos quadrupolos e os do tipo *íon trap*. Na tentativa de obter mais informação acerca do metabólito, as análises vêm sendo realizadas também em espectrômetro de massas com analisadores de alta resolução, como o tempo de voo (TOF – *Time of flight*), no qual é possível obter medições sobre a massa exata, com distinção de até 0,0001 unidade de massa atômica (Wu et al., 2013). Assim, o conjunto de dados obtidos com diferentes

ferramentas analíticas, facilita a interpretação do perfil metabólico e permite identificar as alterações estruturais que ocorrem em um composto devido às reações de metabolismo in vitro.

O objetivo dessa etapa do trabalho foi avaliar a formação in vitro de possíveis metabólitos da CAS X empregando o modelo microssomal hepático de ratos e de humanos, e propor a estrutura química do metabólito formado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma vez que as rotas metabólicas para a CAS X ainda não são conhecidas, foram avaliados os parâmetros relacionados à quantidade de substrato (50 e 100 μg/mL) e proteínas microssomais empregadas nos ensaios de metabolismo (0,5; 1,0 e 2,0 mg/mL). Também foram avaliados o tempo de incubação (5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos), as técnicas de preparo das amostras e os parâmetros e modos de análise por espectrometria de massas a fim de avaliar os possíveis metabólitos formados. Como a pesquisa de metabólitos envolve o desenvolvimento de métodos analítico qualitativos, foram avaliados diferentes solventes extratores no preparo de amostras, como MTBE, éter etílico, diclorometano, acetato de etila, acetonitrila e metanol. A condição que apresentou o melhor resultado está descrita a seguir.

O meio reacional foi preparado em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 com 1% de glicerina e 1 mg/mL de proteínas microssomais, tanto para os ensaios com microssomas hepático de ratos, como de humanos.

O ensaio de metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos foi realizado em um volume reacional de 10 mL, em duplicata. As amostras foram pré incubadas por 5 minutos, sob agitação a 37 ºC. As reações foram iniciadas com a adição da CAS X, na concentração de 100 μg/mL, e encerradas após 20 minutos, pela adição de 20 mL acetato de etila. As amostras foram preparadas por extração liquído-líquido com agitação em *vibrax* a 1.000 rpm por 15 minutos e centrifugação a 10.000 × *g* por 15 minutos. A fase orgânica das amostras foi transferida para um balão de fundo redondo, unificadas e o *pool* obtido foi evaporado em rotavapor IKA, modelo RV10C (Staufen, Alemanha). Os resíduos foram ressuspensos em uma mistura de metanol e água (70:30, v/v) e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial, com analisador *ion trap* e por infusão direta em espectrômetro de massas de alta resolução, com analisador TOF.

O ensaio de metabolismo in vitro com microssomas hepático humano foi realizado com 10 amostras distintas, em um volume reacional de 200 µL. Foram adotados os mesmos procedimentos descritos acima, alterando apenas o volume de acetato de etila utilizado na extração, que foi de 400 µL, e a evaporação da fase orgânica das amostras, que foi unificada em tubo de fundo cônico, no qual o *pool* obtido foi evaporado sob fluxo de ar comprimido.

Amostra controle, contendo apenas a CAS X e amostra branca, contendo apenas os microssomas hepático de ratos ou humano, ambas em solução tampão NaH_2PO_4 100 mM, pH 7,4 com 1% de glicerina, foram submetidas às mesmas condições e analisadas concomitantemente.

2.1. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS-IT)

Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida da marca Shimadzu® (Kyoto, Japão) pormodelo LC-20AD, degaseificador DGU-20A, auto-injetor SIL-20AHT, detector arranjo de diodo SPD-M20A (200–600 nm), forno de coluna CTO-20A e módulo de comunicação CBM-20A, acoplado a um espectrômetro de massas AmaZon SL *ion trap*, Bruker Daltonics® (Massachusetts, EUA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica Ascentis Express Fused Core C_{18} (100 mm x 4,6 mm x 2,7 µm) e uma coluna de guarda Ascentis Express C_{18} (3,0 mm x 4,6 mm x 2,7 µm), ambas da Supelco (Pensilvânia, EUA). A fase móvel foi composta por metanol e água, operada em modo gradiente, com eluição de 50% de metanol nos primeiros 5 minutos, seguido de um aumento gradativo da concentração de metanol até 90% entre 5 e 28 minutos, retornando a condição inicial de 50% entre 28 e 35 minutos. A vazão da fase móvel foi de 0,6 mL/min, com temperatura de análise de 35 °C e volume de injeção de 7 µL. Os espectros foram adquiridos em modo positivo empregando ionização por *electrospray* (ESI – *electrospray ionization*), com voltagem no capilar de 3,5 kV. Nitrogênio (N_2) foi utilizado como gás de nebulização na temperatura de secagem de 300 °C, vazão de 9 L/min e pressão de 40 psi. A amplitude de fragmentação foi de 0,6 V. A aquisição e análise dos dados foram realizadas no software *Bruker Compass Data Analysis* 4.1 (Bremen, Alemanha).

2.2. Análise por espectrometria de massas de alta resolução (MS-ESI-Q-TOF)

As amostras de CAS X submetidas às condições de metabolismo *in vitro* foram também analisadas por infusão direta em espectrômetro de massas equipado com analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo microTOF II-ESI-Q-TOF Bruker Daltonics® (Massachusetts, EUA), empregando uma bomba de infusão (Kd Scientific, EUA) na vazão de 300 µL/min. A voltagem do capilar e do *end plate* foram 3500 V e –500 V, respectivamente, no modo positivo de ionização, com temperatura do gás de secagem (N_2) de 180 °C, vazão de 4 L/min e pressão de 0,4 bar. Para calibração interna foi utilizado solução de ácido trifluoroacético sodiado (Na-TFA), na concentração de 10 mg/mL. Para a aquisição e análise de dados foi empregado o software *Bruker Compass Data Analysis* 4.1 (Bremen, Alemanha).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na investigação da formação do metabólito da CAS X, a análise do produto de metabolismo in vitro pela fração microssomal hepática de ratos por LC-ESI-MS-IT gerou um cromatograma que apresentou um pico com tempo de retenção em 25 minutos, que não está presente no cromatograma referente a amostra branca e nem na amostra controle (**Figura 19**). O respectivo espectro de massas desse sinal em 25 minutos apresentou um íon de maior intensidade com *m/z* 425 (**Figura 20**).

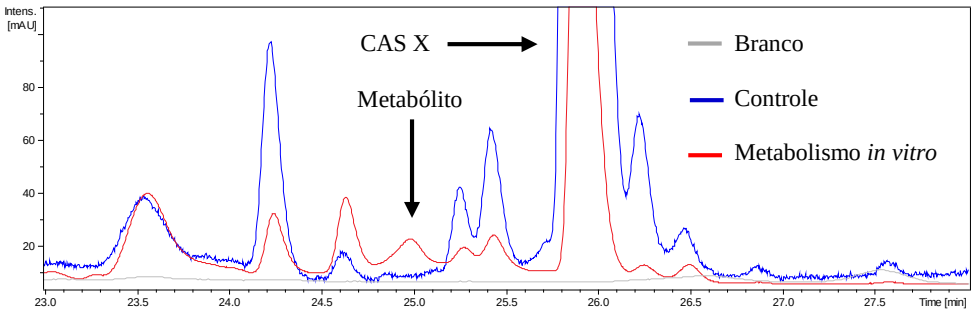


Figura 19. Cromatogramas superpostos referente às análises de uma amostra de metabolismo in vitro da CAS X com microssomas hepático de ratos, uma amostra controle e uma amostra branca, extraídas com acetato de etila.

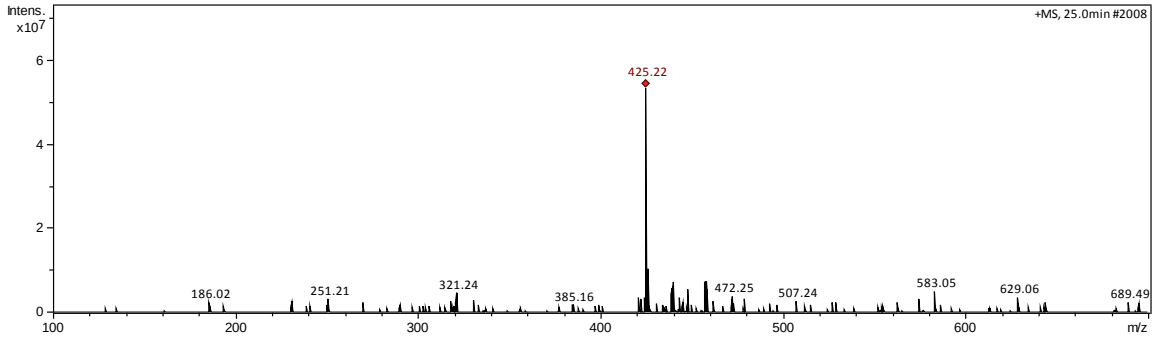


Figura 20. Espectro de massas do produto de metabolismo da CAS X, obtido na ionização por *electrospray* e analisador *ion trap* (LC-ESI-MS-IT).

Para tentar elucidar esse metabólito formado in vitro com microssomas hepático é importante considerar que alguns pesquisadores já relataram que os diterpenos clerodânicos similares às casearinas são instáveis em clorofórmio ($CHCl_3$), resultando na formação de um dialdeído. A geração desse artefato foi relacionada com o uso de $CDCl_3$ em experimentos de RMN (Ressonância Magnética Nuclear), devido à presença de traços de HCl e H_2O (Beutler et al., 2000; Tininis, 2006; Williams et al., 2007). Posteriormente, Santos e cols. (2010) confirmaram a instabilidade da CAS X em $CHCl_3$ e elucidaram a estrutura desse produto de degradação, que foi denominado "casearina X dialdeído", resultante de uma reação de hidrólise com abertura do anel diacetálico (anel C) (**Figura 21**).

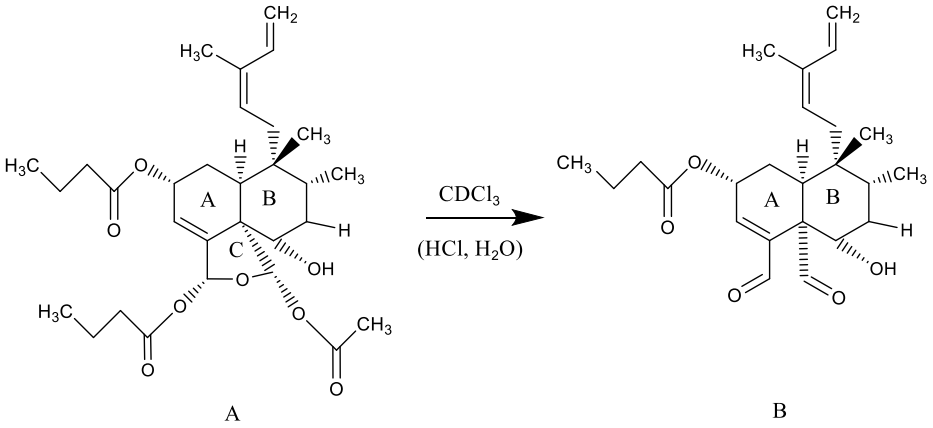


Figura 21. Reação de degradação da CAS X (A) com formação da casearina X dialdeído (B) na presença de clorofórmio (Santos et al., 2010).

A análise deste produto de degradação por espectrometria de massas com ionização por ESI, exibiu o íon $[M + H]^+$ de *m/z* 403 (Santos et al., 2010). Considerando que a CAS X, presente nas amostras controle, sempre exibiu em nossos experimentos, o íon na forma de aduto

de sódio [M + Na] $^{+}$, quando analisada por ESI em modo positivo, é de se esperar que o seu produto de metabolismo também esteja sob a forma de aduto de sódio. Uma vez que foi demonstrado, pelos experimentos prévios, que a via metabólica da CAS X é decorrente da sua hidrólise mediada por carboxilesterases, não havendo evidências de que mecanismos oxidativos estejam envolvidos, a formação da casearina X dialdeído como um metabólito obtido com microssomas hepático também pode ser sugerida. Nesse caso, o valor de *m/z* esperado para o aduto de sódio [M + Na^{+}] da casearina X dialdeído seria 425 [402 +23 (Na^{+})], semelhante ao íon encontrado no produto de metabolismo in vitro da CAS X por LC-ESI-MS-IT (**Figura 20**).

Em seguida, foi realizada uma análise da fragmentação do metabólito da CAS X por LC-ESI-MS-IT. Foi demonstrado a formação do pico base em *m/z* 337, resultante de uma eliminação neutra de 88 Da a partir do íon *m/z* 425 (**Figura 22**), correspondente ao grupo butanoato localizado como substituinte na posição 2 da casearina X dialdeído, conforme a rota de fragmentação proposta na **Figura 23**.

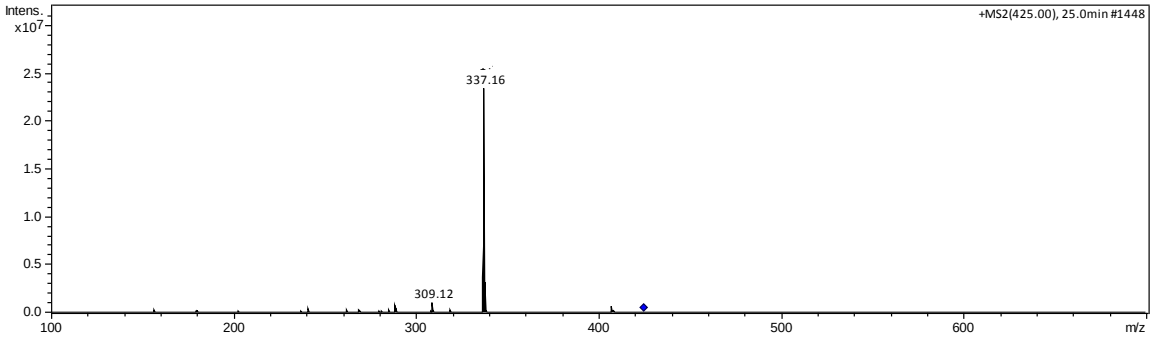


Figura 22. Espectro de massas MS^2 (*ion trap*) do produto de metabolismo in vitro da CAS X (ESI, 0,6 V, modo positivo).

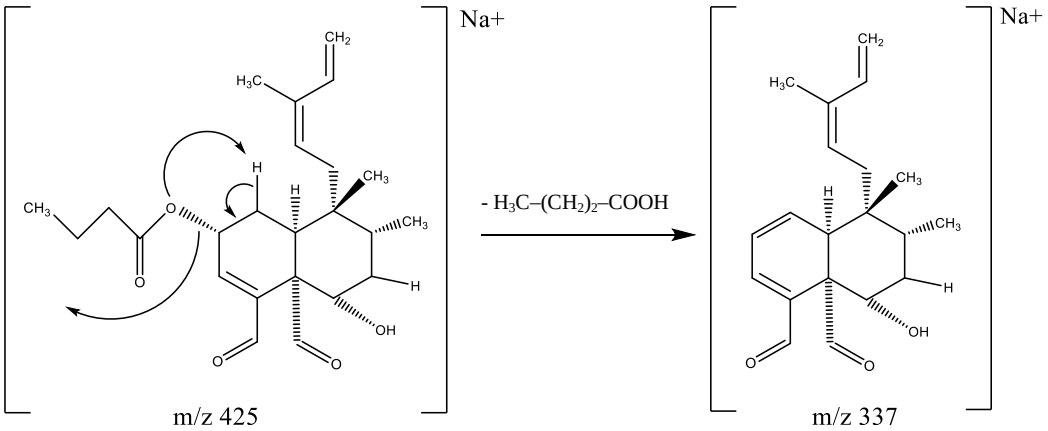


Figura 23. Proposta da rota de fragmentação do metabólito da CAS X obtido no metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos.

O anel diacetálico das casearinas é um arranjo de funcionalidade observado em poucas substâncias na natureza e pode ser visto como um dialdeído protegido (Santos et al., 2010). A sua susceptibilidade à hidrólise já observada anteriormente pela degradação em clorofórmio, corrobora com os resultados observados nos estudos de metabolismo in vitro e sugerem que a mesma reação de hidrólise seja também mediada pelas carboxilesterases microssomais hepática.

Reafirmando essa hipótese, a **Tabela 14** e a **Figura 24** mostram os resultados das análises por espectrometria de massas de alta resolução (MS-ESI-Q-TOF) do metabólito formado in vitro com microssomas hepático de ratos.

Tabela 14. Dados de massa exata observadas no espectro de massas da CAS X e seu metabólito obtido in vitro com microssomas hepático de ratos (MS-ESI-Q-TOF, modo positivo).

Íon diagnóstico $[M+Na]^+$	**Fórmula química**	***m/z* exata**	***m/z* observada**	**Erro (ppm)**
CAS X	$C_{30}H_{44}NaO_8$	555,2928	555,2948	3,5
Metabólito	$C_{24}H_{34}NaO_5$	425,2298	425,2283	3,5

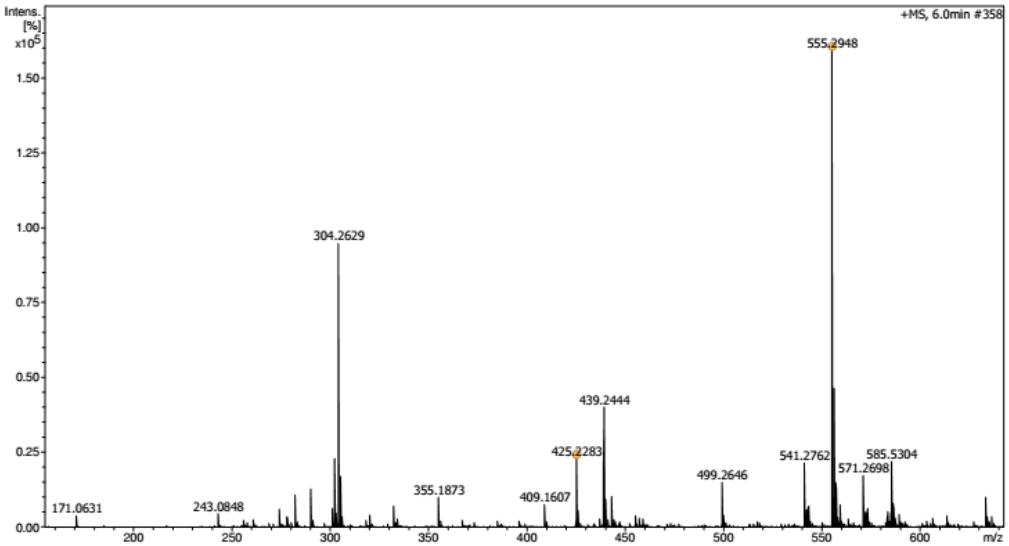


Figura 24. Espectro de massas de alta resolução do produto de metabolismo in vitro da CAS X com microssomas hepático de ratos (MS-ESI-Q-TOF, modo positivo).

A boa correlação entre a massa exata e a massa observada experimentalmente nas análises por espectrometria de massas de alta resolução reforça a dedução da fórmula molecular do metabólito da CAS X. No entanto, a identificação da estrutura de um metabólito desconhecido

requer análises complementares por RMN. Porém, não foi possível obter a quantidade de massa necessária do metabólito formado in vitro com microssomas hepático de ratos para a realização da análise por RMN.

Em relação ao metabolismo in vitro com microssomas hepático humano, não houve formação de metabólito em concentração suficiente, provavelmente devido à menor quantidade de reações que foram possíveis de executar. Apesar do espectro de massas ter detectado a presença do íon de *m/z* 425, não houve adequada diferenciação do seu sinal em relação ao ruído da linha de base. Portanto, a proposta estrutural do metabólito da CAS X formado só foi possível pelas reações de metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos.

Se for considerado que a casearina X dialdeído seja, de fato, o metabólito formado em microssomas hepático, são necessárias algumas observações. A reação de hidrólise mediada pelas CES presente em microssomas hepáticos é uma das principais vias de eliminação de xenobióticos. Essa é uma via de grande importância na proteção do organismo pela inativação de substâncias tóxicas, mas é indesejável pela limitação da atividade de muitos fármacos de interesse (Crow et al., 2007).

Estudos realizados por Santos e cols. (2010) avaliaram a atividade citotóxica, tanto da CAS X, como da casearina X dialdeído, obtida por degradação da CAS X em clorofórmio. A **Tabela 15** correlaciona a estrutura química desses compostos com a atividade citotóxica descrita para 5 linhagens de células leucêmicas.

Tabela 15. Relação estrutura-atividade citotóxica da CAS X e casearina X dialdeído.

	Substituintes do esqueleto geral das casearinas					IC_{50} (μM) relatado em células de linhagens tumorais				
	R1	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**L-929**	**MOLT4**	**MDA/MB-435**	**HCT-8**	**SF-295**
CAS X	Bu	Bu	OAc	OH	H	1,5	0,2	0,4	0,9	0,4
casearina X dialdeído	Bu	-	-	OH	H	>62,1	>62,1	52,6	34,5	>62,1

Bu: grupo n-$C_3H_7CO_2$ (butanoato); OAc: grupo CH_3CO_2 (acetato); OH: grupo hidroxila; H: hidrogênio.

Os valores de IC_{50} observados nesse estudo foram, em média, de 0,7 μM para a CAS X e de 54,7 μM para a casearina X dialdeído. Isso demonstra que, apesar da CAS X possuir alta

atividade citotóxica, o seu produto de degradação não foi eficaz contra as linhagens de células tumorais (Santos et al., 2010). Assim, considerando que os produtos de degradação e de metabolismo da CAS X provavelmente são os mesmos, o papel que as CES presentes no fígado desempenhariam em relação a CAS X, seria realmente o de promover a sua inativação. Isso significa que a biodisponibilidade da CAS X, se administrada por via oral, seria comprometida pelo metabolismo de primeira passagem no fígado, levando a perda da sua atividade.

Além do fígado, o metabolismo de primeira passagem também pode ocorrer no intestino, algumas vezes antes, mesmo da absorção (Chatuverdi; Decker; Odinecs, 2001). Para investigar este e outros processos envolvidos na cinética de absorção da CAS X, foi realizado um estudo para a caracterização in vitro da sua absorção intestinal, conforme descrito no próximo capítulo.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL IN VITRO DA CASEARINA X EM CÉLULAS CACO-2

1. INTRODUÇÃO

Os estudos pré-clínicos de novas moléculas bioativas envolvem avaliações nas quais as propriedades toxicológicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas podem ser previstas por ensaios in vitro. Embora a CAS X tenha demonstrado possuir características farmacodinâmicas promissoras em relação ao mecanismo de ação antitumoral (Ferreira et al., 2010), não existem relatos sobre suas propriedades farmacocinéticas na literatura.

Metabolismo e absorção são processos farmacocinéticos diretamente relacionados com a biodisponibilidade de fármacos, mas é importante dissociar a baixa biodisponibilidade devido ao metabolismo de primeira passagem, da baixa biodisponibilidade devido à baixa permeabilidade (Chatuverdi ; Decker; Odinecs, 2001).

Com os experimentos de metabolismo in vitro foi possível determinar a via metabólica da CAS X com a identificação das enzimas responsáveis pelo seu metabolismo e do principal metabólito formado, além de estimar o *clearance* intrínseco e hepático, prevendo a velocidade na qual o metabolismo ocorre. Por outro lado, os experimentos de absorção in vitro com células intestinais visa estimar a permeabilidade aparente e prever a real fração absorvida, além de fornecer informações sobre o mecanismo dessa absorção, que pode ser paracelular, transcelular ou mediado por transportadores (Artursson; Palm; Luthman, 2001). Assim, ambas as abordagens, metabolismo e absorção in vitro, devem ser levados em consideração para uma previsão mais precisa da biodisponibilidade e, consequentemente, do efeito terapêutico de uma determinada substância (Huang et al., 2010).

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 é o modelo in vitro mais bem estabelecido para a previsão da absorção de fármacos, amplamente empregado em pesquisas acadêmicas e pelas indústrias farmacêuticas (Hidalgo; Raub; Borchardt, 1989; Artursson, 1990). Além disso, o modelo in vitro de células Caco-2 é considerado o método padrão na previsão de permeabilidade de fármacos para o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) devido à sua grande correlação in vitro-in vivo (Chen; Yu, 2008; Giacomini et al., 2010).

Esta linhagem de células epiteliais intestinais pode ser usada em avaliações in vitro de permeabilidade, após seu crescimento sobre um suporte contendo um filtro semi-permeável, adaptado em um poço que divide o sistema em dois compartimentos (**Figura 25**). Dessa forma, a passagem de um fármaco pode ser mensurada em duas direções: apical para basolateral,

equivalente à passagem do lúmen intestinal para a circulação sanguínea (direção absortiva), e vice-versa (direção secretória) (Rubas; Cromwell; Shahrokh, 1996; Balimane et al., 2006).

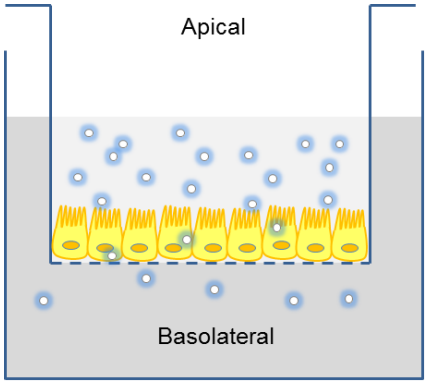


Figura 25. Representação esquemática do sistema para avaliação da permeabilidade in vitro em monocamada de células Caco-2.

Quando mantidas em cultura por longo prazo, as células Caco-2 tem a capacidade de se proliferarem e diferenciarem espontaneamente em enterócitos, formando uma monocamada celular polarizada, com microvilosidades na membrana apical, junções oclusivas entre si e resistência transepitelial similar ao cólon humano. Além disso, elas expressam proteínas transportadoras ativas de efluxo e influxo celular. Assim, os transportes passivo e ativo podem ser avaliados paralelamente, ampliando o entendimento em relação aos diferentes mecanismos envolvidos na absorção (Artursson, 1990; Balimane; Chong; Morrison, 2000).

No entanto, para a determinação dos coeficientes de permeabilidade pressupõe-se que o acúmulo do composto dentro das células é desprezível e que não há grandes perdas do composto no sistema, devido à degradação, metabolismo ou adsorção (Broeders et al., 2012). Dessa forma, a previsão da absorção oral de compostos lipofílicos e de baixa estabilidade empregando o modelo in vitro de células Caco-2 deve ser realizado com cautela, pois pode gerar resultados de difícil interpretação.

Sabe-se que a CAS X possui baixa solubilidade em meios fisiológicos e está sujeita a ligações não específicas por adsorção a materiais plásticos, devido a sua alta lipofilicidade (Clog P = 5,7) (*Advanced Chemistry Development* (ACD/Labs), V11.02, SciFinder® / *American Chemical Society*). Além disso, os estudos de metabolismo in vitro demonstraram sua baixa estabilidade na presença de carboxilesterases (CES). Portanto, tendo em vista o impacto que as propriedades físico-químicas da CAS X podem ter nos estudos de cinética in vitro, o principal objetivo desta etapa do trabalho foi obter um entendimento detalhado da sua

exposição no sistema de células Caco-2. Além da avaliação da permeabilidade, foi realizado um balanço de massas para descrever o destino da CAS X na monocamada de células, abrangendo acumulação intracelular e ligações não específicas por adsorção. Uma vez que as células Caco-2 também expressam CES (Imai et al., 2005), foram empregados dois sistemas de monocamada de células, sendo um intacto e outro no qual a atividade das CES foi inibida. Adicionalmente, um ensaio de hidrólise enzimática da CAS X com a isoforma específica das CES expressa nas células intestinais humanas foi realizado para obter uma melhor previsão da sua absorção oral.

Esse estudo foi realizado na Suíça, em colaboração com um grupo de pesquisa de excelência no Institut für Pharmatechnologie, Fachhochschule Nordwestschweiz (FHNW), sob a supervisão da Profa. Dra. Veronika Butterweck, pesquisadora com larga experiência em estratégias para ensaios pré-clínicos in vitro e in vivo de produtos naturais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultura de células Caco-2

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano, Caco-2, foi originada da *ATCC - American Type Culture Collection* (Rockville, EUA). As células Caco-2 foram cultivadas em placas de Petri (56,7 cm^2) (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca), em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) sem piruvato, suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1% de solução de aminoácidos não essenciais (MEM) e 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco Paisley, Reino Unido) mantidas a 37 °C e em atmosfera com 8% de CO_2, umidificada com água bi-destilada. Ao atingirem 70–90% de confluência, novas passagens celulares foram realizadas pelo tratamento das células com tripsina 0,25% / EDTA 2,4 mM (Gibco, Paisley, Reino Unido). Para todos os experimentos foram usadas células com números de passagem de 60–65.

2.2. Ensaio de toxicidade celular

Para avaliar a toxicidade celular da CAS X e definir a concentração a ser usada nos ensaios de permeabilidade in vitro, foi empregado o teste do MTT (brometo de 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Para isso, 100 µL de suspensão de células Caco-2 com densidade celular de 1,14 $\times 10^5$ células/cm^2 foram semeadas em placa de 96 poços (Falcon®, Corning Inc., NY, EUA), seguida de incubação com meio de cultura por 24 h (37 °C / CO_2 8%).

Uma solução estoque de CAS X (1 mg/mL) foi preparada pela sua dissolução em DMSO e estocada a – 20 °C. Soluções de trabalho nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 µM foram preparadas por diluição em solução tampão de transporte, contendo 8,3 g/L de DMEM base em pó (sem glicose, L-glutamina, vermelho de fenol, piruvato de sódio e bicarbonato de sódio) dissolvido em água autoclavada, previamente obtida por osmose reversa (Arium® 61215, Satorius, Goettingen, Alemanha) e suplementada com D-glicose (4,50 g/L), HEPES (4,76 g/L), NaCl (1,98 g/L) e L-glutamina (0,87 g/L) (Sigma Aldrich, Buchs, Suíça). Após ajuste do pH para 7,4 com hidróxido de sódio, a solução tampão de transporte foi filtrada em filtro esterilizante (Supor-200, 0,2 µm de poro, Pall Corporation, Port, Washington, EUA), estocada a 4 °C e utilizada por até duas semanas (Kapitza et al., 2006).

Para os ensaios de toxicidade celular, o meio de cultura foi removido das placas semeadas com as células Caco-2 e foi adicionada a solução tampão de transporte contendo a CAS X. Para evitar danos às células, as soluções foram diluídas para a concentração final de 1% de DMSO. Um controle consistindo na mesma quantidade de células incubadas com 1% de DMSO em solução tampão de transporte e sem CAS X foi incluído no ensaio.

Após 5 horas de incubação a 37 °C em atmosfera saturada com água, as células foram lavadas com DPBS (*Dulbecco's saline phosphate buffer*, sem Ca^{2+}/Mg^{2+}, Gibco, Paisley, Reino Unido) e 100 µL de solução de MTT foram adicionados em cada poço, seguido de 1,5 h de incubação, nas mesmas condições. A solução de MTT 5 mg/mL em DPBS sem Ca^{2+}/Mg^{2+} foi diluída na proporção de 1:10 em solução tampão de transporte. Após incubação, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan (produto cromogênico artificial resultante da redução dos sais de tetrazólio, ou MTT) foram dissolvidos em 100 µL de DMSO, seguido de agitação em *shaker* orbital (KS 250 basic, IKA® Labortechnik, Staufen, Alemanha) a 200 rpm, por 5 minutos. Em seguida, a densidade ótica foi medida a 570 e 630 nm em leitora de microplaca (SpectraMax M2e, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA).

2.3. Tratamento das células Caco-2 com inibidor de carboxilesterases

As células Caco-2 foram semeadas na densidade de 1,14 × 10^5 células/cm^2 em placas Transwell® de 6 poços e incubadas por 21 dias. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana. As monocamadas de células Caco-2 sem atividade das carboxilesterases (CES) foram obtidas pelo seu tratamento com fosfato de bis-p-nitrofenil (BNPP), um inibidor seletivo das CES que não provoca citotoxicidade e não altera os mecanismos de transporte celular (Ohura et al., 2009). No dia do experimento, as células foram cuidadosamente lavadas duas vezes com solução salina balanceada de *Hanks* (HBSS) (Sigma Aldrich, Buchs, Suíça), seguida de pré-incubação com BNPP 200 μM dissolvido em HBSS (pH 7,4) em ambos os lados do sistema (apical e basolateral), por 40 minutos a 37 ºC. As células foram então lavadas com DMEM, seguida de pré-incubação com novo DMEM (apical e basolateral) por 40 minutos a 37 ºC para remover qualquer BNPP não especificamente ligado à monocamada celular. Finalmente, as monocamadas de células foram lavadas mais uma vez com DMEM antes dos ensaios de permeabilidade. As monocamadas de células intactas foram submetidas às mesmas condições, mas sem o inibidor de CES.

2.4. Ensaios de Permeabilidade in vitro

A integridade e a capacidade de permeação da monocamada de células Caco-2 foram examinadas pela medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) em um medidor de resistência MEVON em câmara EndOhm-24SNAP (World Precision Instruments, Sarasota, EUA), antes e após os experimentos de permeabilidade. A câmara foi preenchida com 4,6 mL de solução tampão de transporte e mantida a 37 ºC. Apenas as monocamadas de células Caco-2 que apresentaram valores de TEER acima de 250 Ω·cm^2 foram utilizadas.

Uma nova solução tampão de transporte contendo 2 μM de CAS X foi adicionada no compartimento apical (1,6 mL), para avaliação do transporte absortivo, ou basal (2,8 mL), para avaliação do transporte secretório. O compartimento remanescente foi preenchido apenas com solução tampão de transporte branco. Em todos os casos, o compartimento basal sempre foi enriquecido com FBS 4% (v/v) para simular melhor as condições fisiológicas. A concentração final de DMSO adicionado com a CAS X foi sempre igual a 1%. As placas Transwell® foram então mantidas a 37 ºC em atmosfera saturada com água e sob agitação em *shaker* orbital a 75

rpm. A permeação da CAS X foi monitorada pela análise de amostras obtidas da solução tampão de transporte de ambos os compartimentos, nos tempos 0, 5, 10, 30, 60, 90 e 120 minutos, em triplicata. Aos 25 µL de amostra coletada foi adicionado o mesmo volume de acetonitrila. Após 5 segundos de agitação em *vortex* (Ika Genius 3, Huber & Co AG, Reinach, Suíça) e 10 minutos de centrifugação a 16.100 × g (Eppendorf 5415R, Hamburg, Alemanha), o sobrenadante foi analisado por LC-MS. O volume da solução tampão de transporte removido só foi reposto no final do experimento para a última medida da TEER.

A permeabilidade aparente (P_{app}) foi o parâmetro usado para descrever o transporte da CAS X por unidade de área da monocamada de células e foi estimada de acordo com a **Equação 8**:

$$P_{app} = \frac{\left(\frac{\Delta Q}{\Delta t}\right) \times v}{A \times C_0} \qquad \text{(Equação 8)}$$

onde ΔQ/Δt é a taxa de aparecimento da CAS X no compartimento receptor (µM/s) ou o *slope* da quantidade acumulada no compartimento receptor (µM) plotado em função do tempo (s); v é o volume do compartimento receptor (cm^3); A é a área da superfície da monocamada de células ou da membrana (cm^2) e C_0 é a concentração inicial no compartimento doador (µM). O coeficiente de efluxo (Cef) foi calculado pela **Equação 9**:

$$\frac{P_{app} B \rightarrow A}{P_{app} A \rightarrow B} \qquad \textbf{(Equação 9)}$$

que é o quociente da permeabilidade aparente na direção secretória pela absortiva.

2.5. Balanço de massas

Nos tempos de 10, 60 e 120 minutos, uma placa com 3 *inserts* foi usada para avaliação da quantidade de CAS X acumulada dentro das células e adsorvida na membrana e no material plástico das placas Transwell®.

Para o monitoramento da acumulação intracelular, as monocamadas foram lavadas duas vezes com DPBS gelado, transferidas para placas de Petri de 22,1 cm^2 (Nunc A/S, Roskilde,

Dinamarca) e 300 µL de solução tripsina 0,25% / EDTA 2,4 mM foram adicionados em cada *insert*. A placa foi agitada em *shaker* orbital a 75 rpm por 15 min e a 37 °C. Após adicionar 1 mL de solução tampão de transporte, as células foram removidas da membrana usando um *cell scraper* (BD Falcon, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, EUA) e transferidas para tubos de 1,5 mL. A suspensão foi centrifugada a 100 × g, por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressupendido com 500 µL de solução tampão de transporte a 37 °C. Nesse estágio, controles positivos foram preparados pela adição de CAS X em *pellets* brancos de células tratadas com BNPP, para correção da recuperação nas amostras experimentais. A suspensão foi agitada em *vortex* por 5 s, congelada a –80 °C por, no mínimo, 15 minutos, e então descongelada em *thermomixer* a 37 °C com agitação a 1.400 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). A seguir, as amostras foram suplementadas com 500 µL de acetonitrila, agitadas em *vortex* por 5 s e colocadas em banho de gelo por 20 min. Os tubos foram agitados novamente a 1.400 rpm, 37 °C, por 10 min e centrifugados a 16.100 × g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e estocado em refrigerador a 4 °C. Os *pellets* foram extraídos mais duas vezes, pela adição de 500 µL de acetonitrila e desintegração com 6 pulsos de ultrassom (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, EUA / configurações: controle de saída 2, ciclos de trabalho 30%). As amostras foram agitadas em *thermomixer* por 10 min (37 °C / 1.400 rpm) e centrifugadas por 10 min (16.100 × g). Os sobrenadantes da segunda e terceira extração foram unificados e evaporados sob fluxo de nitrogênio. Cada resíduo foi dissolvido com o sobrenadante da primeira extração, agitado em *thermomixer* por 10 min (37 °C / 1.400 rpm), centrifugado por 10 min (16.100 × g) e o sobrenadante foi analisado por LC-MS.

Para o monitoramento de adesão da CAS X ao material plástico das placas Transwell®, ao final dos experimentos de permeabilidade e remoção das células, placa e inserts foram lavados duas vezes com DPBS gelado e os resíduos extraídos pela adição de acetonitrila com os mesmos volumes empregados nos ensaios de transporte (1,6 mL apical e 2,8 mL basal). As placas foram seladas com 3 camadas de *parafilm* e agitadas em *shaker* orbital a 75 rpm e 37 °C por 45 minutos. Amostras de 25 µL foram coletadas de cada compartimento, diluídas em 25 µL de solução tampão de transporte (ou solução tampão de transporte contendo 4% de FBS, quando coletada do compartimento basolateral), agitadas por 5 segundos em *vortex*, centrifugadas por 10 min a 16.100 × g e analisadas por LC-MS. Um experimento adicional foi realizado para determinar a eficiência do método de extração da CAS X do material plástico, empregando um ensaio de permeabilidade pela membrana de policarbonato sem células.

Para o balanço de massas, as concentrações de CAS X encontradas nos meios de transporte apical e basolateral, somadas às concentrações encontradas dentro das células e adsorvido ao material plástico dos poços, foram comparadas com a concentração inicial adicionada para calcular a porcentagem de CAS X em cada compartimento.

2.6. Ensaios de hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática da CAS X foram realizados empregando 0,2 μg/mL da isoforma hCE-2 de carboxilesterase humana purificada, diluída em 1 mL de solução tampão KH_2PO_4 90 mM e KCl 40 mM, pH 7,3. Após pré-incubação a 37 ºC por 5 minutos, a reação foi iniciada pela adição de 1 μM de CAS X dissolvida em DMSO. A concentração final de DMSO foi sempre de 0,1%, o que não afeta significativamente a atividade hidrolítica da enzima (Zhang et al., 2014). A degradação da CAS X foi monitorada por até 30 minutos de incubação, em triplicata. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de acetonitrila gelada e as amostras foram agitadas em *vortex* por 5 s e centrifugadas a 16.100 × g por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi analisado por LC-MS. Para confirmar que a CAS X é substrato para a isoforma hCE-2, um experimento adicional foi realizado com a pré-incubação do inibidor específico BNPP (200 μM), por 10 min antes da adição do substrato.

A meia-vida metabólica in vitro da CAS X foi calculada dividindo o ln2 (0,693) pela constante de eliminação (–*k*), que é o *slope* da regressão linear obtida com o logaritmo da porcentagem de substrato remanescente, em função do tempo de incubação.

2.7. Análise por LC-MS

Foi desenvolvido um método para a análise da CAS X, realizadas em um LC-MS da Agilent, *series* 1200 (Agilent, Waldbronn, Alemanha) equipado com degaseificador G1379B, bomba binária G1316A, auto-injetor G1367B, termostato G1330B, forno de coluna G1316A, detector UV G1314B e detector MS quadrupolo G6130A. Foi usada uma coluna de HPLC Zorbax Eclipse XDB-C_{18} 5 μm x 125 mm x 2,0 mm (Agilent Technologies, Holanda) e fase móvel composta de acetonitrila:água (80:20, v/v) com vazão de 0,3 mL/min. As amostras foram mantidas à 20 ºC e a temperatura da coluna foi mantida em 32 ºC. Os íons foram gerados por

electrospray à pressão atmosférica e o detector MS foi operado no modos *scan* (*m/z* 100–1000) e SIM (*Selective Ion Monitoring*), no modo positivo, com voltagem do capilar a 4000 V, fragmentador a 240 V, gás de secagem a 350 °C, com vazão de 9 L/min e pressão do nebulizador em 40 psi. A CAS X foi detectada com *m/z* 555, correspondente ao seu aduto de sódio [M + Na^+].

O método para a quantificação da CAS X em solução tampão de transporte e solução tampão de transporte contendo 4% de FBS foi validado, de acordo com o as recomendações do *Guideline on bionanalytical method validation* (EMA, 2011), avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, precisão e exatidão e estabilidade.

2.8. Análise estatística

Os dados foram exibidos como média ± DP (desvio padrão). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por análise de variância *one-way* ANOVA, seguida do pós-teste de comparação múltipla de *Bonferroni*, usando o software *GraphPad Prism* (Versão 5.01, GharphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio de toxicidade celular

Já foi demonstrado que os diterpenos clerodânicos apresentam citotoxicidade para diferentes linhagens de células tumorais. A CAS X possui grande capacidade citotóxica para células de leucemia (MOLT-4, IC_{50} 0,22 μM), melanoma (MDA/MB-435, IC_{50} 0,35 μM), glioblastoma (SF-295, IC_{50} 0,43 μM) e células tumorais de cólon (HCT-8, IC_{50} 0,97 μM) (Santos et al., 2010). Como a citotoxicidade de uma substância pode afetar os resultados dos ensaios de permeabilidade, primeiramente foi avaliado em quais concentrações a CAS X

poderia ser usada para os ensaios de permeabilidade in vitro, sem danificar a monocamada de células Caco-2.

O MTT é um ensaio colorimétrico empregado para avaliar a viabilidade e o estado metabólico das células, baseado na redução do brometo de tetrazolium amarelo (MTT) em azul de formazan, pela ação da desidrogenase mitocondrial presente somente em células metabolicamente ativas. Os cristais de formazan de coloração roxo são dissolvidos em DMSO e a quantidade produzida pelas células pode ser medida em espectrofotômetro e correlacionada com a viabilidade celular (Han et al., 2010).

Os ensaios empregando a metodologia do MTT para determinar a viabilidade das células Caco-2 foram realizados com as concentrações de 1–10 μM de CAS X. A viabilidade foi avaliada após 5 horas de incubação a 37 ºC, tempo suficiente para os experimentos de permeabilidade in vitro. Os resultados indicaram que a viabilidade celular diminui com o aumento da concentração de CAS X (**Figura 26**).

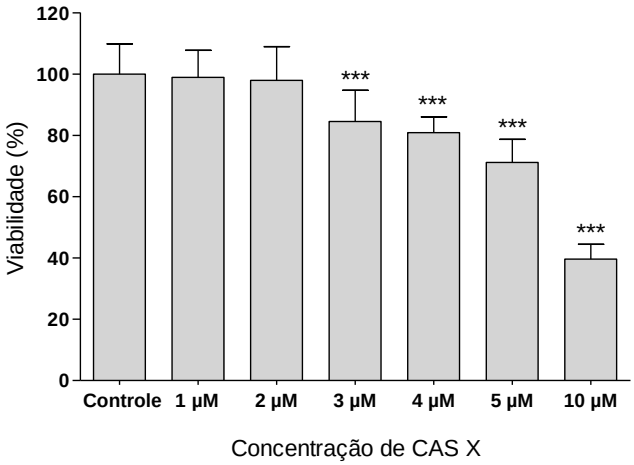


Figura 26. Citotoxicidade dose-dependente da CAS X em células Caco-2 após 5 h de incubação a 37 ºC. Significância estatística: *** $p < 0,05$ vs. controle; n = 18.

A viabilidade celular observada para as células tratadas com a maior concentração de CAS X (10 μM) foi de 39,6 ± 4,9%, enquanto que para as concentrações mais baixas, o ensaio do MTT demonstrou viabilidade próxima a 100%. As células tratadas com 1 e 2 μM de CAS X não apresentaram diferença significativa nos resultados de viabilidade entre si (98,9 ± 8,8 e 97,9 ± 11,1%, respectivamente) e com o controle, contendo apenas 1% de DMSO. Estes resultados confirmaram que a CAS X, em concentrações de até 2 μM, não foi tóxica para as células Caco-2, pelo menos até o período de 5 horas de incubação. Com base nesse resultado,

optou-se pelo emprego de 2 μM de CAS X nos ensaios de permeabilidade in vitro, por ser a maior concentração que não apresentou efeito citotóxico.

3.2. Análise por LC-MS e validação

As análises foram realizadas após o preparo da amostra por precipitação de proteínas, com adição de acetonitrila na proporção de 1:1 (v/v). Em todos os casos, a recuperação da CAS X quando adicionada a solução tampão de transporte ou a solução tampão de transporte contendo 4% de FBS foi previamente avaliada e resultou em aproximadamente 100%. A **Tabela 16** resume os resultados obtidos na análise dos parâmetros de validação.

Tabela 16. Parâmetros de validação do método para quantificação da CAS X nas diferentes soluções tampão de transporte usados nos experimentos de permeabilidade in vitro com células Caco-2.

		Solução Tampão de Transporte		**Solução Tampão de Transporte com 4% de FBS**	
Curva de calibração	Equação	y = 740227x + 1698,5		y = 823306x + 14581	
	Coeficiente de correlação	0,9995		0,9994	
	Lack of fit F calculado	0,32		0,41	
	F tabelado	2,96		2,96	
	p valor	0,948		0,834	
		Intra-corrida	**Inter-corrida**	**Intra-corrida**	**Inter-corrida**
Precisão (CV%)	LIQ	1,6	2,2	2,5	3,3
	CQB	6,7	9,7	1,8	2,9
	CQM	1,5	1,5	0,8	1,6
	CQA	2,2	2,2	4,0	3,4
Exatidão (EPR%)	LIQ	1,0	-1,6	-5,8	-6,7
	CQB	-6,4	1,6	-6,9	-5,9
	CQM	1,9	1,5	1,7	0,6
	CQA	0,6	0,7	1,7	0,7
		CQB	**CQA**	**CQB**	**CQA**
Estabilidade (CV%)	Autoinjetor	-4,2	-1,7	-1,2	2,0
	37 ºC /2h	-10,4	-2,5	4,3	-2,4
	3 ciclos de congelamento	-1,4	0,4	-1,9	-5,2
		CQB	**CQA**	**CQB**	**CQA**
Efeito matriz	Média de FM	5,5	5,1	6,2	6,3
	CV%	6,3	5,6	5,6	6,2

CV%: coeficiente de variação expresso em porcentagem (n=5); EPR: erro padrão relativo expresso em porcentagem (n=5); FM: fator de matriz calculado; LIQ: limite inferior de quantificação; CQB: controle de qualidade de concentração baixa; CQM: controle de qualidade de concentração média; CQA: controle de qualidade de concentração alta.

O LIQ da CAS X para o volume de injeção de 10 µL foi de 5 ng/mL. O método apresentou boa linearidade na faixa de 5–1.300 ng/mL (0,009–2,4 µM) para as curvas de calibração analítica obtidas com a CAS X nas diferentes soluções tampão de transporte. Os valores de F e *p* calculados pela análise de variância ANOVA *lack of fit* demonstraram a adequação do modelo linear (**Tabela 16**). A **Figura 27** mostra um cromatograma de íons extraídos da CAS X, que apresentou um sinal com tempo de retenção em 3,0 minutos.

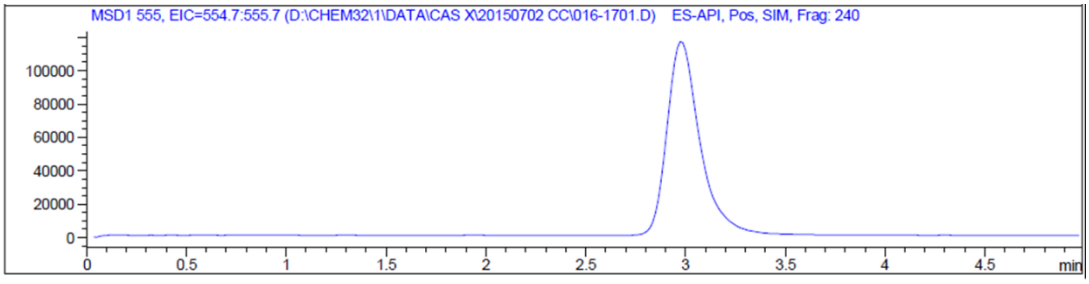


Figura 27. Cromatograma de íons extraídos referente a análise da CAS X na concentração de 2 µM, obtido por ionização por *electrospray* e analisador quadrupolo. Condições de análise: vide item **2.7**.

A avaliação da seletividade demonstrou não haver interferentes das soluções tampão nos cromatogramas de íons extraídos. Também não foi observado efeito residual nas amostras brancas analisadas após a injeção de uma amostra correspondente ao limite superior de quantificação. Os resultados obtidos para todos os parâmetros de validação demonstraram conformidade com o guia oficial para validação de métodos bioanalíticos da EMA (2011).

3.3. Ensaios de permeabilidade in vitro

Neste estudo, as células Caco-2 foram semeadas em placas Transwell® e mantidas em cultura por aproximadamente 20 dias antes de se realizarem os experimentos, conferindo uma estrutura com eficientes junções celulares, confirmada pelos valores de TEER obtidos, todos acima de 250 $\Omega \cdot cm^2$. A TEER das monocamadas de células Caco-2 foi novamente examinada no final dos experimentos de transporte e os valores não apresentaram alterações significativas após 2 horas de exposição à CAS X, na concentração de 2 µM (**Tabela 17**).

Tabela 17. Valores de TEER ($\Omega \cdot cm^2$) das monocamadas de células Caco-2 no tempo zero e após 2 h de incubação com a CAS X. Média (DP), n = 3.

	Células Caco-2 intactas		**Células Caco-2 tratadas com BNPP**	
	0 h	**2 h**	**0 h**	**2 h**
Direção absortiva (A→B)	289,5 (4,7)	275,5 (4,7)	272,6 (5,4)	264,6 (2,7)
Direção secretória (B→A)	301,3 (2,7)	286,4 (2,7)	283,8 (2,7)	272,4 (5,4)

O transporte da CAS X foi avaliado em ambas as direções, absortiva (A→B) e secretória (B→A) e os perfis de permeabilidade foram obtidos pela sua quantificação nos meios de transporte dos compartimentos doadores e receptores.

Para o balanço de massas, as quantidades de CAS X presente nas células e adsorvidas ao material plástico também foram quantificadas para o melhor entendimento do destino do composto no sistema de monocamadas de células Caco-2. A eficiência da extração da CAS X de células tratadas com BNPP e do material plástico foram avaliadas em experimentos separados. A recuperação média da extração da CAS X das células foi de 88%. No material plástico das placas Transwell® foi observado que, do total da CAS X adicionada no início de um experimento sem células, 38% foi adsorvido após 2h de incubação do composto. Nesse caso, a eficiência da extração para a recuperação da CAS X em relação à quantidade inicial adicionada foi de 99%.

3.3.1. Transporte absortivo da CAS X

O transporte da CAS X na direção absortiva foi avaliado nos sistemas de monocamadas de células Caco-2 com a atividade das CES intactas ou inibidas pelo tratamento prévio das células com BNPP. Nas células intactas, a recuperação total da CAS X diminuiu com o passar do tempo, resultando em uma perda de quase 90% após duas horas de incubação, devido à presença de CES ativas. Já nas células tratadas com BNPP, devido à inibição da atividade hidrolítica das CES, o balanço de massas se manteve acima de 85% durante todo e experimento (**Tabela 18**).

Tabela 18. Recuperação total da CAS X (%) obtida nos ensaios de transporte absortivo realizados com monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com inibidor de CES.

	Tempo de Incubação		
	10 min	**60 min**	**120 min**
Células Caco-2 intactas	68,4 (4,7)	33,3 (0,7)	12,0 (0,9)
Células Caco-2 tratadas com BNPP	85,4 (3,7)	87,2 (3,7)	87,4 (4,1)

A quantidade de CAS X encontrada na solução tampão de transporte apical, basolateral, nas células, no material plástico e a quantidade perdida foram comparadas com a quantidade inicial adicionada para calcular sua distribuição em cada compartimento (**Figura 28**).

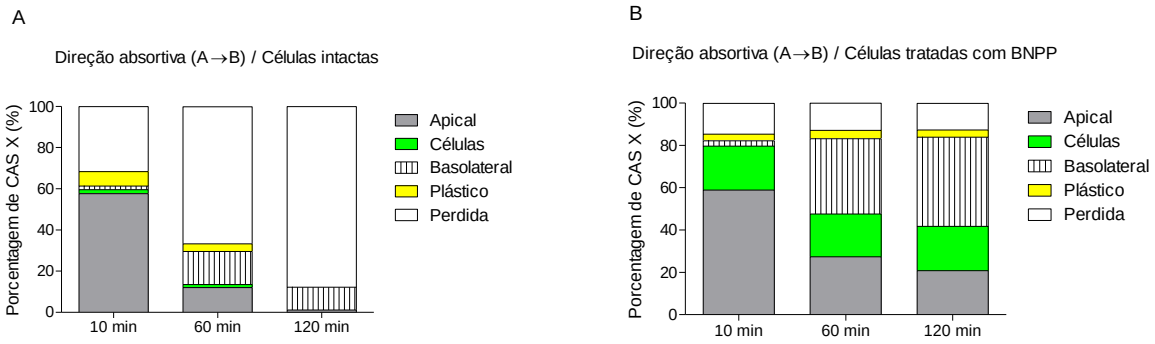


Figura 28. Distribuição da CAS X em diferentes compartimentos dos sistemas de monocamadas de células Caco-2 (A) intactas e (B) tratadas com BNPP, dos ensaios de transporte absortivo (n = 3).

Uma quantidade significativa da CAS X desapareceu durante os experimentos com as células intactas, sem inibição das CES. Após 120 minutos, nenhuma quantidade foi encontrada dentro das células ou adsorvida ao material plástico. Já nas células tratadas com BNPP, cerca de 40% da CAS X foi encontrada no compartimento receptor (basolateral) após 120 minutos de incubação. A diferença na quantidade transportada para o compartimento receptor entre as duas situações foi de aproximadamente 30%, provavelmente devido à ocorrência de hidrólise da CAS X após sua incorporação nas células intactas.

Nas células tratadas com BNPP, a quantidade de CAS X encontrada dentro das células e adsorvida ao plástico foi constante nos intervalos de tempo avaliados (10, 60 e 120 min), com recuperação em torno de 20 e 4%, respectivamente. Esses resultados confirmam que o compartimento intracelular não pode ser ignorado em estudos de transporte realizados com compostos lipofílicos, a fim de possibilitar uma estimativa confiável dos coeficientes de permeabilidade (Broeders et al., 2012). Com a possibilidade de quantificar a CAS X intracelular

e adsorvida ao material plástico nas células tratadas com BNPP, foi observado que a quantidade perdida no final do experimento foi reduzida de 88% para, aproximadamente, 13%.

Os perfis de permeabilidade absortiva da CAS X pelas células intactas e tratadas com BNPP estão representados na **Figura 29**.

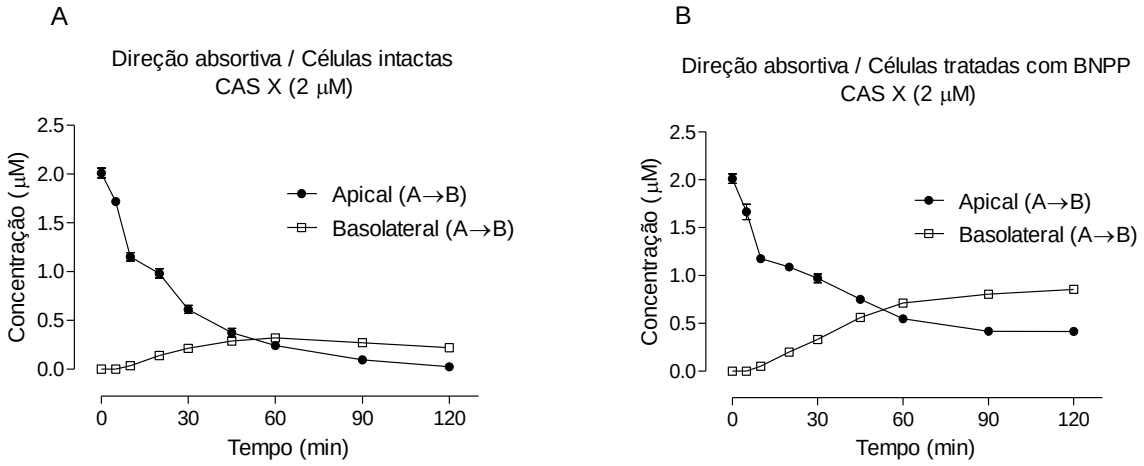


Figura 29. Perfis de permeabilidade absortiva da CAS X (2 μM) em (A) monocamadas de células Caco-2 intactas e (B) tratadas com 200 μM de BNPP (n = 3).

A **Figura 29** mostra que as concentrações de CAS X caíram rapidamente no compartimento doador (apical) nos primeiros 10 minutos, de forma semelhante nas duas situações. De acordo com a distribuição da CAS X avaliada após 10 minutos de transporte (**Figura 28 B**), o principal destino dessa fração foi o compartimento intracelular, evidenciando que a lipofilicidade da CAS X tem um acentuado impacto na cinética de transporte. Com a inibição da hidrólise intracelular, observa-se um acentuado aumento da concentração da CAS X no compartimento receptor (basolateral) do sistema de células tratadas com BNPP (**Figura 28 B**), em contraste com o perfil lento observado no sistema de células intactas (**Figura 28 A**). Além disso, entre 60 e 120 minutos, observa-se uma tendência de diminuição da concentração da CAS X em ambos os compartimentos do sistema de células intactas, em contraste com uma tendência para a estabilidade no sistema de células tratadas com BNPP.

Em relação ao coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}), os compostos podem ser divididos em três categorias. Valores de P_{app} abaixo de 1×10^{-6} cm/s indicam que o composto não será bem absorvidos (0–20%). Valores de P_{app} entre $1–10 \times 10^{-6}$ e acima de 10×10^{-6} cm/s indicam que o composto será moderadamente (20–70%) e bem absorvido (70–100%), respectivamente (Ye, 1997). O valor de P_{app} A→B (absortiva) obtido nesse estudo foi de 66,9 $\pm$ 2,3 $\times 10^{-6}$ cm/s. Esse resultado demonstra que, apesar da acumulação intracelular, a CAS X

exibiu uma alta permeabilidade na direção absortiva, quando as CES tiveram sua atividade inibida pelo tratamento das células com BNPP. Não foi possível calcular a P_{app} no sistema de células intactas devido à baixa recuperação da CAS X, como mencionado anteriormente.

3.3.2. Transporte secretório da CAS X

O transporte da CAS X na direção secretória também foi avaliado em ambos os sistemas de monocamadas de células Caco-2, intactas e tratadas com BNPP. As porcentagens de recuperação total da CAS X nos dois sistemas seguiram a mesma tendência observada no transporte absortivo, sendo sempre maiores nas monocamadas tratadas com BNPP (**Tabela 19**).

Tabela 19. Recuperação total da CAS X obtida nos ensaios de transporte secretório realizados com monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com BNPP. Média (DP), n = 3.

	Tempo de incubação		
	10 min	**60 min**	**120 min**
Células Caco-2 intactas	74,4 (1,8)	46,5 (0,7)	27,6 (1,5)
Células Caco-2 tratadas com BNPP	93,9 (6,1)	89,3 (4,4)	92,9 (6,7)

Pode ser observado que a distribuição da quantidade de CAS X encontrada em cada compartimento foi diferente no transporte secretório, conforme ilustrada na **Figura 30**.

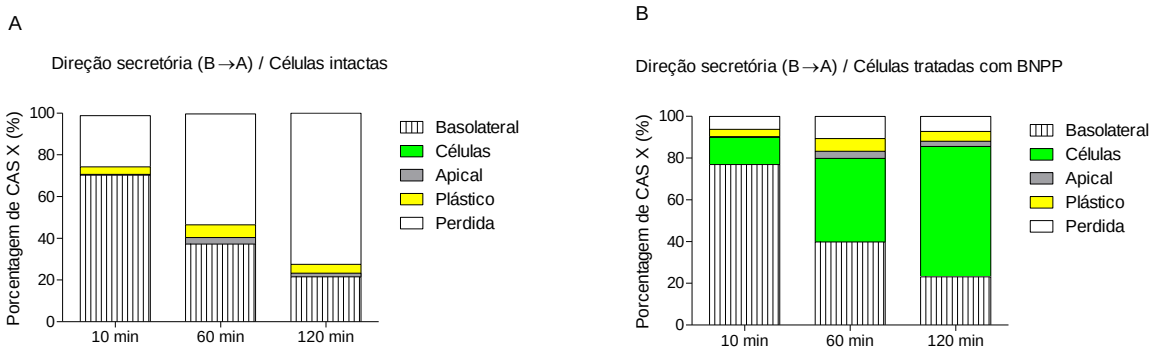


Figura 30. Distribuição da CAS X em diferentes compartimentos dos sistemas de monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com BNPP nos ensaios de transporte secretório (n = 3).

Diferente do observado nos ensaios de transporte absortivo, a quantidade de CAS X recuperada no compartimento doador foi sempre maior que no receptor. Esse fenômeno é esperado devido a menor superfície de contato entre a solução tampão de transporte e a membrana basal celular, que não possui as microvilosidades características do lado apical. Por esse motivo, normalmente pressupõe-se que a quantidade acumulada dentro das células seja sempre maior nos ensaios de transporte absortivo (Slolnik et al., 2010; Broeders et al., 2012). No entanto, foi observado que a quantidade intracelular recuperada nas células tratadas com BNPP foi maior nos ensaios de transporte secretório. Esse resultado coloca em dúvida a difusão passiva como mecanismo envolvido no transporte da CAS X.

Para elucidar os mecanismos de absorção envolvidos no transporte da CAS X em monocamadas de células Caco-2, foram calculadas a permeabilidade aparente (P_{app}) do transporte secretório e o coeficiente de efluxo (Cef). Os perfis de permeabilidade secretório da CAS X nas monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com BNPP estão representados na **Figura 31**.

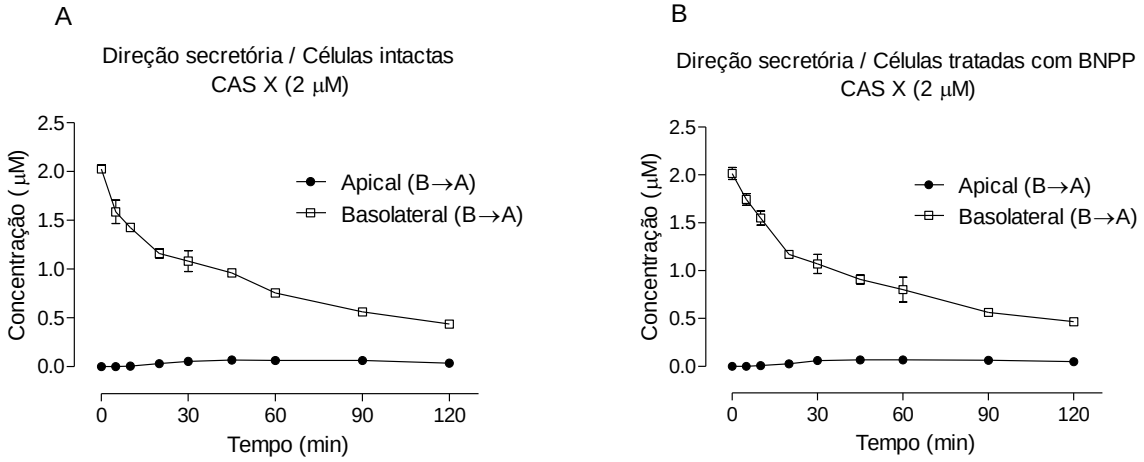


Figura 31. Perfis de permeabilidade secretório da CAS X (2 μM) em monocamadas de células Caco-2 intactas e tratadas com 200 μM de BNPP (n = 3).

A P_{app} B→A (secretória) foi de 7,5 ± 0,6 × 10^{-6} cm/s; quase 9 vezes menor que a P_{app} A→B (absortiva). Essa diferença entre P_{app} absortiva e secretória indica que o mecanismo envolvido na absorção da CAS X não ocorre por difusão passiva. Caso contrário, o transporte nas direções A→B e B→A deveriam ser simétricos, ou seja, P_{app} (A→B) = P_{app} (B→A), resultando numa taxa de permeabilidade em torno de 1. Esse resultado sugere a ocorrência de mecanismos de captação na direção absortiva via proteínas transportadoras (Duan et al., 2014).

As células Caco-2 podem expressar uma variedade de proteínas transportadoras em meios de cultura apropriados. Entre os transportadores de influxo, os mais comuns são o peptídeo transportador (PEPT) e polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP). Ambos funcionam independentemente de ATP, transportando solutos de acordo com o gradiente de concentração (Gutmann et al., 1999; Awortwe; Fasinu; Rosenkranz, 2014).

Por outro lado, o Cef calculado pela razão entre P_{app} B→A e P_{app} A→B tem sido usado como um parâmetro padrão para descrever o envolvimento de transportadores de efluxo. Teoricamente, valores de Cef acima de 2 normalmente sugerem que o composto é um substrato para transportadores de efluxo apical. Valores entre 1 e 2, considerados ambíguos, necessitam de um ensaio adicional empregando inibidores específicos (Sun et al., 2008). No entanto, o valor de 0,11 obtido para a CAS X não deixa dúvidas de que ela não é substrato para transportadores ativos de efluxo, como a glicoproteína P (P-gp), a proteína de resistência a múltiplos fármacos tipo 2 (MRP2) e a proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP), que utilizam ATP como fonte de energia para o transporte de substratos (Awortwe; Fasinu; Rosenkranz, 2014).

3.4. Ensaio de hidrólise enzimática

Embora os resultados obtidos nos ensaios de permeabilidade sugiram que a CAS X pode ser bem absorvida e não ser afetada pelos transportadores de efluxo, ainda há outros fatores que podem limitar sua biodisponibilidade. Os experimentos de permeabilidade realizados com células Caco-2 intactas confirmaram a evidente instabilidade da CAS X devido à presença de CES, também presente em microssomas hepático.

Em humanos, as duas principais isoformas de CES são a carboxilesterase tipo 1 (hCE-1) e a carboxilesterase tipo 2 (hCE-2). As CES estão localizadas no citoplasma e no retículo endoplasmático de muitos tecidos. As maiores quantidades são encontradas no fígado e no intestino delgado, nos quais elas podem diminuir significativamente a biodisponibilidade de substratos sujeitos ao metabolismo de primeira passagem por hidrólise. O fígado humano contém predominantemente hCE-1 e pouca quantidade de hCE-2, enquanto o intestino delgado contém principalmente hCE-2 (Laizure et al., 2013). No entanto, as células Caco-2 possuem um gene mutante que resulta em maior expressão de hCE-1 (Ohura et al., 2009).

Uma vez que a isoforma hCE-1 também é capaz de hidrolisar substratos para hCE-2, foi realizado um ensaio de hidrólise enzimática empregando a isoforma hCE-2 purificada, a fim de examinar para qual isoforma de CES a CAS X é substrato. Como mostra a **Figura 32**, aproximadamente 30% da quantidade inicial de CAS X adicionada ao meio de reação foi hidrolisada após 30 minutos de incubação com hCE-2 a 37 ºC.

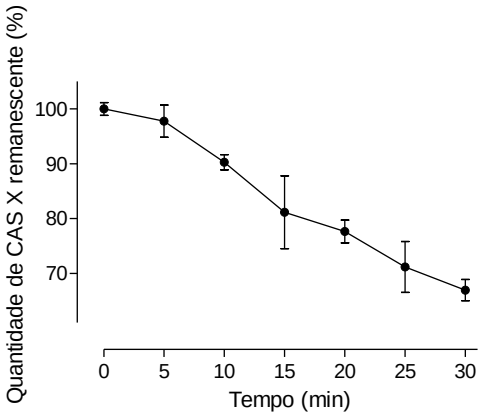


Figura 32. Perfil de hidrólise da CAS X incubada com a isoforma hCE-2 de carboxilesterase a 37 ºC por 30 minutos (n = 3).

A atividade específica da hCE-2 nesse ensaio de hidrólise da CAS X foi de 55,8 ± 3,2 pmol/min/mg de proteínas e a meia vida metabólica da CAS X foi de 49,5 minutos. Posteriormente, novo experimento de hidrólise realizado com adição de BNPP ao meio reacional reduziu quase completamente a atividade da hCE-2, com uma porcentagem de inibição de 95,8 ± 1,5%.

Esse resultado está de acordo com a especificidade de substratos descrita para as CES, no qual a isoforma hCE-1 catalisa preferencialmente a hidrólise de compostos esterificados com álcool de cadeia curta, enquanto a hCE-2 hidrolisa compostos com álcool de cadeia longa e grupos acil relativamente pequenos. No entanto, ésteres que possuem a porção acil curta, como o caso da CAS X, também podem ser hidrolisados por hCE-1, devido à presença de dois principais sítios de ligação: um sítio pequeno e rígido, portanto mais seletivo, e outro maior e flexível, podendo atuar sob compostos contendo cadeias curtas ou longas na porção alcoólica do éster (Imai, 2006).

Assim, a CAS X demonstrou ser substrato para ambas as isoformas de CES: hCE-1 presente em células Caco-2, da mesma forma que em microssomas hepático, e hCE-2 purificada, a principal isoforma encontrada no epitélio intestinal humano. Mais uma vez, isso

deixa claro que a biodisponibilidade oral da CAS X será comprometida pelo metabolismo de primeira passagem, tanto no fígado (**capítulo 4**), quanto no intestino.

Essas informações devem ser levadas em consideração como um guia que pode contribuir para futuros estudos a serem realizados *in vivo*, e nas pesquisas sobre possíveis alterações na susceptibilidade hidrolítica da CAS X, mediante modificações moleculares ou com o emprego de artifícios farmacotécnicos.

CONCLUSÃO

Após o desenvolvimento de todas as etapas propostas neste trabalho, foi determinada a via metabólica da CAS X, demonstrando que ela é substrato para reações de hidrólise mediada pelas CES microssomais hepática de ratos e de humanos, em detrimento das isoformas do CYP 450. O metabolismo microssomal hepático da CAS X na ausência de inibidores seletivos das CES, indicou que ela é substrato para a isoforma hCE-1. Os estudos de cinética enzimática demonstraram que o Cl_{int} observado com os microssomas hepático humano foi 1,7 vezes maior que o observado com microssomas hepático de ratos, o que é consistente com as diferenças na expressão genética de CES entre as espécies estudadas. A previsão do Cl_H da CAS X obtido por extrapolação in vitro-in vivo foi semelhante entre as espécies, e correspondeu a quase todo fluxo sanguíneo hepático, sugerindo que a CAS X é quase completamente eliminada após sua passagem pelo fígado. As análises por LC-ESI-MS-IT e MS-ESI-Q-TOF mostraram que o metabólito da CAS X obtido por reações de metabolismo in vitro com microssomas hepático de ratos corresponde a casearina X dialdeído.

Nos estudos de permeabilidade intestinal *in vitro*, a CAS X foi capaz de permear a monocamada de células Caco-2, em condições de inibição das CES ativas, demonstrando ter boa capacidade de absorção intestinal. O mecanismo de absorção ocorre provavelmente via transportadores de influxo, sem a ocorrência de efluxo, mas com alta retenção do composto dentro das células. Além disso, esses estudos reforçaram que a CAS X é substrato para a isoforma hCE-1 e os ensaios de hidrólise com a enzima purificada demonstrou que ela também é substrato para a isoforma hCE-2.

Assim, pelos estudos de metabolismo e de absorção *in vitro* da CAS X, pode-se inferir que a sua biodisponibilidade oral *in vivo* tende a ser comprometida pelo metabolismo de primeira passagem, tanto no intestino, quanto no fígado.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, B.; LENNERNAS, H. Aplication of the biopharmaceutic classification system now and in the future. In: WATERBEEMD, H.; LENNERNAS, H.; ARTURSSON, P. **Drug bioavailability, estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability**. 1 ed. Wiley, 2005. p. 495–531.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para Validação de Métodos Bioanalíticos**. *Resolução RDC n.27, de 17 de maio de 2012*. [Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregado em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos]. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/ rdc0027_17_05 _2012.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2013.

ALI, B.; KAUR, S., JAMES, E. C.; PARNAR, S. S. Identification and characterization of hepatic carboxylesterases hydrolyzing hydrocortisone esters. **Biochemical Pharmacolody**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 1881–1886, 1985.

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

AMENI, A. Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos *Wistar***. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ARAÚJO, E. J. F. **Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isoladas das folhas da *Casearia sylvestris* Swartz**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

ARTURSSON, P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Boca Raton, v. 8, n. 4, p. 305–330, 1990.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 46, n. 1–3, p. 27–43, 2001.

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

AWORTWE, C.; FASINU, P. S.; ROSENKRANZ, B. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences**, Edmonton, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2014.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmaceutical and Toxicological Methods**, New York, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug discovery today**, Kidlington, v. 10, n. 5, p. 335–343, 2005.

BALIMANE, P. V.; HAN, Y.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Arlington, v. 8, n. 1, p. E1–E13, 2006.

BARR, J. T.; FLORA, D. R.; IWUCHUKWU, O. F. Practical considerations with experimental design and Interpretation. In: TWEEDIE, D. J.; ARGIKAR, U. A.; NAGAR, S. **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism, Fundamentals and Applications**. 1 ed. Springer Protocols, 2014. p. 419–429.

BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of Casearia sylvestris: Preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 30, n. 2, p. 185–197, 1990.

BENET, L. Z.; CUMMINS, C. L.; WU, C. Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 277, n. 1–2, p. 3–9, 2004.

BEHRENS, I.; KISSEL, T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 19, n. 5, p. 433 – 442, 2003.

BEHRENS, I.; KAMM, W.; DANTZIG, A. H.; KISSEL, T. Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 93, n.7, p. 1743–1754, 2004.

BEUTLER, J. A.; McCALL, K. L.; HERBERT, K.; JOHNSON, T.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Cytotoxic clerodane diterpenes esters from Laetia procera. **Phytochemistry**, v. 55, n. 3, p. 233–236, 2000.

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

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of Casearia sylvestris (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Phisiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 127, n. 1, p. 21–30, 2000.

BRANDON, E. F. A.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Review: An update on in vitrotest methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v.189, n. 3, p. 233–246, 2003.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, 1. ed., 1926. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/virtuais.htm>. Acesso em 19 jan. 2016.

BROEDERS, J. J. W.; EIJKEREN, J. C. H.; BLAAUBOER, B. J.; HERMENS, J. L. M. Transport of chlorpromazine in the Caco-2 cell permeability assay: a kinetic study. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 25, n.7, p. 1442–1451, 2012.

BRZEZINSKI, M. R.; ABRAHAM, T. L.; STONE, C. L.; DEAN, R. A.; BOSRON, W. F. Purification and characterization of human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzylecgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 48, n. 9, p. 1747–1755, 1994.

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

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: EMBRAPA, 2006. v. 2, p. 627.

CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 3, p. 277–284, 2009.

CAVALCANTE, W. L.; CAMPOS, T. O.; DAL PAI-SILVA, M.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of Casearia sylvestris (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 3, p. 490–497, 2007.

CHATURVEDI, P. R.; DECKER, C. J.; ODINECS, A. Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, n. 4, p. 452–463, 2001.

CHEN, I. J.; TANEJA, R.; YIN, D.; SEO, P. R.; YOUNG D.; MACKERELL, A. D.; POLLI, J. E. Chemical substituent effect on pyridine permeability and mechanistic insight from computational molecular descriptors. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 3, n. 6, p. 745–755, 2006.

CHEN, M.; YU, L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 6, n. 1, p. 74–81, 2008.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p. 169–170.

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Espécies Cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura/IBDF, 1975. p. 514–516.

COX, K. Special requirements for metabolite characterization. In: KORFMACHER, W.A. **Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies**. 1 ed. CRC Press. 2005. p. 229–252.

CROW, J. A., BORAZJANI, A., POTTER, P. M., ROSS, M. K. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 221, n. 1, p. 1–12, 2007.

DANUELLO, A.; PIVATTO, M. VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CAVALHEIRO, A.; LOPES, N. P. Estudo de fragmentação de diterpenos clerodânicos presentes em espécies de *Casearia*, ionizados por *electrospray*. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 35, 2012, Águas de Lindóia. **Anais Eletrônicos da 35ª Reunião Anual da SBQ**. Resumos. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/35ra/resumos/T0911-1.pdf >. Acesso em: 17 jan. 2014.

DUAN, J.; XIE, Y.; LUO, H.; LI, G.; WU, T.; ZHANG, T. Transport characteristics of isorhamnetin across intestinal Caco-2 cell monolayers and the effects of transporters on it. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 66, p. 313–320, 2014.

ELKINS, S.; RING, B. J.; GRACE, J.; McROBIE-BELLE, D. J.; WRIGHTON, S. A. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 44, n. 1, p. 313–324, 2000.

EMA – European Medicines Agency. **Guideline on Bioanalytical Method Validation**. 2011. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/ Scientific_guideline /2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2013.

EMOTO, C.; MURAYAMA, N.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; YAMAZAKI, H. Methodologies for investigation drug metabolism at the early drug discovery stage: prediction of hepatic drug clearance and P450 contribution. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 11, n. 8, p. 678–685, 2010.

ESPINDOLA, L. S.; VASCONCELOS JÚNIOR, J. R.; MESQUITA, M. L.; MARQUIÉ, P.; PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from Casearia sylvestris var. lingua. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 11, p. 1093–1095, 2004.

ESTEVES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G.; SANTOS, L. S.; SERTIÈ, J. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from Casearia sylvestris Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n. 1, p. 191–196, 2005.

FANDIÑO, A. S.; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on in vivo degradation of anhydroecgonine methyl ester (Methylecgonine) in human plasma. **Journal of Analytical Toxicology**, Oxford, v. 26, p. 567–570, 2002.

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

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; HARIPARSAD, N.; SANE, R. S.; STROM, S. C.; DESAI, P. B. In vitro methods in human drug biotransformation research: impliations for cancer chemotherapy. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 135–153, 2006.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, n. 188, v. 3, p. 497–504, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry**: Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: studies in vitro. Rockville, 1997. Disponível em: < http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/CDER/UCM1424 39.pdf>. Acesso em 25 jan. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry**. Drug interaction studies- study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. Rockville, 2012. Disponível em: < http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatory information/guidances/ucm292362.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2015.

GIACOMINI, K. M.; HUANG, S. M.; TWEEDIE, D. J.; BENET, L. Z.; BROUWER, K. L.; CHU, X.; DAHLIN, A.; EVERS, R.; FISCHER, V.; HILLGREN, K. M. HOFFMASTER, K. A.; ISHIKAWA, T.; KEPPLER, D.; KIM, R. B.; LEE, C. A.; NIEMI, M.; POLLI, J. W.; SUGIYAMA, Y.; SWAAN, P. W.; WARE, J. A.; WRIGHT, S. H.; YEE, S. W.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J.; ZHANG, L. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GONZALVO, M. C.; GIL, F.; HERNÁNDEZ, A. F.; VILLANUEVA, E.; PLA, A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 169–179, 1997.

GUAÇATONGA faz úlcera cicatrizar mais rápido. **Estadão**, São Paulo, 12 jul. 2004. Disponível em: < http://www.estadao.com.br/noticias/geral,guacatonga-faz-ulcera-cicatrizar-mais-rapido,20040712p1706>. Acesso em 05 ago. 2013.

GUTMANN, H.; FRICKER, G.; TÖRÖK, M.; MICHAEL, S.; BEGLINGER, C.; DREWE, J. Evidence for different ABC-transporters in Caco-2 cells modulating drug uptake. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 16, n. 3, p. 402–407, 1999.

HAN, M.; LI, J.; TAN, Q.; SUN, Y.; WANG, Y. Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, Peking, v. 19, n. 3, p. 195–200, 2010.

HIDALGO, I. J.; RAUB, T. J.; BORCHARDT, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 96, n. 3, p. 736–49, 1989.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939. p. 196–199.

HOEHNE, F. C.; KUHLMANN, M.; HANDRO, O. **O Jardim Botânico de São Paulo**. São Paulo: Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, 1941.

HOUSTON, J. B. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 47, n. 9, p. 1469–1479, 1994.

HUANG, L., BERRY, L., GANGA, S., JANOSKY, B., CHEN, A., ROBERTS, J.; COLLETTI, A.; LIN, M. H. J. Relationship between passive permeability, efflux, and predictability of clearance from in vitro metabolic intrinsic clearance. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 38, n. 2, p. 223–231, 2010.

IMAI, T.; IMOTO, M.; SAKAMOTO, H.; HASHIMOTO, M. 2005. Identification of esterases expressed in Caco-2 cells and effects of their hydrolyzing activity in predictiong human intestinal absorption. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 33, n. 8, p. 1185–1190, 2005.

IMAI, T. Human carboxylesterase isoenzymes: catalytic properties and rational drug design. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Tokyo, v. 21, n. 3, p. 173–185, 2006.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. New antitumor principles from Casearia sylvestris Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2D NMR spectroscopy. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 36, n. 12, p. 1585–1588, 1988.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New antitumor principles, casearins A-F, for Casearia sylvestris Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 38, n. 12, p. 384–3388, 1990.

ITOKAWA, H.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H. Antitumor compounds isolated from higher plants. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, Tokyo, v. 119, n. 8, p. 529–583, 1999.

IWATSUBO, T.; HIROTA, N.; OOIE, T.; SUZUKI, H.; SHIMADA, N.; CHIBA, K.; ISHIZAKI, T.; GREEN, C. E.; TYSON, C. A.; SUGIYAMA, Y. Prediction of *invivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 147–171, 1997.

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

JUNGES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. Flavonóides da Casearia sylvestris Sw. (erva de bugre). **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 95–101, 1985.

KANG, H. E.; LEE, M. G. Approaches for predicting human pharmacokinetics using interspecies pharmacokinetic scaling. **Archives of Pharmacal Research**, Seul, v. 34, n. 11, p. 1779–1788, 2011.

KAPITZA, S. B.; MICHEL, B. R.; VAN HOOGEVEST, P.; LEIGH, M. L. S.; IMANIDIS, G. Absorption of poorly water soluble drugs subject to apical efflux using phospholipids as solubilizers in the Caco-2 cell model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.66, n. 1, p. 146–158, 2006.

KERNS, E.; DI, L. Advantages of good drug-like properties. In: KERNS, E.; DI, L. **Drug-Like Properties: Concepts, Structure, Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization**. 1 ed. Oxford: Elsevier, 2008. cap. 1, p. 6–16.

KING, R. S. Factors affecting metabolism. In: NASSAR, A. F. **Drug Metabolism Handbook – concepts and applications.** I ed. John Wiley & Sons, Inc. 2009. p. 17–40.

LAKE, B.G. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotics metabolism. In: Snell, K.; Mullock, B. **Biochemical toxicology – a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1987, cap. 8, p. 183–215.

LAIZURE, C.; HERRING, V.; HU, Z.; WITBRODT, K.; PARKER, R.B. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? **Pharmacotherapy**, Calisle, v. 33, n. 2, p. 210–222, 2013.

LEE, Y.; LIU, K.; MOON, J.; KO, J.; CHOI, H.; HWANG, K.; KIM, E.; KIM, J. **In vitro metabolism of flucetosulfuron by human liver microsomes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 62, n. 1, p. 3057–3063, 2014.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 49, n. 4, p. 403–449, 1997.

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

LIU, K. H.; MOON, J. K.; SEO, J. S.; PARK, B. S.; KOO, S. J.; LEE, H. S.; KIM, J. H. Characterization of Pyribenzoxim Metabolizing Enzymes in Rat Liver Microsomes, **Toxicological Research**, London, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2006.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the Casearia sylvestris extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, Oxford, n. 18, v. 3, p. 337–342, 2004.

MAJORS, R. Sample preparation. In: SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. Wiley, 2011. p. 720–752.

MARQUES, L. M. M.; SILVA-JÚNIOR, E. A.; GOUVEIA, D. R.; VESSECHI, R.; PUPO, M. T.; LOPES, N. P.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism of the alkaloid piplartine by rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 95, p. 113–120, 2014.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M.; KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, London, v. 2, n. 6, p. 875–894, 2006.

MATTOS, E. S.; FREDERICO, M. J.; COLLE, T. D.; PIERI, D. V.; PETERS, R. R.; PIOVEZAN, A. P. Evaluation of antinociceptive activity of Casearia sylvestris and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 1, p. 1–6, 2007.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J. ; BORIES, C. ; FOURNET, A. ; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 783–787, 2005.

MESSIANO, G. B.; SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, L. S.; SIMÕES, R. A.; JABOR, V. A. P.; KATO, M. J.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T.; OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism study of the promising anticancer agent the lignin(-)-grandisin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 72, p. 240–244, 2013.

MOREIRA, F. L.; SOUZA, G. H. B.; RODRIGUES, I. V.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, A. R. M. A non-michaelian behaviour of the *in vitro* metabolism of the pentacyclic triperpene alfa and beta amyrins by employing rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 84, p. 14–19, 2013.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from Casearia sylvestris Sw. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 39, n. 3, p. 693–697, 1991.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 627–642, 2000.

NAKAMORI, F.; NARITOMI, Y.; FURUTANI, M.; TAKAMURA, F.; MIURA, H.; MURAI, H.; TERASHITA, S.; TERAMURA, T. Correlation of intrinsic in vitro and in vivo clearance for drugs metabolized by hepatic UDP-glucuronosyltransferases in rats. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Tokyo, v. 26, n. 5, p. 465–473, 2011.

NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SOUZA, M. A.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 99, n. 1, p. 37–41, 2005.

NASSAR, A. E. F.; TALAAT, R. E. Strategies for dealing with metabolite elucidation in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 317–327, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 4 de. W. H. Freeman, 2004, p. 190–237.

NISHIMUTA, H.; HOUSTON, J. B.; GALENTIN, A. Hepatic, intestinal, renal, and plasma hydrolysis of prodrugs in human, cynomolgus monkey, dog, and rat: implications for in vitro-in vivo extrapolation of clearance of prodrugs. **Drug Metabolism and Disposition**, Amsterdam, v. 42, n. 9, p. 1514–1521, 2014.

OBACH, R. S., BAXTER, J. G., LISTON, T. E., SILBER, B. M., JONES, B. C., MACINTYRE, F.; RANCE, D. J.; WASTALL, P. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 283, n. 1, p. 46–58, 1997.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.;

WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of Casearia sylvestris. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, n. 2, p. 95–99, 2002.

OHURA, K.; SAKAMOTO, H.; NINOMYIA, S.; IMAI, T. Development of a new system for estimating human intestinal absorption using Caco-2 cell in the absence of esterase activity. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 38, n. 2, p. 323–331, 2009.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 74–79, 2011.

PASSARELI, F. **Preparação e caracterização de casearinas de *Casearia sylvestris* como padrão fitoquimico**. 2010. 286p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado de São Paulo, Araraquara, 2010.

PINDEL, E. V.; KEDISHVILI, N. Y.; ABRAHAM, T. L.; BRZEZINSKI, M. R.; ZHANG, J.; DEAN, R. A.; BOSRON, W. F. Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin. **Journal of Biochemical Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 23, p. 14769–14775, 1997.

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

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

RANE, A.; WILKINSON, G. R.; SHAND, D. G. Prediction of hepatic extraction ratio from in vitro measurement of intrinsic clearance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 200, n. 2, p. 420–424, 1977.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D.S.; BORGES, M. H.; LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of Casearia sylvestris Sw. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, Milano, v. 141, n. 6, p. 457–460, 2002.

RAUTIO, J.; HUMPHREYS, J. E.; WEBSTER, L. O.; BALAKRISHNAN, A.; KEOGH, J. P.; KUNTA, J. R.; SERABJIT-SINGH, C. J.; POLLI, J. W. In vitro P-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probes substrates. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 34, n. 5, p. 786–792, 2006.

REDINBO, M. R.; POTTER, P. M. Mammalian carboxylesterases: from drug targets to proteins therapeutics. **Drug Discovery Today**, Kindlington, v. 10, n. 5, p. 313–325, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 771–780, 2004.

ROBBI, M.; BEAUFAY, H. Purification and characterization of various esterases from rat liver. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 137, n. 1–2, p. 293–301, 1983.

ROBBI, M.; BEAUFAY, H. Biosynthesis of rat liver pI-6.1 esterase, a carboxylesterase of the cisternal space of endoplasmatic reticulum. **The Biochemical Journal**, London, v. 248, n. 2, p. 545–550, 1987.

ROCHA, B. A.; ASSIS, M. D.; PETI, A. P. F.; MORAES, L. A. B.; MOREIRA, F. L.; LOPES, N. P.; POSPISIL, S.; GATES, P. J.; OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism of monensin A: microbial and human liver microsomes models. **Xenobiotica**, London, v, 44, n. 4, p. 326–335, 2014.

ROZET, E.; MARINI, R. D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B. HUBERT, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 848–858, 2011.

RUBAS, W.; CROMWELL, M.; SHAHROKH, Z. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 85, n. 2, p. 165–169, 1996.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 203–205, 1991.

SANTOS, A. G.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1100–1103, 2007.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico**. 2008. 361p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado de São Paulo, Araraquara, 2008.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; JÚNIOR, G. M. V.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of Casearia sylvestris: evaluation of citotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemisty and Biodiversity**, Zürich, v. 7, n. 1, p. 205–215, 2010.

SATOH, T.; HOSOKAWA, M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 38, p. 257–288, 2001.

SCHOENFELDER, T.; PICH, C. T.; GEREMIAS, R.; AVILA, S.; DAMINELLI, E. N.; PEDROSA, R. C.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of Casearia sylvestris methanolic extract. **Fitoterapia**, Milano, v. 79, n. 6, p. 465–467, 2008.

SEGEL, I. H. Kinetics of unireactant enzymes. In: **Enzyme Kinetics – Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**. 1 ed. John Wiley & Sons, Inc. 1975. p. 18-99.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Fundamentals of enzyme kinetics. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. **Enzyme Kinetic in Drug Discovery**. 1 ed. Springer Protocols. 2014. p. 9–22.

SERTIÈ, J. A.; CARVALHO, J. C.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 38, n. 2, p. 112–119, 2000.

SILVA, F. A.; BAISCH, A. L. M.; OLIVEIRA, B.; BATTASTINI, A. M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; SILVA, E. S.; ALAM, M. F.; APOLINARIO, J. C. G.; LAPA, A. J. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos de Casearia sylvestrisSwartz. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 18, n. 1, p. 219–229, 1988.

SKOLNIK, S.; LIN, X.; WANG, J.; CHEN, X. H.; HE, T.; ZHANG, B. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 99, n. 7, p. 3246–3265, 2010.

SUN, H.; CHOW, E. C.; LIU, S.; DU, Y.; PANG, K. S. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, London, v. 4, n. 4, p. 395–411, 2008.

TANG, J.; CHAMBERS, J. E. Detoxication of paraoxon by rat liver homogenate and serum carboxylesterases and A-esterases. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 13, n. 5, p. 261–268, 1999.

TAKETANI, M.; SHII, M.; OHURA, K.; NINOMIYA, S.; IMAI, T. Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. **Life Sciences**, Oxford, v. 81, n. 11, p. 924–932, 2007.

TININIS, A. G. **Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração de casearinas em Casearia sylvetris Sw**. 2006. 182 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado de São Paulo, Araraquara, 2006

TIWARI, G; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: an update review. **Pharmaceutical Methods**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 25–38, 2010.

TRACY, T. S. Enzyme Kineticks. In: **Metabolism in Drug Design and Development**. 1 ed. John Wiley & Sons, Inc. 2008. p.89–112.

TRAN, T. T.; MITTAL, A.; ALDINGER, T.; POLLI, J. W.; AYRTON, A.; ELLENS, H.; BENTZ, J. The elementary mass action rate constants of P-gp transport for a confluent monolayer of MDCKII-hMDR1 cells. **Biophisical Journal**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 715–738, 2005.

USANSKY, H. H.; SINKO, P. J. Estimating human drug oral absorption kinetics from Caco-2 permeabilily using an absorption-disposition model: model development and evaluation and derivation of analytical solutions for K_a and F_a. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.314, n. 1, p. 391–399, 2005.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; DUTRA, L. A.; FERREIRA, P. M. P; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. DO Ó.; TORRES, R. B.; BORALLE, N.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Cytotoxic Clerodane Diterpenes from *Casearia rupestris*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, n. 4, p. 776–781, 2011.

WEIL, X. L.; HAN, R.; HU, X.; QUAN, L. H.; LIU, C. Y.; CHANG, Q.; LIAO, Y. H. Stabilization of zeylenone in rat plasma by the presence of esterases inhibitors and its LC-MS/MS assay for pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, London, v. 27, n. 5, p. 636–540, 2013.

WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; MILLER, S. J.; BIRKINSHAW, C.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSFIERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic clerodane diterpenoids and theyr hydrolysis products from Casearia nigrescena from the Rainforest of Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 206–209, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATON **Tecnical Report Series**, n 341, Principles for pre-clinical testing of drug safety. Genebra, 1996.

WU, H.; GUO, J.; CHEN, S.; LIU, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; XU, X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituints and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmacutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.72, p.267–291, 2013.

XIA, L.; GUO, Q.; TU, P.; CHAI, X. The genus Casearia: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 99–135, 2014.

YANG, Y.; ALOYSIUS, H.; INOYAMA, D.; CHEN, Y.; HU, L. Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. Oxford, v. 1, n. 3, p. 143–159, 2011.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption of man-fact or myth. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 14, n.16, p. 763–766, 1997.

ZHANG, C., XU, Y., ZHONG, Q., LI, X., GAO, P., FENG, C; CHU, Q.; CHEN, Y.; LIU, D. In Vitro Evaluation of the Inhibitory Potential of Pharmaceutical Excipients on human carboxylesterase 1A and 2. **Plos one**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1–8, 2014.

ZHANG, H.; DAVIS, C. D.; SINZ, M. W.; RODRIGUES, A. D. Cytrochrome P450 reaction-phenotyping: an industrial perspective. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, London, v. 3, n. 5, p. 667–587, 2007.

ZHANG, J.; BURNELL, J. C.; DUMAUAL, N.; BOSRON, W. F. Binding and hydrolysis of meperidine by human liver carboxylesterase hCE-1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 290, n. 1, p. 314–318, 1999.

ZHANG, Z.; KAMINSKY, L. S. Determination of metabolic rates and enzyme kinetics. In: ZHANG, D.; ZHU, M.; HUMPHREYS, W. G. **Drug Metabolism in Drug Design and Development**. 1 ed. Wiley. 2008. p. 413–446.