UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PÂMELA RODRIGUES ROSA PEREIRA

Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina

Ribeirão Preto
2018

PÂMELA RODRIGUES ROSA PEREIRA

Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Ribeirão Preto
2018

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.

Pereira, Pâmela Rodrigues Rosa
Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina. Ribeirão Preto, 2018.
43 p : il. ; 30cm.

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

1. Carambola. 2. Caramboxina. 3. Espectrometria de massas. 4. Metabolismo *in vitro*. 5. Microssomas hepáticos de ratos. 6. Oxidação biomimética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pâmela Rodrigues Rosa Pereira
Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor e criador de todas as coisas, inclusive da caramboxina.

Aos meus pais Maria das Dores e Ariston, e aos meus irmãos Albert e Michel, pelo carinho, paciência, confiança e amor dedicados, pelo incentivo e suporte me permitindo correr atrás dos meus objetivos e realizar meus sonhos.

À minha tia Maria Alcidete e família, pela acolhida e suporte durante todo esse tempo de mestrado.

Ao professor e orientador Dr. Norberto Peporine Lopes, por sua paixão pela ciência que contagia a todos, pela oportunidade de crescimento e aprendizagem tanto na pesquisa como pessoal, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e pela paciência e confiança durante todo o caminho.

Ao Laboratório de Metabolismo e Técnicas de Separação (LAB-METS), pela disponibilização dos materiais e espaço físico para realização dos ensaios de metabolismo com microssomas hepáticos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e a todos os professores e funcionários da FCFRP que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), pela infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Jacqueline Nakau, José Carlos Tomaz e Isabel Cristina, pela dedicação, paciência e disponibilidade em ajudar os alunos.

Aos colegas e amigos do NPPNS, que fizeram parte deste trajeto, Alan Pilon, Andrés Brunetti, Anelize Bauermeister, Ariane Manzoni, Artur Vaz, Camila Capel, Daniel Demarque, Daniel Pavarini, Danielle Rocha, Eduarda Moreira, Eduardo, Franco Caires, Gabriela Buqui, Gibson Santos, Juliano Amaral, Larissa Rolim, Lucas Maciel, Marília Gallon, Matheus Gazolla, Murilo Marcondes, Rafael Soldi, Rodolfo Nishimura, Rodrigo Moreira e Valter Eduardo, pelas discussões científicas, pelos conselhos e ajuda nos experimentos, pela amizade e momentos descontração.

Aos amigos-irmãos Taciana Cavaton, Pe. Josirlei, Douglas Rossato, Raquel Godoi, William Gerena e Tuca, pelos conselhos e orações, pelos e momentos de descontração, por todo o suporte e carinho e, sobretudo, pela grande pela amizade.

À família Ministério Universidades Renovadas, em especial Aline Scharr, Pedro Alexandre, Douglas Elias, Raony Molim, Letícia Luanda, Karen Bandeira, Fernanda Martins, Ana Paula, Maria Carolina, Antonio Irane, Lívia Melo, Lívia Cintra, Eduardo Santos, Edmilson, João Paulo, Beatriz Freitas, Flaviane Cunha e Rodrigo Calderari, por me ensinarem a renovar meus sonhos a cada dia, por todo o cuidado e carinho,

pelos momentos de descontração e espiritualidade, por serem minha família do coração.

A todos os amigos que contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que indiretamente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante o desenvolvimento do projeto.

Às instituições de fomento que viabilizaram este trabalho: CNPq e FAPESP.

“Sem amor, até a ciência perde a sua nobreza. Só o amor garante a humanidade da pesquisa.”

(Bento XVI, 2012)

RESUMO

PEREIRA, P. R. R.. **Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina**. 2018. 43p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2018.

A carambola (*Avehrroa carambola* L.) é uma rica fonte de vitaminas, sais minerais e antioxidantes. Seu formato de estrela, quando seccionada transversalmente, torna essa fruta muito valorizada na culinária. Contudo, nos últimos anos têm sido relatados alguns casos de intoxicação após ingestão desta fruta, relacionados, principalmente, a pacientes nefropatas. Sintomas como soluços intratáveis, agitação, confusão mental, vômito, convulsão e morte, decorrentes do *status epilepticus* (SE), foram descritos na maioria dos casos de intoxicação. Este quadro pode estar associado a presença de uma neurotoxina, caramboxina (CBX), que tem a capacidade de inibir o sistema de condução GABAérgico, além de atuar sobre os principais receptores glutamatérgicos, levando a ativação do mecanismo de excitotoxicidade neuronal. Há diversos modelos experimentais que buscam estudar os mecanismos ligados ao aparecimento do SE. Uma vez que a caramboxina pode estar relacionada com a indução do SE, estudos para melhor compreender seu metabolismo podem contribuir para sua possível aplicação em modelos experimentais de epilepsia. Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo *in vitro* da caramboxina, utilizando microssomas hepáticos e modelo de oxidação biomimética. Um extrato metanólico foi preparado na proporção de 1:1 (m/v) e em seguida fracionado em coluna contendo sephadex LH-20. A fração contendo CBX foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para seu isolamento. Essa metodologia permitiu um rendimento superior ao descrito na literatura, permitindo que esta neurotoxina possa ser futuramente avaliada em modelos experimentais *in vivo* de epilepsia. Parte da CBX isolada foi avaliada em ensaios de metabolismo *in vitro* com microssomas hepáticos de ratos, no entanto, não foi observado formação de produtos de oxidação nas condições empregadas, o que pode sugerir que não ocorra metabolismo de fase I da CBX, corroborando com a proposta de rápida eliminação pela urina por pessoas saudáveis que ingerem carambola. A avaliação da oxidação da CBX por modelo biomimético, utilizando catalizador de Jacobsen e oxidante e iodosilbenzeno (PhIO), apresentou a formação de um metabólito, o qual poderá ser posteriormente utilizado nos estudos de mecanismo de ação da CBX.

Palavras-chave: Carambola. Caramboxina. Espectrometria de massas. Metabolismo *in vitro*. Microssomas hepáticos de ratos. Oxidação biomimética.

ABSTRACT

PEREIRA, P. R. R.. **In vitro metabolism study of caramboxin**. 2018. 43p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2018.

The Star fruit (*Averrhoa carambola* L.) is a good source of vitamins, minerals and antioxidants. Its star shape, when cross-sectioned, makes this fruit highly prized in cooking. However, in the last years some cases of intoxication after ingestion of this fruit, mainly related to nephropathy patients, have been reported. Symptoms such as intractable hiccups, agitation, mental confusion, vomiting, convulsion, and death, due to *status epilepticus* (SE), have been described in most cases of intoxication. These clinical conditions may be associated with the presence of a neurotoxin, caramboxine (CBX), which has the capacity to inhibit the GABAergic conduction system, in addition to acting on the main glutamatergic receptors, leading to activation of the mechanism of neuronal excitotoxicity. Several experimental models aim to study the mechanisms related to the appearance of the SE. Since caramboxin may be related to the induction of ES, studies to better understand its metabolism may contribute to its possible application in experimental models of epilepsy. Therefore, this work aimed to study the in vitro metabolism of caramboxin, using hepatic microsomes and biomimetic oxidation model. A methanolic extract was prepared in the ratio of 1: 1 (m / v) and then fractionated on a column containing LH-20 sephadex. The fraction containing CBX was submitted to high performance liquid chromatography (HPLC) for its isolation. This methodology allowed a higher yield than described in the literature, allowing this neurotoxin to be evaluated in vivo in experimental models of epilepsy. Part of the isolated CBX was evaluated in in vitro metabolism assays with hepatic microsomes of rats, however, no oxidation product formation was observed under the conditions employed, which may suggest that CBX phase I metabolism does not occur, corroborating with a proposal for rapid urinary elimination by healthy people who eat carambola. The evaluation of CBX oxidation by biomimetic model, using Jacobsen's catalyst and oxidant and iodosilbenzene (PhIO), presented the formation of a metabolite, which could be used in future CBX action mechanism studies.

Keywords: Biomimetic oxidation. Caramboxin. In vitro metabolism. Mass spectrometry. Rat liver microsomes. Star fruit.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da caramboxina (CBX) 3

Figura 2 – Principais aminoácidos neurotransmissores excitatórios e inibitórios 4

Figura 3 - Protoporfirina IX, o sítio ativo do citocromo P450. 6

Figura 4 – Cromatograma LC-MS e espectros ESI-MS do extrato bruto de carambola. A) Cromatograma de pico base (BPC) com destaque para o sinal referente à CBX; B) Espectro ESI-MS *fullscan* com destaque em região onde a CBX está presente; C) Ampliação de B com destaque para o sinal referente à CBX. 15

Figura 5 - Fluxograma do rendimento em massa por etapa do isolamento da CBX .16

Figura 6 - Estrutura da lactama, produto da degradação da caramboxina (inativo). .17

Figura 7 - Cromatogramas do extrato de carambola. A) Cromatograma de pico base (BPC); B) Cromatograma com detecção UV-Vis (Ultravioleta-Visível). 17

Figura 8 – Cromatogramas do extrato bruto e da fração enriquecida, e espectros UV e MS. A) Cromatograma de pico base (BPC) do extrato bruto de carambola; B) BPC da fração enriquecida com sephadex LH-20; C) Espectro de ultravioleta (UV) da CBX; D) Espectro de massas (ESI-MS) da CBX. 19

Figura 9 - Cromatogramas ultravioleta (UV) de fração enriquecida. A) Cromatograma UV sem adição de TFA na fase móvel; B) Cromatograma UV com adição de TFA na fase móvel. 20

Figura 10 – Cromatograma UV da CBX após secagem em presença (A) e ausência (B) de TFA.....21

Figura 11 – Espectro de ^{1}H da CBX (Solvente CD_3OD, 500 MHz).....23

Figura 12 - Espectro COSY da CBX (Solvente CD_3OD, 300 MHz). 24

Figura 13 - Espectro HMBC da CBX (Solvente CD_3OD, 500 MHz).....25

Figura 14 - Espectro HSQC da CBX (Solvente CD_3OD, 400 MHz). 26

Figura 15 – Ampliação do espectro HSQC da CBX (Solvente CD_3OD, 400 MHz)....27

Figura 16 - Espectros ESI-MS/MS da CBX em três energias de colisão diferentes. A) MS/MS em 5eV; B) MS/MS em 10eV; C) MS/MS em 15eV. 29

Figura 17 – Cromatograma após a reação de oxidação biomimética da CBX utilizando *m*CPBA como agente oxidante 31

Figura 18 – Superposição dos cromatogramas após reação com modelo biomimético utilizando PhIO como agente oxidante. 32

Figura 19 – Espectros ESI-MS (A) e ESI-MS/MS (B) do metabólito putativo da CBX. 33

Figura 20 – Cromatogramas de pico base (BPC) das reações com microssomas hepáticos de ratos. A) Reação controle com padrão de CBX; B) Reação 60 minutos 37

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Fragmentação da CBX 30

Esquema 2 – Proposta1 de fragmentação do íon *m/z* 240 35

Esquema 3 – Proposta 2 de fragmentação do íon *m/z* 240 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{1}H-RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de 1H-RMN
ACN	Acetonitrila
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico, 4
BPC	Cromatograma de pico base (do inglês, *base peak chromatogram*)
CBX	Caramboxina
CD_3OD	Metanol deuterado
CEAGSP	Companhia de entrepostos e armazéns gerais de São Paulo
COSY	Espectroscopia de correlação (do inglês, *correlation spectroscopy*)
CYP	Enzimas da superfamília citocromo P450
DAD	Detector de arranjo de diodo
DIB	(diacetoxiodo)benzeno
DRC	Doença renal crônica
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês, *electrospray ionization*)
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (do inglês, *electrospray ionization/ mass spectrometry*)
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas sequencial com ionização por eletrospray (do inglês, *electrospray ionization/ tandem mass spectrometry*)
ESI-QTOF-MS	Espectrometria de massas por quadrupolo-tempo de voo sequencial com ionização por eletrospray (do inglês, *electrospray ionization/ quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry*)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HMBC	*Heteronuclear multiple bond correlation*
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)
HPLC-DAD	Cromatografia líquida com detecção de arranjo de diodo (do inglês, *liquid chromatography/ diode-array detection*)

HSQC	*Heteronuclear single quantum coherence*
IRA	Insuficiência Renal Aguda
LC-DAD-MS	Cromatografia líquida com detecção de arranjo de diodo acoplada a espectrometria de massas (do inglês, *liquid chromatography/ diode-array detection/ mass spectrometry*)
LC-ESI-QTOF- MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas por quadrupolo-tempo de voo sequencial com ionização por eletrospray (do inglês, *liquid chromatography/ electrospray ionization/ quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry*)
LC–MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (do inglês, *liquid chromatography/tandem mass spectrometry*)
m/z	Relação massa/carga
*m*CPBA	Ácido m-cloroperbenzoico
MeOH	Metanol
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina
NaOCl	Hipoclorito de sódio
Na-TFA	Ácido trifluoracético sodiado
NMDA	N-metil-D-aspartato
PhIO	Iodosilbenzeno
RMN	Ressonância magnética nuclear
SE	Status epilepticus
SNC	Sistema nervoso central
t-BuOOH	terc-butil hidroperóxido
TFA	Ácido trifluoracético
UGT	Uridina-difosfato-glucoronil transferase
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 HISTÓRICO DE INTOXICAÇÕES POR CARAMBOLA 1
1.2 NEUROTOXICIDADE DA CARAMBOXINA 3
1.3 ESTUDOS DE METABOLISMO *IN VITRO* 5
2 OBJETIVOS 8
2.1 GERAL 8
2.2 ESPECÍFICOS 8
3 MATERIAL E MÉTODOS 9
3.1 ISOLAMENTO DA CARAMBOXINA 9
3.2 ESTUDO DE METABOLISMO EMPREGANDO MODELO BIOMIMÉTICO 11
3.3 ESTUDO DE METABOLISMO EMPREGANDO MODELO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS 12
3.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE REAÇÕES DE METABOLISMO *IN VITRO* 13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 14
4.1 ISOLAMENTO DA CARAMBOXINA 14
4.2 ESTUDO DO METABOLISMO *IN VITRO* DA CARAMBOXINA EMPREGANDO MODELO BIOMIMÉTICO 31
4.3 ESTUDO DO METABOLISMO *IN VITRO* DA CARAMBOXINA EMPREGANDO MODELO MICROSSOMAL HEPÁTICO 36
5 CONCLUSÃO 38
REFERÊNCIAS 39

1 INTRODUÇÃO

A caramboleira (*Averrhoa carambola* L.), pertence à família Oxalidaceae, é originária do sudeste asiático e tem ampla distribuição mundial, especialmente em países tropicais como Índia, Malásia, Indonésia, Filipinas, Estados Unidos, Austrália e Brasil. A caramboleira pertence ao gênero *Averrhoa*, o qual contém 5 espécies – *A. bilimbi, A dolichocarpa, A. lucopetala, A. microphylla* e *A. carambola*. Entretanto, entre elas, apenas *A. carambola* é cultivada em escala comercial, possuindo 27 variedades registradas e comercializadas. Seus frutos são bastante valorizados por seu formato e aparência pouco usuais, em geral apresentam cinco saliências longitudinais e quando fatiados transversalmente apresentam o formato de estrela, podendo ser amarelados ou esverdeados, com sabor variando do azedo ao doce (ARAÚJO; MINAMI, 2001; MUTHU et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2011; PRATI et al., 2002).

A carambola é uma rica fonte de minerais e vitaminas, como magnésio, potássio, fósforo, cálcio, vitamina C e vitaminas B1 e B2. As carambolas são também uma rica fonte natural de antioxidantes como ácido gálico, β-caroteno, minerais antioxidantes (ferro, zinco e manganês) e flavonoides [(+)-catequina e (-)-epicatequina] (MUTHU et al., 2016; SHUI; LEONG, 2004). Apesar de ser utilizada na medicina popular como antitérmico, tônico digestivo, antiescorbútico, antioxidante e adstringente, assim como para o aumento da secreção salivar e para o alívio de problemas oculares, (THOMAS et al., 2008), a carambola é cultivada principalmente para fins alimentícios (MUTHU et al., 2016; PRATI et al., 2002) e, apesar de seu uso consagrado, existem relatos de intoxicação ligados ao seu consumo (CHUA et al, 2017), como apresentados a seguir.

1.1 HISTÓRICO DE INTOXICAÇÕES POR CARAMBOLA

Os efeitos tóxicos da carambola foram descritos pela primeira vez em 1980, em um trabalho experimental realizado por Muir e Lam, no qual demonstraram que a administração intraperitoneal do extrato de carambola em ratos, em doses acima de 8 g/kg, causou convulsões seguidas de morte, alguns minutos após a administração nos animais. A partir disso, sugeriu-se a presença de uma neurotoxina excitatória, mas de natureza ainda desconhecida. Em 1993, foi descrito o primeiro surto de neurotoxicidade por carambola em pacientes com doença renal crônica (DRC),

quando, após a ingestão de carambola, oito pacientes desenvolveram soluços (MARTIN et al.[1] apud OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Em 1998, Moyses-Neto, Robl e Coutinho-Netto descreveram seis casos de intoxicação por carambola como manifestações clínicas como insônia, soluços, agitação psicomotora e morte. Entre 2002 e 2014, foram publicados trabalhos mostrando que tanto pacientes com DRC submetidos a hemodiálise quanto pacientes sem necessidade de diálise apresentaram sintomas de intoxicação após ingestão de carambola (OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Há ainda, o relato de pessoas com função renal anteriormente normal, que após o consumo de carambola apresentaram sintomas de intoxicação, além de apresentarem insuficiência renal aguda (IRA). Estudos posteriores mostraram que a IRA foi provocada pela formação de cristais de oxalato, devido à alta concentração de ácido oxálico presente na carambola (ABEYSEKERA et al., 2015; FANG et al., 2008; MOYSES-NETO et al., 2009; SCARANELLO et al., 2014).

Dentre os sintomas apresentados na intoxicação por carambola, o mais comumente relatado foi o soluço, que em geral não respondia às medicações convencionais. Outros sintomas como agitação, confusão mental, vômito, convulsão e morte, decorrentes do *status epilepticus* (SE), também foram descritos. Sendo as crises convulsivas relacionadas com o mau prognóstico do paciente (GARCIA-CAIRASCO et al., 2013; MOYSES NETO et al., 1998; MOYSES NETO et al., 2003 OLIVEIRA; AGUIAR, 2015).

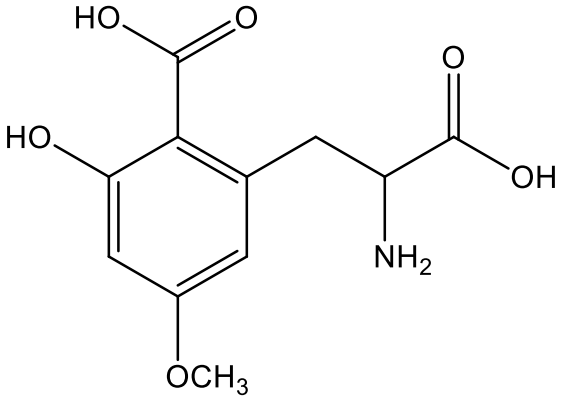
Em decorrência dos relatos acerca da intoxicação por carambola, buscou-se uma correlação entre a ingestão de carambola, neurotoxicidade e lesão renal. Para tal, utilizaram-se modelos experimentais com administração do extrato bruto ou de solução de oxalato por gavagem em ratos, demonstrando a importante contribuição do oxalato no desenvolvimento de lesão renal aguda, chegando a ser sugerido que o ácido oxálico fosse o responsável pela toxicidade da fruta (FANG et al., 2001; FANG et al., 2008; OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Contudo, Carolino e colaboradores (2005), após o isolamento de uma fração ativa do extrato de carambola e sua comparação com um padrão do ácido oxálico excluíram essa possibilidade. Somente em 2013, Garcia-Cairasco e colaboradores isolaram da carambola e caracterizaram a neurotoxina capaz de causar distúrbios neurológicos em pacientes com problemas

---

[1] Martin LC, Caramori JST, Barretti P, Soares VA. Soluço intratável desencadeado por ingestão de carambola ("Averrhoa carambola") em portadores de insuficiência renal crônica. J Bras Nefrol, v. 15, p. 92-94, 1993.

renais. A substância, que apresenta similaridades com o aminoácido fenilalanina, foi chamada pelos pesquisadores de caramboxina – CBX (Figura 1). Essa molécula apresenta potentes propriedades excitatória, convulsivante e neurodegenerativa, como foi observado no mesmo estudo. Contudo, se por um lado a substância apresenta alta toxicidade, por outro sua concentração nos frutos é extremamente reduzida, o que permite pacientes sem DRC utilizarem seus frutos na dieta de maneira segura.

Figura 1 - Estrutura química da caramboxina (CBX)



Fonte: GARCIA-CAIRASCO et al., 2013.

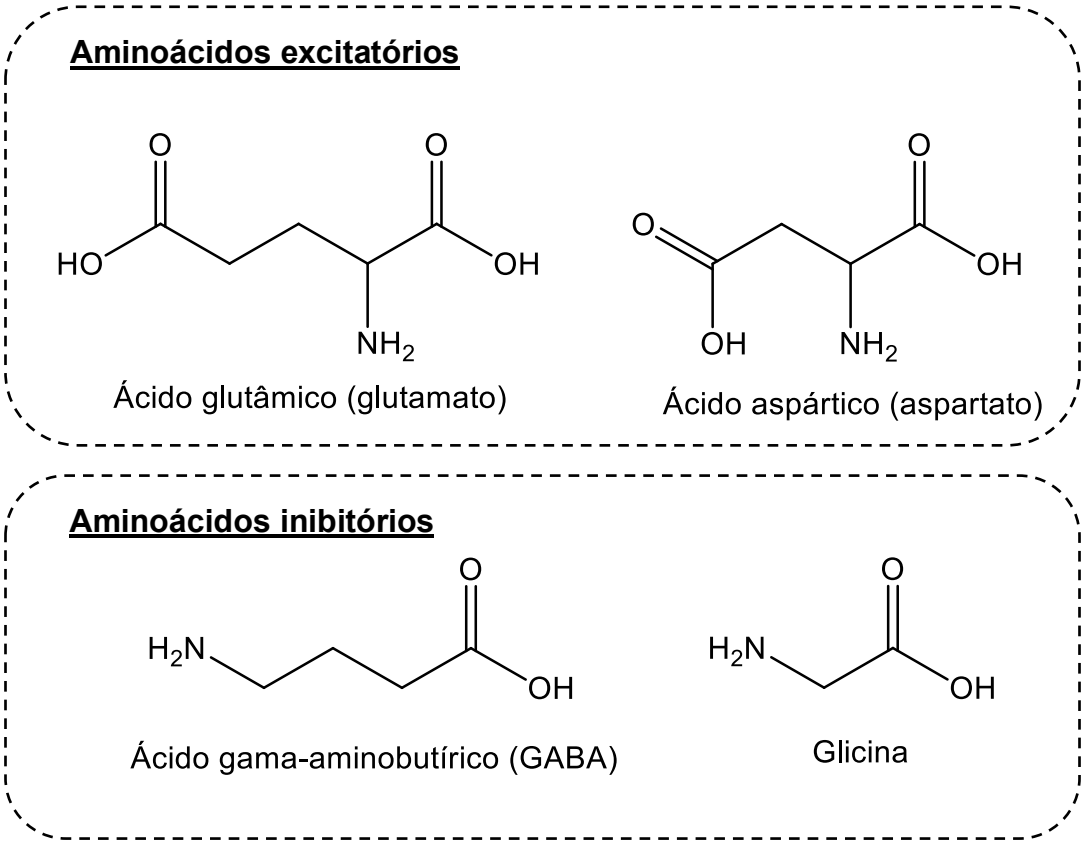
Recentemente, houve o relato de um caso de intoxicação por bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) em um paciente com DRC em hemodiálise com sintomatologia semelhante a apresentada nas intoxicações por carambola. O bilimbi pertence ao mesmo gênero que a carambola, este fato indica que a CBX ou algum análogo pode estar presente em outras espécies do gênero *Averroha* (CAETANO et al., 2017).

1.2 NEUROTOXICIDADE DA CARAMBOXINA

Neurotransmissores, tanto inibitórios quanto excitatórios, são capazes de regular diversos processos do comportamento, incluindo aprendizagem, memória, sono e sensação de dor. Alguns aminoácidos estão presentes em altas concentrações no sistema nervoso central (SNC), principalmente glutamato e ácido γ-aminobutírico (GABA), e podem alterar a descarga neuronal. Os aminoácidos dicarboxílicos, como glutamato e aspartato, produzem excitação, ao passo que os aminoácidos monocarboxílicos, como GABA e glicina, causam inibição (Figura 2). Processos patológicos como a epilepsia e a neurotoxicidade podem ter como causa alterações de neurotransmissores excitatórios e inibitórios. A base molecular desses

processos é constituída pelas interações, no SNC, entre os canais iônicos, os receptores que regulam esses canais e os neurotransmissores de aminoácidos (FORMAN et al., 2009; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015) .

Figura 2 – Principais aminoácidos neurotransmissores excitatórios e inibitórios



Fonte: HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015.

Estudos apontam que a CBX atua inibindo discretamente a captação de glutamato pelos transportadores presentes nos astrócitos adjacentes à sinapse, além de alterar a ligação de GABA aos seus receptores, inibindo especificamente o sistema de condução GABAérgico. A CBX também atua sobre o ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico (AMPA) e o N-metil-D-aspartato (NMDA), principais receptores glutamatérgicos do mecanismo da excitotoxicidade neuronal, sendo capaz de ativá-los (CAROLINO et al., 2005; GARCIA-CAIRASCO et al., 2013). A ativação do receptor AMPA facilita a despolarização neuronal, o que favorece a entrada de íons cálcio no neurônio pós-sináptico tanto pela atuação do glutamato no receptor NMDA como por canais específicos. O excesso de glutamato na fenda sináptica ocasiona uma superestimulação de seus receptores e a consequente entrada excessiva de íons cálcio no terminal pós-sináptico, a qual ativa

os mecanismos intracelulares de excitotoxicidade, que levam a morte celular (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015; OLIVEIRA; AGUIAR, 2015).

Quando o íon cálcio está presente em elevadas concentrações no espaço intracelular promove a ativação de uma série de enzimas, como fosfolipases, endonucleases, proteases e óxido-nítrico sintetase, que no decorrer de uma atividade epiléptica prolongada determinam o desacoplamento da fosforilação oxidativa – lesão direta ao esqueleto celular –, somado a formação de radicais livres, os quais aceleram esse processo. Com a lesão do neurônio há a liberação de mais glutamato para o espaço extracelular, levando a lesão dos neurônios vizinhos (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015; OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Estes mecanismos podem explicar a relevância da CBX no desenvolvimento e evolução dos quadros de intoxicação pela ingestão de carambola.

1.3 ESTUDOS DE METABOLISMO *IN VITRO*

Após o processo de absorção, substâncias tidas como exógenas ao organismo – fármacos, toxinas, contaminantes ambientais e outras substâncias – passam por biotransformações, levando à formação de metabólitos de maior polaridade, e visando sua eliminação através da urina ou outros fluidos biológicos. Este mecanismo tem papel importante na cinética de compostos químicos absorvidos pelo organismo, seja para sua excreção ou para sua ativação (MOHUTSKY et al., 2008).

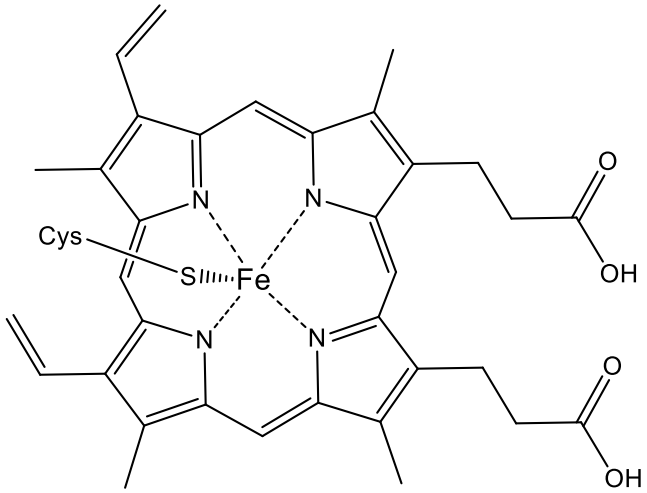
O metabolismo compreende processos catalisados por enzimas, podendo ser dividido em duas fases, responsáveis por diferentes reações: reações de fase I – oxidação, redução e hidrólise – e reações de fase II – conjugação de grupos polares diretamente ao composto absorvido ou a um produto de reações de fase I. Estudos de metabolismo *in vitro* podem fornecer dados sobre as vias metabólicas de fase I e fase II, os sítios moleculares mais vulneráveis à metabolização, os metabólitos que poderão ser formados *in vivo*, a toxicidade dos metabólitos formados e os efeitos da inibição e/ou indução enzimática no metabolismo (COLEMAN[2], 2010 apud FERNANDES, 2013; NASSAR; TALAAT, 2004; MOREIRA et al., 2017).

A oxidação é uma relevante rota da fase I do metabolismo de xenobióticos e moléculas endógenas, catalisada geralmente por enzimas da superfamília citocromo

[2] COLEMAN, M. Human drug metabolism: an introduction. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2010.

P450 (CYP). As CYP são classificadas como monooxigenases por transferir apenas um átomo do oxigênio elementar para um substrato enquanto outro átomo de oxigênio é reduzido à água. O centro ativo das CYP contém um resíduo de ferroprotoporfirina IX com um resíduo de cisteína presente no quinto ligante e o sexto ligante livre, o qual servirá como sítio para o oxigênio molecular (Figura 3) (LOHMANN; KARST, 2008).

Figura 3 - Protoporfirina IX, o sítio ativo do citocromo P450.



Fonte: LOHMANN; KARST, 2008

A partir do conhecimento disponível acerca da família de enzimas CYP, foram desenvolvidos modelos com a intenção de reproduzir *in vitro* as reações de biotransformação ocorridas no organismo. A utilização de metaloporfirinas como métodos biomiméticos se justifica pela presença do grupo heme em sua estrutura, que também é encontrado nas enzimas CYP e atua como grupo prostético na catálise das reações. Como no centro ativo das CYP é observada a presença de ferro, para o desenvolvimento de um modelo biomimético utilizando metaloporfirinas também é necessário a presença de um catalisador porfirínico que contenha um metal, podendo ser ferro, manganês ou rutênio. Outro componente que será necessário ao modelo é um doador de oxigênio, como o hipoclorito de sódio (NaOCl), o iodosilbenzeno (PhIO), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o terc-butil hidroperóxido (*t*-BuOOH) e ácido m-cloroperbenzoico (*m*CPBA) (FERNANDES, 2013; LOHMANN; KARST, 2008).

Uma alternativa para o estudo *in vitro* do perfil metabólico de xenobióticos são os microssomas hepáticos, utilizados para determinar de forma qualitativa a identidade do metabólito e obter informações sobre a estabilidade metabólica. Este

modelo é o mais empregado para avaliação de reações de oxidação na fase I e de conjugações na fase II (enzimas do CYP e do sistema UGT – uridina-difosfato-glucoronil transferase –, respectivamente). O modelo microssomal possibilita observar a influência de isoenzimas específicas frente a inibidores específicos. Microssomas hepáticos são uma fração sub-celular do retículo endoplasmático liso e podem ser obtidos através de centrifugação diferencial. Para suprir a demanda energética do CYP, faz-se necessário o emprego do sistema NADPH (Fosfato de dinucleotídeo de nicotina e adenina). Este modelo tem como vantagens o baixo custo e a simplicidade de uso, sendo um dos modelos mais bem caracterizados e que possibilita a avaliação da variação interindividual, além de manter a atividade enzimática quando armazenada em temperaturas inferiores a -70 °C por longo período (BRANDON et al., 2003; MARQUES, 2013; PIGATTO, 2011).

Neste contexto, diversos modelos experimentais de epilepsia utilizam-se da injeção de substâncias neuroativas, seja de forma sistêmica ou local, para produzir *status epilepticus* (SE) (DIVINEY et al., 2015; IVANOVA et al., 2015; JAGIRDAR et al., 2015; Turski et al., 1986). Esses modelos buscam estudar os mecanismos ligados ao aparecimento do SE. Uma vez que a caramboxina foi descrita como uma substância capaz de induzir o SE, estudos mais detalhados sobre sua farmacocinética e metabolismo podem contribuir para sua possível utilização em modelos experimentais de epilepsia e entender qual a contribuição de seus possíveis metabólitos na neurotoxidade. Além disso, mesmo com a caracterização estrutural da caramboxina e o apontamento da ação de antagonismo em receptores ionotrópicos GABAérgico e glutamatérgico com propriedades excitatória, convulsivante e neurodegenerativa (GARCIA-CAIRASCO et al., 2013), ainda merece ser investigado com maiores detalhes, uma vez que existe uma lacuna relacionada a estudos que indiquem o possível metabolismo desta neurotoxina para uma melhor compressão do seu comportamento no organismo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar o metabolismo *in vitro* da caramboxina, utilizando microssomas hepáticos e modelo de oxidação biomimética.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia de isolamento em maior escala da caramboxina, a partir do fruto da *Averrhoa carambola*, visando alcançar quantidade suficiente para o estudo de metabolismo;
- Analisar o metabolismo *in vitro* da caramboxina aplicando modelo com microssomas hepáticos de ratos;
- Analisar o metabolismo *in vitro* da caramboxina aplicando modelo de oxidação biomimética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DA CARAMBOXINA

Para o preparo do extrato metanólico, as carambolas foram adquiridas comercialmente na Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGSP) da cidade Ribeirão Preto – SP. As carambolas foram lavadas e pesadas, o extrato metanólico foi preparado numa proporção de 1:1 (m/v). Nesta etapa foram realizadas quatro extrações sucessivas utilizando em cada uma delas ¼ do volume total do solvente extrator. A clarificação do extrato foi realizada em algumas etapas, sendo que, na primeira foi utilizada uma peneira fina para retirada da maior parte das fibras, presentes em grande quantidade na carambola; logo após seguiram-se duas etapas de filtração, uma em algodão e outra em papel de filtro. O extrato foi levado ao evaporador rotativo para redução do seu volume e posteriormente foi adicionado metanol (MeOH), numa proporção mínima de 6:1 (MeOH/extrato). Essa solução foi levada ao *freezer*, onde permaneceu pelo tempo mínimo de 8 horas, até a formação de um precipitado. Após, a solução foi filtrada em filtro de papel e novamente levada ao evaporador rotativo.

Outras metodologias de separação como análise direta em coluna aberta de sílica e isolamento do extrato bruto em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram testadas, mas em nenhuma dessas foi possível um aumento de escala. Portanto, após a secagem, que forneceu um extrato fluido com aproximadamente 42% de resíduo seco, optou-se por aplicar o extrato em cromatografia em coluna de filtração em gel de Sephadex LH-20 (3,5 x 41 cm) eluída com metanol. As frações nas quais a caramboxina (CBX) estava presente foram reunidas e secas.

A fração enriquecida, obtida a partir do fracionamento com sephadex LH-20, foi purificada em um sistema de HPLC da Shimadzu (Quioto, Japão) modelo LC-20AD, degaseificador DGU-20A, autoinjetor SIL-20AHT, detector de arranjo diodo SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de comunicação CBM-20A, utilizando coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,01% e acetonitrila (ACN) com eluição por gradiente, variando a porcentagem de acetonitrila de 5% a 15% no período de 18 minutos, seguida de uma variação de 15% a 100%

no período de 18 a 20 minutos, mantendo-se em 100% até 25 minutos e em seguida voltando a 5% em 27 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 50 µL. O detector de arranjo de diodo (DAD) foi operado em modo *fullscan* nos comprimentos de onda de 190 a 400 nm. O pico cromatográfico com máximos de absorção de 212, 256 e 297, correspondente a CBX, foi coletado e aplicado em um cartucho com Sephadex LH-20 (0,8 x 2,7 cm), em seguida foi eluído uma vez com H_2O – para retirar o excesso de TFA da fase móvel – e depois com MeOH. As frações metanólicas foram secas e armazenadas em *freezer*. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de CBX em quantidade suficiente para realização dos ensaios de caracterização e de metabolismo *in vitro*.

Para o monitoramento da caramboxina no extrato e nas frações purificadas foram realizadas análises em um sistema de LC–MS/MS da Shimadzu (Quioto, Japão) modelo LC-20AD, degaseificador DGU-20A, autoinjetor SIL-20AHT, detector de arranjo diodo SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de comunicação CBM-20A, acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (ESI), operado no modo positivo de ionização, e analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo microTOF II (ESI-QTOF-MS) Bruker Daltonics (Massachusetts, EUA). Foi utilizada coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel foi composta por solução aquosa de TFA 0,01% e acetonitrila com eluição por gradiente, variando a porcentagem de acetonitrila de 5% a 30% no período de 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% no período de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30 µL. Nitrogênio foi empregado como gás de nebulização com temperatura de secagem de 220 °C, vazão de 10 L min^{-1} e pressão de 5,5 bar. A tensão do capilar foi de 3,5 kV. Para calibração interna foi utilizado solução de ácido trifluoracético sodiado (Na-TFA), na concentração de 10 mg/mL. Para a aquisição dados foi empregado o software Bruker Daltonics otofControl e para análise dos dados o software Bruker Compass DataAnalysis 4.3 (Bremen, Alemanha).

As análises por infusão direta (ESI-MS/MS) foram realizadas em um espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (ESI), operado no modo positivo de ionização, e analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo microTOF II

(ESI-QTOF-MS) Bruker Daltonics (Massachusetts, EUA). Nitrogênio foi empregado como gás de nebulização com temperatura de secagem de 180 °C, vazão de 4 L min^{-1} e pressão de 0,4 bar. A tensão do capilar foi de 3,5 kV. Para a fragmentação de íons foi usado nitrogênio como gás de colisão. Para calibração interna foi utilizado solução de ácido trifluoracético sodiado (Na-TFA), na concentração de 10 mg/mL.

Conforme descrito por Garcia-Cairasco e colaboradores (2013) a caramboxina (CBX) em sua forma protonada $[M+H]^+$ corresponde ao íon *m/z* 256 a partir do qual podem ser formados os íons *m/z* 238 – eliminação de H_2O – e *m/z* 212 – eliminação de CO_2, além do íon *m/z* 192 resultante da eliminação de CH_2O_2 a partir do fragmento *m/z* 238 e do íon *m/z* 166 resultante da eliminação de CH_2O_2 a partir do fragmento *m/z* 212. Este perfil de fragmentação foi o principal critério para confirmação da presença da CBX no extrato e para a seleção das frações que seguiriam para a etapa seguinte de purificação em HPLC.

3.2 ESTUDO DE METABOLISMO EMPREGANDO MODELO BIOMIMÉTICO

Foram testados dois tipos de agentes oxidantes: o iodosilbenzeno (PhIO) previamente sintetizado e o ácido *meta*cloroperbenzóico (*m*CPBA), empregando o catalizador de Jacobsen [cloreto de (S,S)-(+)-N,N'-bis(3,5-di-tert-butilsalicilideno)-1,2-ciclohexanodiaminomanganês(III)]. Foi utilizado MeOH grau HPLC como meio reacional.

As reações foram realizadas em microtubo cônico do tipo eppendorf de 1,5 mL. O catalisador de Jacobsen (0,05 µmol) foi dissolvido em MeOH para um volume total de 200 µL, e o agente oxidante PhIO ou *m*CPBA (1,5 µmol) foi adicionado em seguida. Por fim, o substrato CBX (1,5 µmol) foi adicionado ao meio. Tanto a CBX quanto os agentes oxidantes foram previamente dissolvidos em MeOH numa concentração de 1 mg/mL. A mistura foi mantida em temperatura ambiente na ausência de luz por diferentes períodos (Tabela 1). Amostras controles na ausência de agente oxidante ou de substrato foram submetidas às mesmas condições e analisadas.

Tabela 1 – Tempos de reação do modelo biomimético

Tempo de reação	Duração (minutos)
T_0	0
T_1	50
T_2	150
T_3	250
T_4	350
T_5	450

3.3 ESTUDO DE METABOLISMO EMPREGANDO MODELO O MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS

As reações de metabolismo em modelo microssomal hepático de ratos foram realizadas em colaboração com o Professor Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, no Laboratório de Metabolismo e Técnicas de Separação (LAB-METS), da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP).

Para a observação da formação de metabólitos da CBX com microssomas hepático de ratos utilizou-se a concentração de 200 µg mL^{-1} do substrato no meio de incubação. Duas alíquotas de 40 µL da solução padrão de CBX solubilizada em MeOH foram transferidas para microtubo cônico do tipo eppendorf de 1,5 mL, logo após o MeOH foi evaporado sob fluxo de nitrogênio. A seguir, foram adicionados 110 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 e 50 µL do sistema de regeneração de NADPH (fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina), contendo $NADP^+$ 0,25 mM, glicose-6-fosfato 5 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase. Após 5 minutos de incubação a 37 °C foram adicionados 40 µL da fração microssomal (concentração proteica de 1 mg mL^{-1}). Transcorrido 30 e 60 minutos de incubação, respectivamente, 200 µL de MeOH foram adicionados para interromper a reação enzimática e extrair a CBX do meio microssomal. Em paralelo, foi preparado um controle sem a presença do cofator NADPH e 200 µL de meio microssomal na ausência de CBX, processado sob as mesmas condições, para verificar a presença de interferentes da matriz.

As amostras foram submetidas ao procedimento de extração, no qual foram agitadas utilizando agitador para tubos durante 1 min e depois centrifugadas a 10000 rpm, durante 10 min a 4 °C, para separar as proteínas microssomais. O

sobrenadante foi coletado e transferido para microtubo cônico do tipo eppendorf de 1,5 mL, que foi prontamente evaporado sob fluxo de nitrogênio. Os resíduos foram solubilizados em 100 µL de MeOH e analisado por LC-MS/MS.

3.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE REAÇÕES DE METABOLISMO *IN VITRO*

As análises das amostras provindas de reações tanto do modelo biomimético quanto do modelo microssomal hepático foram realizadas em um sistema de LC–MS/MS da Shimadzu (Quioto, Japão) modelo LC-20AD, degaseificador DGU-20A, autoinjetor SIL-20AHT, detector de arranjo diodo SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de comunicação CBM-20A, acoplado a um espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo microTOF II (ESI-QTOF-MS) Bruker Daltonics (Massachusetts, EUA). Foi utilizada coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel foi composta por solução aquosa de TFA 0,01% e acetonitrila com eluição por gradiente, variando a porcentagem de acetonitrila de 5% a 30% no período de 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% no período de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30 µL. Nitrogênio foi empregado como gás de nebulização com temperatura de secagem de 220 °C, vazão de 10 L min^{-1} e pressão de 5,5 bar. A tensão do capilar de 3,5 kV. Para calibração interna foi utilizado solução de ácido trifluoracético sodiado (Na-TFA), na concentração de 10 mg/mL. Para a aquisição dados foi empregado o software Bruker Daltonics otofControl e para análise dos dados o software Bruker Compass DataAnalysis 4.3 (Bremen, Alemanha).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

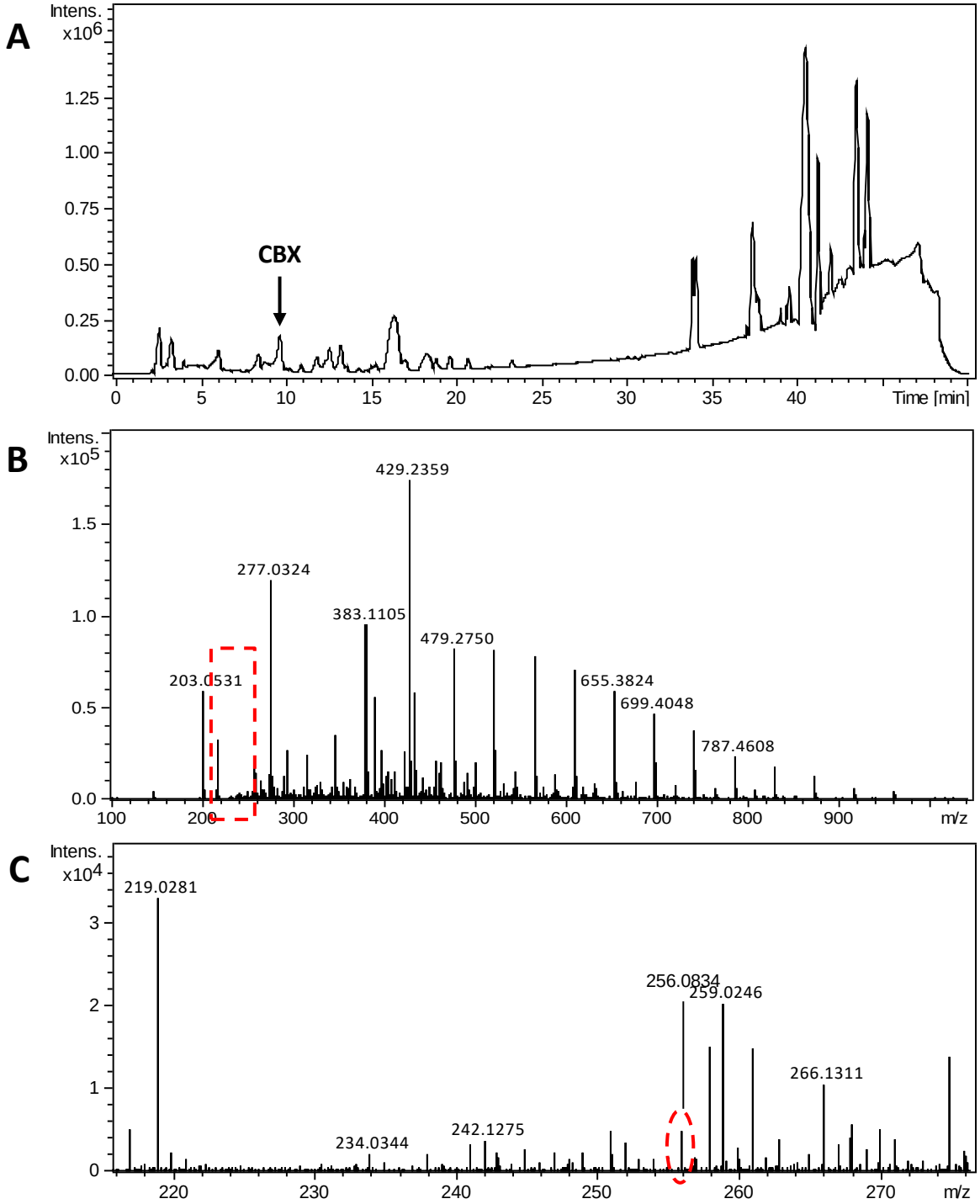
4.1 ISOLAMENTO DA CARAMBOXINA

Alguns trabalhos presentes na literatura apresentaram métodos que resultaram em frações enriquecidas (CAROLINO et al., 2005), ou até mesmo no isolamento da CBX (GARCIA-CAIRASCO et al., 2013), utilizando animais para o monitoramento da fração ativa – técnica conhecida como isolamento bioguiado. Entretanto, até então não se conhecia a substância responsável pela toxicidade da carambola. Uma vez que a substância – CBX – foi descrita, não se existe mais a necessidade de fazer isolamento bioguiado e outras possibilidades de trabalho devem apresentadas. Sendo assim, como alternativa, neste estudo, utilizou-se a espectrometria de massas – acoplada ou não a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência – para o monitoramento da presença da CBX, tanto para o isolamento quanto para os estudos de metabolismo *in vitro*. Essa abordagem além de atender de forma mais completa as exigências do uso racional de animais, também permite a otimização de escala e um maior rendimento das frações, pois utiliza quantidades reduzidas de material para o monitoramento e soluciona a ausência de padrões de referência da CBX .

Cabe ainda destacar que o grande desafio da etapa de isolamento foi obter a caramboxina em quantidade suficiente para realização dos ensaios, uma vez que trata-se de um metabólito secundário que ocorre em baixas concentrações em sua fonte natural. Em geral, o isolamento de metabólitos secundários minoritários demanda um longo período de trabalho, dependo de fatores como a complexidade do material vegetal, as classes químicas dos compostos presentes, as características físico-químicas da molécula de interesse e dos demais componentes, além dos efeitos sazonais e circadianos que podem afetar significativamente a sua concentração (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Como é possível observar na Figura 4, a CBX é uma molécula que está presente em baixa concentração no extrato de carambola, além de apresentar uma baixa estabilidade podendo se converter facilmente ao análogo lactâmico que é inativo. Estes fatores foram pontos críticos para o desenvolvimento de um novo protocolo de isolamento em maior escala permitindo o desenvolvimento do estudo de metabolismo *in vitro*.

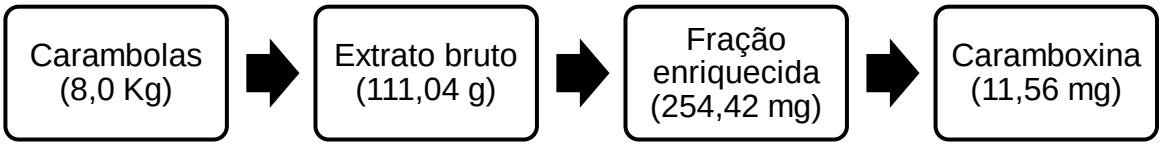
Figura 4 – Cromatograma LC-MS e espectros ESI-MS do extrato bruto de carambola. A) Cromatograma de pico base (BPC) com destaque para o sinal referente à CBX; B) Espectro ESI-MS *fullscan* com destaque em região onde a CBX está presente; C) Ampliação de B com destaque para o sinal referente à CBX.



Cromatograma (A): Coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel composta por solução aquosa de TFA 0,01% e ACN com eluição por gradiente, variando a porcentagem de ACN de 5% a 30% em 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30 µL.

Garcia-Cairasco e colaboradores (2013) foram os primeiros a apresentar um método para o isolamento da CBX, pelo qual obtiveram 2,5 mg de CBX a partir de 10 Kg de carambola, o que pode ser considerado um rendimento muito baixo para a utilização da substância isolada em outros ensaios além da caracterização. Pensando nisso, as diversas etapas do método utilizado por Garcia-Cairasco e colaboradores (2013) foram reavaliadas, buscando aumentar o rendimento do processo. Desta forma, após uma série de testes com variações das técnicas, foi desenvolvido um novo método de isolamento, o qual resultou num rendimento maior que o método descrito na literatura (Figura 5).

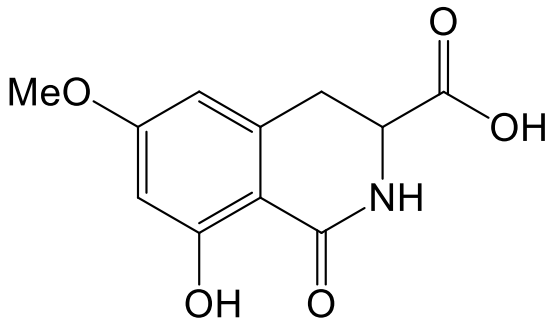
Figura 5 - Fluxograma do rendimento em massa por etapa do isolamento da CBX



Inicialmente, foi realizada uma análise do extrato em espectrômetro de massas de alta resolução por infusão direta visando confirmar a presença da caramboxina, uma vez que alguns cultivares não produzem a toxina. Além disso, fatores bióticos e abióticos podem influenciar na biossíntese de metabólitos secundários (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PAVARINI et al., 2012; GOBBO-NETO et al., 2017), podendo haver caramboleiras que não produzem CBX em quantidade suficiente para viabilizar o isolamento. Desta forma, por espectrometria de massas, buscou-se a presença do íon de *m/z* 256,0816 no espectro total. Sendo observada a fórmula molecular correspondente a $[C_{11}H_{13}NO_6 + H]^+$ com erro de 1,4 ppm. Soma-se a essa observação o perfil de fragmentação após a ativação colisional (critérios descritos no item 3.1), indicando a presença da CBX neste extrato.

Uma das principais mudanças realizadas, em relação ao método anteriormente utilizado, foi a mudança do solvente extrator e da proporção em que este foi utilizado. Apesar da água ser um bom extrator da CBX, esta molécula degrada quando mantida em solução aquosa em temperatura ambiente, formando um análogo de anel fechado do tipo lactama (Figura 6) e torna-se inativa. Ademais, aumentamos tanto o volume quanto a quantidade de extrações, pois percebemos que apenas uma extração, como descrito na literatura, não seria suficiente para extrair toda a CBX presente na carambola (GARCIA-CAIRASCO et al., 2013).

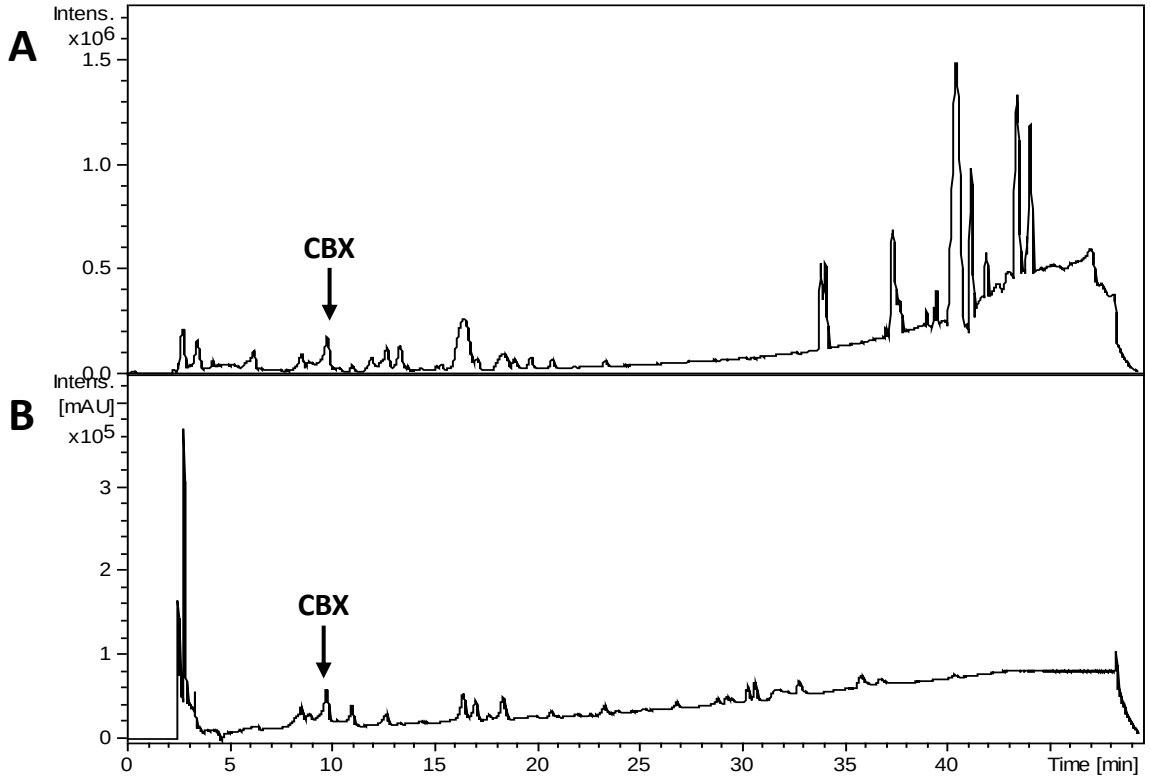
Figura 6 - Estrutura da lactama, produto da degradação da caramboxina (inativo).



Fonte: GARCIA-CAIRASCO et al.,

Para uma melhor compreensão da composição do extrato de carambola, este foi analisado por LC-DAD-MS, obtendo-se com isso um perfil cromatográfico (Figura 7). Esta análise mostrou a complexidade do extrato bruto e destacou a necessidade de etapas adicionais de purificação.

Figura 7 - Cromatogramas do extrato de carambola. A) Cromatograma de pico base (BPC); B) Cromatograma com detecção UV-Vis (Ultravioleta-Visível).



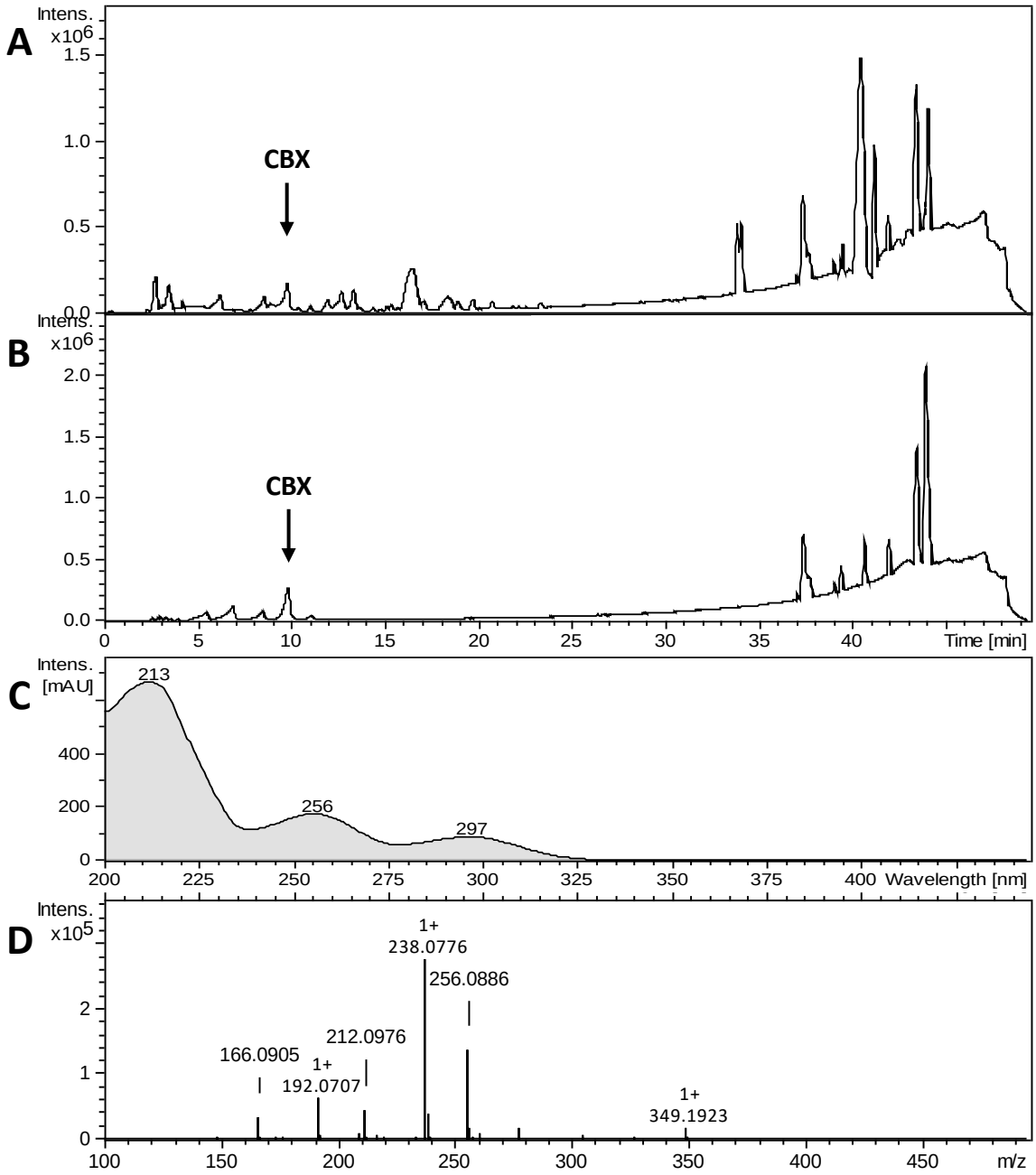
Coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel composta por solução aquosa de TFA 0,01% e ACN com eluição por gradiente, variando a porcentagem de ACN de 5% a 30% em 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30 µL.

Devido à grande quantidade de amostra, inicialmente optou-se pela cromatografia em coluna aberta de vidro, porém com a grande variedade de fases estacionárias disponíveis, para definir qual a mais adequada para o fracionamento do extrato. Esse etapa exigiu uma análise detalhada dos dados disponíveis e a cada etapa tornou-se necessário uma reavaliação para confirmar sua viabilidade. Inicialmente, para isso, realizamos uma revisão no método descrito por Garcia-Cairasco e colaboradores (2013) que utilizaram cromatografia de troca iônica para obter uma fração enriquecida de CBX. Este tipo de cromatografia utiliza resina de troca iônica (catiônica ou aniônica) como fase estacionária e solução tampão como fase móvel, que é compatível com o método bioguiado de isolamento. Contudo a utilização de soluções tampão em espectrometria de massas é restrita a alguns poucos tampões voláteis e em baixas concentrações (MANNUR et al., 2011).

Outro tipo de fase estacionária comumente utilizada é a sílica gel (SiO_2), porém a presença dos grupos silanois favorecem a lactamização da CBX, gerando o produto de degradação mostrado na Figura 5. Além disso, a sílica gel pode reter demasiadamente compostos mais polares como a caramboxina, não sendo possível recuperar todo o material aplicado, o que implica em uma perda de rendimento (COLLINS et al., 2009). Após um teste inicial, a baixa concentração da caramboxina na matriz vegetal, confirmou ser este um processo não viável. Assim, optamos por não utilizar nenhuma das estratégias citadas acima.

Devido à presença de muitos açúcares e substâncias polares de maior massa molecular, optou-se por iniciar o processo com cromatografia por exclusão de tamanho, em coluna aberta de vidro contendo sephadex LH-20. Essa metodologia permitiu obtenção de frações enriquecidas do íon *m/z* 256, referente à CBX, com número de sinais cromatográficos bem menor quando comparado ao extrato bruto (Figura 8). Esse resultado nos indicou estarmos no caminho correto e optamos por utilizar esta fase estacionária (sephadex LH-20) em modelos de coluna aberta, cabendo posteriormente apenas a adequação do fluxo.

Figura 8 – Cromatogramas do extrato bruto e da fração enriquecida, e espectros UV e MS. A) Cromatograma de pico base (BPC) do extrato bruto de carambola; B) BPC da fração enriquecida com sephadex LH-20; C) Espectro de ultravioleta (UV) da CBX; D) Espectro de massas (ESI-MS) da CBX.

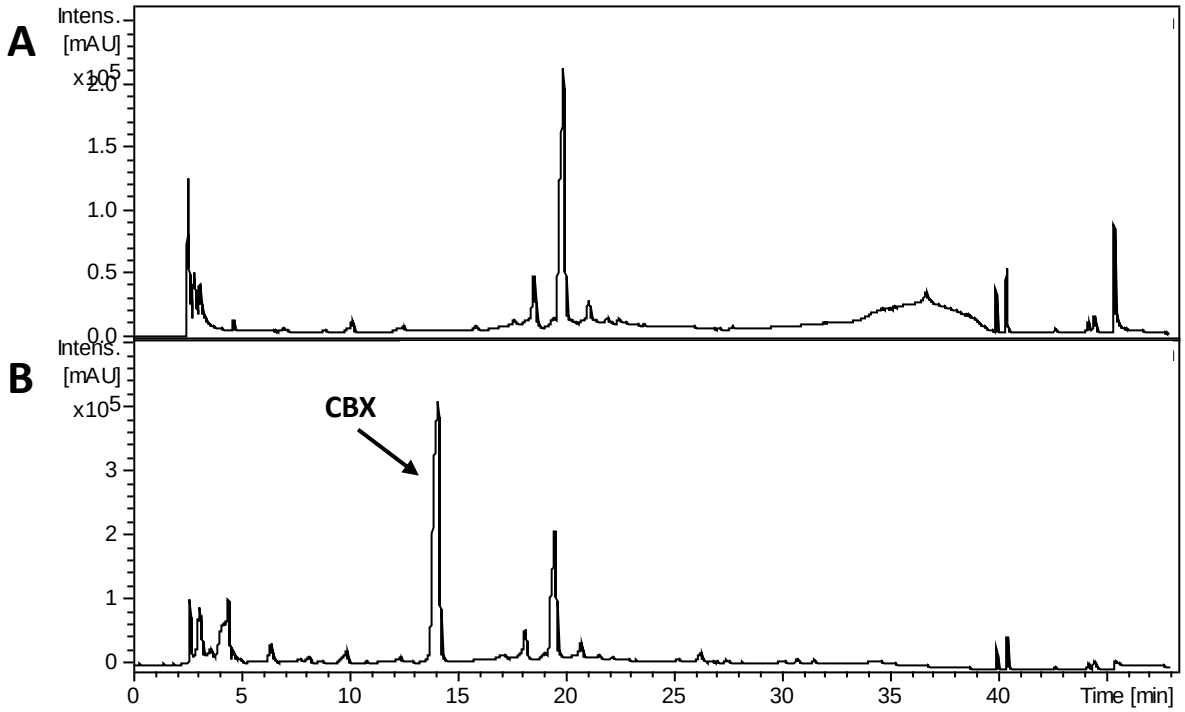


Cromatogramas A e B: Coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel composta por solução aquosa de TFA 0,01% e ACN com eluição por gradiente, variando a porcentagem de ACN de 5% a 30% em 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30 µL .

No que se refere às análises e as etapas de purificação, é importante ressaltar que o sinal cromatográfico referente à CBX foi observado no espectro na região do UV somente quando o ácido trifluoracético (TFA) foi adicionado à fase

móvel (Figura 9). O fato foi observado ao avaliar a retirada do ácido da fase móvel em uma etapa seguinte de purificação por HPLC-DAD, uma vez que a presença do ácido pode causar degradação na molécula de interesse na etapa de concentração e secagem da amostra. Além disso, a adição de TFA também promoveu mudanças no tempo de retenção e melhorou a ionização no espectro de massas.

Figura 9 - Cromatogramas ultravioleta (UV) de fração enriquecida. A) Cromatograma UV sem adição de TFA na fase móvel; B) Cromatograma UV com adição de TFA na fase móvel.



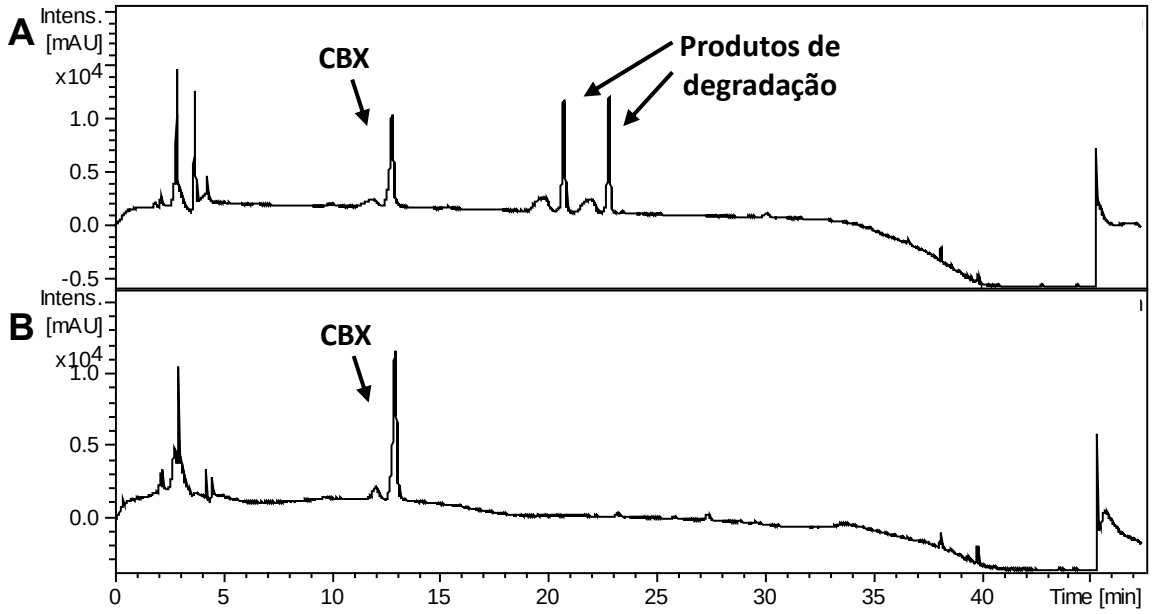
Coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel composta por solução aquosa de TFA 0,01% e ACN com eluição por gradiente, variando a porcentagem de ACN de 5% a 30% em 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30 µL.

As mudanças observadas, no cromatograma obtido por HPLC-(UV)DAD, proporcionadas pela adição de TFA na fase móvel são justificadas por alguns fenômenos que podem ocorrer de forma conjunta ou separadamente. Primeiramente, o deslocamento batocrômico, que é caracterizado pelo deslocamento da banda de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) em direção ao vermelho. Alguns estudos demonstram que a presença do TFA na fase móvel pode aumentar a absorção da radiação UV em baixos comprimentos de onda (SANTOS-NETO, 2011; SIMAS, 2005; STOCK, 2014; ZHANG *et al*., 2013). Além disso, pode ter ocorrido formação de par iônico entre o TFA e a CBX, uma vez que a adição do

TFA na fase móvel leva a diminuição do pH e também favorece a protonação do da CBX. Mesmo não sendo o principal aditivo utilizado em cromatografia de par iônico, alguns trabalhos relatam o uso do TFA como uma alternativa a este tipo de cromatografia (CECCHI, 2007, 2008). Essa protonação permite, portanto, observarmos a substância em sua forma neutra, pois a presença de dois grupamentos ácido carboxílico favorece a forma do carboxilato que confere a substância uma polaridade muito superior, levando a uma grande modificação de sua retenção na fase estacionária.

Portanto, após essa confirmação, a fração enriquecida, obtida a partir do fracionamento com sephadex LH-20, foi analisada por HPLC-DAD, como descrito acima, onde foi realizada a coleta do sinal cromatográfico referente à CBX. Contudo, após secagem do material coletado e uma nova injeção, para averiguar a pureza cromatográfica, no sistema de HPLC-DAD, notou-se a presença de outros sinais cromatográficos referentes à degradação da CBX (Figura 10), como discutido anteriormente. Sendo assim, o problema foi solucionado aplicando-se o volume coletado em uma pequena coluna de sephadex LH-20, para retirada do TFA presente na fase móvel, antes do processo de secagem.

Figura 10 – Cromatograma UV da CBX após secagem em presença (A) e ausência (B) de TFA



Coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel composta por solução aquosa de TFA 0,01% e ACN com eluição por gradiente, variando a porcentagem de ACN de 5% a 30% em 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30

Para a elucidação e confirmação da estrutura da substância isolada, foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear (RMN), onde foram obtidos os sinais em experimento de ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD): δ 6,37 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-4), 6,29 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-2), 4,17 (dd, J = 5,4, 9,5 Hz, 1H, H-8), 3,81 (dd, J = 5,4, 13,4, 1H, H-7A), 3,72 (s, 3H), 3,01 (dd, J = 9,5, 13,3, 1H, H-7B). HMBC (500 MHz, CD_3OD): H-11 → C-3.

O espectro ^{1}H-RMN apresentou dois sinais em δ 6,37 (H-4) e 6,29 (H-2) com constante de acoplamento (2,4 Hz) referente ao acoplamento aromático na posição meta, que é um padrão comum de anel aromático tetra-substituído. A presença dos sinais δ 4,17 (H-8), 3,81 (H-7A) e 3,01 (H-7B) e suas constantes de acoplamento foram importantes para confirmar a integridade da cadeia lateral, na porção do ácido aminado. O espectro COSY ajudou a confirmar os dados obtidos no ^{1}H-RMN mostrando o acoplamento de H-8, H-7A e H-7B. Outro sinal visto no ^{1}H-RMN foi de δ 3,72 referente aos hidrogênios da metoxila (H-11). Comparando-se os dados obtidos com os apresentados por Garcia-Cairasco e colaboradores (2013), pôde-se atribuir o deslocamento dos carbonos de forma indireta pelo HSQC e HMBC: δ 163,74 (C, C-3), 111,75 (CH, C-2), 100,24 (CH, C-4), 54,72 (CH_3, C-11), 53,48 (CH, C-8), 36,79 (CH_2, C-7) (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15).

Figura 11 – Espectro de ^{1}H da CBX (Solvente CD_3OD, 500 MHz).

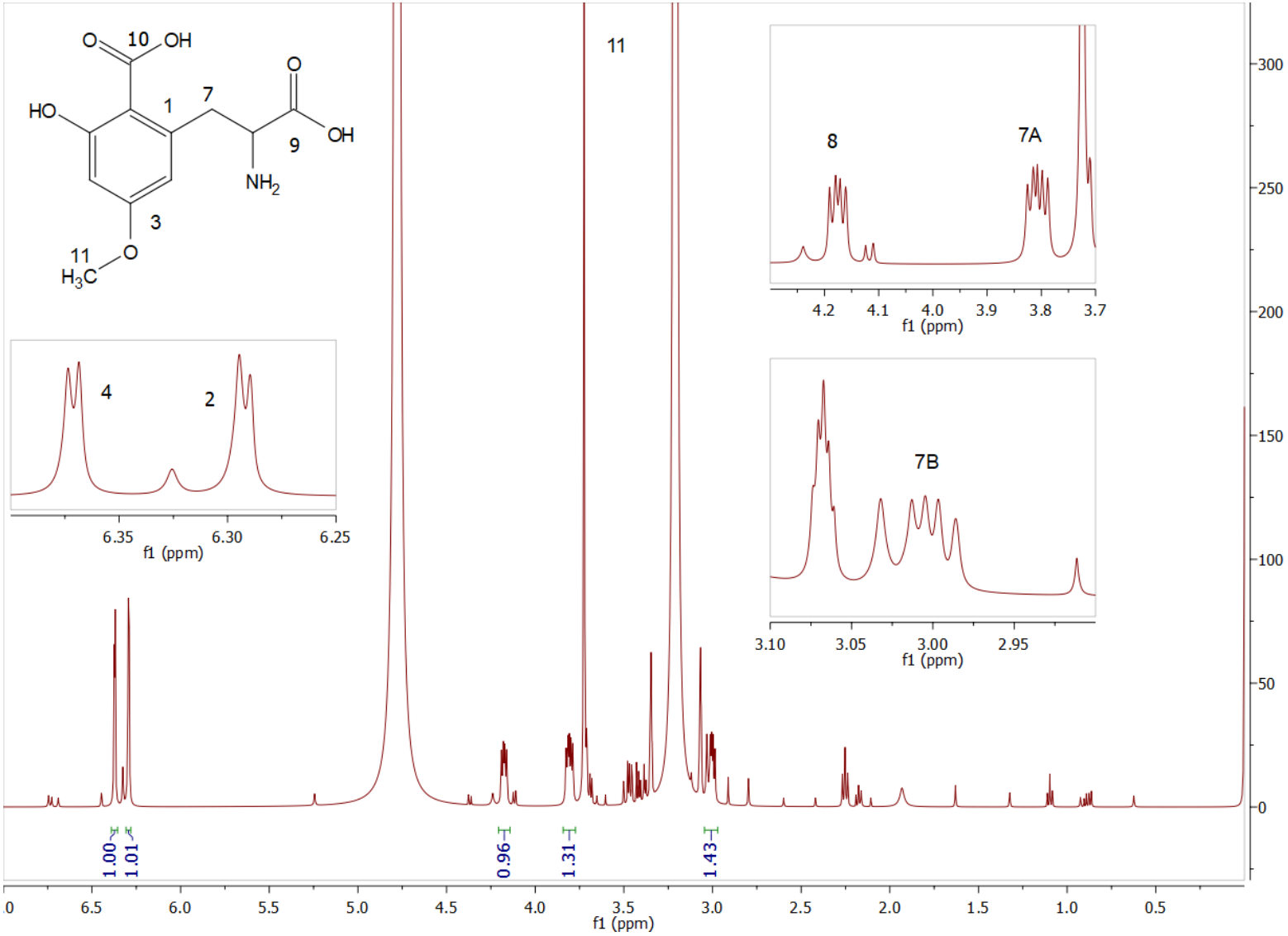


Figura 12 - Espectro COSY da CBX (Solvente CD_3OD, 300 MHz).

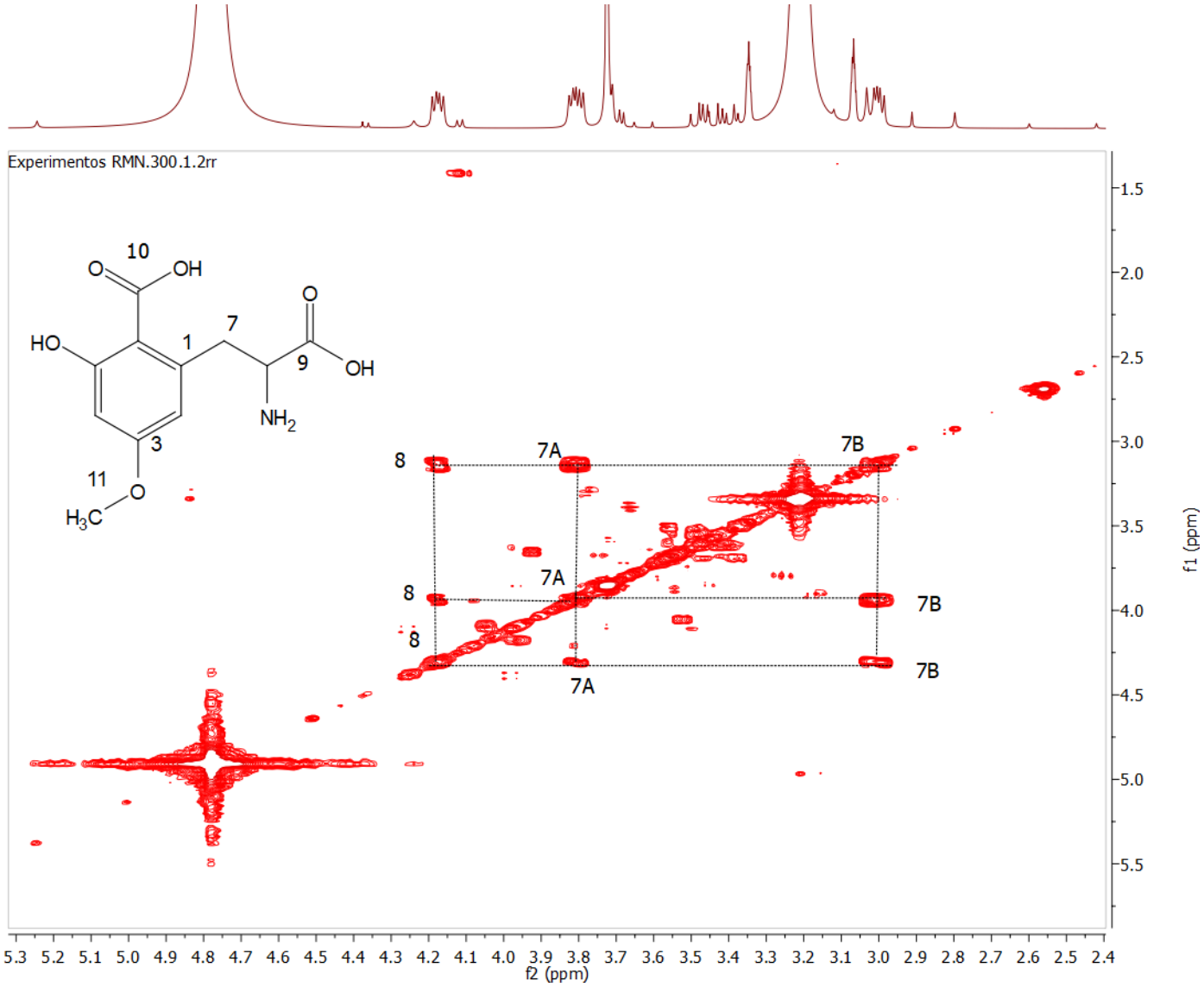


Figura 13 - Espectro HMBC da CBX (Solvente CD_3OD, 500 MHz).

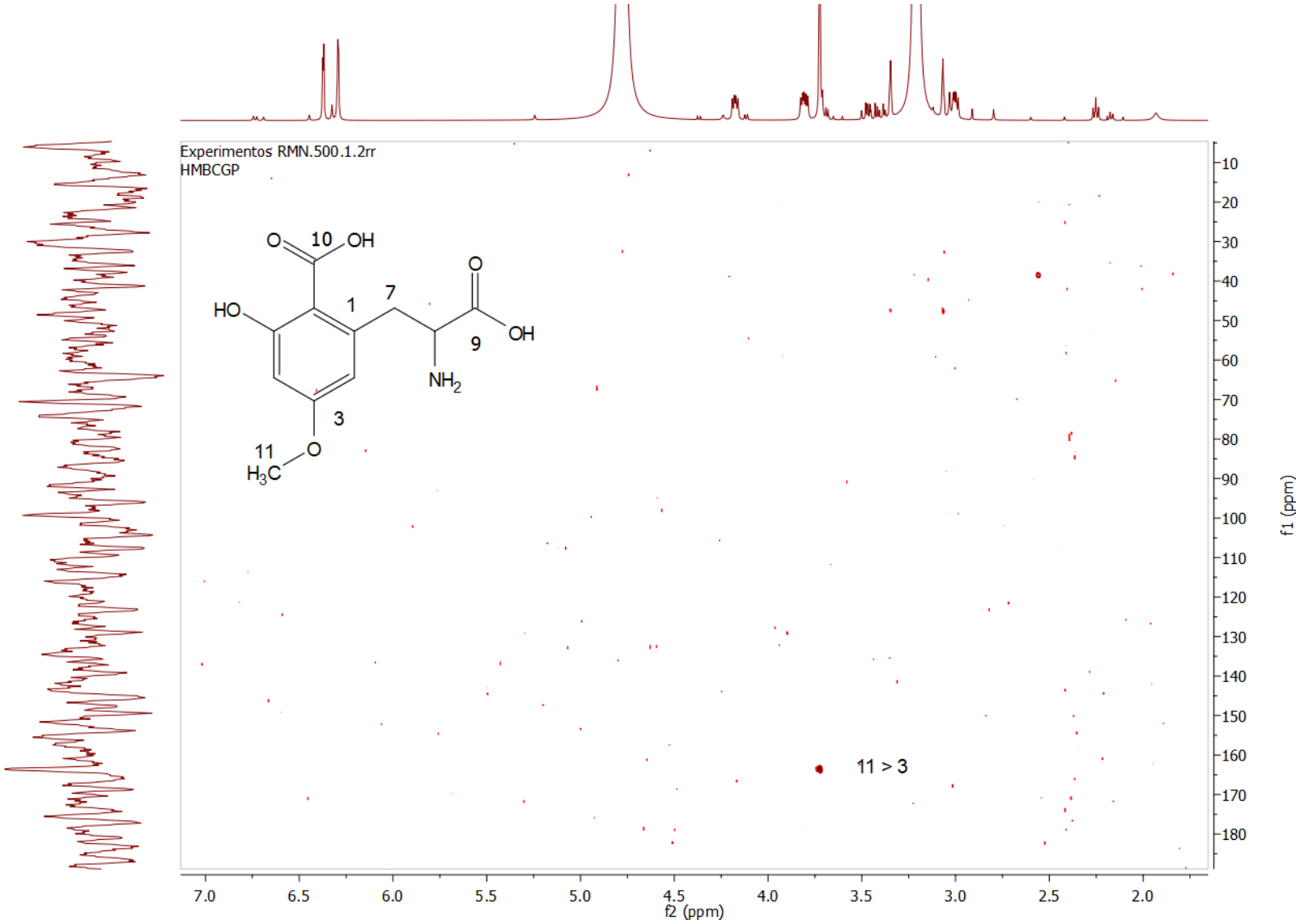


Figura 14 - Espectro HSQC da CBX (Solvente CD_3OD, 400 MHz).

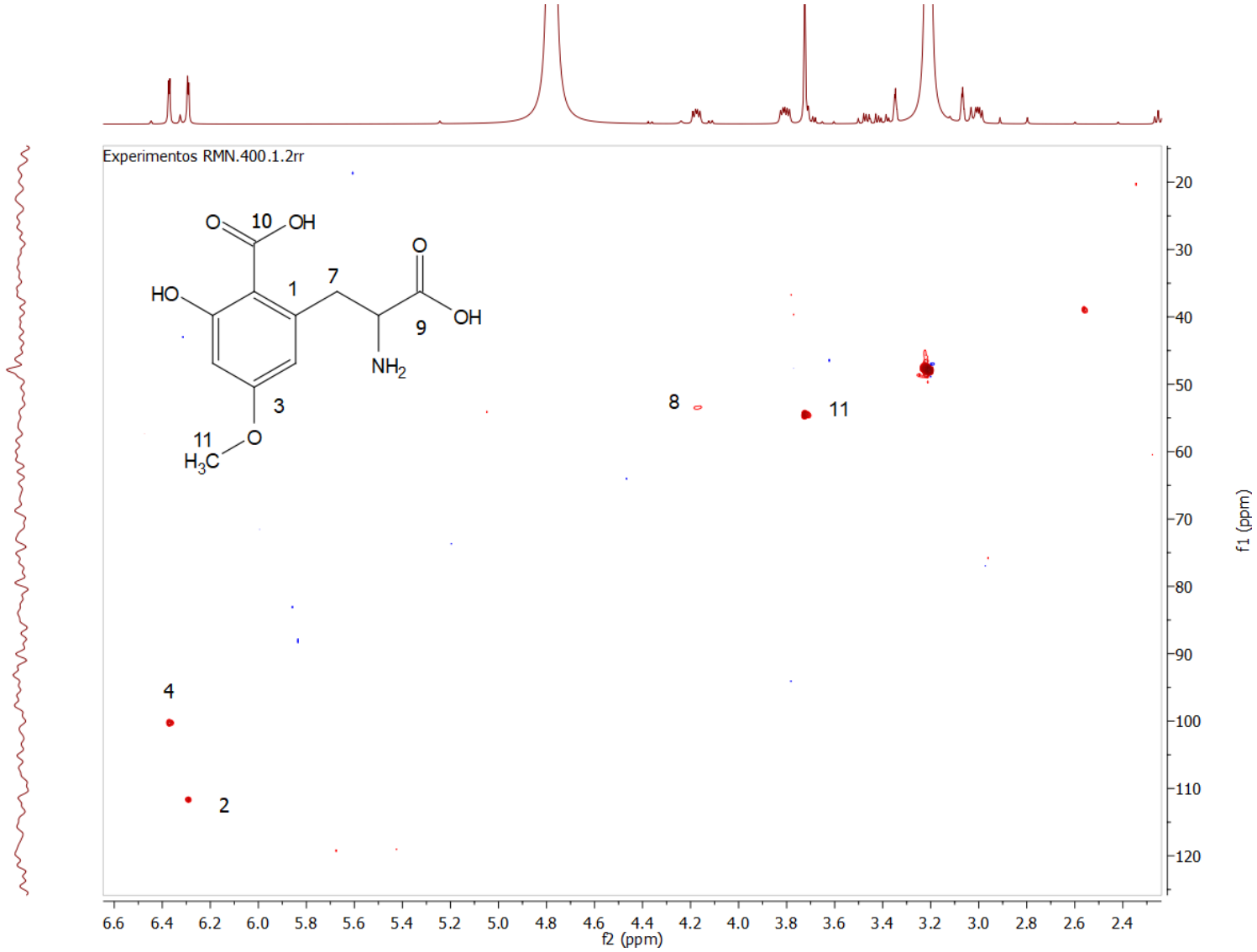
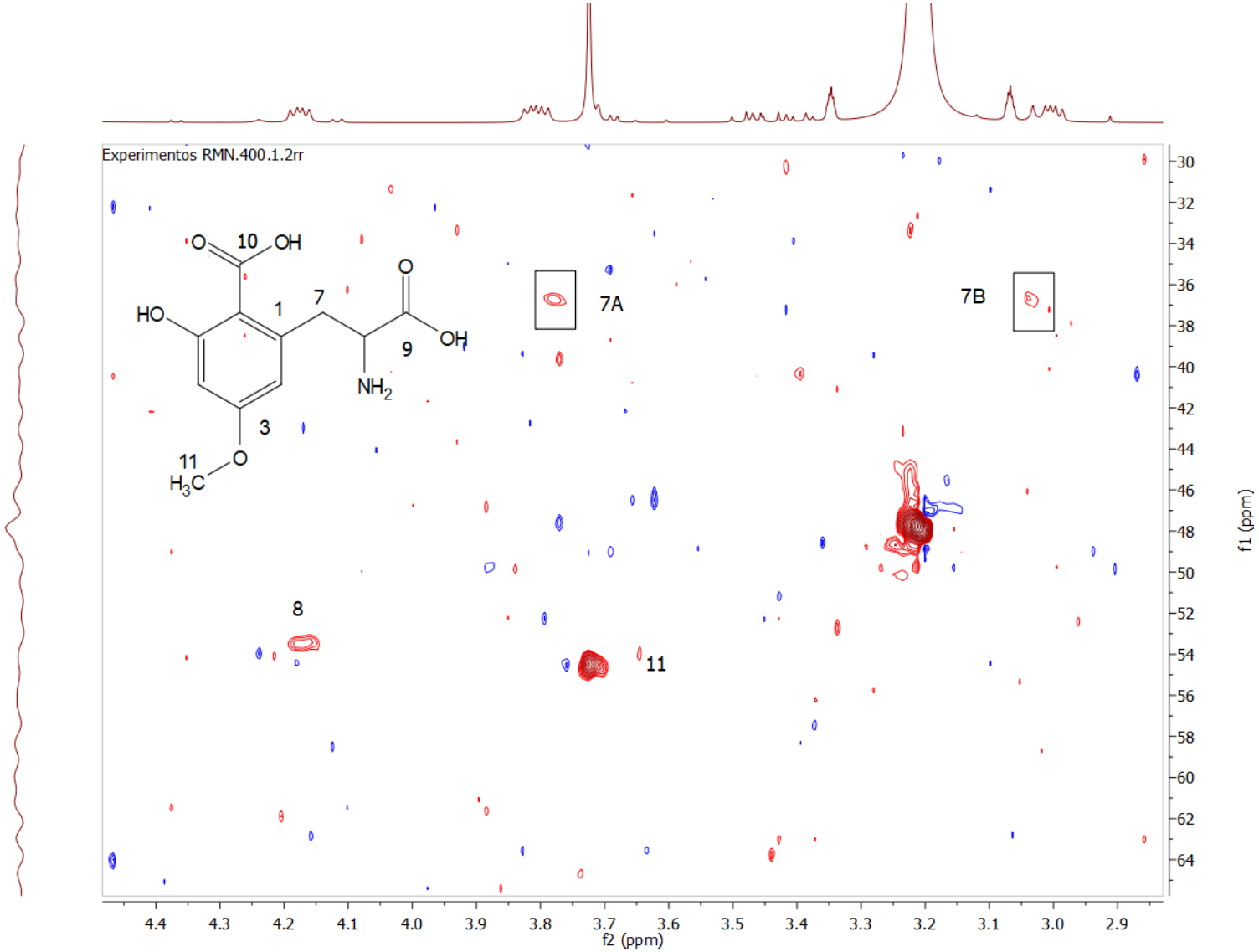
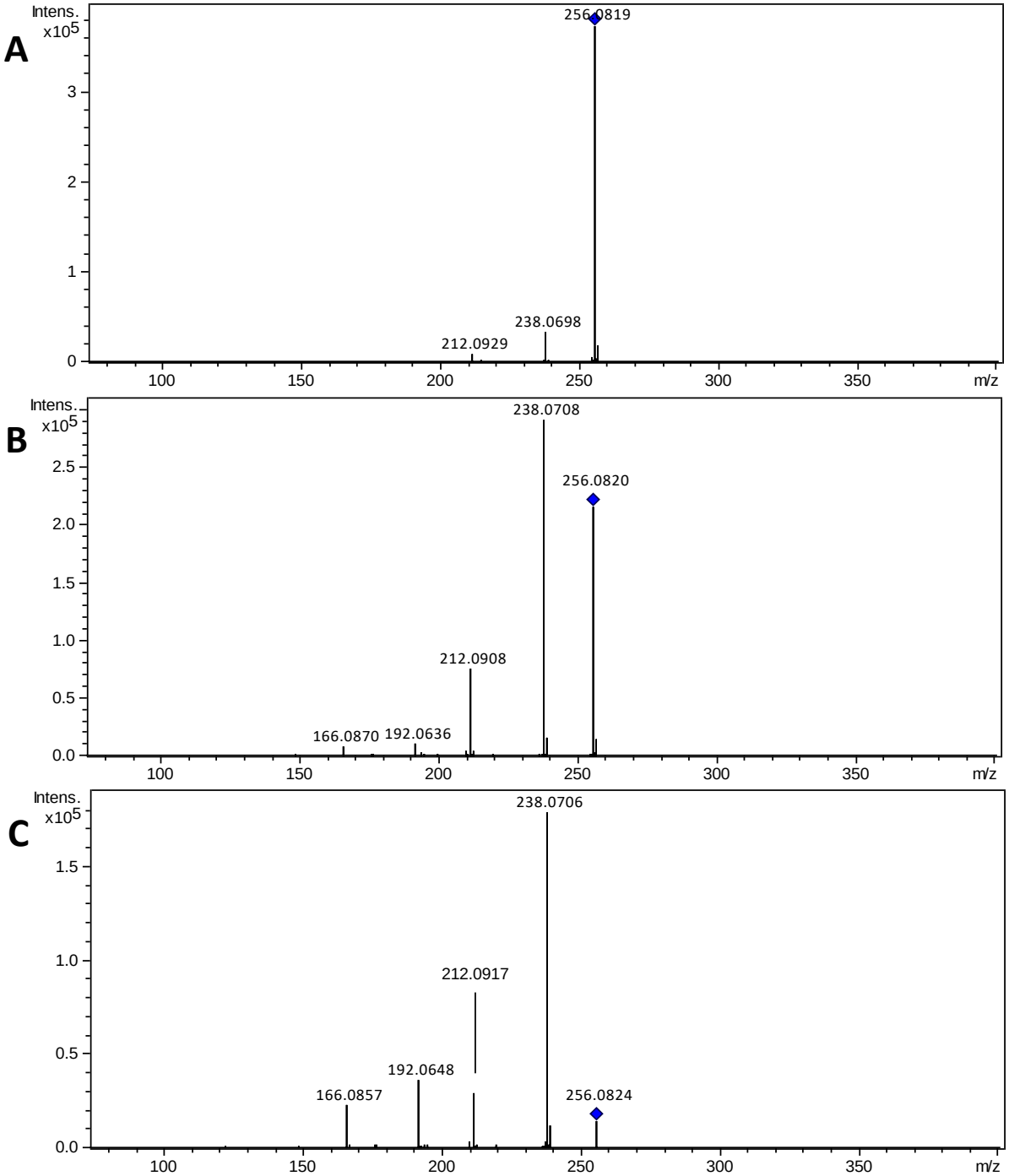


Figura 15 – Ampliação do espectro HSQC da CBX (Solvente CD_3OD, 400 MHz).



A seguir, o material seco foi ressuspendido em MeOH e analisado em espectrômetro de massas de alta resolução (micrOTOF Q II) por infusão direta (ESI-MS/MS) obtendo os íons *m/z* 256 referente à CBX protonada $[CBX + H]^+$ e *m/z* 238 referente a perda de uma molécula de água $[CBX – H_2O + H]^+$. O íon *m/z* 256 foi selecionado para fragmentação a partir do qual foram gerados íons fragmentos *m/z* 238 e *m/z* 212 aplicando-se apenas 5 eV, quando foi aplicado uma energia um pouco mais elevada, porém ainda assim baixa, de 10 eV foram observados outros íons fragmentos além dos observados anteriormente, os íons *m/z* 192 e *m/z* 166 (Figura 10). Neste experimento foi possível observar ainda que quando aplicado 15 eV o íon referente a CBX protonada fragmentou quase por completo, o que mostra que essa molécula é muito susceptível de fragmentação. Este perfil de fragmentação é semelhante ao perfil descrito por Garcia-Cairasco e colaboradores (2013), indicando que a substância isolada se trata da CBX.

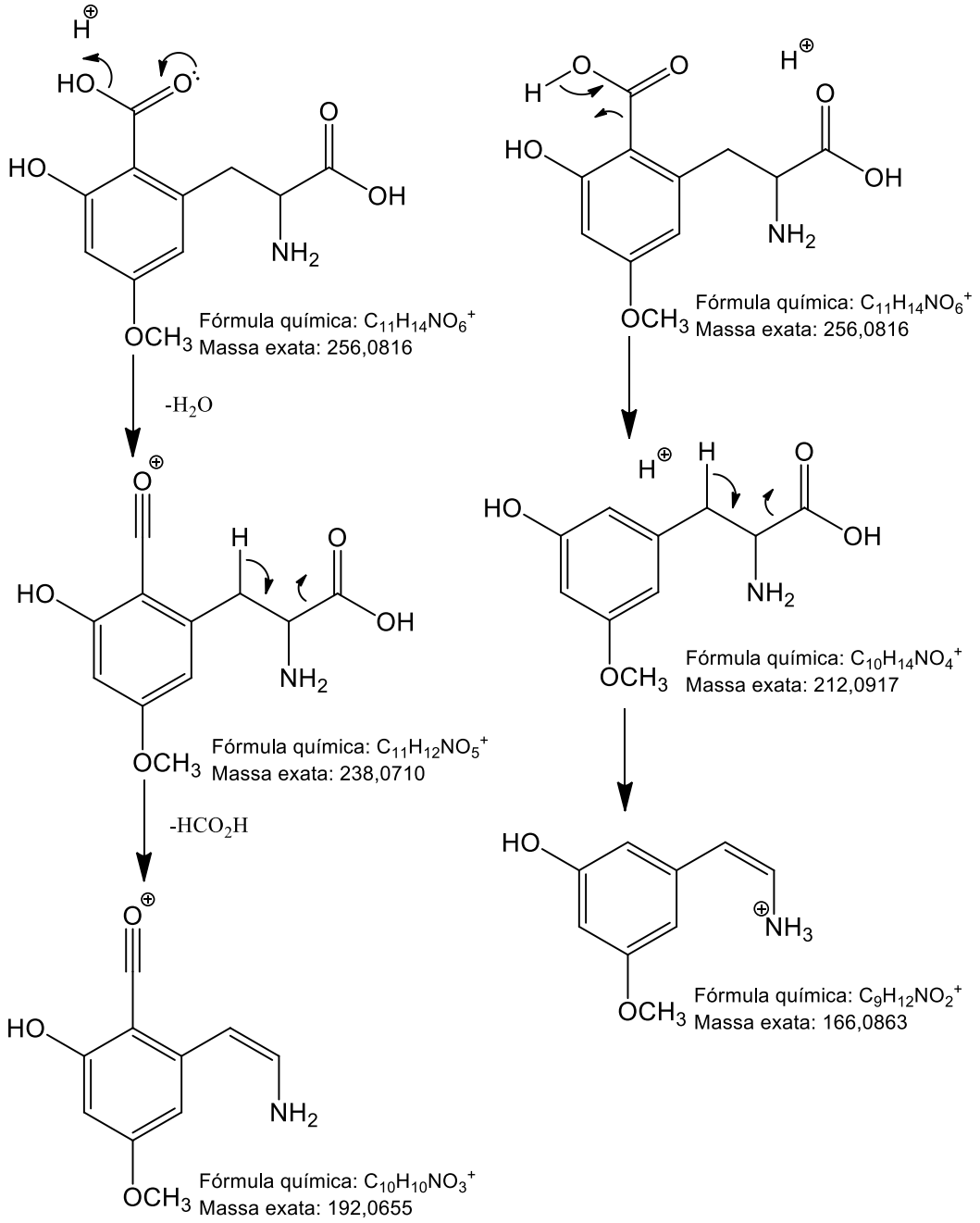
Figura 16 - Espectros ESI-MS/MS da CBX em três energias de colisão diferentes. A) MS/MS em 5eV; B) MS/MS em 10eV; C) MS/MS em 15eV.



A partir dos espectros de fragmentação apresentados na Figura 10, neste trabalho foi apresentada uma proposta de mecanismo de fragmentação para a CBX protonada. A CBX (*m/z* 256) sofre uma eliminação neutra de H_2O (*m/z* 238) e de CO_2 (*m/z* 212), a partir do grupo ácido carboxílico do anel aromático. Com o aumento da energia de colisão observou-se a formação do íon *m/z* 192, devido à eliminação de CH_2O_2 (46 u) como uma molécula neutra por eliminação 1,2. Um

mecanismo semelhante foi observado na formação do íon *m/z* 166 a partir do íon *m/z* 212 (Esquema 1). A análise detalhada do mecanismo foi importante para auxiliar na determinação de possíveis metabólitos nos estudos posteriores.

Esquema 1 – Fragmentação da CBX

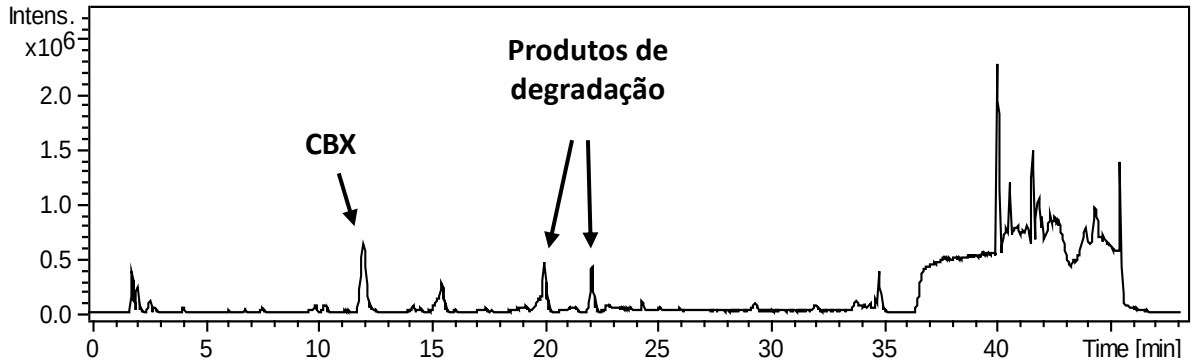


Fonte: GARCIA-CAIRASCO et al., 2013

4.2 ESTUDO DO METABOLISMO *IN VITRO* DA CARAMBOXINA EMPREGANDO O MODELO BIOMIMÉTICO

Na etapa inicial desse estudo buscou-se utilizar a metodologia de análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa com ionização por *electrospray* e analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo (LC-ESI-QTOF- MS). Essa estratégia demonstrou que o tempo de retenção da CBX foi de 12,2 minutos e o espectro de massa adquirido em modo positivo exibiu os íons com *m/z* 256 $[M+H]^+$, além dos íons com *m/z* 238 e 212 correspondentes aos íons-fragmento da CBX, devido a dissociação logo na fonte de ionização (Figura 17).

Figura 17 – Cromatograma após a reação de oxidação biomimética da CBX utilizando *m*CPBA como agente oxidante



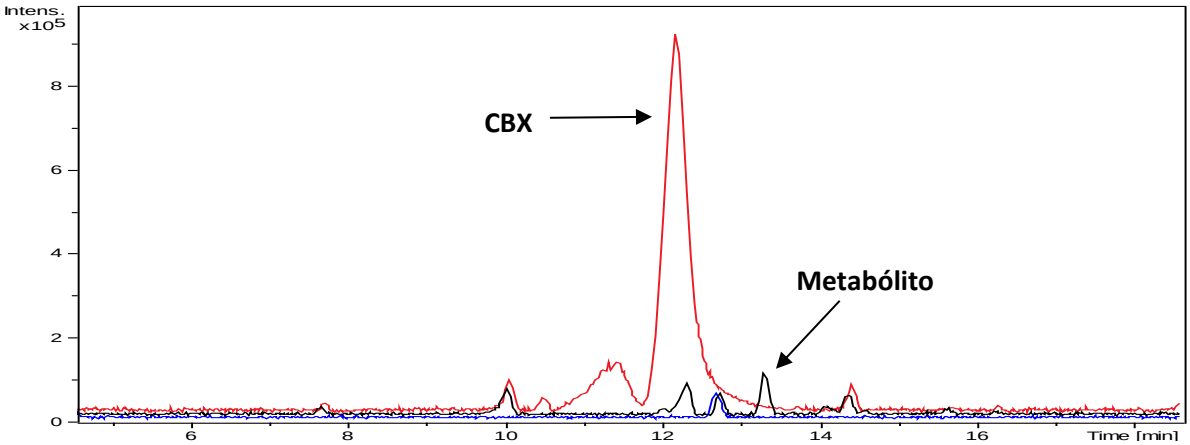
Coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel composta por solução aquosa de TFA 0,01% e ACN com eluição por gradiente, variando a porcentagem de ACN de 5% a 30% em 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30

Nas reações onde foi utilizado o *m*CPBA como agente oxidante ficou evidente um sinal com tempo retenção de 12,2 minutos, referente a CBX, de *m/z* 256, além de dois sinais com *m/z* 519, referente a um produto de degradação da CBX presente na amostra, com tempo de retenção de 20,1 e 22,2 minutos. Todos os demais sinais observados na amostra submetida à reação de oxidação são referentes aos reagentes empregados no ensaio, também observados na amostra controle sem CBX. Esse modelo biomimético tem grande utilidade para a formação de produtos de oxidação, em alguns casos redução e desmetilação. Contudo, pela possibilidade da formação de espécies radicalares, estruturas do tipo C6-C3 como derivados de fenilalanina ou de lignóides, podem formar dímeros apresentando aumento de massas, como nas reações de Fenton (TEPONNO; KUSARI; SPITELLER, 2016). Nesses casos, o produto formado não pode ser relacionado com o metabolismo *in*

vivo e torna-se necessária a busca de outros catalisadores organometálicos, ou mudança de catalisadores ou mesmo o uso apenas dos microssomas que permitem identificarmos com mais segurança o produto, mas inviabilizam os futuros aumentos de escala.

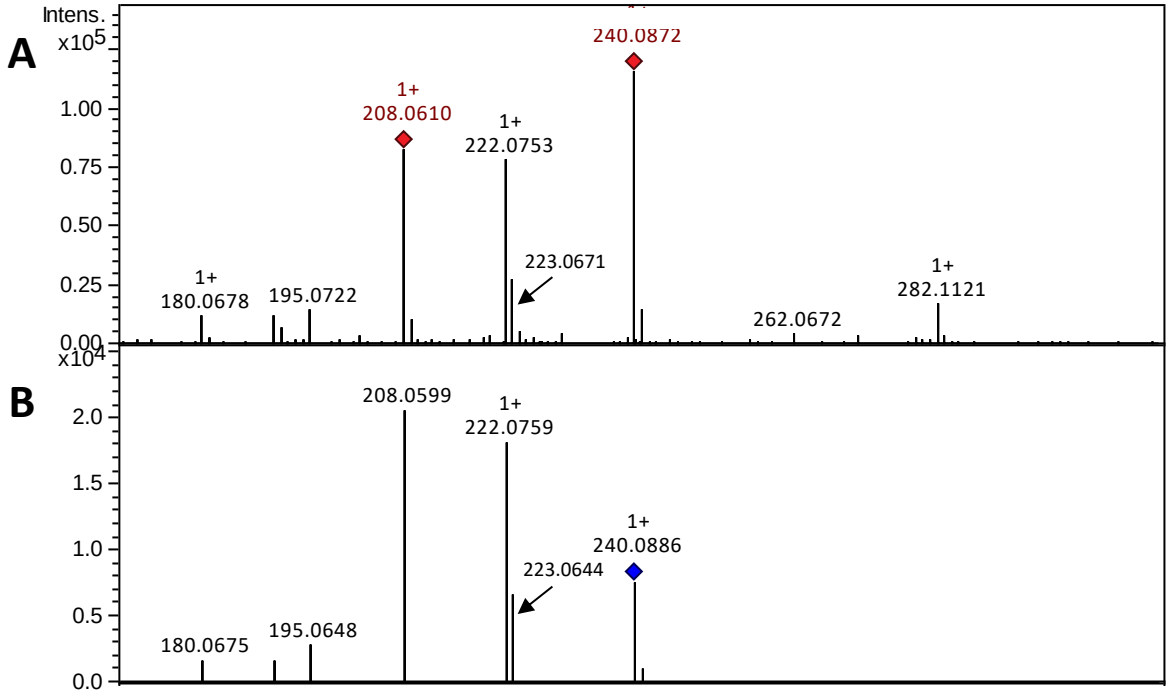
Nos ensaios com PhIO como agente oxidante houve diminuição do sinal referente a CBX, além disso foi observado um sinal com tempo de retenção de 13,3 minutos (Figura 18), referente a um possível metabólito putativo formado. O espectro de massa do metabólito (Figura 19) apresentou um íon mais intenso de *m/z* 240, além dos íons *m/z* 222 e 208, que poderiam indicar a presença de mistura ou uma alta instabilidade no sistema de ESI-MS/MS do metabólito formado. Para confirmar essa proposta o íon *m/z* 240 foi selecionado e mesmo em baixas energias já há formação dos fragmentos em 208 e 222, confirmando a baixa estabilidade na fonte de ESI (Figura 19). Este metabólito está presente na análise feita com 50 minutos transcorridos de reação (T_1), demonstrando que a CBX é pouco estável nessas condições. Contudo, ele pode ser observado no transcorrer total da reação.

Figura 18 – Superposição dos cromatogramas após reação com modelo biomimético utilizando PhIO como agente oxidante.



Ampliação de 4,5 a 18,5 minutos dos cromatogramas superpostos da reação (catalisador:oxidante:substrato), do controle (CBX) e do branco (catalisador:oxidante) com indicação do sinal em 13,3 minutos, referente ao metabólito putativo formado.

Figura 19 – Espectros ESI-MS (A) e ESI-MS/MS (B) do metabólito putativo da CBX.



Com isso, percebemos que a variação do agente oxidante foi importante para a metabolização da CBX, demonstrando que o modelo biomimético empregando catalisador de Jacobsen e PhIO, como agente oxidante, favoreceu a previsão de possíveis metabólitos de fase I.

O passo seguinte foi inferir uma possível estrutura ao metabólito putativo formado. Apesar de o modelo empregado apresentar preferencialmente reações oxidativas, a CBX já possui uma estrutura com diversas funcionalizações o que novamente torna esse estudo algo muito particular. Uma análise detalhada das reações de desproporção que ocorrem espontaneamente em soluções de (diacetoxiodo)benzeno (DIB) em acetonitrila, dando espécies de iodo (V) e iodo (I), sugere que o metabólito observado na reação biomimética da CBX trata-se de um produto proveniente de um processo redox. Esta reação redox é acelerada pela presença de água e pelo aumento da temperatura, mas não exclusiva destas condições. As várias espécies da solução de DIB foram identificadas nas soluções por ESI-MS/MS de alta resolução no modo positivo, o que permitiu a elucidação do mecanismo de desprotonação para DIB (SILVA Jr; VASCONCELOS; LOPES, 2008). O mecanismo apresenta a presença de espécies diméricas, que foram completamente caracterizadas. Portanto, para todos esses processos redox, a existência das espécies capazes de promover as reações tanto de oxidação como

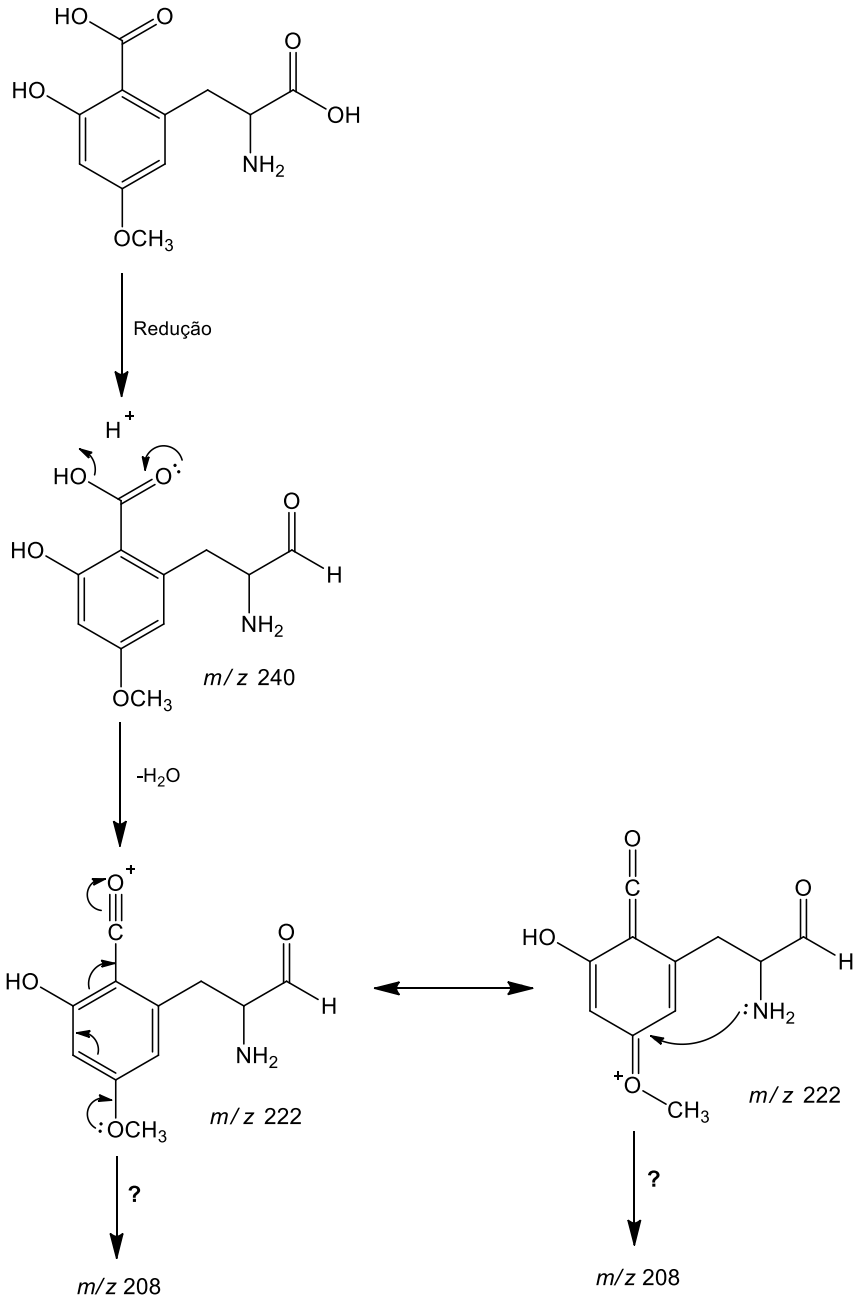
de redução coexistem. Contudo o maior interesse pelo potencial oxidativo levou, na literatura, a caracterização em apenas um modo de ionização, o qual foi confirmado posteriormente por um estudo dos principais agentes oxidantes de espécies de iodo (V), incluindo derivados de PhIO (VASCONCELOS; SILVA Jr; LOPES, 2012).

Partindo das observações acima, apesar de esperarmos uma possível reação de oxidação ou a indução da ciclização, foi observado um sinal com 16 unidades de massa (u) menor que a CBX. Além disso, conforme observado nas análises de massas, o produto formado é bastante instável e sofre alta dissociação na fonte, formando os dois principais íons fragmentos observados em MS/MS (Figura 19). A análise combinada dessas informações sugere, portanto, a redução de uma das funções ácido carboxílico para a função aldeído. O primeiro íon produto formado está de acordo com a estrutura proposta seguida de uma eliminação de água, como ocorre com a fragmentação da CBX.

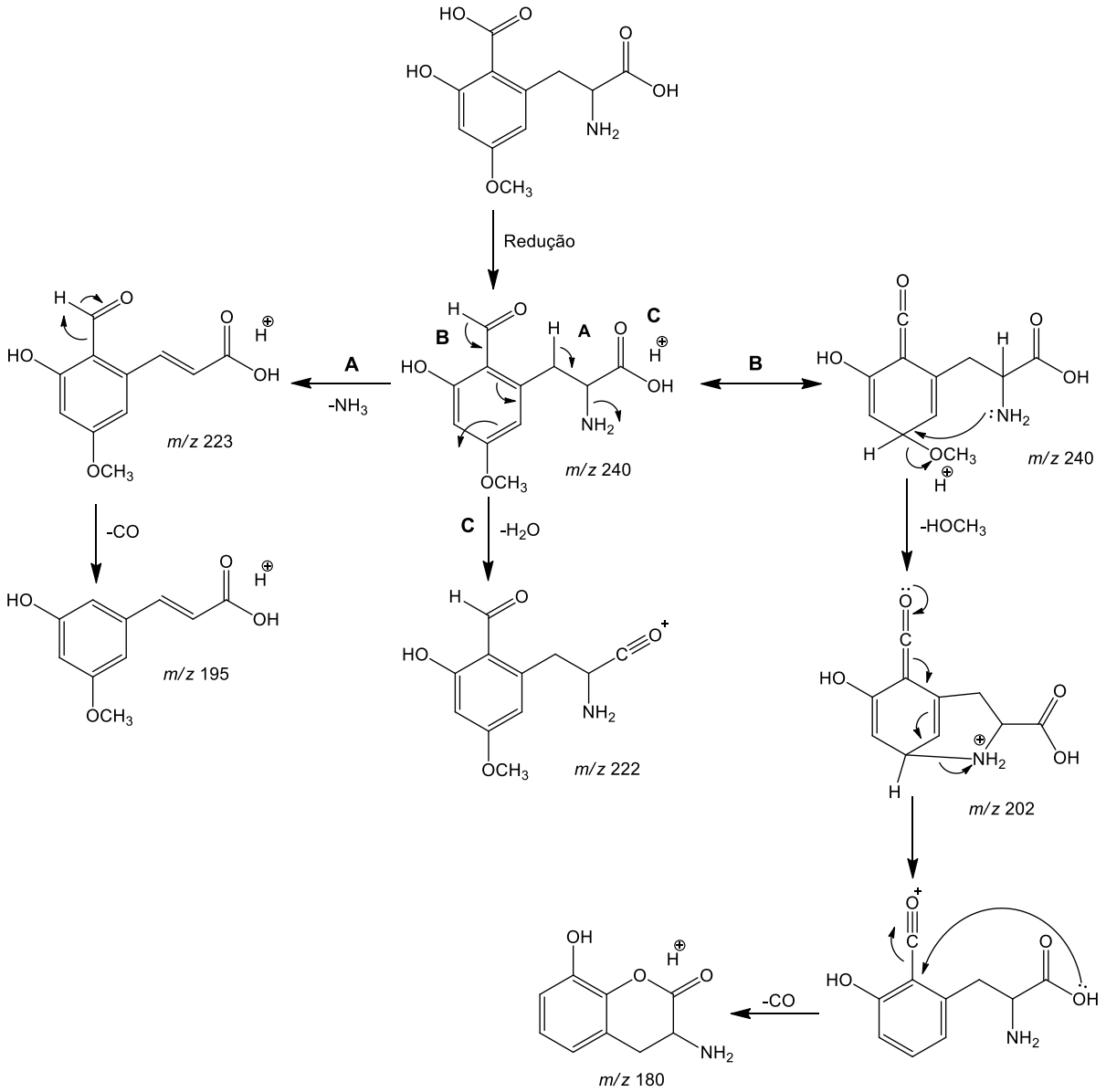
Os resultados discutidos acima são um forte ponto a favor da formação de um aldeído, sendo as duas propostas apresentadas nos esquemas a seguir. Na proposta 1 (Esquema 2), ocorre a redução do ácido carboxílico da porção do ácido aminado, o que leva a eliminação de água por um mecanismo de assistência anquimérica no sítio de protonação da função ácida restante na molécula. Nesse caso, a eliminação de CO fica inibida. No entanto, uma possível eliminação de 32 u, referente a uma molécula de metanol exige uma série de rearranjos que não poderiam ocorrer na fonte de ESI como observado no espectro de MS. Por outro lado, na segunda proposta (Esquema 3), a redução ocorre na função ácido carboxílico ligada ao anel aromático, com três possíveis vias de fragmentação. Na primeira (A), ocorreria a eliminação de NH_3 por um mecanismo do tipo E2, seguida de eliminação de CO. Esse fato sugere que o íon *m/z* 223 não é um isótopo, mas um fragmento formado a partir do íon *m/z* 240. A análise da intensidade do sinal de 223 também descarta qualquer possibilidade de isotopia. Na segunda via de fragmentação (B), o aldeído formado pode se rearranjar na própria fonte de ESI levando ao produto de migração de H. A maior liberdade do átomo de oxigênio da metoxila poderia permitir a fixação do próton da carga entre os átomos de N e O. Nesse caso, um pequeno deslocamento da carga para o oxigênio pode permitir um ataque no par de elétrons não ligantes do oxigênio resultando na eliminação do metanol e formação de um anel de 6 membros estável. Esse íon, por sua vez, sofreria novo rearranjo levando a abertura do anel contando a energia da

rearromatização do sistema, o que permitiria uma assistência anquimérica a longa distância, levando à eliminação de CO sem a formação do cátion sobre o carbono do anel aromático. Na terceira via de fragmentação (C), ocorre a direta eliminação da água pelo processo de remoção de carga. Com base nessas observações de análise mecanística das reações de fragmentação podemos sugerir que o modelo de metabolismo biomimético empregado ocorre a inesperada reação de redução do ácido carboxílico ligado ao anel aromático levando a formação do aldeído correspondente..

Esquema 2 - Proposta 1 de fragmentação do íon *m/z* 240



Esquema 3 - Proposta 2 de fragmentação do íon *m/z* 240

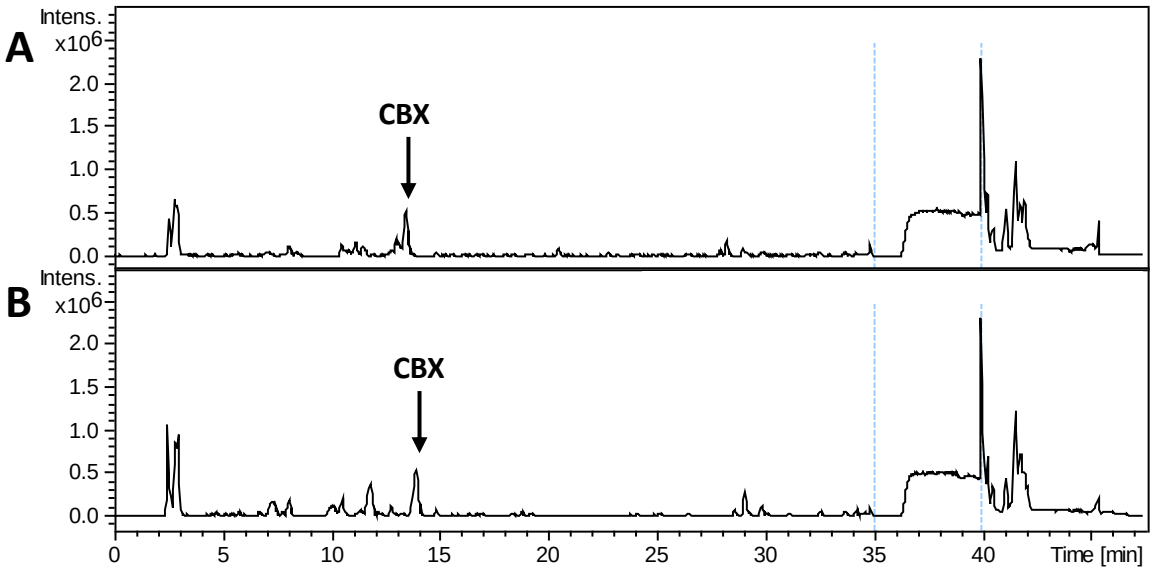


4.3 ESTUDO DO METABOLISMO *IN VITRO* DA CARAMBOXINA EMPREGANDO MODELO MICROSSOMAL HEPÁTICO DE RATOS

Visando confirmar a viabilidade da ocorrência do metabólito putativo obtido através da redução, submetemos a substância CBX a reações no modelo microssomal de ratos que normalmente reproduzem com maior exatidão os fenômenos *in vivo*, com a limitação da não possibilidade de produção do metabólito em maior escala. Os estudos nesse modelo não revelaram a formação de produtos oxidados (Figura 20) em ambos os tempos de incubação (30 e 60 minutos). Evidenciou-se apenas o sinal com tempo de retenção de 14,0 minutos, referente a CBX, de *m/z* 256. Sendo que os demais sinais observados na amostra são

referentes aos reagentes empregados no ensaio, também observados na amostra controle, ausente de CBX.

Figura 20 – Cromatogramas de pico base (BPC) das reações com microssomas hepáticos de ratos. A) Reação controle com padrão de CBX; B) Reação 60 minutos



Coluna C18 analítica (Phenomenex, Luna; 4,6 x 250 mm, 5 µm) e a fase móvel composta por solução aquosa de TFA 0,01% e ACN com eluição por gradiente, variando a porcentagem de ACN de 5% a 30% em 30 minutos, seguida de uma variação de 30% a 100% de 30 a 37 minutos, mantendo-se em 100% até 42 minutos e em seguida voltando a 5% em 45 minutos. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL min^{-1}, com temperatura da coluna de 35 °C e volume de injeção de 30

Estes resultados demonstraram a estabilidade da CBX frente ao modelo biológico microssomal hepático de ratos, que não permitiu prever os possíveis metabólitos de fase I. Por outro lado, corrobora para a hipótese que a caramboxina já é suficientemente oxidada para ser eliminada rapidamente pela urina, independentemente do metabolismo de passagem pelo fígado e corrobora também a observação que pacientes sem problemas renais não apresentam quaisquer transtornos em função do consumo de carambola (CHUA et al, 2017; OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Por outro lado, o produto obtido é de grande interesse para a discussão do mecanismo de ação da toxina o qual se baseia na ocorrência de dois grupamentos ácidos carboxílicos com distribuição espacial semelhante ao ácido ibutênico (GARCIA-CAIRASCO, 2013). Portanto, o aumento de escala dessa reação permitirá estudos sobre esse ponto importante da toxicidade da CBX.

5 CONCLUSÃO

Em resumo podemos concluir que o protocolo final de isolamento apresentou um aumento considerável no rendimento do método de isolamento da CBX, possibilitando assim desenvolver os estudos de metabolismo *in vitro*. O desenvolvimento deste método de isolamento da CBX permite que esta neurotoxina avaliada futuramente em modelos experimentais *in vivo* de epilepsia.

O modelo biomimético empregando catalisador de Jacobsen utilizando PhIO como agente oxidante demonstrou ser um modelo mais adequado para os estudos de metabolismo *in vitro* da CBX, tendo em vista que houve a formação de um metabólito putativo, o qual poderá ser posteriormente utilizado nos estudos de mecanismo de ação da CBX. Por outro lado, o uso do *m*CPBA, como agente oxidante, neste mesmo modelo biomimético não proporcionou a formação de metabólitos nas condições empregadas.

O ensaio com modelo microssomal hepático de ratos não possibilitou a formação de produtos de oxidação nas condições empregadas, podendo sugerir que não ocorra o metabolismo de fase I da caramboxina e corroborando com a proposta de rápida eliminação pela urina, por pacientes saudáveis que ingerem frutos de carambola.

REFERÊNCIAS

ABEYSEKERA, R. A. et al. Star fruit toxicity: a cause of both acute kidney injury and chronic kidney disease: a report of two cases. **BMC Res Notes**, v. 8 n. 796, p. 1-4 2015.

ARAÚJO, P. S. R; MINAMI, K. Seleção de caramboleiras pelas características biométricas e físico-químicas dos frutos. **Sci Agric**, v.58, n.1, p.91-99, 2001.

BARROS, V. P. D. **Uso de metaloporfirinas como modelos do citocromo P450 no metabolismo de corantes azo**. Tese - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BENTO XVI. Discurso do Papa Bento XVI na visita à Universidade Católica do Sagrado Coração no 50º aniversário da fundação da Faculdade de Medicina e Cirurgia da policlínica Agostino Gemelli. **Libreria Editrice Vaticana**, Vaticano, 3 mai. 2012. Disponível em: < http://w2.vatican.va/content/benedict-xvi/pt/speeches/2012/may/documents/hf_ben-xvi_spe_20120503_gemelli.html>. Acesso em: 4 fev. 2018.

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

CAETANO, C. P. et al. Neurotoxicity following the ingestio of bilimbi fruit (*Averroha bilimbi*) in an end-stage renal disease patient on hemodialysis. **Case Rep Nephrol Dial**, v. 7, p. 6-12, 2017.

CAROLINO, R. O. G. et al. Convulsant activity and neurochemical alterations induced by a fraction obtained from fruit Averrhoa carambola (Oxalidaceae: Geraniales). **Neurochem Int**, v. 46, p. 523-531, 2005.

CECCHI, T. Application of Ion Pairing Chromatography to the Analysis of Inorganic Analytes: Review. **J Liq Chromatogr Relat Technol**, v. 30, p. 1205-1225, 2007.

CECCHI, T. Ion Pairing Chromatography. **Crit Rev Anal Chem**, v. 38, p. 161-213, 2008.

CHUA, C. B et al. Association of renal function and symptoms with mortality in star fruit (Averrhoa carambola) intoxication. **Clinical Toxicology**, v. 55, n. 7, p. 624–628, 2017.

COLLINS, C. H. et al. Fundamentos de cromatografia. Campinas: UNICAMP, 2009.

DIVINEY, M.; REYNOLDS, J. P.; HENSHALL, D. C. Comparison of short-term effects of midazolam and lorazepam in the intra-amygdala kainic acid model of status epilepticus in mice. **E&B**, v. 51, p. 191-198, 2015.

FANG, H. C. et al. Acute Oxalate Nephropathy Induced by Star Fruit in Rats. **Am J Kidney Dis**, v. 38, n. 4, p. 876-880, 2001.

FANG, H. C. et al. Mechanisms of star fruit-induced acute renal failure. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p.1744–1752, 2008.

FARIA, A. L. **Complexos salen e metaloporfirínicos como catalisadores na oxidação de hidrocarbonetos e fármacos em meio homogêneo e heterogêneo**. Tese - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FERNANDES, E. F. A. **Estudo do metabolismo in vitro do diterpeno ácido caurenoico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

FORMAN, S. A. et al. Farmacologia da neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica. In: GOLAN, D. E., et al. **Princípios de farmacologia:** a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 11, p. 146-165.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. A video-EEG study of the neurotoxic effects of star fruit (Averrhoa carambola) juice ingestion in animals with renal failure. In: **39 ERA-EDTA Congress**, Copenhagem, 2002.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Elucidating the neurotoxicity of the Star Fruit. **Angew Chem Int Ed**, v. 52, p. 13067-13070, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Quim. Nova***,* v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOBBO-NETO, L. et al. Spatial and temporal variations in secondary metabolites content of the Brazilian Arnica leaves (Lychnophora ericoides Mart., Asteraceae). **J Braz Chem Soc**, v. 28, n. 12, p. 2382-2390, 2017.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. L. (Org.). **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman**. 2 ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. p. 219-237.

IVANOVA, N. M. et al. Long-term intracerebroventricular infusion of angiotensin II after kainate-induced status epilepticus: effects on epileptogenesis, brain damage, and diurnal behavioral changes. **E&B**, v. 51, p. 1-12, 2015.

JAGIRDAR, R. et al. Rapid changes in expression of class I and IV histone deacetylases during epileptogenesis in mouse models of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v. 273, p. 92-104, 2015.

LOHMAN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: strategies, advantages and limitations. **Anal Bioanal Chem**, v. 391, p. 79-96, 2008.

MANNUR, V. S. et al. Selection of buffers in LC-MS/MS: an overview. **Int. J Pharm Sci Rev Res,** v. 6, n. 1, p. 34-37, 2011.

MARQUES, L. M. M. **Estudo de metabolismo in vitro do alcaloide piplartina empregando microssomas hepáticos de ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

MARQUES, L. M. M. et al. In vitro metabolism of the alkaloid piplartine by rat liver microsomes. **J Pharm Biomed Anal**, v. 95, p. 113-120, 2014.

MAURIN, A. J. M. et al. LC-MS-MS identification of drug metabolites obtained by metalloporphyrin mediated oxidation. **J Braz Chem Soc**, v. 14, n. 2, p. 322-328, 2003.

MOHUTSKY, M. A.; WRIGHTON, S. A.; RING, B. J. In vitro metabolism: subcellular fractions. In: PEARSON, P. G.; WIENKERS, L. C. **Handbook of drug metabolism**. 2nd. ed. New York: Informa Healthcare, v. 186, 2008. Cap. 17, p. 445-458.

MOREIRA, F. L. In vitro metabolism studies of natural products are crucial in the early development of medicines. **Phytochem Rev**, v. 16, p. 355-373, 2017.

MOYSES NETO, M. et al. Intoxication by star fruit (Averrhoa carambola) in 32 uraemic patients: treatment and outcome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 120-125, 2003.

MOYSES NETO, M.; ROBL, F.; COUTINHO NETTO, J. Intoxication by starr fruit (Averrhoa carambola) in six dialysis patients? (Preliminary report). **Nephrol Dial Transplant**, v. 13, p. 570-572, 1998.

MOYSES-NETO, M. et al. Star fruit: simultaneous neurotoxic and nephrotoxic effects in people with previously normal renal function. **NDT Plus** v. 2, p. 485-488, 2009.

MUIR, C. K.; LAM, C. K. Depressant action of Averrhoa carambola. **Med J Malaysia**, v. 34, n. 3, p. 279-280, Mar. 1980.

MUTHU, N. et al. Nutritional, Medicinal and Toxicological Attributes of Star-Fruits (*Averrhoa carambola* L.): A Review. **Bioinformation** v. 12, n.12, p. 420-424, 2016.

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

OLIVEIRA, E. S. M. D.; AGUIAR, A. S. D. Por que a ingestão de carambola é proibida para pacientes com doença renal crônica? **J Bras Nefrol**, v. 37, n. 2, p. 241-247, 2015.

OLIVEIRA, M. T. R. et al. Características biométricas e físico-químicas do fruto, morfologia da semente e da plântula de Averrhoa carambola L. (Oxalidaceae). **Rev Bras Sementes**, v. 33, n. 2, p. 251-260, 2011.

PAVARINI, D. P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Anim Feed Sci Technol**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PIGATTO, M. C. **Avaliação farmacocinética e do metabolismmo in vivo e in vitro do candidato a antitumoral AC04**. Dissertação - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

PIGATTO, M. C. et al. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **Eur J Med Chem**, v. 46, p. 4245-4251, 2011.

PRATI, P.; NOGUEIRA, J. N.; DIAS, T. S. Avaliação de carambola L. dos tipos doce e ácido para o processamento de fruta em calda. **B CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 221-246, 2002.

QUINTILIANO, S. A. P. **Reações de álcoois homoalílicos com tálio (III), iodo e iodo hipervalente, dicloração de cetonas e estudos visando à síntese total da caramboxina**. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

ROCHA, B. A. et al. In vitro metabolism of monensin A: microbial and human liver microsomes models. **Xenobiotica**, v. 44, n. 4, p. 326-335, 2014.

SANTOS NETO, A. J. A importância do volume do misturador de solventes em HPLC gradiente. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 327-338, 2011.

SCARANELLO, K. L. et al. Carambola como causa de lesão renal aguda. **J Bras Nefrol**, v. 36, n. 2, p. 246-249, 2014.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. **J Chromatog A**, v. 1022, p. 67-75, 2004.

SILVA Jr, L. F.; VASCONCELOS, R. S.; LOPES, N. P. Application of high-resolution electrospray mass spectrometry for the elucidation of the disproportionation reaction of iodobenzene diacetate. **Int J of Mass Spectrom**, v. 276, n. 1, p. 24-30, 2008.

SIMAS, E. R. **Síntese, caracterização e estudo das propriedades fotofísicas de um copolímero derivado de quinolina.** Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

STOCK, R. I. **Síntese de *(e)*-4-(estiril)fenóis nitro-substituídos e aplicações como sondas na investigação da polaridade de solventes puros, de misturas binárias de solventes e da micropolaridade de ciclodextrinas.** Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 2014)

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Nat Prod Rep**, v. 33, p. 1044-1092, 2016.

THOMAS, S. et al. Pharmaconostic evaluation and physicochemical analysis of Averrhoa carambola L. fruit. **J Herb Med Toxicol**, v. 2, n.2, p. 51-54, 2008.

TURSKI, L. et al. Seizures produced by pilocarpine: neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain. **Brain Res**, v. 398, p. 37-48, 1986.

VASCONCELOS, R. S.; SILVA Jr, L. F.; LOPES, N. P. Estudo por espectrometria de massas de soluções de hidróxi(tosilóxi)iodobenzeno: propostas para mecanismos de desproporção. **Quim Nova***,* v. 35, n. 8, p. 1593-1599, 2012

WU, C. C. et al. Star fruit induced neurotoxicity in two patients with chronic renal failure. **J Med Sci**, v. 22, p. 75-78, 2002.

ZHANG, J. et al. Remarkable fluorescence change based on the protonation–deprotonation control in organic crystals. **Chem Commun**, v. 49, p. 3878-3880, 2013.