UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo in vitro do perfil metabólico do agente antitumoral piplartina frente às enzimas do citocromo P450 e predição de parâmetros farmacocinéticos

Fernanda de Lima Moreira

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo in vitro do perfil metabólico do agente antitumoral piplartina frente às enzimas do citocromo P450 e predição de parâmetros farmacocinéticos

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

Área de Concentração: Medicamentos e

Cosméticos

Orientada: Fernanda de Lima Moreira

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

Oliveira

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 21/02/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

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, Fernanda de Lima

Estudo in vitro do perfil metabólico do agente antitumoral piplartina frente às enzimas do citocromo P450 e predição de parâmetros farmacocinéticos. Ribeirão Preto, 2017.

212 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: De Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes

- 1. Piperlongumine 2. Microssomas hepáticos humanos.
- 3. Interação produto natural-medicamento 4. Metabolismo in vitro 5. CYP450

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda de Lima Moreira

Estudo in vitro do perfil metabólico do agente antitumoral piplartina frente às enzimas do citocromo P450 e predição de parâmetros farmacocinéticos

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

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Anderson Rodrigo Moraes de

Oliveira

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof.Dr		
Instituição:	Asinatura:	
Prof.Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.Dr.		
	Assinatura:	
Prof.Dr		
Instituição:		

Dedicatória

À minha mãe Luciana e à minha irmã Marcela por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida À minha querida Rosária por todas as orações Ao meu orientador Anderson por todos os ensinamentos, incentivo e amizade

Agradecimentos

À Deus por me guiar e guardar durante esta etapa da minha vida.

Aos Professores Doutores Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira e Norberto Peporine Lopes pela orientação, confiança e amizade, exemplos de profissionais dedicados e competentes que contribuíram positivamente para minha formação profissional. Ficam aqui minha eterna gratidão, respeito e admiração.

À minha mãe Luciana por estar presente em todos os momentos, sempre me dando suporte emocional para vencer as batalhas do dia a dia e por não medir esforços para que eu atingisse meus objetivos.

À minha irmã Marcela pela amizade, carinho, incentivo e ajuda na superação das minhas dificuldades.

Aos meus familiares pelo carinho e torcida pelo meu êxito, gostaria de agradecer em especial à tia Lucineire e Juliana pela paciência e pelos conselhos dados. Aos meus afilhados Daniel e Rafael pela leveza e felicidade que dão a minha vida. Ao meu padrasto Flávio por toda paciência e ajuda. Ao meu pai Jairo pelo carinho e apoio incondicional. Aos meus avós queridos (in memorian), Vó Meiga e Vô Alaor por todo o amor que dedicaram a mim. A minha amiga Carol, minha irmã de coração, por todas as risadas, conselhos e momentos bons vividos durante estes anos.

A todos os membros do Laboratório de Metabolismo in vitro e Técnicas de Separação pela amizade e experiência compartilhada. Agradeço em especial à Maísa, com quem realizei grande parte do trabalho, obrigada pela paciência e dedicação ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Vessecchi por todo os ensinamentos sobre elucidação estrutural.

Ao Dr. Alan Cesar Pilon e à Profa. Dra. Vanderlan Da Silva Bolzani da UNESP de Araraquara pelo suporte nas análises por RMN.

Ao Prof. Dr. Zeruesenay Desta por ter aberto as portas para o estágio no exterior.

À Profa. Dra. Sara K. Quinney por ter me recebido em seu laboratório e por toda a disponibilidade e auxílio durante a execução do meu projeto de doutorado sanduíche.

Aos demais membros do Departamento de Farmacologia Clínica da Escola de Medicina da Universidade da Indiana, Indianápolis, Estados Unidos.

Ao Departamento de Química da USP-Ribeirão Preto pelo suporte à pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP e profissionais envolvidos pela oportunidade em realizar este trabalho.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES (bolsa de doutorado sanduíche número do processo: 99999.003269/2015-09) e em especial à FAPESP pela bolsa concedida (número processo: 2013/04188-4).

Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo universo conspira a seu favor. (Goethe)

RESUMO

MOREIRA, F. L. Estudo in vitro do perfil metabólico do agente antitumoral piplartina frente às enzimas do citocromo P450 e predição de parâmetros farmacocinéticos. 2017. 212 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A piplartina (PPT) ou piperlongumine é um produto natural da classe dos alcaloides encontrada em espécies da família Pipereaceae. Devido a sua alta potência e seletividade na inibição de diversas linhagens de células tumorais, a PPT têm sido investigada como um potencial candidato à fármaco. Neste contexto, estudos relacionados à sua toxicidade e segurança devem ser realizados, incluindo a determinação do papel das enzimas do Citocromo P450 (CYP450) sobre o metabolismo da PPT. Esta família de enzimas é responsável pela biotransformação de cerca de 75% dos fármacos presentes no mercado. Os estudos pré-clínicos que visam avaliar o metabolismo podem ser realizados empregando modelos in vitro como uma ferramenta para predição de características farmacocinéticas in vivo. Assim, o presente estudo teve como objetivo a avaliação do perfil metabólico da PPT frente as enzimas do CYP450 empregando-se estudos in vitro com microssomas hepáticos humanos (HLM) e a posterior predição de parâmetros farmacocinéticos. Estes estudos incluíram a determinação de parâmetros enzimáticos, estudos de inibição da PPT sobre as principais isoformas do CYP450, elucidação estrutural de metabólitos gerados com a reação de metabolismo e, finalmente, estudos de fenotipagem enzimática. A metodologia geral de estudo de metabolismo in vitro envolveu o uso de técnicas cromatográficas acopladas a diversos detectores/analisadores, tais como arranjo de diodos, espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. O metabolismo foi avaliado pela medida da taxa de desaparecimento da PPT do meio microssomal. Após validação da metodologia para quantificação da PPT e determinação das condições de velocidade inicial de reação, um perfil sigmoidal foi obtido, indicando o metabolismo da PPT por enzimas contendo múltiplos sítios ativos e/ou catálise por diversas enzimas concomitantemente. Os parâmetros cinéticos calculados foram $V_{max} = 5.5 \pm 0.5$ nmol mg proteína⁻¹ min⁻¹, $S_{50} = 127.70$ μmol L⁻¹ e Coeficiente de Hill (h) = 3. O clearance intrínseco obtido foi de 22,68 μL min ⁻¹ mg ⁻¹. A fração não ligada às proteínas plasmáticas e microssomais foi de 0,07 e 0,76, respectivamente. O clearance in vivo predito foi de 19,79 mL min ⁻¹ kg ⁻¹, o clearance hepático de 1,89 mL min ⁻¹ kg ⁻¹ e extração hepática de 0,09. Dentre quatro isoformas avaliadas, CYP3A, CYP2C9, CYP2D6 e CYP1A2, a PPT demonstrou um potencial em causar interação produto natural-medicamento apenas sobre a CYP1A2. A PPT é um inibidor competitivo dose-dependente da CYP1A2, apresentando um valor de Kide 1,5 µmol L-1. A razão [I]/Ki obtida de 9,1 prediz uma interação relevante in vivo. Além disso, a PPT apresentou uma inibição tempo-dependente sobre a CYP1A2 com valores de K_I de 8 µmol L⁻¹ e k_{inact} de 0,014 min⁻¹. A inibição dose-, NADPH- e tempo-dependente confirmam uma inibição baseada no mecanismo em que o modo pelo qual a PPT liga-se à enzima é irreversível. Baseado nos dados obtidos pelas análises por espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear, quatro metabólitos gerados após metabolismo da PPT com HLM tiveram suas estruturas propostas. Assim, foram caracterizados os metabólitos M1 (produto de uma desmetilação na posição meta do anel 3,4,5-trimetoxicinâmico). M2 (produzido por uma epoxidação entre o C3 e C4 do anel lactâmico), M3 (gerado através de uma oxidação no C5 do anel lactâmico) e, finalmente, M4 (produto de uma reação transdiidrodiol entre C3 e C4). O metabólito M4 é formado tardiamente (após 40 min de reação) e provavelmente é um metabólito secundário produzido a partir de M2 através de uma reação trans-diidrodiol. O estudo de fenotipagem demonstrou que as principais isoformas que contribuem para o metabolismo da PPT são a CYP1A2 (formação de M1) e a CYP3A4 (formação de M2 e M3). O emprego das isoformas recombinantes demonstrou a formação de M4 a partir da catálise por diversas isoformas, CYP2C19, CYP2C8, CYP2D6, CYP2B6 e CYP2E1. Portanto, o perfil metabólico do candidato a agente antitumoral PPT frente às enzimas do CYP450 foi demonstrado neste trabalho, proporcionando aspectos relacionados à segurança e eficácia desta substância. Os dados apresentados certamente servirão como guia em estudos clínicos futuros.

Palavras-chave: Piperlongumine, Produto Natural, CYP450, Microssomas Hepáticos Humanos, Interação Produto Natural-Medicamento

ABSTRACT

MOREIRA, F. L. Metabolic profile of the antitumor agent piplartine by Cytochrome P450 enzymes, in vitro study and prediction of pharmacokinetic parameters. 2017. 212 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Piplartine (PPT) or Piperlongumine is a naturally occurring alkaloid found in species of Pipereaceae family. Due its high potency and selectivity of inhibition of several cancer cell lines, PPT has been investigated as a potential drug candidate. In this context, studies related with toxicity and safety should be performed, including the role of the Cytochrome P450 (CYP450) enzymes in PPT metabolism. This family of enzymes is responsible for the biotransformation of 75% of the drugs in the market. The preclinical studies that aim to evaluate the drug metabolism can be performed by employing in vitro models as a tool for prediction of in vivo pharmacokinetic characteristics. Therefore, the aim of this work was to evaluate the metabolic profile of PPT after metabolism by CYP450 enzymes employing in vitro studies with human liver microsomes (HLM) and the ensuing prediction of pharmacokinetic parameters. These studies embraced the kinetic parameters determination, inhibition ability of PPT over the most important CYP450 isoforms, structural elucidation of the produced metabolites after metabolism reaction and, finally, the enzymatic phenotyping study. The general procedure for in vitro metabolism studies consisted of the use of chromatographic techniques coupled to different detectors/analyzers, such as diode array, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The metabolism was evaluated measuring the rate of disappearance of the PPT from de microsomal medium. After method validation for PPT quantification and determination of initial velocity conditions, the enzymatic kinetics with a sigmoidal profile indicating a metabolism of PPT by enzymes with multiple active sites and/or metabolism by multiple CYP450 enzymes was observed. The following parameters were calculated: V_{max} = 5.5 ± 0.5 nmol/mg protein/min, $S_{50} = 127.7$ µmol/L, and Hill coefficient of 3.0. The intrinsic clearance was 22.68 µL min ⁻¹ mg ⁻¹. The unbound fraction of PPT on plasmatic and microsomal proteins was 0.07 and 0.76, respectively. The predicted in vivo clearance was 19.79 mL min ⁻¹ kg ⁻¹, the hepatic clearance was 1.89 mL min ⁻¹ kg ⁻¹ and the hepatic extraction was 0.09. Among 4 isoforms evaluated, CYP3A, CYP2C9, CYP2D6 and CYP1A2, a potential natural product-drug interaction for only CYP1A2 isoenzyme by PPT was observed. PPT showed to be a competitive and dosedependent inhibitor of CYP1A2, showing a K_i value of 1.5 µmol L⁻¹. The ratio [I]/K_i of 9.1 predicts an important in vivo interaction. Furthermore, a time-dependent inhibition of CYP1A2 with a K_I of 8 µmol L⁻¹ and a k_{inact} of 0.014 min⁻¹ by PPT was demonstrated. The dose-, time- and NADPH-dependent inhibition confirms an inhibition based on mechanism through an irreversible bond. Based on results obtained from the mass spectrometry analysis and from the nuclear magnetic resonance analysis, four metabolites were identified and characterized. The metabolites characterized were: M1 (product of a demethylation in the 3,4,5-trimethoxyphenyl portion, M2 (derived from an epoxidation between C3 and C4 on the lactone ring), M3 (product of a simple oxidation on C5 of lactone ring), and finally M4 (derived from a dihydrodiol reaction between C3 and C4). The metabolite M4 is produced later (after 40 min of reaction) and probably is a secondary metabolite produced from M2 through a dihydrodiol reaction. The phenotyping study demonstrated that the main isoforms involved in PPT metabolism are CYP1A2 (production of M1) and CYP3A4 (production of M2 and M3). The recombinant isoforms study demonstrated that several isoforms (CYP2C19, CYP2C8, CYP2D6, CYP2B6 and CYP2E1) catalyze the production of M4. In summary, a wide view about the metabolism of the promising drug candidate PPT by CYP450 enzymes was accomplished. These results, certainly, will be a useful guide for further clinical studies of PPT.

Keywords: Piperlongumine, Natural product, CYP450, Human liver microsomes, natural product-drug interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Figura 2-	Estrutura química da morfina e do ácido acetilsalicílico Estrutura química de compostos derivados de plantas e que são	2
rigula 2-	utilizados no tratamento de câncer	3
Figura 3-	Estrutura química da piplartina (PPT) ou piperlongumine	4
Figura 4-	Etapas do desenvolvimento de um novo medicamento	7
Figura 5-	As três fases do metabolismo/transporte de fármacos	9
Figura 6-	A) Abundância relativa das enzimas do CYP450 hepáticas em humanos, B) Contribuição relativa de cada isoforma do CYP450	J
	no metabolismo de fármacos	11
Figura 7-	Contribuição das enzimas do CYP450 na catálise de produtos	
	naturais	11
Figura 8-	Estrutura do bosetan e seus dois possíveis fragmentos com <i>m/z</i> 202	18
Figura 9-	a) Cinética de saturação sigmoidal. b) Gráfico de Eadie-Hofstee para o comportamento sigmoidal	20
Figura 10-	a) Cinética bifásica. b) Gráfico de Eadie-Hofstee para o comportamento bifásico	22
Figure 11	a) Cinética de inibição pelo substrato. b) Gráfico de Eadie-	22
Figura 11-	,	22
Figura 12-	Hofstee para a cinética de inibição pelo substrato	22
J	Inibição reversível. a) Competitiva; b) Não-competitiva; c) Incompetitiva; d) Mista	27
Figura 13-	Representação gráfica dos tipos de inibição reversível	28
Figura 14-	Modos de inibição tempo-dependente sobre a CYP450	29
Figura 15-	Deslocamento no espectro absorção da troleandomicina devido	
	à ligação quasi-irreversível formada entre o metabólito nitroso da	
	troleandomicina e o Fe(II) presente no grupamento heme do CYP450	31
Figura 16-	Representação esquemática das etapas envolvidas em uma	
E'	inibição irreversível	32
Figura 17-	Recomendações do FDA empregando a correlação IVIV dos	26
Eiguro 10	dados de inibição reversível	36 45
Figure 18-	Estrutura química da carbamazepina	45
Figura 19-	Cromatograma representativo do branco microssomal sem a adição de PPT e padrão interno (A). Meio microssomal fortificado	
	com o padrão interno (IS) 500 µg mL ⁻¹ e a PPT (1) 180 µg mL ⁻¹	
	(B)	51
Figura 20-	Injeção de uma amostra "branco" após injeção do analito na	J 1
r igura 20	concentração equivalente ao limite superior de quantificação	54
Figura 21-	Efeito da variação da quantidade de proteínas no consumo do	J 1
. 19414 21	substrato	55
Figura 22-	Efeito da variação do tempo de incubação no consumo do	55
gara _	substrato	56

Figura 23-	Sigmoide obtida para o estudo de metabolismo in vitro da PP1	57
Figura 24-	Gráfico de Eadie-Hofstee após o metabolismo da PPT pelas enzimas do CYP450	58
Figura 25-	Substratos e marcadores da reação específica de cada isoforma	
	do CYP450 avaliada	71
Figura 26-	Inibidores seletivos de cada isoforma do CYP450 avaliada	71
Figura 27-	Avaliação da inibição sobre a CYP1A2. Determinação do IC ₅₀ A) do inibidor seletivo α-naftoflavona e B) da PPT	79
Figura 28-	Cromatogramas obtidos após extração líquido-líquido dos analitos em HLM. Pico 1, acetaminofeno e pico 2, cafeína em A) 272 nm e B) 245 nm; branco de meio microssomal em C) 272 nm e D) 245 nm	80
Figura 29-	A) Gráfico de Lineweaver-Burk obtido do estudo cinético da Odeetilação da fenacetina frente à CYP1A2. B) Gráfico Secundário obtido através dos coeficientes angulares do gráfico de Linewever-Burk versus concentração de PPT (inibidor)	83
Figura 30-	A) Gráfico de decaimento Log-linear da atividade da CYP1A2 versus tempo de pré-incubação com a PPT. B) Gráfico Secundário obtido a partir dos coeficientes angulares do gráfico de decaimento log-linear da atividade da CYP1A2 versus	
Figura 31-	concentração de PPT Estudo da influência do NADPH e do tempo de pré-incubação sobre a taxa de inibição da CYP1A2 pela PPT monitorando-se a quantidade de acetaminofeno produzido	86 87
Figura 32-	Espectro de UV-VIS monitorado durante a reação de metabolismo da PPT monitorada em uma faixa de tempo de 1 a 40 min	87
Figura 33-	Destaque na região de 390 a 510 nm no espectro de UV-VIS monitorado durante a reação de metabolismo da PPT, região em que ocorre o deslocamento no espectro para moléculas que se ligam quasi-irreversivelmente à CYP450	88
Figura 34-	Espectro de UV-VIS obtido para um controle (vermelho), sem adição de NADPH e para uma amostra (preto) que sofreu metabolismo	88
Figura 35-	Grupamentos químicos geralmente relacionados com a inibição quasi-irreversível do CYP450 estão destacados em vermelho. A) metilenodioxifenil, B) hidrazina e C) alquil amina	89
Figura 36-	Avaliação da inibição sobre a CYP3A. Determinação do IC ₅₀ A) do inibidor seletivo cetoconazol e B) da PPT	92
Figura 37-	Avaliação da inibição sobre a CYP2C9. Determinação do IC _{50.} A) do inibidor seletivo sulfafenazol e B) da PPT	93
Figura 38-	Avaliação da inibição sobre a CYP2D6. Determinação do IC ₅₀ . A)	
•	do inibidor seletivo quinidina e B) da PPT	94

Figura 39-	A) (A) Cromatograma representativo do branco microssomal sem a adição de piplartina, B) Cromatograma ampliado da	
Figura 40-	amostra de PPT que sofreu metabolismo Espectros de absorção no UV-Vis. Número 3) corresponde à PPT	104
	e números 1), 2) e 4) aos prováveis metabólitos. Intervalo de absorção: 190 a 800 nm	105
Figura 41-	Cromatograma obtido através da análise por CG-EM para análise da piplartina e seus metabólitos	106
Figura 42-	Estrutura da PPT e seu respectivo íon-produto, o qual é usado para o diagnóstico, <i>m/z</i> 221	107
Figura 43-	Espectro de massas da PPT, t _R 40,26 min (PPT), obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons	108
Figura 44-	Proposta de fragmentação para os íons da PPT empregando o impacto de elétrons, t _R 40,26 min	108
Figura 45-	Espectro de massas do composto <i>O</i> -desmetilado, t _R 41,37 min (M1) obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons	109
Figura 46-	Proposta de fragmentação para os íons do metabólito <i>O</i> -desmetilado da PPT (M1) empregando o impacto de elétrons, t _R 41,37 min	110
Figura 47-	Espectro de massas do composto epoxidado, t _R 41,64 min (M2) obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons	111
Figura 48-	Proposta de fragmentação para os íons do metabólito epoxidado (M2) empregando o impacto de elétrons, t _R 41,64 min	112
Figura 49-		113
Figura 50-	Proposta de fragmentação para os íons do metabólitomono- hidroxilado (M3) empregando o impacto de elétrons, t _R 42,57 min	113
Figura 51-	Espectro de massas do composto di-hidroxilado seguido de redução, t _R 43,41 min (M4) obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons	114
Figura 52-	Proposta de fragmentação para os íons do metabólitoque sofreu redução e di-hidroxilação (M4) empregando o impacto de elétrons, t _R 43,41 min	115
Figura 53-	Estruturas químicas propostas a partir da análise por CG-EM dos metabólitos da PPT após metabolismo por HLM	117
Figura 54- Figura 55-	Mapa de potencial eletrostático molecular da piplartina Cromatograma de CL obtido a 325 nm, correspondendo à análise da PPT após reação com HLM. CL-EM-IT operando no modo	118
	positivo e negativo	119

Figura 56-	Espectro de massas no modo positivo da PPT, através da análise	121
Figura 57-	por CL-EM-IT Espectro de massas no modo negativo da PPT, através da	
	análise por CL-EM-IT	121
Figura 58-	Via de fragmentação da PPT protonada, através do emprego do CL-EM-IT	122
Figura 59-	Espectro de massas no modo positivo de M1, através da análise por CL-EM-IT	123
Figura 60-	Espectro de massas no modo negativo de M1, através da análise por CL-EM-IT	123
Figura 61-	Mecanismo de fragmentação para o metabólito M1 protonado, através do emprego do CL-EM-IT	124
Figura 62-	Mecanismo de fragmentação para o metabólito M1 desprotonado, através do emprego do CL-EM-IT	124
Figura 63-	Espectro de massas no modo positivo de M2, através da análise por CL-EM-IT	125
Figura 64-	Mecanismo de fragmentação para o metabólito M2 protonado, através do emprego do CL-EM-IT	125
Figura 65-	Mecanismo hipotético de detoxificação de M2 a partir da conjugação com GSH	127
Figura 66-	Espectro de massas no modo positivo de M3, através da análise por CL-EM-IT	128
Figura 67-	Espectro de massas no modo negativo de M3, através da análise por CL-EM-IT	128
Figura 68-	Mecanismo de fragmentação para o metabólito M3 protonado, através do emprego do CL-EM-IT	129
Figura 69-	Mecanismo de fragmentação para o metabólito M3 desprotonado, através do emprego do CL-EM-IT	129
Figura 70-	Espectro de massas no modo positivo de M4, através da análise por CL-EM-IT	130
Figura 71-	Espectro de massas no modo negativo de M4, através da análise por CL-EM-IT	130
Figura 72-	Mecanismo de fragmentação para o metabólito M4 protonado, através do emprego do CL-EM-IT	131
Figura 73-	Mecanismo de fragmentação para o metabólito M4 desprotonado, através do emprego do CL-EM-IT	131
Figura 74-	Cromatograma de EM obtido a partir do TIC no modo positivo, correspondendo a análise da PPT após o metabolismo com HLM	132
Figura 75-	Estrutura química da PPT, M1, M2, M3 e M4	137
Figura 76-	Formação relativa dos metabólitos da PPT com o tempo de incubação (<i>Time Course</i>)	144
Figura 77-	Formação do metabólito secundário M4 a partir da hidrólise de	
J	M2	145

Estudo de Fenotipagem sob tempo de incubação de 10 min. A) Inibição do metabolismo da PPT por inibidores seletivos. Inibidores químicos respectivos (CYP inibida): sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4), α-naftoflavona (CYP1A2), quinidina (CYP2D6). B) Formação dos metabólitos da PPT através da reação com as isoformas humanas recombinantes do	
CYP450	146
Estudo de Fenotipagem sob tempo de incubação de 50 min. A) Inibição do metabolismo da PPT por inibidores seletivos. Inibidores químicos respectivos (CYP inibida): sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4), ticlopidina (CYP2C19), α-naftoflavona (CYP1A2), quinidina (CYP2D6), dietilcarbamato (CYP2E1), orfenadrina (CYP2B6), pilocarpina (CYP2A6), montelukast (CYP2C8). B) Formação dos metabólitos da PPT através da reação com as isoformas humanas recombinantes do	
CYP450	147
Formação de M2 e M4 após incubação da PPT com HLM na presença (+) e ausência (-) de ácido valproico (AV) (inibidor da	
epóxido hidrolase)	151
Enzimas da família CYP450 hepáticas envolvidas no metabolismo da PPT	152
	Inibição do metabolismo da PPT por inibidores seletivos. Inibidores químicos respectivos (CYP inibida): sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4), α-naftoflavona (CYP1A2), quinidina (CYP2D6). B) Formação dos metabólitos da PPT através da reação com as isoformas humanas recombinantes do CYP450

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Principais rotas de eliminação dos fármacos através do	
T 0	metabolismo	9
Tabela 2-	Diferença de massa comuns em reações de Fase I	16
Tabela 3-	Dados da linearidade do método desenvolvido para	
	quantificação da PPT em HLM	52
Tabela 4-	Limite de quantificação, precisão e exatidão intra- e	
	interensaio para análise da PPT em meio microssomal	52
Tabela 5-	Efeito de matriz para análise da PPT em meio microssomal	53
Tabela 6-	Estabilidade de bancada, de incubação e de autoinjetor	53
Tabela 7-	Parâmetros farmacocinéticos preditos	61
Tabela 8-	Condições de preparo de amostras empregando-se a extração	
	líquido-líquido	68
Tabela 9-	Condições cromatográficas para o estudo de cada isoforma do	
	CYP450	69
Tabela 10-	Isoformas do CYP450 de humanos e seus respectivos	
	substratos padrões, marcadores de reação e inibidores	
	seletivos	70
Tabela 11-	Condições empregadas na determinação do IC ₅₀	74
Tabela 12-	Linearidade do método desenvolvido para análise do	
	acetaminofeno em HLM	81
Tabela 13-	Precisão e exatidão para análise do acetaminofeno em HLM	81
Tabela 14-	Inibição da CYP1A2 pela PPT	90
Tabela 15-	Substratos da CYP1A2 que participam de interações	
145014 10	medicamentosas clinicamente relevantes	91
Tabela 16-	Porcentagem relativa da PPT e seus metabólitos durante a	0.
Tabela 10	reação de metabolismo microssomal	107
Tabela 17-	Principais fragmentos obtidos com CG-EM para a PPT e seus	107
Tabela 17	respectivos metabólitos	116
Tabela 18-	•	110
Tabela 10-	para a PPT e seus produtos de metabolismo empregando-se	
		100
Tabala 10	CL-EM-IT	120
Tabela 19-	Dados da massa exata da PPT e seus metabólitos	400
T. I I 00	empregando-se CL-EM-TOF	132
Tabela 20-	Deslocamento químico dos prótons das substâncias PPT, M1,	405
T 04	M2, M3 e M4	135
Tabela 21-	Deslocamentos químicos de ¹³ C da PPT e M3	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C_{max} Concentração máxima alcançada

CG-EM Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CL Clearance total in vivo
CL_{int} Clearance intrínseco
CL_H Clearance hepático

CLAE Cromatografia liquida de alta eficiência

CLAE-DAD Cromatografia liquida de alta eficiência acoplada ao detector de

arranjo de diodos

CL-EFS-RMN Cromatografia líquida acoplada ao sistema de concentração de

amostras através da extração em fase sólida e análise por

ressonância magnética nuclear

CQA Controle de qualidade alto
CQB Controle de qualida baixo
CQM Controle de qualidade médio

CYP450 Citocromo P450

Da Unidade de medida em Daltons

DPR Desvio padrão relativo
E Taxa de extração hepática

EMA do inglês, European Medicine Agency

ER Erro relativo
ESI Eletrospray

EUA Estados Unidos da América

FDA do inglês, Food and Drug Administration

fu_{mic} Fração livre do composto no meio microssomal

fu_{plasma} Fração livre do composto no plasma

H Coeficiente de Hill

HLM do inglês, Human Liver Microsomes, microssomas hepáticos

humanos

IBM Inibição baseada no mecanismo

[I] Concentração do inibidor

IC₅₀ Concentração do composto teste que inibe 50% da atividade

enzimática

IT do inglês, *ion trap* IVIV In vitro-in vivo

KH₂PO₄ Fosfato de potássio monobásico

K_i Constante de inibição necessária para alcançar metade da

velocidade máxima de inativação para a inibição reversível

Kı Constante de inibição necessária para alcançar metade da

velocidade máxima de inativação para a inibição irreversível

k_{inact} Velocidade máxima de inativação para a inibição irreversível

K_m Constante de Michaelis-MentenLIQ Limite inferior de quantificação

MALDI Matriz assistida por dessorção/ionização

MIC do inglês, Metabolite Intermediate Complex, complexo

metabólico intermediário

MR Metabólito reativo

MS² Espectrometria de massas em dois estágios MS³ Espectrometria de massas em três estágios

m/z Razão massa carga

NADP+ Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada
NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
PhRMA do inglês, *Pharmaceutical Research and Manufacturers of*

America

PI Padrão Interno PN Produto natural

PPT Piplartina

Q Fluxo sanguíneo hepático

Q-LIT do inglês, *Quadrupole Linear Ion Trap*Q-TOF do inglês, *Quadrupole-Time of Flight*

REL Retículo Endoplasmático Liso

rhCYP Isoformas humanas recombinantes do CYP450

RMN Ressonância Magnética Nuclear

S₅₀ Concentração necessária para atingir metade da velocidade

enzimpatica máxima, usada para cinéticas sigmoidais

t_{1/2} Tempo de meia-vida

UGT UDP-glucuronosiltransferase

UV Ultravioleta

UV-VIS Ultravioleta-Visível

V_D Volume de distribuição

V_{max} Velocidade máxima da reação

V₀ Velocidade inicial

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de figuras	٧
Lista de tabelas	Χ
Lista de abreviaturas e siglas	xi
CAPÍTULO 1	
Revisão Bibliográfica	2
1.1 Produtos Naturais: Fonte de novos fármacos	2
1.1.1 Piplartina (PPT) ou Piperlongumine: um agente antitumoral	
promissor	3
1.2 Estudos de metabolismo in vitro: Etapa essencial durante o	
desenvolvimento de um novo fármaco	6
1.3 Metabolismo de fármacos pelo organismo humano	8
1.3.1 CYP450: pluralidade na ação catalítica	10
1.3.2 CYP3A4 na catálise de produtos naturais	11
1.4 Modelos empregados no metabolismo in vitro	12
1.4.1 Novas metodologias de metabolismo in vitro	14
1.5 Identificação e caracterização dos metabólitos obtidos a partir das	
reações de metabolismo	15
1.5.1 Ferramentas na elucidação estrutural de metabólitos: Espectrometria	
de Massas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	17
1.6 Cinética enzimática in vitro aplicada a enzimas que metabolizam	
fármacos	19
1.7 Reação de Fenotipagem Enzimática: Identificando as enzimas	
responsáveis pelo	
metabolismo	23
1.8 Estudos de inibição enzimática in vitro: Predição de interações	
medicamentosas in vivo	24
1.8.1 Inibição Reversível	26
1.8.2 Inibição Baseada no Mecanismo (Mechanism-Based Inhibition)	
(MBI)	29
1.8.2.1 Inibição quasi-irreversível	30
1.8.2.1.1 Complexo Metabólico Intermediário (<i>Metabolite Intermediate</i>	
Complex) (MIC)	30
1.8.2.2 Ligação Irreversível	31
1.8.2.2.1 Modificação covalente da apoproteína	31
1.8.2.2.2 Destruição do grupamento heme	31
1.8.2.3 Cinética da Inibição Baseada no Mecanismo	32
1.9 Aplicações dos estudos in vitro: Predição do comportamento in	
vivo	33
1.9.1 Extrapolação IVIV do Clearance	34

1.9.2 Extrapolação IVIV dos estudos de inibição	36
OBJETIVO GERAL DO TRABALHO	39
CAPÍTULO 2	
	41
	41
	41
- · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	41
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.2.1 Materiais	41
	41
2.2.1.2 Obtenção do produto natural PPT	42
2.2.1.3 Equipamentos em geral	42
2.2.1.4 Análises cromatográficas por cromatografia liquida de alta eficiência	
acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	43
2.2.1.5 Preparo das soluções de PPT e do padrão interno	43
2.2.1.6 Microssomas hepático de humanos (HLM)	43
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	44
	44
2.2.2.1 Procedimento de incubação para o estudo de metabolismo in vitro	44
	45
•	48
2.2.2.4 Determinação da fração não ligada da PPT às proteínas	
	49
•	50
	50
2.3.2 Validação do método analítico para quantificação da PPT no meio	
	51
	54
	59
·	59
~ ~	63
CAPÍTULO 3	
	66
	66
	66
	66
	66
	66
	66
	66
	67
	67
o.z. i. i i ogianido dilizados no processamente de dados	J'

3.2.2 Métodos	68
3.2.2.1 Preparo das amostras e análise cromatográfica dos analitos	68
3.2.2.2 Isoformas do CYP450 estudadas	70
3.2.2.3 Procedimento geral para determinação do IC50	73
3.2.2.4 Validação do método analítico de quantificação do acetaminofeno	75
3.2.2.5 Determinação do mecanismo e da constante de inibição dose-	
dependente (K _i)	75
3.2.2.6 Determinação da inibição baseada no mecanismo (IBM) e da	
constante de inibição tempo-dependente (K _I)	76
3.2.2.7 Determinação da inibição NADPH-dependente	77
3.2.2.8 Natureza da inibição baseada no mecanismo	77
3.2.2.8.1 Complexo Metabólico Intermediário (MIC)	77
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.3.1 Estudos de inibição sobre a CYP1A2	78
3.3.1.1 Validação do método para quantificação do acetaminofeno em	
HLM	80
3.3.1.2 Determinação do Kie do modo de inibição dose-dependente sobre	
a CYP1A2	82
3.3.1.3 Determinação do K_{I} e do k_{inact} e do modo de inibição tempo-	
dependente sobre a CYP1A2	84
3.3.1.4 Determinação da inibição NADPH-dependente	87
3.3.1.5 Pesquisa da formação do MIC	87
3.3.1.6 Piplartina: potencial interação medicamentosa sobre a CYP1A2	89
3.3.2 Estudos de inibição sobre a CYP3A	91
3.3.3 Estudos de inibição sobre a CYP2C9	93
3.3.4 Estudos de inibição sobre a CYP2D6	93
3.4 CONCLUSÕES	94
CAPÍTULO 4	
Elucidação estrutural dos metabólitos da piplartina gerados através da	
reação com enzimas do CYP450	97
4.1 OBJETIVOS	97
4.1.1 Objetivo geral	97
4.1.2 Objetivos Específicos	97
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	97
4.2.1 Materiais	97
4.2.1.1 Reagentes	97
4.2.1.2 Análises Cromatográficas através da cromatografia líquida de alta	•
eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD)	98
4.2.1.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-	
EM)	98
4.2.1.4 Cromatografia liquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria	
de massas (CL-EM-IT)	98

4.2.1.5 Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massas de alta	•
resolução (CL-EM-TOF)	99
4.2.1.6 Cromatografia Líquida acoplada a Extração em Fase Sólida e	
Ressonância Magnética Nuclear (CL-EFS-RMN)	99
4.2.1.6.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	100
4.2.2 Métodos	100
4.2.2.1 Procedimento de incubação para a determinação estrutural dos	
produtos da reação da PPT no meio microssomal	100
4.2.2.2 Estratégia adotada na elucidação estrutural	101
4.2.2.3 Modelo computacional empregado em combinação com os dados	
obtidos com o CL-EM-IT	103
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
4.3.1 Identificação e caracterização estrutural da PPT e seus metabólitos	103
3.3.1.1 Análises por CLAE-DAD	103
4.3.1.2 Análises por CG-EM	105
4.3.1.2.1 Análise Estrutural da PPT	107
4.3.1.2.2 Análise Estrutural do metabólito M1	109
4.3.1.2.3 Análise Estrutural do metabólito M2	111
4.3.1.2.4 Análise Estrutural do metabólito M3	112
4.3.1.2.5 Análise Estrutural do metabólito M4	114
4.3.1.2.6 Resumo dos resultados obtidos com CG-EM	115
4.3.1.3 Análises por CL-EM-IT	117
4.3.1.3.1 Estudo computacional de reatividade da PPT	117
4.3.1.3.2 Estudo de fragmentação da PPT e seus metabólitos empregando	
CL-EM-IT	118
4.3.1.3.2.1 Análise estrutural da PPT	120
4.3.1.3.2.2 Análise estrutural do metabólito M1	122
4.3.1.3.2.3 Análise estrutural do metabólito M2	124
4.3.1.3.2.4 Análise estrutural do metabólito M3	127
4.3.1.3.2.5 Análise estrutural do metabólito M4	129
4.3.1.4 Análises por CL-EM-TOF	130
4.3.1.5 Análise da PPT por RMN	133
4.3.1.5.1 Análise da PPT e seus metabólitos por CL-EFS-RMN	133
4.4 CONCLUSÕES	137
CAPÍTULO 5	
Determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo	
metabolismo da piplartina (fenotipagem enzimática)	140
5.1 OBJETIVOS	140
5.1.1 Objetivo Geral	140
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	140
5.2.1 Materiais	1/10

5.2.1.1 Reagentes	140
5.2.1.2 Análises Cromatográficas	141
5.2.1.3 Programa utilizado no processamento de dados	141
5.2.2 Métodos	141
5.2.2.1 Monitoramento da produção de metabólitos com o tempo	141
5.2.2.2 Estudo de Fenotipagem	141
5.2.2.2.1 Inibidores químicos seletivos do CYP450	141
5.2.2.2 Estudo com as isoformas recombinantes do CYP450	143
5.2.2.3 Inibidor seletivo da epóxido hidrolase	143
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	144
5.3.1 Monitoramento da produção dos metabólitos com o tempo	144
5.3.2 Estudo de Fenotipagem	145
5.3.3 Emprego do inibidor seletivo da epóxido hidrolase	150
5.4 CONCLUSÕES	152
~	
CONCLUSÕES FINAIS	155
REFERÊNCIAS	158
APÊNDICES	177
ANEXO	187

CAPÍTULO 1 Revisão bibliográfica

CAPÍTULO 1

Revisão bibliográfica

1.1 Produtos Naturais: Fonte de novos fármacos

Através da história, verifica-se o importante papel da natureza, especialmente das plantas, como uma fonte rica para o desenvolvimento de novos fármacos (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014). Os primeiros relatos do uso das plantas na medicina data de 2600 a.C., em um documento que reuniu aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia (CRAGG; NEWMAN, 2013). Com o passar do tempo, as substâncias isoladas de plantas inspiraram o desenvolvimento da síntese destas moléculas ou derivados em larga escala. Assim, foram produzidos os primeiros produtos naturais (PNs) puros e disponíveis comercialmente, tais como a morfina em 1826, por E. Merck e o primeiro fármaco semi-sintético baseado em PN, a aspirina em 1899, por Bayer (Figura 1). Ressaltando-se a importância desta fonte de novos medicamentos, pode-se citar que entre os 1135 novos fármacos aprovados pelo FDA no período de 1981 a 2010, 50% apresentaram relação estrutural com algum PN (NEWMAN: CRAGG, 2012).

Figura 1- Estrutura química da morfina e do ácido acetilsalicílico.

Atualmente, os PNs continuam inspirando a produção de novos medicamentos e o estudo destas substâncias tem sido focado sobre a descoberta de novos antibióticos e fármacos destinados ao tratamento do câncer. A Figura 2 demonstra a estrutura química de diversos compostos usados atualmente no tratamento de câncer

e que foram baseados em compostos encontrados em plantas. A alta potência e a seletiva bioatividade adquirida pelas plantas durante seu processo evolucionário são aproveitadas pelo homem para tratamentos terapêuticos que necessitam destes mesmos requisitos para alcançar os efeitos desejados em um medicamento clinicamente relevante (CRAGG et al., 2014). Além disso, a outra razão de interesse nestas substâncias é a diversidade estrutural que as compõe (CRAGG et al., 2014).

Figura 2- Estrutura química de compostos derivados de plantas e que são utilizados no tratamento de câncer. 1) Vimblastina; 2) Vincristina; 3) Etoposídeo (R= CH_3), Teniposídeo (R= α -tiazol); 4) Paclitaxel; 5) Taxotere (R= H), Cabzitaxel (R= CH_3), 6) Camptotecina; 7) Irinotecano; 8) Belotecano. Baseado em CRAGG; NEWMAN, 2013.

1.1.1 Piplartina (PPT) ou Piperlongumine: um agente antitumoral promissor

A piplartina (PPT), (E)-1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acriloil)-5,6-diidropiridin-2(1H)-ona (Figura 3), é um alcaloide encontrado em muitas espécies do gênero Piper tais como P. *longum* L., *Piper tuberculatum* J. (de Jacq.), *Piper arborescens* Roxb. e *Piper chaba* Hunter (BEZERRA et al., 2013). Estruturas provindas destas plantas são utilizadas em medicinas tradicionais de diferentes culturas, tais como pela medicina

Ayuveda na Índia e pela medicina folclórica latino-americana. Como exemplo, podemos citar a *Piper tuberculatum* J. (de Jacq.), popularmente conhecida como pimenta d'arda, que é utilizada no nordeste do Brasil como um sedativo e como um antídoto para picadas de cobra (FELIPE et al., 2007). A estrutura trans da PPT foi definida em 1984 por Boll et al. utilizando raios-X e análises cristalográficas para tal afirmação (BOLL et al., 1984). Os nomes piplartina e piperlongumine são atribuídos à mesma estrutura, e, apesar do termo piplartina ter sido mais usado na literatura antigamente, a empresa Sigma-Aldrich® adotou comercialmente o nome piperlongumine, o que levou a um aumento na frequência do uso deste segundo termo atualmente (BEZERRA et al., 2013).

$$H_3CO$$
 12 11 10 9 8 7 N 6 5 4 OCH_3

Figura 3- Estrutura química da piplartina (PPT) ou piperlongumine.

A PPT tem recebido um grande destaque no campo científico devido aos seus resultados biológicos promissores. Dimensionando a importância desta substância, uma pesquisa no sítio eletrônico da empresa de registro de patentes *Thomson Reuters Integrity* mostra o registro de oito patentes a respeito de estudos biológicos da PPT ou de estruturas derivadas dela em diversas doenças; na dor durante processos cancerosos; em problemas cognitivos; em desordens cerebrovasculares e cardiovasculares, e, finalmente, contra o câncer (INTEGRITY, 2015). Uma publicação de destaque na renomada revista Nature apresentou a ação citotóxica da PPT sobre 14 linhagens de células tumorais, sem demonstrar efeito sobre 6 linhagens de células normais, indicando-se então, a potente atividade seletiva desta substância sobre o câncer (RAJ et al., 2011). A atividade antitumoral da PPT alcança diversas células tumorais, como revisado por Bezerra et al. (2013), incluindo tumores no cólon, na mama, no pulmão, no sistema nervoso central, no pâncreas, na bexiga, nos rins, na próstata, entre outros (BEZERRA et al., 2013). Este trabalho ainda sumariza os

diferentes mecanismos de ação mostrados pela PPT sobre cada tipo de tumor como, por exemplo, apoptose e metástase.

Recentemente, alguns trabalhos avaliaram o potencial da PPT sobre diferentes linhagens de células cancerosas de mama; estes estudos demonstraram excelentes resultados no tratamento desta doença (BHARADWAJ et al., 2015, SHRIVASTAVA et al., 2014, KIM et al., 2015). Inúmeros fitoquímicos com atividade quimioterápica, apresentam em sua estrutura uma carbonila α,β-insaturada responsável por ativar o Fator Nuclear Eritrocitário 2 (Nrf2). Esta molécula é capaz de ligar-se ao elemento de resposta antioxidante que, por sua vez, ativa a codificação de genes que levam a produção de enzimas e proteínas citoprotetoras. A PPT possui este referido grupamento químico entre os carbonos C7 e C9 e também entre os carbonos C4 e C5, indicando uma das possíveis razões pela qual apresenta atividade antitumoral. Baseado nesta informação, Lee et al. (2015) comprovaram a ação da PPT sobre células cancerosas de mama mediada pela ativação do Nrf2. Além disso, o trabalho indica que a enzima heme-oxigenase 1, também ativada pela PPT, possui funções antitumorais em células cancerosas, mas citoprotetoras em células normais demonstrando, mais uma vez, a seletiva atividade da PPT (KIM et al., 2015). Bharadwaj et al. (2015) descobriram que uma das possíveis vias de ação da PPT sobre este tipo de câncer ocorre através da inibição do Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (STAT 3), uma proteína que está relacionada com diversos aspectos do câncer, tais como, crescimento celular, resistência à apoptose e metástase (BHARADWAJ et al., 2015).

Similar ao efeito sobre tumores sólidos, a PPT também apresenta atividade sobre outras células tumorais tais como no linfoma de Burnet, no qual um estudo demonstrou o efeito citotóxico desta substância ao inibir as principais proteínas relacionadas a este tipo de câncer no sangue, tais como o fator nuclear kappa β e o proto-oncogene MYC (HAN et al., 2013).

A PPT também apresenta atividade contra parasitas causadores de doenças negligenciadas que afetam a população brasileira (BODIWALA et al., 2007; MORAES et al., 2013; MORAES et al., 2011). Empregando-se a dose de 15,8 µM a PPT reduziu a atividade motora do esquistossomo (*Schistosoma mansoni*), causando a morte dentro de 24 horas. Além disso, a PPT também apresentou diminuição na produção

de ovos deste parasita mesmo empregando concentrações sub-letais (6,3 μ M), já empregando-se concentrações acima de 157,6 μ M ela induziu mudanças morfológicas no esquistossomo (MORAES et al. 2011). A PPT também apresenta atividade leishmanicida, o IC₅₀ de 7,5 μ M contra formas promastigotas de *L. donovani* foram demonstrados por Bodiwala et al. (2007) (BODIWALA et al., 2007).

Com isso, verifica-se a necessidade de um estudo completo sobre o destino metabólico da PPT dentro do organismo humano, especialmente, é necessário entender a atuação do citocromo P450 (CYP450) sobre o metabolismo deste candidato a fármaco, uma vez que esta família de enzimas é a principal envolvida na biotransformação de xenobióticos.

1.2 Estudos de metabolismo in vitro: Etapa essencial durante o desenvolvimento de um novo fármaco

Durante as etapas de descoberta de um novo fármaco, destaca-se a etapa préclínica, incluída nas fases iniciais de avaliação de compostos ativos (Figura 4), que visa avaliar parâmetros de segurança e de eficácia através de estudos de toxicidade e de atividade in vitro e in vivo (EVERS et al., 2013). Dentro dos estudos pré-clínicos inserem-se os estudos de metabolismo in vitro que possibilitam a pesquisa durante as duas fases do metabolismo, a fase I de funcionalização e a fase II biosintética (conjugação) (BUXTON, 2011). Através destes estudos é possível determinar as enzimas envolvidas no metabolismo do substrato em estudo (estudos de fenotipagem); predizer possíveis interações medicamentosas, além da possibilidade de estudos mais complexos como a variabilidade genética (estudo de genotipagem) sobre o metabolismo do fármaco. Para avaliar o comportamento metabólico dos fármacos, vários modelos experimentais in vitro podem ser usados, tais como microssomas hepáticos, hepatócitos, frações S9 de fígado e isoformas recombinantes isoladas do CYP450 (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

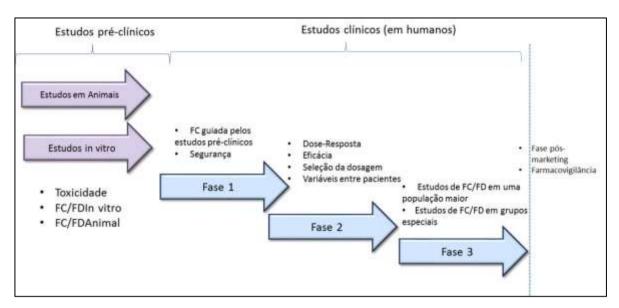


Figura 4- Etapas do desenvolvimento de um novo medicamento. FC: Farmacocinética e FD: Farmacodinâmica. Fonte: Figura baseada em TOZER; ROWLAND, 2006.

Os modelos celulares in vitro são delineados para confinar o estudo de compostos isolados de uma determinada célula ou órgão, simplificando a metodologia de estudo em um ambiente em que as condições experimentais são bem controladas (COSTA; SARMENTO; SEABRA, 2014). O estudo de metabolismo in vitro de uma substância permite a predição do clearance e da possível toxicidade em humanos, além de acessar o potencial deste candidato a fármaco em causar uma possível interação medicamentosa. Além disso, estes modelos permitem entender a rota metabólica, identificar a(s) enzima(s) envolvida(s) no metabolismo e os metabólitos e intermediários formados durante a biotransformação. Finalmente, os estudos in vitro podem ser aplicados a diferentes espécies, permitindo uma correlação entre a variabilidade interespécies, ajudando na escolha do melhor modelo animal a ser utilizado em etapas posteriores do estudo (COSTA; SARMENTO; SEABRA, 2014).

As técnicas in vitro ganharam maior destaque após o desenvolvimento de cálculos que permitem a correlação in vitro-in vivo (IVIV), introduzida por Houston em 1994 (HOUSTON, 1994). A partir dos parâmetros cinéticos enzimáticos obtidos dos estudos in vitro é possível o cálculo do clearance intrínseco e a predição do clearance in vivo (SEIBERT; TRACY, 2014). O clearance ou depuração intrínseca é uma medida da relação dos parâmetros cinéticos enzimáticos para o processo de eliminação e, desta forma, refletem a capacidade máxima da depuração. Esse parâmetro fornece uma estimativa da capacidade intrínseca do organismo em eliminar o fármaco na

ausência de limitações, como as impostas pelo fluxo sanguíneo e ligação às proteínas plasmáticas (SEIBERT; TRACY, 2014).

1.3 Metabolismo de fármacos pelo organismo humano

Um dos aspectos mais importantes da farmacologia é a farmacocinética, que corresponde ao estudo do destino do fármaco desde a administração até a eliminação do organismo. Uma substância ao ser administrada ao organismo sofre os seguintes processos: absorção, distribuição e eliminação. Esta última etapa é dividida em duas fases, a biotransformação ou metabolismo e a excreção. O metabolismo visa transformar os fármacos em metabólitos mais hidrofílicos, etapa necessária para a eliminação destes compostos do organismo e, consequente, término de sua atividade biológica. Nesta fase, enzimas específicas no metabolismo de substâncias possuem um papel fundamental na inativação de fármacos e xenobióticos. No entanto, em alguns casos podem ser gerados metabólitos com atividade biológica ou com propriedades tóxicas. O fígado é o principal órgão relacionado ao metabolismo de substâncias, que contém inúmeras enzimas presentes nos hepatócitos responsáveis pela biotransformação de xenobióticos e substâncias endógenas, tais como os esteroides (BUXTON, 2011).

Os estágios do metabolismo/transporte de fármacos são denominados Fases I de funcionalização, II biosintética e III de transporte através de membranas (Figura 5). A Fase I é catalisada principalmente pelas enzimas da família do CYP450, responsáveis pelas reações de oxidação, redução e hidrólise (COLLEMAN, 2005). A Fase II visa transformar compostos que permaneceram apolares em estruturas altamente solúveis em água. Esta etapa é realizada pela conjugação com compostos endógenos polares tais como açucares (ácido glicurônico), sais (sulfatos) ou aminoácidos (glicina) (COLLEMAN, 2005). Finalmente, a Fase III corresponde ao sistema de transporte dos metabólitos e fármacos realizados através das membranas celulares (COLLEMAN, 2005). A Tabela 1 cita os principais mecanismos de eliminação dos fármacos através do metabolismo e as respectivas enzimas envolvidas (ZIENTEK; YOUDIM, 2015).

Tabela 1- Principais rotas de eliminação dos fármacos através do metabolismo.

Mecanismo de Eliminação	Possíveis enzimas envolvidas
Metabolismo oxidativo	CYP450, AO, FMO, MAO, Peroxidases
Metabolismo de conjugação	UGT, ST, GST, NAT, metil-transferases
Metabolismo hidrolítico	CYP450, Esterases, amidases, epóxido hidrolase
Metabolismo de redução	CYP450, cetoredutase, Mo-CO

AO, Aldeído Oxidase; FMO, Flavina Monoxigenase; GST, Glutationa S-transferase, MAŌ, Monoaminoxidase; Mo-CO, Cofator de molibdénio; NAT, N-acetil transferase; ST, sulfotransferase.

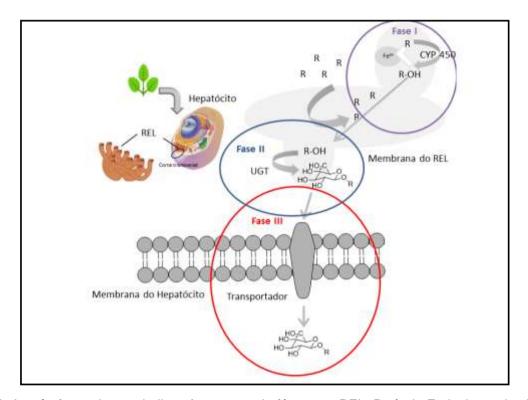


Figura 5- As três fases do metabolismo/transporte de fármacos. REL: Retículo Endoplasmatico Liso, CYP450: Citocromo P450, UGT: UDP-glucuronosiltransferase. R: Fármaco. Fonte: autoria própria.

Agências regulatórias tais como o FDA (*US Food and Drug Administration*) recomendam que se o clearance de um determinado fármaco for afetado por pelo menos 25% ou mais em sua eliminação, um estudo aprofundado sobre esta via de eliminação deve ser realizado para entender o impacto clínico; possíveis interações medicamentosas, farmacogenômica, entre outros fatores relacionados. Assim, a compreensão do destino metabólico de um fármaco é essencial e obrigatório para garantir sua segurança e eficácia (ZIENTEK; YOUDIM, 2015).

1.3.1 CYP450: pluralidade na ação catalítica

O CYP450 compõe uma família de enzimas que possuem em sua estrutura uma parte central comum (centro ativo) e modos similares de atuação (COLLEMAN, 2005). Elas constituem a classe de enzimas mais estudadas com mais de 69.000 artigos publicados até o final de 2013 (RENAULT et al., 2014). Estas enzimas são encontradas em diversas espécies, desde bactérias até os seres humanos. Entre os 57 genes encontrados em humanos, apenas 5 estão envolvidos no metabolismo de fármacos sendo responsáveis por aproximadamente 75% das reações de metabolismo (GUENGERICH, 2012). No corpo humano estas enzimas podem ser encontradas em diversos órgãos, mas concentram-se especialmente nas células do fígado (hepatócitos) atribuindo a este órgão o importante papel na biotransformação de substâncias endógenas e exógenas (CLARKE; JONES, 2008). As enzimas do CYP450 encontram-se em vesículas hidrofóbicas no interior do Retículo Endoplasmático Liso (REL) dos hepatócitos, no qual, o sítio ativo, também conhecido como Ferro Protoporfirina IX, possui um átomo de Fe²⁺ em seu interior. A estrutura da Ferro Protoporfirina IX é basicamente a mesma em todas as isoformas, enquanto que os aminoácidos que envolvem o sítio ativo comandam a flexibilidade e permitem a variedade de reações catalisadas por esta família de enzimas (COLLEMAN, 2005).

Existem três principais famílias de enzimas (CYP 1, 2 e 3) e 11 enzimas individuais do CYP450 (isoformas do CYP450) que são expressas em fígado de humanos saudáveis (CYPs 1A2, 2A6, 2B6, 2C8/9/18/19, 2D6, 2E1 e 3A4/5 (COLLEMAN, 2005). A Figura 6 demonstra a abundância e a participação relativa de cada isoforma do CYP450 no metabolismo de fármacos (GUENGERICH, 2012).

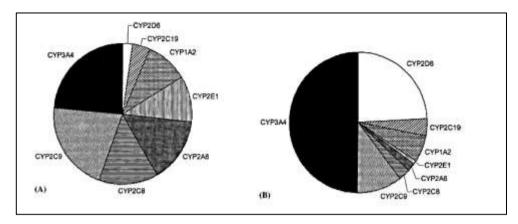


Figura 6- A) Abundância relativa das enzimas do CYP450 hepáticas em humanos, **B)** Contribuição relativa de cada isoforma do CYP450 no metabolismo de fármacos Fonte: CLARKE; JONES, 2008 (Capítulo 3, Figura 1). Reproduzido com permissão de Informa Healthcare (número da licença: 3939340544574).

1.3.2 CYP3A4 na catálise de produtos naturais

Assim como os fármacos sintéticos empregados na prática clínica, os produtos naturais também são metabolizados predominantemente pelas enzimas do CYP450, sendo a CYP3A4 a principal responsável pela catálise, seguida da família CYP2C (Figura 7) (MOREIRA et al., 2016a).

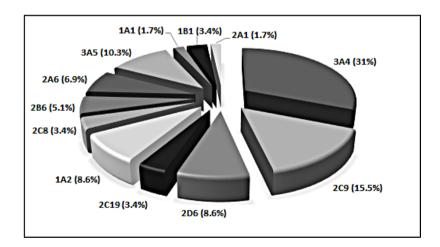


Figura 7- Contribuição das enzimas do CYP450 na catálise de produtos naturais. Período investigado: 2010-2016. Fonte: MOREIRA et al., 2016a (Figura 1). Reproduzido com permissão da Springer (número da licença: 3990820056107).

O consumo de compostos derivados de PNs tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, apenas no ano de 2012 nos Estados Unidos foram gastos um valor estimado a \$5,6 bilhões de dólares com fitoterápicos e derivados (LINDSTROM;

LYNCH; BLUMENTHAL, 2013). No entanto, a administração concomitante destas substâncias com medicamentos alopáticos pode levar às severas interações (BRANTLEY et al., 2014). Com isso, no contexto da polifarmácia, a compreensão da via de eliminação dos PNs é importante no sentido de prever interações fármaco-produto natural.

1.4 Modelos empregados no metabolismo in vitro

Para avaliar o comportamento metabólico dos fármacos, vários modelos experimentais in vitro podem ser usados (ASHA; VIDYAVATHI, 2010, WILK-ZASADNA et al., 2015). O uso de cada um destes modelos depende da finalidade do estudo, como por exemplo, o tipo de enzima a ser avaliada e também da disponibilidade de cada modelo no laboratório de pesquisa.

Microssoma hepático é o modelo in vitro mais empregado em estudos de metabolismo. Consiste de uma fração subcelular do REL dos hepatócitos e são obtidos por meio de homogeneização do fígado, seguido de centrifugações diferenciais (FASINU; BOUIC; ROSENKRANZ, 2012). A fração microssomal contém as enzimas do CYP450, que realizam reações de Fase I e as enzimas UGT, responsáveis pela glicuronidação durante a Fase II do metabolismo, além de uma fração minoritária de outras enzimas; com isso, as duas principais famílias de enzimas atuantes na biotransformação de fármacos encontram-se contidas na mesma fração subcelular (SINZ, 2012).

Os estudos com microssomas são aplicados na descoberta e desenvolvimento de fármacos que incluem a identificação dos metabólitos, comparação de metabolismo por diferentes espécies, predição do clearance in vivo e reações de fenotipagem e genotipagem. Entre as vantagens desta técnica estão o baixo custo, a simplicidade no uso, é um dos modelos in vitro melhor caracterizados em estudos de metabolismo de fármacos, podem ser armazenados por longos períodos sem perder a atividade enzimática, baixa variabilidade entre diferentes lotes, além de permitir a obtenção de um *pool* com múltiplos doadores (ASHA; VIDYAVATHI, 2010, COE; KOUDRIAKOVA, 2014). Recentemente, microssomas contendo enzimas com polimorfismos genéticos têm sido empregados na avaliação da variabilidade

interindividual no metabolismo de fármacos (OKUBO et al., 2013, XU et al., 2012). Com o objetivo de facilitar a escrita, o termo "microssomas hepático de humanos" será denominado como HLM (*Human Liver Microsomes*) no texto daqui em diante.

Os hepatócitos possuem a vantagem de aproximar-se melhor da situação in vivo, uma vez que contêm todas as enzimas presentes no citosol e as enzimas microssomais, além da estrutura celular e outras proteínas que podem contribuir na ligação não específica do substrato (LIPSCOMB; POET, 2008). Este é o principal modelo empregado em estudos de indução enzimática, uma vez que, quando comparado com o modelo que emprega frações hepáticas, aquele apresenta toda a estrutura necessária para a produção de novas enzimas, consequentemente promovendo o aumento da atividade enzimática da célula. Os hepatócitos podem ser utilizados como uma suspensão de células ou como uma cultura de células. O primeiro tipo possui a desvantagem de perder a atividade em apenas algumas horas (2 a 3 horas), enquanto a cultura celular mantém a atividade durante vários dias devido ao ambiente artificial criado na cultura com a matriz extracelular e o contato entre as células (SILVA; NICOLL-GRIFFITH, 2014). Este modelo também permite o estudo de interações medicamentosas em transportadores de membranas presentes nestas células (SWIFT; PFEIFER; BROUWER, 2010).

As isoformas isoladas do CYP450 são enzimas recombinantes obtidas através da expressão direta de seu DNA em uma variedade de células hospedeiras, tais como células de bactérias, de insetos, de leveduras e de mamíferos, os quais são capazes de expressar a isoforma desejada do CYP450 (SINZ, 2012). Esta é a principal vantagem uma vez que as isoformas podem ser empregadas em estudos de polimorfismos (estudos de genotipagem) como também na avaliação da interação entre fármacos. Além disso, este modelo permite o conhecimento rápido da(s) isoforma(s) responsável(eis) pelo metabolismo do substrato avaliado (ASHA; VIDYAVATHI, 2010, XU et al., 2012).

Em algumas situações, o resultado obtido com as enzimas recombinantes pode não mimetizar o que ocorre em outros modelos in vitro ou in vivo. Primeiramente, porque o seu conteúdo catalítico difere do real uma vez que a concentração de NADPH-CYP redutase é muito maior neste modelo do que aquele presente em HLM. Outra dificuldade na reprodução dos resultados ocorre quando o perfil metabólico de

um fármaco é obtido a partir da ação de múltiplas isoformas, assim o emprego de uma única enzima não refletirá o clearance metabólico real para tal substância (OGILVIE et al., 2014, SINZ, 2012).

1.4.1 Novas metodologias de metabolismo in vitro

A indústria farmacêutica têm se deparado com o aumento nos custos durante o desenvolvimento de novos fármacos, visando atender as exigências das agências reguladoras quanto aos critérios de segurança e eficácia. Neste contexto, a fase préclínica é uma das etapas mais dispendiosas durante o desenvolvimento de um novo fármaco, abrangendo 40 – 70% do custo total (USTA et al., 2015). Dentro dos estudos pré-clínicos, os estudos in vitro têm aumentado significativamente, resultado da preocupação com o uso de animais e questões éticas, seguindo o princípio dos 3Rs, "Redução, Refinamento e Recolocação" (USTA et al. , 2015). Além disso, a substituição por sistemas in vitro resultam em economia de tempo e dinheiro, além de serem mais preditivos, em alguns casos como na predição do clearance, em relação ao modelo animal. Devido a este grande interesse tanto pela academia quanto pelas indústrias, novas tecnologias tem sido desenvolvidas tentando suprir algumas limitações dos modelos in vitro tradicionais.

O sistema de cultura sanduíche de hepatócitos é o modelo 2D mais completo e consiste no plaqueamento de hepatócitos primários de humanos entre duas camadas de matriz extracelular. Este modelo permite estudar enzimas de fase I, II e transportadores, além da excreção biliar e captação hepática do fármaco (CHANG et al., 2016; YANG et al., 2016).

Os microssistemas biomiméticos que reproduzem grande parte da complexidade estrutural e funcional de um órgão, denominados "*organ-on-chip*", também têm sido bastante explorados no contexto do metabolismo in vitro, em diversos formatos e alguns já estão sendo comercializados (ESCH; BAHINSKI; HUH, 2015). A empresa Organovo[®] usa a técnica de bioimpressão 3D para gerar tecidos hepáticos em pequenas escalas usando células primárias humanas em uma plataforma denominada fígado ex vivo 3D (CHANG et al., 2016). O microdispositivo HµREL[®] é um sistema celular microfluídico cultivado a partir de tecido hepático e

também de outros tecidos em paralelo. O biochip plástico é conectado a um reservatório contendo um fluido no qual uma bomba impulsiona em um sistema de recirculação (CHANG et al., 2016).

Um outro modelo interessante criado recentemente é o Silensome[®]. Nesse modelo os clássicos microssomas hepáticos tem uma específica isoforma do CYP450 quimicamente inativada, o qual pode ser aplicado especialmente em estudos de fenotipagem e na determinação da fração metabolizada pela enzima inativada através da comparação com o HLM (PARMENTIER et al., 2016).

1.5 Identificação e caracterização dos metabólitos obtidos a partir das reações de metabolismo

No início do desenvolvimento as substâncias-alvo do estudo geralmente não apresentam propriedades biofarmacêuticas desejáveis. Estas questões podem resultar em um clearance sistêmico alto devido à baixa estabilidade metabólica do candidato a fármaco. A identificação precoce dos principais metabólitos formados permite a otimização da estrutura química da substância e, consequentemente, a produção de um composto metabolicamente mais estável e com propriedades desejáveis (LAM et al., 2014).

A detecção e identificação de metabólitos produzidos através de reações de Fase I é extremamente importante devido à possibilidade de metabólitos tóxicos serem produzidos (metabólitos reativos), podendo causar efeitos adversos severos como a hepatotoxicidade. Além disso, alguns metabólitos são mais ativos do que o fármaco precursor, sendo interessante o estudo da atividade farmacológica de ambas as substâncias no processo de desenvolvimento. Em outros casos, a administração de um pró-fármaco com propriedades mais favoráveis é realizada; uma vez que o pró-fármaco encontra-se dentro do organismo ele é rapidamente transformado no fármaco ativo (NIESSEN, 2006). A biotransformação de Fase I leva a perdas de massa relativa ao composto precursor (Tabela 2) e o conhecimento da razão massa carga (*m/z*) destes fragmentos facilita a predição do metabólito formado. Por exemplo, a adição de 16 unidades de massa à estrutura original indica que a substância sofreu uma

reação de hidroxilação, a qual pode ter ocorrido por diferentes mecanismos tais como a epoxidação e a sulfoxidação.

Tabela 2- Diferença de massa comuns em reações de Fase I. Adaptado de NIESSEN, 2006.

Processo	Δ ^a (<i>Da</i>)	Grupamento envolvido	Reação de Biotransformação
Hidroxilação	+16	Aromático	$Ar-H \rightarrow Ar-OH$
		Alifático	$R\text{-}CH_2 \rightarrow R\text{-}CHOH$
		N-Hidroxilação	R -NH-CO-R \rightarrow R-NOH-CO-R
		Epoxidação	$RCH=CH-R \rightarrow R-CHOCH-R$
		Sulfoxidação	R-S-R → R-SO-R
Dealquilação	-14	N-alquil	$R\text{-}NH\text{-}CH_3 \to R\text{-}NH_2$
		O-alquil	$R\text{-O-CH}_3 \rightarrow R\text{-OH}$
		S-alquil	$\text{R-SCH}_3 \to \text{R-SH}$
Amino Oxidação	-30	Nitro	$R-NO_2 \rightarrow R-NH_2$
Desidrogenação	-2	Álcool	$R\text{-}CH_2\text{-}OH \rightarrow R\text{-}COH$
	+16	Aldeído	R-COH → R-COOH
	+14	Álcool	$R\text{-}CH_2\text{-}OH \to R\text{-}COOH$
	_		

^a Variação de massa em Da em relação ao composto precursor

O metabolismo de Fase II constitui a etapa real de eliminação do substrato no qual uma estrutura polar é incorporada à substância inicial, sendo que na maioria dos casos os metabólitos de Fase II não são biologicamente ativos. Além disso, a principal reação verificada é a glicuronidação com a introdução do ácido glicurônico à estrutura precursora (NIESSEN, 2006).

Segundo o guia do FDA que diz respeito aos testes de segurança relacionados aos metabólitos de fármacos (*Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry*, FDA, 2016), estudos mais detalhados sobre aspectos de segurança do metabólito produzido no organismo humano devem ser realizados se este metabólito for produzido em uma concentração maior que 10% em relação à concentração plasmática do fármaco precursor observado no estado estacionário (FDA, 2016). Este guia ainda ressalta a importância da identificação precoce de diferenças no metabolismo entre animais e humanos a fim de selecionar o melhor modelo animal para estudos de segurança dentro da fase pré-clínica de desenvolvimento (FDA, 2016).

1.5.1 Ferramentas na elucidação estrutural de metabólitos: Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Dentre os analisadores de massas mais comumente usados durante os diversos estágios de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco, destacamse o quadrupolo (Q), o ion trap (IT) e o tempo de voo (TOF) e suas respectivas variações e acoplamentos com outros analisadores. Cada um deles possui distinta capacidade de resolução entre massas, exatidão de massa, faixa de massas atendida, velocidade e compatibilidade com as fontes de ionização (CHACKO et al., 2012, BHARDWAJ; HANLEY, 2014). O IT apresenta uma melhor performance em análises no modo full scan e na espectrometria de massas com dois estágios (MS²), que são frequentemente necessários em estudos de identificação de metabólitos. Entretanto, a principal limitação de operação do ion trap é a incapacidade de capturar íons fragmentos com m/z menor do que um terço do m/z do íon precursor. Consequentemente, diversos fragmentos com baixa razão *m/z* no final do espectro são perdidos. Por esta razão, para a obtenção de uma elucidação estrutural mais detalhada, o pseudo-MS³ obtido no triplo quadrupolo muitas vezes é escolhido ao invés do MS³ em um *ion trap* (NIESSEN, 2006). O pseudo-MS³ é alcançado através da aplicação de uma voltagem que acarreta em uma fragmentação na fonte e a subsequente dissociação induzida por colisão.

A necessidade do desenvolvimento de instrumentos mais eficientes levou ao advento dos espectrômetros de massas híbridos que fundem a vantagem de cada analisador em um único instrumento (CHACKO et al., 2012). Neste contexto, o espectrômetro de massas híbrido contendo como analisador um quadrupolo linear acoplado ao *ion trap* (*Quadrupole Linear Ion Trap, Q-LIT*) é uma ferramenta poderosa na identificação de metabólitos. Este instrumento é composto de um triplo quadrupolo em que o terceiro quadrupolo pode funcionar como um quadrupolo ou como um *ion trap* linear (NIESSEN, 2006, CHACKO et al., 2012).

O TOF é um analisador que permite a aquisição de alta resolução de massas, consequentemente, a composição química da molécula em análise pode ser determinada. Tanto a forma simples quanto as formas híbridas que contém este analisador são ferramentas importantes na elucidação estrutural de metabólitos. O quadrupolo acoplado ao tempo de voo (*Quadrupole-Time of Flight, Q-TOF*) provê uma

massa em alta resolução tanto nos modos MS quanto MS². Um exemplo da utilidade do TOF foi demonstrada na determinação da estrutura exata do fragmento *m/z* 202 derivado do composto bosentan, no qual foi possível apenas com a aquisição da massa em alta resolução, como pode ser verificado na Figura 8 (NIESSEN, 2006). Além disso, uma grande vantagem é a possibilidade de uma interface tanto com a fonte de eletrospray (ESI) quanto com a matriz assistida por dessorção/ionização (sigla do inglês MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) (NIESSEN, 2006).

Figura 8- Estrutura do bosetan e seus dois possíveis fragmentos com *m/z* 202. A medida do *m/z* indicou que a estrutura correta corresponde a *m/z* 202,0729 com um erro de 0,4 u. Fonte: NIESSEN, 2006 (Figura 10.7). Reproduzido com permissão de Taylor and Francis (número da licença: 3943160346661).

A espectrometria de massas, em geral, é a técnica preferida na elucidação estrutural de metabólitos devido às vantagens tais como a capacidade de acoplamento à cromatografia líquida, além da maior sensibilidade em relação ao RMN, requerendo menores volumes/concentração das amostras. Esta última vantagem é especialmente importante durante o estudo de metabolismo de fármacos, devido a baixa quantidade de metabólitos formados durante os ensaios. Com isso, a determinação das estruturas químicas de metabólitos por RMN geralmente necessitam da realização de experimentos em larga escala e posterior isolamento do metabólito em escala semi-preparativa ou preparativa para obtenção de massa suficiente para as análises (TOLONEN; PELKONEN, 2015). Apesar das limitações, o RMN constitui uma excelente técnica para identificação estrutural e ela é imprescindível na determinação exata da estrutura quando a fragmentação obtida com a espectrometria de massas falha nesta identificação.

A cromatografia líquida acoplada ao sistema de concentração de amostras através da extração em fase sólida e análise por ressonância magnética nuclear (CL-EFS-RMN) elimina a etapa de isolamento prévio dos metabólitos através da cromatografia preparativa, uma vez que a concentração da amostra pode ser obtida por injeções sucessivas da amostra no aparelho e posterior retenção das bandas cromatográficas de interesse no sistema de extração em fase sólida e, finalmente, a análise do composto de interesse é realizada no RMN (EXARCHOU et al., 2005).

1.6 Cinética enzimática in vitro aplicada a enzimas que metabolizam fármacos

A determinação da cinética in vitro do metabolismo de um candidato a fármaco é uma etapa crítica durante o processo de desenvolvimento de um medicamento. Este processo envolve, basicamente, o uso de um sistema enzimático como, por exemplo, HLM, hepatócitos e/ou enzimas recombinantes, e um sistema para quantificação do decaimento do fármaco ou da produção do metabólito formado; consequentemente obtém-se um perfil cinético (SUBRAMANIAN;TRACY, 2012).

O modelo típico que descreve o comportamento de inúmeras enzimas é o chamado modelo hiperbólico ou michaeliano. Este sistema assume que as enzimas são saturáveis e podem ser descritas matematicamente pelo modelo de Michaelis-Menten (Equação 1).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$
 Equação 1

Neste modelo, durante baixas concentrações de substrato [S] ocorre uma relação de primeira ordem entre a velocidade e a concentração de substrato, enquanto que em altas concentrações, a velocidade torna-se independente da concentração e alcança um valor máximo. Este valor é denominado V_{max} ou velocidade máxima, a metade da concentração necessária para alcançar a velocidade máxima é conhecida como K_m ou constante de Michaelis-Menten (SEIBERT; TRACY, 2014, SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

No entanto, as enzimas do CYP450, principal família de enzimas relacionadas ao metabolismo de fármacos, possuem um sítio catalítico bem flexível que permite metabolizar substratos com estruturas químicas variadas, através de diversos

modelos cinéticos, além do modelo clássico Michaeliano; denominados cinéticas atípicas (SEIBERT; TRACY, 2014). Estas cinéticas são resultado da catálise por uma única enzima com múltiplos sítios ativos e/ou produzidas por múltiplas enzimas que catalisam o mesmo substrato (SEIBERT; TRACY, 2014). As cinéticas não-michaelianas tem sido frequentemente observadas para a CYP3A4 e CYP2C9, além destas as isoformas 2D6, 1A2 e 1A1 também podem demonstrar este comportamento (SINZ, 2012).

Enzimas que possuem apenas um único sítio ativo ou múltiplos sítios independentes geralmente apresentam a cinética descrita por Michaelis-Menten. No entanto, se a ligação de um substrato ao sítio ativo altera a afinidade dos demais sítios, a enzima possui um comportamento alostérico (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). A cooperatividade homotrópica positiva, também denominada autoativação, aumenta a afinidade da enzima quando múltiplas moléculas do mesmo substrato ligam-se à enzima simultaneamente (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). Consequentemente, o perfil cinético observado é descrito por uma sigmoide, denominado cinética sigmoidal (Figura 9a). O modelo matemático que descreve a cooperatividade homotrópica é a equação de Hill (Equação 2).

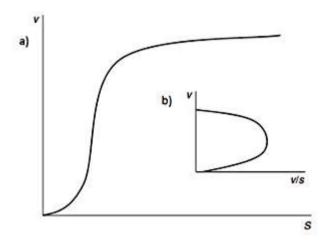


Figura 9- a) Cinética de saturação sigmoidal. **b)** Gráfico de Eadie-Hofstee para o comportamento sigmoidal. Fonte: SUBRAMANIAN; TRACY, 2012 (Figura 9.4). Reproduzido com permissão de John Willey and Sons (número da licença: 3939340544574).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^n}{S_{50} + [S]^n}$$
 Equação 2

Na equação, [S] corresponde à concentração do substrato, S₅₀ é a concentração do substrato na qual a enzima está hemissaturada e sua velocidade é a metade da velocidade máxima (V_{max}); h ou n corresponde ao coeficiente de Hill e indica o grau de cooperatividade (ou sigmoicidade) (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). Quando h é igual a 1 a Equação 2 simplifica-se e torna-se a equação de Michaelis-Menten (Equação 1). Quando o valor de h for maior que 1, tem-se uma cooperatividade positiva. Outra representação gráfica que permite visualizar facilmente o comportamento sigmoidal é o gráfico de Eadie-Hofstee, que é representado como v *versus* v/[S], no qual obtêm-se um perfil em forma de gancho característico (Figura 9b).

O perfil bifásico constitui outro perfil de cooperatividade homotrópica, no entanto, neste caso, o perfil cinético não alcança a saturação, exibindo duas fases distintas (Figura 10). A primeira fase é observada em baixas concentrações de substratos e o perfil é mais característico de uma cinética hiperbólica. Em altas concentrações de substrato, a segunda fase é marcada por aumento linear da velocidade da reação, sem evidência de saturação (KRAMER; TRACY, 2012). Este tipo de comportamento pode ser visualizado em sistemas multienzimáticos em que as duas enzimas distintas estão produzindo o mesmo metabólito com diferentes velocidades, no qual uma enzima é dita de alta afinidade e a outra de baixa afinidade, ou também pode descrever o comportamento dentro da mesma enzima que possui sítios de ligação com diferentes afinidades. A velocidade da reação bifásica é calculada de acordo com a Equação 3.

$$v = \frac{V_{max1}[S] + \frac{V_{max2}}{K_{m1} + [S]} x [S]^{2}}{K_{m1} + [S]}$$
 Equação 3

Na equação, v é a velocidade inicial, V_{max1} a velocidade máxima catalisada pela enzima ou sítio de ligação que tem alta afinidade pelo substrato, K_{m1} a constante de Michaelis-Mentem relacionada com a enzima ou sítio de ligação de alta afinidade, [S] corresponde à concentração do substrato. Por fim, V_{max2} e K_{m2} são os parâmetros relacionados à enzima ou sítio de ligação de baixa afinidade.

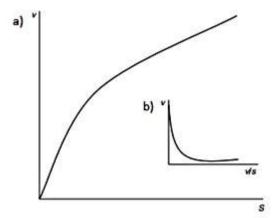


Figura 10- a) Cinética bifásica. **b)** Gráfico de Eadie-Hofstee para o comportamento bifásico. Fonte: SUBRAMANIAN; TRACY, 2012 (Figura 9.2). Reproduzido com permissão de John Willey and Sons (número da licença: 3939340544574).

Finalmente, o perfil cinético denominado inibição pelo substrato ocorre quando o platô de formação do produto em um certo ponto tem a sua velocidade diminuída com o aumento da concentração do substrato (Figura 11) (KRAMER; TRACY, 2012). Este comportamento pode ocorrer através de ligações de moléculas de substrato em outros sítios de ligação, denominados sítios inibitórios, os quais provocam mudanças na conformação da enzima e, consequentemente diminuem a taxa de conversão do substrato em produto (SEIBERT; TRACY, 2014).

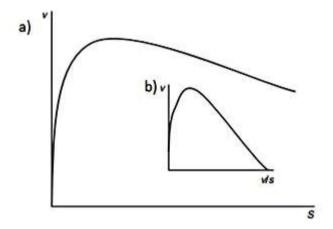


Figura 11- a) Cinética de inibição pelo substrato. **b)** Gráfico de Eadie-Hofstee para a cinética de inibição pelo substrato. Fonte: SUBRAMANIAN; TRACY, 2012 (Figura 9.4). Reproduzido com permissão de John Willey and Sons (número da licença: 3939340544574).

1.7 Reação de Fenotipagem Enzimática: Identificando as enzimas responsáveis pelo metabolismo

reações de fenotipagem enzimática, também conhecidas como mapeamento enzimático, permitem a identificação da(s) enzima(s) envolvida(s) no metabolismo da substância em estudo (SENSENHAUSER, 2014, ZIENTEK; YOUDIM, 2015). Este ensaio semi-quantitativo a respeito da contribuição relativa das enzimas no processo de eliminação do fármaco, permite predizer possíveis interações medicamentosas resultantes da ação de um agente terapêutico sobre a exposição e eliminação de um fármaco administrado concomitantemente (SENSENHAUSER, 2014). Dentro da perspectiva da interação medicamentosa e da farmacogenética, os fármacos podem ser classificados como vítimas ou agressores (OGILVIE et al. 2014). As vítimas são aquelas substâncias cuja eliminação (ou clearance) depende predominantemente de uma única rota de eliminação como, por exemplo, o metabolismo por uma única isoforma do CYP450. Estas citadas substâncias tem um alto potencial de tornarem-se vítimas devido à diminuição ou perda de tal rota de eliminação através de alguma deficiência genética ou a inibição desta enzima pela administração concomitante de outro fármaco que utiliza a mesma via (OGILVIE et al., 2014). Por outro lado, os agressores são substâncias que inibem ou induzem a enzima responsável pela eliminação da vítima (OGILVIE et al., 2014).

Alguns exemplos de fármacos que são vítimas são a terfenadina, a cisaprida e o astemizol que foram retirados do mercado ou são comercializados com severas restrições (OGILVIE et al., 2014). Estes fármacos são considerados vítimas devido à extensa metabolização pelo CYP3A4. Assim, a inibição desta isoforma por alguns fármacos como antimicóticos (cetoconazol) ou certos antibióticos (eritromicina) leva a diminuição do clearance da terfenadina, da cisaprida e do astemizol, resultando em um aumento na concentração plasmática de tais substâncias que, em alguns indivíduos, pode causar arritmias ventriculares (prolongamento do intervalo QT e torsade de pointes) (OGILVIE et al., 2014). Outro exemplo é o bloqueador de canal de cálcio mibefradil, o qual foi retirado do mercado por causar uma extensa inibição da CYP3A4 através dos modos dose- e tempo-dependente. Devido à inibição irreversível da CYP3A4, o restabelecimento da atividade normal necessita da síntese de novas enzimas (OGILVIE et al., 2014).

Segundo recomendações do FDA, o melhor modo de realizar o estudo de fenotipagem é obter primeiramente o perfil metabólico do novo fármaco e, em seguida, estimar a importância relativa de cada enzima no seu clearance (FDA, 2012). Quatro diferentes abordagens tem sido desenvolvidas para as reações de fenotipagem envolvendo as enzimas do CYP450, cada um dos métodos apresentam suas vantagens e desvantagens e a combinação deles é altamente recomendada para a caracterização eficaz das enzimas humanas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do candidato a fármaco (OGILVIE et al., 2014, ZIENTEK; YOUDIM, 2015). O primeiro método abrange a medida da taxa de metabolismo por diversas amostras de microssomas humanos e a correlação com as taxas obtidas para esta mesma substância, mas empregando as isoformas recombinantes do CYP450. O segundo modelo consiste da avaliação da taxa de inibição sofrida pelas enzimas do CYP450 por inibidores químicos seletivos de cada isoforma na presença do candidato a fármaco. Nesse modelo é empregado os microssomas humanos como sistema in vitro. A terceira metodologia envolve a avaliação do efeito de anticorpos inibitórios contra isoformas do CYP450 selecionadas no estudo do novo fármaco e empregando os microssomas humanos como sistema in vitro. Por último, a reação de fenotipagem pode ser realizada através do emprego de isoformas recombinantes da CYP450, que pode predizer se uma particular isoforma participa do metabolismo da substância em estudo (ZIENTEK; YOUDIM, 2015, OGILVIE et al., 2014, SINZ, 2012).

1.8 Estudos de inibição enzimática in vitro: Predição de interações medicamentosas in vivo

As interações medicamentosas têm se tornado um grande obstáculo na indústria farmacêutica e determinações precisas destas interações se tornaram muito importantes no desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que a administração concomitante de vários medicamentos é muito comum no tratamento de doenças. Com isso, o estudo da inibição enzimática in vitro é de grande importância na predição de interações medicamentosas (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). Dessa forma, conhecer estas interações previamente pode evitar reações adversas graves em pacientes assim como prejuízos à indústria farmacêutica. Dentro deste contexto, pode-se citar a venda de cimetidina que diminuiu bruscamente após o conhecimento

das interações medicamentosas em que ela está envolvida (inibição da CYP3A4), um fato que só foi verificado na fase pós-marketing de desenvolvimento do medicamento (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

Dentre os tipos de reações que envolvem as enzimas, as de inibição são clinicamente mais relevantes do que as reações de indução, uma vez que em um curto período de tempo, a situação clínica do paciente pode ser alterada podendo causar efeito graves, muitas vezes irreversíveis como um derrame ou infarto (COLLEMAN, 2010).

O objetivo inicial na avaliação dos fármacos como inibidores in vitro das isoformas do CYP450 é a determinação do seu potencial em ser um agressor, ou seja, ser um forte inibidor sobre esta enzima antes de atingir estágios mais avançados durante o desenvolvimento de um novo medicamento (OGILVIE et al., 2014). O planejamento de um estudo de inibição in vitro envolve inúmeros fatores que devem ser respeitados para a obtenção de resultados condizentes com o perfil in vivo. O guia do FDA acerca dos estudos de interações medicamentosas (FDA, 2012) incorpora tais recomendações, sendo o seu conteúdo aplicado tanto no ambiente da indústria quanto da pesquisa; por exemplo, esse guia descreve a lista de substratos, marcadores e inibidores característicos de cada isoforma do CYP450 que devem ser usados em tal estudo.

Existem dois tipos de inibição avaliados: a inibição reversível e a inibição baseada no mecanismo (inibição irreversível ou quase-irreversível); esta última constitui um tipo de inibição tempo-dependente visualizado frequentemente sobre enzimas do metabolismo. A inibição reversível é mais fácil de ser determinada e ela pode ser rotineiramente avaliada durante as primeiras etapas do desenvolvimento de um novo fármaco através de uma triagem inicial utilizando testes de alto rendimento analítico, do tipo *high throughput* (GENOVESE et al., 2011, LEE et al., 2012, CALDWELL; YAN, 2014). A inibição irreversível é mais difícil de ser detectada e envolve ligações químicas fortes que são difíceis de serem desfeitas.

1.8.1 Inibição Reversível

A inibição reversível, também conhecida como inibição dose-dependente ou direta, pode ser subdividida em dois tipos. O primeiro tipo envolve a competição entre duas substâncias que são metabolizadas pela mesma enzima, sendo conhecido como inibição competitiva (OGILVIE et al., 2014). Neste caso, o inibidor e o substrato competem pelo mesmo sítio ativo da enzima (Figura 12a), resultando em nenhuma mudança no V_{max} e um aumento no K_m. (KRAMER; TRACY, 2012). O segundo tipo ocorre quando o inibidor não é um substrato para a enzima em estudo, consequentemente, inibidor e substrato não competem pelo mesmo sítio ativo da enzima. Este tipo de inibição pode ocorrer através de três mecanismos distintos. O primeiro é a inibição não-competitiva (Figura 12b) que ocorre quando inibidor e substrato ligam-se reversível e independentemente entre si. Neste caso, a ligação do inibidor reduz a atividade da enzima, mas não tem nenhum efeito sobre a ligação do substrato, consequentemente, observa-se uma diminuição no V_{max} e nenhuma alteração no K_m. A inibição incompetitiva (Figura 12c) é o segundo modo de inibição em que substrato e inibidor não competem pelo mesmo sítio, neste caso o inibidor só se liga ao complexo enzima-substrato (E-S) resultando em um complexo inativo enzima-substrato-inibidor (E-S-I). Nesse tipo de inibicão ocorre uma diminuição do V_{max} e K_m. O último modo é a inibição mista (competitiva-não-competitiva) (Figura 12d) que ocorre quando o inibidor liga no sítio ativo da enzima assim como no sítio alostérico ou quando o inibidor liga no sítio ativo, mas não bloqueia a ligação do substrato, resultando em uma diminuição do V_{max} e um aumento do K_m simultaneamente (KRAMER; TRACY, 2012, OGILVIE et al., 2014).

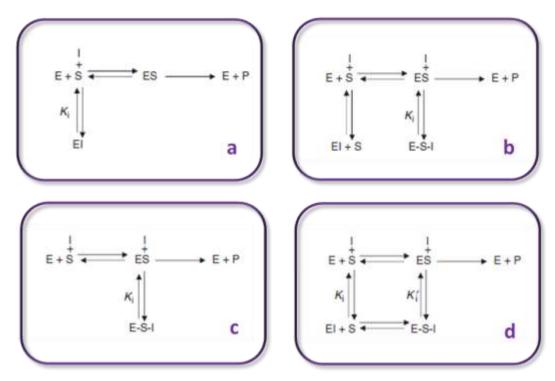


Figura 12- Inibição reversível. **a)** Competitiva; **b)** Não-competitiva; **c)** Incompetitiva; **d)** Mista. E: Enzima; S: Substrato; I: Inibidor; P: Produto; K_i: Constante de inibição. Fonte: Adaptado de KRAMER; TRACY, 2012.

Durante a análise dos dados de inibição, o modelo matemático de Michaelis-Menten pode ser empregado, uma vez que cada comportamento resultará em um perfil diferente. Além disso, o gráfico de Lineweaver-Burk (também conhecido como duplo-recíproco) é muito empregado para estimar os parâmetros cinéticos. Neste caso, um gráfico duplo-recíproco 1/v versus 1/[S] resulta em uma transformação linear de acordo com a Equação 4 (SEIBERT; TRACY, 2014).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} x \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$
 Equação 4

No gráfico resultante, o coeficiente angular de cada reta obtida corresponde a K_m/V_{max} , enquanto que os interceptos do eixo y e x equivalem a $1/V_{max}$ e - $1/K_m$, respectivamente. Os dois modos mais usuais de representação da inibição enzimática (gráfico hiperbólico e gráfico Lineweaver-Burk) e o perfil dos modos de inibição enzimática reversível são resumidos na Figura 13.

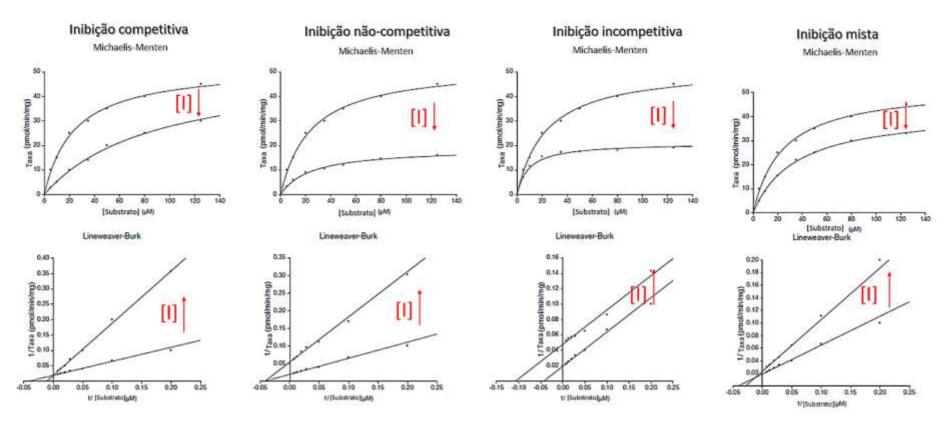


Figura 13- Representação gráfica dos tipos de inibição reversível. [I]: Concentração do Inibidor. Adaptado de SEIBERT; TRACY, 2014 (Capítulo 2, Figura 2). Reproduzido com permissão de Humana Press (número da licença: 39393500776572).

1.8.2 Inibição Baseada no Mecanismo (Mechanism-Based Inhibition) (MBI)

Inibidores tempo-dependentes do CYP450 podem causar interações medicamentosas clinicamente relevantes, sendo necessário em alguns casos ajustes na prescrição ou até mesmo a retirada do fármaco do mercado (ZHOU et al., 2007). A maioria dos casos de inibição tempo-dependente ocorre durante o metabolismo do fármaco precursor levando a formação de metabólito(s), assim o nome Inibição Baseada no Mecanismo deriva deste comportamento e constitui um tipo de inibição tempo-dependente. Com isso, a MBI envolve a bioativação metabólica do xenobiótico pelo CYP450, resultando em um intermediário eletrofilicamente reativo que pode causar uma inativação irreversível ou quasi-irreversível da enzima (KAMEL; HARRIMAN, 2013, MOHUTSKY; HALL, 2014). A MBI exibe uma inibição de modos NADPH- tempo- e dose-dependente, sendo necessário a presença destes comportamentos para ser classificada como tal. A Figura 14 ilustra a classificação da inibição tempo-dependente sobre enzimas do metabolismo.

Inibição tempo-dependente sobre a CYP450

- Inibição baseada no Mecanismo (tempo, NADPH e dose-dependente)
 - Quasi-irreversível
 - Complexo Intermediário Metabólito
 - Irreversível
 - Modificação covalente da apoproteína
 - Destruição do grupamento Heme

Figura 14- Modos de inibição tempo-dependente sobre a CYP450. Fonte: autoria própria.

Os metabólitos altamente reativos formados através da conversão de xenobióticos pelo CYP450 podem causar hepatotoxicidade dependendo da sua afinidade pelos grupamentos nucleofílicos e à sua capacidade de ligar-se a macromoléculas intracelulares. As principais vias pelas quais os metabólitos reativos (MRs) podem causar hepatotoxicidade são: i) formação de adutos de proteínas ligadas aos MRs que desencadeiam respostas imunes; ii) ligação covalente dos MRs a macromoléculas intracelulares tais como as mitocôndrias e, iii) superprodução de MRs, resultando em uma depleção na quantidade de glutationa, que está envolvida

na eliminação de substâncias do organismo (FENG; HE, 2013). Neste contexto, os produtos naturais, apesar de constituírem uma ótima inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos, também demonstram uma alta capacidade de bioativação dentro do organismo resultando em metabólitos reativos tóxicos (NJUGUNA et al., 2012). Dessa forma, ressaltando-se a importância da investigação de MRs através dos estudos in vitro.

1.8.2.1 Inibição quasi-irreversível

1.8.2.1.1 Complexo Metabólico Intermediário (*Metabolite Intermediate Complex*) (MIC)

A formação de uma ligação quasi-irreversível com o grupamento heme do CYP450, seguida do metabolismo do substrato ou algum metabólito derivado, é conhecido como formação do Complexo Metabólico Intermediário (MIC). Através da coordenação do estado ferroso (Fe(II)) do CYP450 cria-se uma ligação fortemente não covalente capaz de provocar um deslocamento no espectro de absorção exibido para tal enzima (Figura 15) (MOHUTSKY; HALL, 2014). Este comportamento é frequentemente visualizado em substâncias contendo nitrogênio em um grupamento heteroaromático, tais como derivados de piridina, quinolina, imidazol e triazol (KAMEL; HARRIMAN, 2013). Os principais exemplos descritos na literatura a respeito de grupamentos químicos que podem levar à formação de MIC são metilenodioxifenil, observados em medicamentos como o tadalafil e a paroxetina, grupamentos aminas e grupamentos hidrazinas (KAMEL; HARRIMAN, 2013).

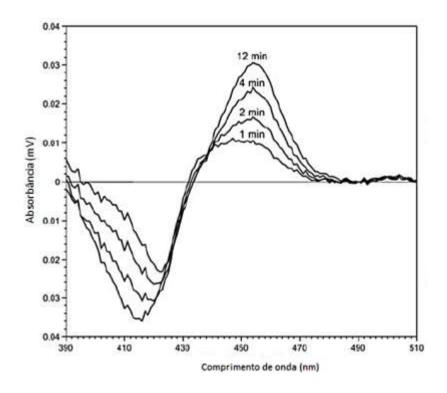


Figura 15- Deslocamento no espectro absorção da troleandomicina devido à ligação quasi-irreversível formada entre o metabólito nitroso da troleandomicina e o Fe(II) presente no grupamento heme do CYP450. Fonte: OGILVIE, 2014 (Capítulo 7, Figura 6). Reproduzido com permissão de Informa HealthCare (número da licença: 3939340544574).

1.8.2.2 Ligação Irreversível

1.8.2.2.1 Modificação covalente da apoproteína

A ligação irreversível através da modificação covalente da apoproteína ocorre quando os MRs ligam-se covalentemente aos resíduos de aminoácidos nucleofílicos presentes dentro do sítio ativo da enzima (apoproteína). Esta modificação resultará em uma perda da atividade catalítica apenas se aminoácidos essenciais para a manutenção do sítio ativo da enzima forem alterados (MOHUTSKY; HALL, 2014).

1.8.2.2.2 Destruição do grupamento heme

O último modo de inibição baseada no mecanismo é o tipo mais raro de ocorrer e deriva da reação dos MRs com átomos de nitrogênio presentes na porção porfirínica do CYP450 (sítio ativo); esta reação de alquilação e/ou arilação no grupamento heme causa uma inibição irreversível, sendo necessária a produção de novas enzimas para restabelecer a atividade. Fármacos que possuem esta propriedade estão inseridos na

classe dos acetilenos terminais, tais como o gestodeno e o etinilestradiol, que inativam seletivamente a CYP3A (MOHUTSKY; HALL, 2014).

Experimentalmente, os dois mecanismos de inibição irreversível podem ser diferenciados determinando se a enzima ainda é capaz de ligar monóxido de carbono (CO). A inativação da apoproteína retém a habilidade de ligar CO, indicando que o grupamento heme não foi modificado (KAMEL; HARRIMAN, 2013).

1.8.2.3 Cinética da Inibição Baseada no Mecanismo

Um inibidor irreversível comporta-se como um substrato convencional com uma etapa de ligação inicial em que enzima (E) e inibidor (I) combinam-se para formar o complexo enzima-inibidor (E-I) (Figura 16) (MOHUTSKY; HALL, 2014). A fração de E contida no complexo E-I dependerá do equilíbrio entre as constantes k_1 e k_{-1} e a concentração do inibidor quando a catálise está ausente (k_2). O complexo E-I leva a formação de um intermediário que pode reagir com uma molécula de água ou glutationa (GSH), por exemplo, para formar um metabólito ou reagir com E, inativando a proteína (MOHUTSKY; HALL, 2014).

Enzima
$$k_1$$
 Complexo k_2 Dintermediário k_3 Metabólito + Enzima k_4 Inibidor Enzima Inativada

Figura 16- Representação esquemática das etapas envolvidas em uma inibição irreversível. Fonte: Figura adaptada de MOHUTSKY; HALL, 2014.

A concentração do composto intermediário em uma dada concentração de I e E é dependente de uma relação de primeira ordem entre as constantes k₂, k₃ e k₄ que determinam a taxa destas reações. Assim, sob condições de velocidade inicial, a taxa de inativação da enzima é descrita pela Equação 5.

Taxa de formação da enzima inativa =
$$k_{inact}$$
. E. $\frac{I}{K_{t+1}}$ Equação 5

 K_I corresponde ao K_m de Michaelis-Menten e representa a concentração do inibidor não ligada a enzima que mantém metade da taxa máxima de inativação. k_{inact} é a constante análoga à V_{max} de Michaelis-Menten e que representa a taxa máxima de inativação da enzima em concentração saturante de inibidor.

1.9 Aplicações dos estudos in vitro: Predição do comportamento in vivo

Mudanças em um ou mais parâmetros de segurança e eficácia de um fármaco quando administrado concomitantemente com uma segunda substância têm sido foco de um crescente interesse na última década. Este interesse tem aumentado particularmente devido ao relato de inúmeras interações medicamentosas clinicamente relevantes (HUANG; LESKO; TEMPLE, 2014). Outro fator envolvido é a prática comum da polifarmácia, na qual os pacientes fazem o uso de diversos medicamentos diferentes ao longo do dia.

Um breve histórico mostra a importância da detecção antecipada de interações medicamentosas. Em 1997 a terfenadina foi retirada do mercado devido a interações medicamentosas fatais com os medicamentos eritromicina e cetoconazol. A partir deste episódio, institutos de pesquisa e indústrias farmacêuticas iniciaram o desenvolvimento de guias a fim de direcionar estudos de predição de interações medicamentosas ainda nas etapas iniciais de desenvolvimento de um novo fármaco. Estes guias focaram especialmente na detecção de inibição tempo-dependente sobre o CYP450 (OGILVIE et al., 2014). Assim, em 2001 os pesquisadores chegaram a um consenso a respeito da conduta de estudos in vitro e in vivo sobre interações de metabolismo e com transportadores de membrana; o documento, então denominado artigo de consenso 2001, serviu como base inicial para estudos de interação medicamentosa (TUCKER; HOUSTON; HUANG, 2001).

Em seguida, em 2004 o FDA publicou um documento preliminar intitulado "*Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling*". Este documento apoiou diversos outros publicados após esta data. O guia mais atualizado encontra-se sítio do FDA,

http://www.fda.gov/cder/drug/drugInteractions/default.htm (FDA, 2012).

Um completo entendimento da correlação in vitro-in vivo (IVIV) ainda não foi alcançado. Os estudos in vitro sugerem as principais rotas metabólicas que podem ser alvo de inibidores ou se o candidato a fármaco pode ser um potencial inibidor, no entanto, estudos in vivo são necessários para avaliar a extensão desta possível interação (HUANG; LESKO; TEMPLE, 2014). Um estudo in vitro delineado adequadamente, empregando o modelo certo e respeitando-se a condição de velocidade inicial, pode ser um ótimo indicativo do comportamento in vivo de um potencial candidato a fármaco.

1.9.1 Extrapolação IVIV do Clearance

O clearance (CL) é um parâmetro farmacocinético que estima a taxa de eliminação do fármaco do organismo; o seu valor determina a posologia a ser aplicada a um paciente juntamente com outros parâmetros, tais como meia-vida (t_{1/2}) e volume de distribuição (V_D) (POULIN et al., 2012). Nos estudos in vitro é possível obter inicialmente o clearance ou depuração intrínseca (CL_{int}), que corresponde a uma medida da relação dos parâmetros cinéticos enzimáticos para o processo de eliminação e, desta forma, refletem a capacidade máxima de depuração. O CL_{int} pode ser extrapolado para a condição in vivo, assim, predizendo a situação real de eliminação do fármaco do organismo (POULIN et al., 2012). A relação demonstrada na Equação 6 é utilizada para a determinação do CL_{int} em situações em que a enzima apresenta um comportamento hiperbólico e não levando em consideração a ligação do fármaco às proteínas (AUSTIN et al., 2005).

$$CL_{int} = rac{V_{max}}{K_m}$$
 Equação 6

Na Equação 7 o clearance in vivo (CL) pode ser predito empregando o CL_{int} obtido nos estudos cinéticos in vitro (AUSTIN et al., 2005).

$$CL = rac{Q.A.B.fu_p.CL_{int}}{fu_{mic}}$$
 Equação 7

No qual, A representa a quantidade em miligramas de microssoma por grama de fígado, B descreve a quantidade em gramas de fígado por quilograma de peso corporal, Q indica o fluxo sanguíneo hepático, fup é a fração livre do composto no plasma e fumic corresponde à fração livre do composto no meio microssomal (AUSTIN et al., 2005). Estudos prévios demonstraram que a consideração das frações livres do fármaco resulta em uma predição mais precisa do clearance in vivo (OBACH, 1999, VENKATAKRISHNAN; OBACH; GREENBLATT, 2000).

Assim como o clearance total (CL), o clearance hepático (CL_H) pode ser predito considerando-se os fatores que afetam a determinação deste; a predição do CL_H é descrita pela Equação 8 (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

$$CL_{H}=rac{Q.fu_{p}.rac{CL_{int}}{fu_{mic}}}{Q+fu_{p}.rac{CL_{int}}{fu_{mic}}}$$
 Equação 8

No entanto, deve-se ressaltar que o fígado pode não ser o único órgão responsável pela eliminação do fármaco do organismo. Neste caso, a determinação do clearance total do fármaco envolve a soma do clearance dos diversos órgãos envolvidos (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

Uma maneira de entender a relevância do CL_H é através do cálculo da taxa de extração do fármaco pelo fígado (E), como demonstrado na Equação 9 (MAKOID; UCHETICH; BANAKAR, 1996).

$$E = \frac{CL_H}{O}$$
 Equação 9

Na equação, E corresponde à taxa de extração hepática, Q, ao fluxo sanguíneo hepático (20 mL min⁻¹ kg⁻¹) e CL_H, ao clearance hepático (mL min⁻¹ kg⁻¹). A taxa de

extração hepática corresponde à fração da dose do fármaco presente no fígado que será eliminada durante o efeito de primeira passagem pelo fígado (HEDAYA, 2012, NARITOMI et al., 2001). Assim, fármacos que apresentam uma taxa de extração menor que 0,3 são considerados fármacos com baixa taxa de extração, enquanto valores maiores que 0,7 indicam uma extensa taxa de extração pelo fígado (TOZER; ROWLAND, 2006). Este parâmetro não indica a fração do fármaco metabolizada, mas sim a fração do fármaco administrada que é eliminada do organismo através do metabolismo de primeira passagem (CHIBA; ISHII; SUGIYAMA, 2009).

1.9.2 Extrapolação IVIV dos estudos de inibição

As principais recomendações do FDA para correlacionar a inibição reversível in vitro e seu impacto em predizer uma interação medicamentosa in vivo relevante estão demonstradas na Figura 17 (FDA, 2012). Este é apenas um guia geral, sendo necessário o estudo caso a caso, para evitar resultados falsos negativos (OGILVIE et al., 2014). [I] representa a C_{max} (concentração máxima) total do inibidor potencial (ligado e não ligado às proteínas) durante o estado estacionário, determinado após a administração da dose clínica (a dose usual administrada durante o tratamento) e K_i representa a constante inibição no modo reversível.

- $ightharpoonup [I]/K_i > 1,0$: Inibição clinicamente significante é provável;
- ightharpoonup [I]/ K_i = 0,1 a 1,0: Inibição clinicamente significante é possível;
- \triangleright [I]/ K_i < 0,1: Inibição clinicamente relevante é improvável.

Figura 17- Recomendações do FDA empregando a correlação IVIV dos dados de inibição reversível. Fonte: FDA, 2012; OGILVIE et al. 2014.

Por exemplo, sabe-se que o cetoconazol é um inibidor potente da CYP3A4, utilizando-se a fexofenadina como substrato padrão da CYP3A4, o K_i calculado em um sistema in vitro foi de 0,1 µmol L⁻¹, enquanto que a concentração máxima de cetoconazol dosada no plasma ([I]) foi de 6,6 µmol L⁻¹, portanto a razão [I]/K_i foi de

66, indicando uma potencial inibição in vivo que, segundo o FDA, deve ser investigada com mais detalhes (BLANCHARD et al., 2004).

Objetivo Geral do Trabalho

Objetivo geral do trabalho

O objetivo deste trabalho foi a avaliação in vitro do perfil metabólico do agente antitumoral piplartina frente às enzimas do citocromo P450 e predição de parâmetros farmacocinéticos. Os resultados obtidos com este trabalho estão subdivididos nos seguintes capítulos:

- 2 Perfil cinético das enzimas do CYP450 frente à piplartina;
- 3 Estudo de inibição das enzimas do CYP450 pela piplartina;
- 4 Elucidação estrutural dos metabólitos da piplartina gerados através da reação com enzimas do CYP450;
- 5 Determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo da piplartina (fenotipagem enzimática).

CAPÍTULO 2
Perfil cinético das enzimas do
CYP450 frente à piplartina

CAPÍTULO 2

Perfil cinético das enzimas do CYP450 frente à piplartina

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Determinação dos parâmetros enzimáticos das enzimas do CYP450 contidas no microssomas hepático de humanos e posterior predição dos parâmetros farmacocinéticos in vivo da piplartina.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Validação de um método analítico para quantificação da PPT em microssomas hepático de humanos;
- Determinação dos parâmetros cinético enzimáticos envolvidos;
- Determinação do clearance intrínseco;
- Determinação da fração não ligada da PPT às proteínas microssomais e plasmáticas;
- Predição dos parâmetros farmacocinéticos in vivo.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

2.2.1.1 Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados (grau cromatografia) nos experimentos foram: acetonitrila da J.T. Baker[®] (Phillipsburg, EUA), hexano da Panreac (Barcelona, Espanha), acetato de etila da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, EUA). A solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ pH 7,4 foi adquirido da BD Biosciences (Nova Jersey, EUA) sendo diluído para uma concentração final de 0,1 mol L⁻¹. Os cofatores empregados para geração do NADPH também foram obtidos da BD Biosciences (Nova Jersey, EUA) e consistem em: solução A de regeneração do sistema NADPH (31 mmol L⁻¹ NADP+, 66 mmol L⁻¹ glicose-6-fosfato e 66 mmol L⁻¹ de MgCl₂) e solução B de

regeneração do sistema NADPH (40 U mL⁻¹ glicose-6-fosfato desidrogenase). Como padrão interno foi utilizado a carbamazepina obtida da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA).

2.2.1.2 Obtenção do produto natural PPT

A PPT foi isolada das folhas da *Piper tuberculatum* e foi fornecida pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, campus São Paulo. Para determinação da pureza da amostra foram feitas previamente análises espectroscópicas, tais como ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MORAES et al., 2011; NAVICKIENE et al., 2000). Posteriormente, para confirmar a pureza da amostra, foi realizada, novamente, análises qualitativas, tais como espectrometria de massas de alta resolução e RMN de carbono e hidrogênio que demonstraram que o composto presente na amostra é a PPT. Além disso, foram realizadas análises quantitativas tais como a termogravimetria e a cromatografia liquida de alta eficiência que comprovaram uma pureza de 99,54% da PPT (**Anexo 1**).

2.2.1.3 Equipamentos em geral

Para a pesagem das substâncias foi utilizada a balança Sartorius AG Germany modelo CP225D (Sartorius, Santo André, SP, Brasil). A água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, EUA). Para a incubação das amostras foi utilizado um banho metabólico, modelo SL 157, Solab (Piracicaba, SP, Brasil). Na etapa de preparação das amostras foi utilizado um agitador Vibrax VXR (IKA, Staufen, Alemanha), um agitador orbital Phoenix modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil) e a centrífuga Hitachi (CF16RXII, Himac, Tóquio, Japão). Na etapa de avaliação de ligação às proteínas foi empregado o dispositivo de ultrafiltração Amicon 30000 Da (Millipore, Bedford, EUA).

2.2.1.4 Análises cromatográficas por cromatografia liquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

O equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência empregado é da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-20AT operando a uma vazão de 1 mL min⁻¹, degaseificador DGU-20A5, injetor com amostrador de 50 μ L SIL-10AF, detector de arranjo de diodos SPD-M20A operando no intervalo entre 190 a 800 nm, controladora CBM-20A, e forno para coluna modelo CTO-20A. As injeções foram realizadas automaticamente e o programa empregado na aquisição dos dados foi o Software LC Solution, SPD-M20A PDA utility (Shimadzu, Kyoto, Japão). A coluna empregada foi a Shim-pack VP-ODS Shimadzu (250 mm x 4,6 mm d.i. e 5 μ m de tamanho de partícula) e a coluna de guarda Shim-pack GVP-ODS Shimadzu (10 mm x 4,6 mm d.i. e 5 μ m de tamanho de partícula) (Shimadzu, Kyoto, Japão). A fase móvel foi composta por acetonitrila: água (40:60, v/v) e a temperatura da coluna foi de 32° C.

2.2.1.5 Preparo das soluções de PPT e do padrão interno

Para a obtenção das soluções-trabalho de PPT foi preparada uma solução-estoque de 1500 μg mL-1, solubilizada em acetonitrila: água (1:1, v/v) e a partir dela foram preparadas as seguintes soluções-trabalho nas concentrações: 900; 750; 675; 450; 300; 180; 60; 30; 18; 12; 6; 3; 1,8 e 1,2 μg mL-1, solubilizadas em acetonitrila: água (25:75, v/v). Este procedimento foi adotado com o objetivo de utilizar um volume de solvente adequado para não inibir as enzimas do CYP450 durante o procedimento de metabolismo ((BUSBY; ACKERMANN; CRESP., 1999, CHAURET; GAUTHIER; NICOLL-GRIFFITH, 1998. O padrão interno, carbamazepina, foi devidamente pesado e solubilizado em acetonitrila, resultando em uma concentração de 500 μg mL-1.

2.2.1.6 Microssomas hepático de humanos (HLM)

A preparação microssomal de fígado humano foi adquirida da Corning Life Sciences (Mayfield, EUA) composta por um *pool* de 50 doadores de ambos os sexos, número de catálogo 452156, na concentração proteica de 20 mg mL⁻¹.

2.2.1.7 Programas utilizados no processamento de dados

O programa GraphPad Prism Versão 3.03 (San Diego, EUA) foi empregado para a obtenção da regressão não-linear e também para a obtenção do gráfico de Eadie-Hofstee. A regressão linear foi obtida empregando-se o Excel do pacote Microsoft Office 2007 (Kansas City, EUA). O teste de falta de ajuste (*lack of fit*) foi realizado empregando o programa MINITAB Release, versão 14.1 (State College, EUA).

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Procedimento de incubação para o estudo de metabolismo in vitro

Para a incubação foram utilizados tubos de vidro de 10 mL âmbar para evitar degradação da PPT pela incidência de luz (SILVA-JÚNIOR, 2013). Inicialmente, 20 μL da solução do substrato foi adicionado ao tubo, sendo que a concentração de solvente orgânico usada no estudo não interferiu na ação das enzimas do CYP450 (BUSBY; ACKERMANN; CRESP., 1999, CHAURET; GAUTHIER; NICOLL-GRIFFITH, 1998). Em seguida, adicionou-se a solução tampão fosfato 0,1 mol L-1 pH 7,4 diluído a partir da solução tampão fosfato 0,5 mol L-1 pH 7,4. Posteriormente, foi adicionado 10 μL da solução A e 2 μL da solução B de regeneração do sistema NADPH. O cofator NADPH é importante nos estudos de metabolismo in vitro, uma vez que ele é responsável pela a doação de elétrons para o sistema. Dessa forma a sua concentração nesses estudos foi empregada em excesso para não haver depleção deste cofator durante os experimentos (GENTEST, 2013).

A mistura, então, foi pré-incubada em banho-maria na presença do substrato e do NADPH a 37 °C durante 5 min. Finalmente, a fração microssomal do fígado humano (HLM) foi acrescentada e então, iniciou-se o procedimento de metabolismo in vitro. A incubação foi realizada sob agitação a 37 °C. O volume final do meio de incubação foi de 200 μL. Depois de decorrido o tempo de incubação, de acordo com cada ensaio realizado, a reação foi encerrada pela adição de 200 μL de acetonitrila gelada. Em seguida, o tubo foi agitado durante 20 segundos em um agitador de tubos tipo "mixer" e, após, centrifugou-se a 2860 x g durante 5 minutos. Controles foram

realizados sem a adição do cofator NADPH e sem a presença de microssomas. A diferença entre os valores obtidos com e sem NADPH foi considerada como a taxa da PPT que sofreu metabolismo pelo CYP450. Este procedimento de incubação foi adaptado do guia para teste com microssomas humanos da BD Gentest (GENTEST, 2013).

2.2.2.2 Validação do Método Analítico

Toda validação analítica foi realizada empregando HLM, resultando em uma concentração proteica final de 0,18 mg mL-1. Além disso, foi empregada a padronização interna, visando melhorar a reprodutibilidade dos ensaios. Para isto, foi adicionado 20 μL de uma solução de carbamazepina na concentração de 500 μg mL-1 (2,12 mmol L-1). Na validação analítica optou-se por seguir os parâmetros recomendados pela ANVISA (ANVISA, 2012) e pelo FDA (FDA, 2013) para análise de fármacos em fluidos biológicos, sendo esses: linearidade, limite de quantificação, seletividade, estabilidade, precisão, exatidão, efeito de matriz e efeito residual.

Com o objetivo de melhorar a reprodutibilidade do método e minimizar os problemas decorrentes do processo de preparo da amostra, optou-se pela padronização interna empregando a carbamazepina como padrão interno (Figura 18).

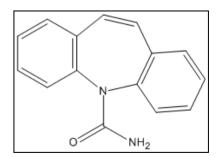


Figura 18- Estrutura química da carbamazepina.

A linearidade refere-se à capacidade do método em gerar resultados proporcionais à concentração do analito, contidos em uma faixa analítica especificada (ANVISA, 2012). Segundo recomendações da ANVISA, deverão ser analisadas pelo menos 5 concentrações distintas, no mínimo em triplicata. O teste F deve ser realizado

para avaliar a significância do coeficiente angular. Na análise de resíduos deverá ser considerado um nível de significância de 5% (ANVISA, 2012). O teste de falta de ajuste foi realizado empregando o programa MINITAB, considerando como estatisticamente significativo um valor de p maior que 0,05. A curva analítica foi preparada a partir de 6 pontos de diferentes concentrações, adicionando no meio microssomal (volume final de 200 μL) 20 μL da solução de PPT (n = 3, para cada concentração), obtendo-se assim as concentrações finais no meio microssomal de: 0,38; 0,95; 9,45; 141,80; 236,34 e 283,61 μmol L-1 de PPT.

Durante a determinação do perfil cinético da PPT, como não se conheciam os valores dos parâmetros cinético enzimáticos, foi necessário o emprego de uma faixa de concentração ampla (aproximadamente três ordens de grandeza) contemplando a concentração mínima capaz de ser quantificada até a concentração máxima solúvel no meio microssomal. Neste caso, os dados apresentaram variâncias diferentes para as diversas concentrações empregadas na curva gerando desvios grades e causando um comportamento de dados que é denominado de heterocedástico (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). Devido a este comportamento, aplicou-se um tratamento estatístico a fim de minimizar os erros gerados, empregando o fator de ponderação 1/x². Este tipo de correção tem sido empregado em outros estudos de metabolismo in vitro (MARQUES et al., 2014; MOREIRA et al. 2013).

O Limite Inferior de Quantificação (LIQ) pode ser considerado como a menor concentração empregada capaz de ser quantificada de uma forma precisa e exata. O erro relativo não deve ser maior que ± 20%, enquanto que o coeficiente de variação não devem ultrapassar 20%. O LIQ foi determinado avaliando a concentração de 0,38 μmol L-1 em quintuplicata. Estas amostras foram analisadas com base em uma curva analítica preparada na faixa de 0,38 – 283,61 μmol L-1.

A precisão normalmente é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR%) de acordo com a Equação 10.

$$DPR (\%) = \frac{s}{x} \times 100$$
 Equação 10

Onde S e X representam, respectivamente, a estimativa do desvio padrão e a média dos valores de concentração obtidos das amostras analisadas. Os valores aceitáveis do desvio padrão relativo para os dados são de 15% para as concentrações

ao longo da curva sendo que, para o LIQ é permitido 20% (ANVISA, 2012). Já a exatidão pode ser expressa em porcentagem do erro relativo, através da Equação 11.

$$Erro\ Relativo\ (\%) = \frac{Conc\ obtida - Conc\ nominal}{Conc\ nominal}\ x\ 100$$
 Equação 11

A Conc. obtida refere-se à concentração obtida na análise e Conc. nominal é a concentração considerada verdadeira. Os valores aceitáveis do erro relativo para os dados são de ± 15% para as concentrações ao longo da curva e de ± 20% para o LIQ (ANVISA, 2012). Para a determinação da exatidão e precisão foram analisadas amostras na concentração equivalente ao LIQ, em concentração baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA), sendo estas: 0,38; 0,95; 141,80 e 283,61 μmol L⁻¹.

Nos ensaios de exatidão e precisão intraensaio os experimentos foram realizados em um mesmo dia (n = 5); já nos ensaios de precisão e exatidão interensaio os experimentos foram realizados em três dias consecutivos (n = 3). Deve ser destacado que a cada dia de ensaio era realizada uma nova curva analítica para a quantificação das amostras.

A precipitação proteica foi a técnica escolhida para preparação das amostras, uma vez que é rápida e simples e promoveu a limpeza necessária para o desenvolvimento do método. Além disso, foi analisada a eficácia de romper a ligação dos analitos com estas biomoléculas, comparando amostras contendo a matriz microssomal e amostras em solução tampão. Para isto, nesse ensaio, foi utilizado concentrações baixa, média e alta: 0,95; 141,80 e 212,7 μmol L⁻¹ e a precipitação proteica foi promovida pela adição de 200 μL de acetonitrila gelada ao meio de incubação e o procedimento realizado de acordo com o item 2.2.2.1.

Os ensaios de estabilidade foram realizados adicionando ao meio microssomal (sem cofatores) quantidades conhecidas da PPT. Foram analisadas concentrações baixa e alta, 0,95 e 236,34 µmol L⁻¹, respectivamente. Os ensaios foram realizados mantendo as amostras a 37°C em banho-maria durante 50 minutos e em repouso sobre a bancada durante 4 horas. Após esse período, foi adicionada acetonitrila gelada, as amostras foram preparadas e posteriormente analisadas por CLAE. Na avaliação, as amostras submetidas ao teste de estabilidade foram quantificadas a partir da curva analítica obtida de amostras recém preparadas. Além disso, avaliou-se

a estabilidade das amostras quando permanecidas no autoinjetor do sistema cromatográfico. Neste experimento as amostras, após serem extraídas dos microssomas hepático, foram solubilizadas na fase móvel e permaneceram em repouso durante 24 horas no autoinjetor e posteriormente foram quantificadas com o emprego de uma curva analítica recém preparada, a fim de verificar se há algum tipo de degradação. Como recomendado pela ANVISA, as amostras são consideradas estáveis se os valores de erro relativo forem menores 15% da concentração nominal (ANVISA, 2012).

Na seletividade foi avaliada a capacidade do procedimento de preparação da amostra em eliminar interferentes provenientes da matriz microssomal (BONFILIO et al., 2012). Esse estudo foi realizado extraindo amostras "brancos" de microssomas sem adição dos analitos. Posteriormente foi avaliada a presença de interferentes nos tempos de retenção do analito e do padrão interno.

O efeito residual foi avaliado e consiste na injeção de um "branco" antes da injeção da amostra contendo o analito e duas injeções de "branco" posteriores à injeção da amostra correspondente a concentração do limite superior de quantificação. De acordo com a ANVISA as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ, enquanto que as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser inferiores a 5 % da resposta do padrão interno.

2.2.2.3 Procedimento para determinação da cinética enzimática

Três etapas foram realizadas para obter os dados de cinética enzimática, resultantes da relação entre Velocidade *versus* Concentração de substrato. Existem inúmeros fatores que devem ser considerados no procedimento de incubação in vitro a fim de obter uma reprodução aproximada do que ocorre in vivo (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). Dentre estes, a concentração de proteínas, isto é, a concentração de enzimas microssomais e o tempo de incubação produzem grande influência sobre a reação durante a incubação. Na determinação de proteínas microssomais foi avaliada uma faixa de 0,1 – 1,5 mg mL⁻¹ de meio microssomal e a concentração de PPT empregada foi de 18,91 μmol L⁻¹ e fixado o tempo de 40 minutos de incubação. Na

determinação do tempo de incubação foi avaliada uma faixa de 3-40 minutos, empregando-se a concentração de 18,91 μmol L-1 de PPT e fixada a concentração de proteína microssomal em 1 mg mL-1. Estes dois experimentos foram realizados com a finalidade de obter condições que atendessem a condição de Velocidade Inicial (V₀), estas condições foram obtidas quando a depleção do substrato foi linear com o tempo de incubação e concentração de proteínas microssomais. Dentro desta faixa linear ainda selecionaram-se as condições que representaram aproximadamente 10% de depleção de substrato (SUBRAMANIAN;TRACY, 2012). Assim, o experimento de cinética enzimática (variação da concentração do substrato) foi executado empregando tais condições otimizadas. Neste experimento de variação de concentração de substrato foram empregadas as concentrações finais de PPT no meio microssomal de 0,38; 0,57; 0,95; 1,89; 3,78; 5,67; 9,45; 18,91; 56,7; 94,5; 141,80; 212,7; 236,34; 283,61 μmol L-1.

2.2.2.4 Determinação da fração não ligada da PPT às proteínas microssomais e plasmáticas

Na determinação da fração não ligada da PPT às proteínas foi empregada uma concentração correspondente ao S₅₀ (determinado na cinética enzimática). Nesse teste foram empregados os dispositivos de ultrafiltração com tamanho de poro ideal (30000 Da) para a retenção tanto de proteínas microssomais, quanto de proteínas plasmáticas. O meio contendo um volume final de 200 μL foi incubado sem a presença de NADPH, mas utilizando o tempo de incubação e a concentração de proteínas microssomais correspondente às condições de V₀ determinadas durante a etapa da cinética enzimática (seção 2.2.2.3). No ensaio com proteínas plasmáticas foi empregada a concentração de 42 mg mL⁻¹, correspondente a uma concentração média presente no corpo humano (GÓMEZ-GÓNZALEZ et al., 2015). Para ambos os testes foi realizado um controle contendo apenas a PPT e a solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4. Após a incubação, o meio foi transferido para o dispositivo de ultrafiltração e submetido a centrifugação a 21800 *x g* por 30 minutos, empregando uma temperatura de 30°C. Após este procedimento, o ultrafiltrado foi coletado e injetado diretamente no sistema CLAE-DAD.

A fração não ligada às proteínas microssomais (fu_{mic}) foi calculada a partir da razão entre a área da PPT contida no ultrafiltrado empregando os microssomas (Área_{mic}) dividido pela área de PPT contida no ultrafiltrado da solução tampão, isto é, ausência de proteínas (Área_{tampão}), de acordo com a Equação 12.

$$fumic = \left(\frac{\text{Á}rea_{mic}}{\text{Á}rea_{tampão}}\right)$$
 Equação 12

Para obtenção da fração não ligada à proteína plasmática (fuplasma) uma equação análoga a anterior foi empregada (Equação 13).

$$fuplasma = \begin{pmatrix} Area_{plasma} / Area_{tampão} \end{pmatrix}$$
 Equação 13

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análise Cromatográfica da PPT

O método empregado na análise cromatográfica foi anteriormente otimizado por Marques et al. (2014). Para tanto foi utilizado uma coluna C18 e fase móvel composta por acetonitrila: água (40: 60, v/v). A vazão empregada foi de 1 mL min⁻¹ e o comprimento de onda fixado em 220 nm. Nesta condição observou-se um tempo de retenção (t_R) de 8,5 min para o padrão interno e 15,2 min para PPT (Figura 19).

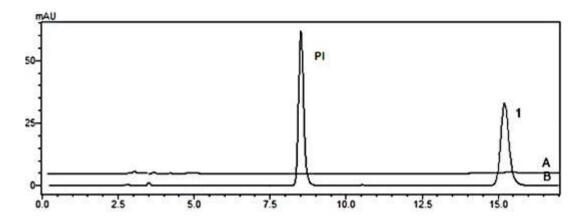


Figura 19- Cromatograma representativo do branco microssomal sem a adição de PPT e padrão interno (A). Meio microssomal fortificado com o padrão interno (PI) 500 μg mL⁻¹ e a PPT (1) 180 μg mL⁻¹ (B). Condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS Shimadzu[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μm), vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹. O comprimento de onda foi fixado em 220 nm. Volume injetado: 40 μL. Fase móvel acetonitrila: água (40: 60, v/v). Temperatura de análise 32°C.

2.3.2 Validação do método analítico para quantificação da PPT no meio microssomal

Estabelecidas as condições para análise da PPT por CLAE, iniciou-se o processo de validação analítica a fim de quantificar a PPT em HLM. Os experimentos foram realizados de acordo com as exigências previstas no guia para métodos bioanalíticos elaborado pela ANVISA (ANVISA, 2012). A validação analítica visa demonstrar que um determinado método é adequado para uma específica aplicação, no caso, determinar os parâmetros cinéticos das enzimas do CYP450 presentes no meio microssomal após metabolismo da PPT.

A seletividade de um método bioanalítico é um importante parâmetro a ser avaliado. Esse parâmetro garante que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de metabólitos, produtos de degradação ou compostos presentes na amostra (CASSIANO et al., 2009, PASCHOAL et al., 2008). Verificou-se que nenhum pico interferente elui no mesmo tempo de retenção do analito ou do padrão interno (Figura 18). Com isso, pode-se concluir que a técnica de preparo de amostra foi efetiva para a limpeza da matriz.

A Tabela 3 apresenta os dados da linearidade do método. Como pode ser observado, todos os valores apresentados estão de acordo com as exigências dos guias adotados (ANVISA, 2012; FDA, 2013).

Tabela 3- Dados da linearidade do método desenvolvido para quantificação da PPT em HLM.

Analito		Linearidade L			ack of fit	
	Faixa (µmol L ⁻¹) ^a	Equação Linear ^b	rc	F ^d	Pe	
PPT	0,378- 283,6	y= 0,003394x - 0,0000003702	0,999	2,34	0,055	

^a Ponderação 1/x²

A análise de resíduos das curvas analíticas mostraram uma distribuição aleatória dos valores no gráfico (dados não apresentados), indicando assim uma regressão linear satisfatória (RIBEIRO et al., 2008).

Os parâmetros limite de quantificação e precisão e exatidão intra- e interensaio estão expostos na Tabela 4. Como demonstrado, os valores de erro relativo e desvio padrão relativo para o limite de quantificação estão inferiores ao recomendável pela legislação, comprovando assim o poder de quantificação mínima do método (ANVISA, 2012).

Tabela 4- Limite de quantificação, precisão e exatidão intra- e interensaio para análise da PPT em meio microssomal.

Parâmetro	Conc. Nominal (µmol L ⁻¹)	Conc. Obtida (µmol L ⁻¹)	Erro Relativo (%)ª	DPR (%) ^b
LIQ	0,38	0,38	0	5
	0,38	0,41	6	7
Precisão e	0,95	0,95	0	10
Exatidão Intraensaio	141,8	141,0	–1	8
	236,3	225,5	-4	5
	0,38	0,39	2	6
Precisão e	0,95	0,93	-2	6
Exatidão Interensaio	141,8	152,1	7	7
IIILETETISAIU	236,3	247,2	5	8

^a: Erro Relativo expresso em porcentagem

^b Os erros relativos para cada ponto da curva foram inferiores a 15%.

^c Coeficiente de Correlação

^d F_{valor (2,34)} < F_{tabelado (6,39)}

e nível de significância p ≤ 0,05

b: Desvio Padrão Relativo

O método de preparação de amostra empregado foi a precipitação proteica; dessa forma, para avaliar se a ligação do fármaco à matriz microssomal pudesse influenciar nesse processo foi realizado um experimento considerando a PPT solubilizada apenas em um volume de solução tampão como 100% e comparando a área obtida com a PPT presente na matriz microssomal após adição de acetonitrila gelada (Tabela 5). Como pode ser observado na Tabela 5, os valores de recuperação relativa obtidos estão próximos a 100% com valores de desvio padrão inferiores a 7%, confirmando assim a reprodutibilidade do processo de preparação das amostras.

Tabela 5- Efeito de matriz para análise da PPT em meio microssomal.

^a Desvio Padrão Relativo

Os ensaios de estabilidade demonstraram que as amostras se mantêm estáveis a 37°C durante 50 min em banho-maria, ao permanecer sobre a bancada durante 4 horas e ao permanecer em repouso no autoinjetor por 24 horas. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6- Estabilidade de bancada, de incubação e de autoinjetor.

PPT (μmol L ⁻¹)	Banca	Bancada 4 hs		37°C 50 min		Autoinjetor 24 hs	
	Erro ^a (%)	DPR ^b (%)	Erro (%)	DPR (%)	Erro (%)	DPR (%)	
0,95	0,6	4	0,6	4	-4	2	
212,7	6	1	0,0	3	0	7	

a: Erro Relativo expresso em porcentagem

Marques (2013) demonstrou em seu trabalho que a PPT sofre degradação após um tempo de incubação longo e ao ser deixada sobre a bancada por longos períodos;

b: Desvio Padrão Relativo

dessa forma, neste trabalho teve-se o cuidado de empregar condições em que a substância pesquisada não sofresse processos de degradação.

O efeito residual, também conhecido como "carryover", corresponde a um aparecimento de sinal do analito ou padrão interno decorrente de contaminação proveniente de análises anteriores (ANVISA, 2012). A análise do cromatograma (Figura 20) mostra que não apareceram picos interferentes nos tempos de retenção do padrão interno e da PPT, demonstrando que não há efeito residual entre as injeções.

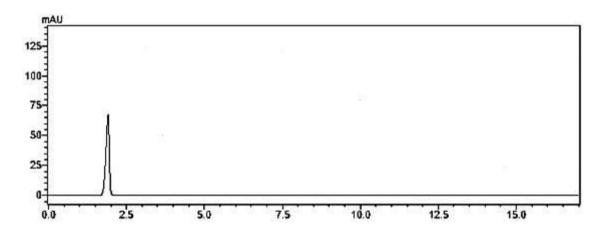


Figura 20- Injeção de uma amostra "branco" após injeção do analito na concentração equivalente ao limite superior de quantificação. Condições cromatográficas descritas na Figura 18.

2.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos

Após a validação da metodologia analítica, iniciou-se o estudo para a determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas do CYP450 após metabolismo da PPT. Na avaliação destes parâmetros, deve-se observar o desaparecimento do substrato ou a produção do metabólito em uma região linear para concentração de proteínas microssomais e tempo de incubação. No presente estudo optou-se por utilizar a avaliação da depleção do substrato, uma vez que os metabólitos da PPT ainda não se encontram para comercialização. Este método possui a vantagem que o substrato geralmente está em maior quantidade do que o metabólito, sendo possível o alcance de menores limites de quantificação (OBACH; REED-HAGEN, 2002). Para a obtenção de altas concentrações do metabólito é necessário utilizar condições extremas de incubação, como um tempo de incubação longo e alta concentração de

proteína microssomal, o que acarreta em vários problemas como a instabilidade da enzima, inibição do metabolismo pelo produto, entre outros (OBACH; REED-HAGEN, 2002, JONES; HOUSTON, 2004).

Na determinação da cinética enzimática é essencial a manutenção das condições de Velocidade Inicial (V₀); ou seja, condição onde o consumo do substrato seja linear em relação ao tempo de incubação e à quantidade de proteínas microssomais. Com isso, o primeiro parâmetro avaliado foi a influência da variação da concentração das proteínas na degradação da PPT. Para tanto, o seguinte intervalo de concentração de microssomas foi empregado: 0,10; 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,20 e 1,50 mg de proteínas por mL de meio microssomal (Figura 21).

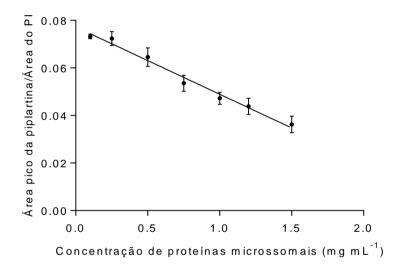


Figura 21- Efeito da variação da quantidade de proteínas no consumo do substrato. Concentração da PPT 18,9 μ mol L⁻¹. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Tempo de incubação: 40 min. Equação da reta: y= -0.02834x + 0.07727, r = 0,97. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A concentração de proteínas no meio microssomal é um indicativo da concentração de enzimas do CYP450. A partir deste gráfico que apresentou um comportamento linear na faixa estudada (r= 0,97) foi possível calcular a concentração de proteínas correspondente à 10% de depleção do substrato, o qual correspondeu a 0,45 mg mL⁻¹.

O segundo parâmetro avaliado foi a influência da variação do tempo de incubação no consumo do substrato (Figura 22). A variação do tempo de incubação

permite determinar em qual período o consumo do analito ou a produção do metabólito é linear. Os tempos avaliados foram: 3, 6, 10, 15, 20, 30 e 40 min. Dentro desta faixa obteve-se uma linearidade (r = 0,97) permitindo o cálculo do tempo correspondente a 10% de depleção do substrato que foi de 16 min.

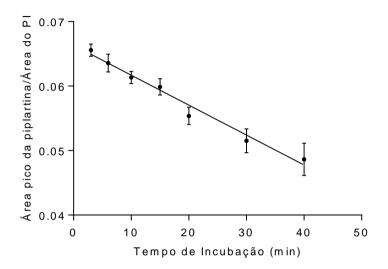


Figura 22- Efeito da variação do tempo de incubação no consumo do substrato. Concentração da PPT 18,9 μ mol L⁻¹. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Concentração de proteínas microssomais de 1 mg mL⁻¹. Equação da reta: y= -0,0004641x + 0,06633, r= 0,97. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Posteriormente, a última etapa do estudo foi a determinação dos parâmetros enzimáticos através da variação da concentração do substrato. Neste estudo é essencial a manutenção das condições de velocidade inicial (V₀), uma vez que ao longo da reação outros fatores, além da concentração do substrato, podem influenciar, como: inibição pelo produto formado, degradação da enzima e depleção do substrato (SEIBERT; TRACY, 2014). Com isso, foram utilizados a concentração de 0,45 mg mL⁻¹ de proteínas microssomais e tempo de incubação de 16 minutos na determinação dos parâmetros cinéticos.

O gráfico da velocidade (V) *versus* a concentração [S] de PPT apresentou um perfil de saturação sigmoidal (Figura 23), não correspondendo a cinética hiperbólica descrita por Michaelis-Menten.

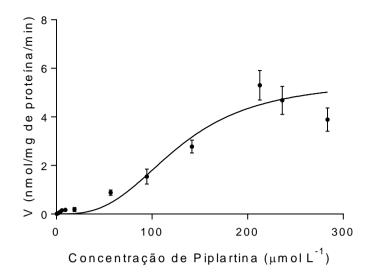


Figura 23- Sigmoide obtida para o estudo de metabolismo in vitro da PPT. Concentração de proteínas microssomais: 0,45 mg mL⁻¹, tempo de incubação 16 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Fonte: MOREIRA et al., 2016b.

Os parâmetros enzimáticos obtidos após o metabolismo da PPT foram: $V_{max} = 5.5 \pm 0.5$ nmol mg proteína ⁻¹ min ⁻¹, $S_{50} = 127,70$ µmol L⁻¹ e o coeficiente de Hill, h = 3. Nos estudos de metabolismo in vitro o clearance intrínseco é um importante parâmetro que pode ser calculado através destes dados obtidos. Esse parâmetro é a medida da relação dos parâmetros cinéticos para o processo de eliminação e, desta forma, reflete a capacidade máxima do metabolismo (BUXTON, 2011). Para o cálculo do clearance intrínseco de substâncias que seguem o modelo sigmoidal, utilizou-se a Equação 14 (KRAMER; TRACY, 2012).

$$CL_{int} = rac{V_{max}}{S_{50}} x rac{(h-1)}{h(h-1)^{1/h}}$$
 Equação 14

CL_{int} corresponde ao clearance intrínseco, V_{max} corresponde a velocidade máxima, S₅₀ indica a concentração de substrato para a qual V corresponde a metade de V_{max}. n ou h é o coeficiente de Hill o qual indica uma medida do grau de cooperatividade (ou sigmoidicidade). Então a partir desta equação calculou-se o clearance intrínseco para a PPT que foi de 22,68 μL min ⁻¹ mg ⁻¹.

Marques et al (2014) reportou um comportamento não michaeliano usando microssomas hepático de ratos, obtendo $V_{max} = 4.7 \ \mu mol \ \mu g$ proteína $^{-1}$ min $^{-1}$, $S_{50} = 44.7 \ \mu mol \ L^{-1}$ e o coeficiente de Hill de 2,5. Além disso, o clearance intrínseco descrito foi de 53,6 μ L min $^{-1}$ mg $^{-1}$. Apesar de ambos os trabalhos demonstrarem um comportamento sigmoidal, os parâmetros cinéticos e o clearance intrínseco foram distintos, com exceção do coeficiente de Hill que indicou em ambos estudos que o metabolismo da PPT envolve enzima(s) com múltiplos sítios ativos. O clearance intrínseco em ratos foi aproximadamente o dobro do valor encontrado em humanos, sugerindo uma maior exposição à PPT em humanos. Sabe-se que humanos diferem dos animais quanto ao conteúdo das suas isoformas, e dessa forma a comparação interespécies deste tipo de estudo sofre limitações (MARTIGNONI; GROOTHUIS; DE KANTER, 2006). Existem trabalhos na literatura que caracterizam o metabolismo de várias espécies animais e comparam com humanos a fim de encontrar o melhor modelo animal (BOGAARDS et al., 2000).

O gráfico de Eadie-Hofstee corresponde a outra forma de expressar os resultados obtidos com a variação da concentração do substrato. Este gráfico está representado na Figura 24. Como pode ser observado pelo gráfico há o cooperativismo positivo no metabolismo desse substrato. Este tipo de gráfico distingue o comportamento Michaeliano (o qual corresponde a uma reta) da cinética de Hill (caracterizada por um gráfico em forma de "gancho") (WU, 2011).

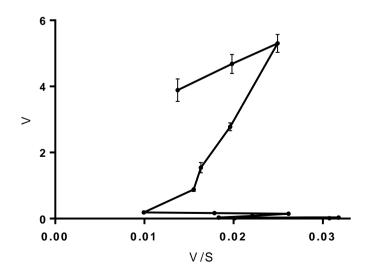


Figura 24- Gráfico de Eadie-Hofstee após o metabolismo da PPT pelas enzimas do CYP450.

O desvio do comportamento hiperbólico descrito por Michaelis e Menten (1913), indica o efeito de cooperatividade observado em enzimas que possuem múltiplos sítios ativos. Este efeito foi observado para as enzimas do CYP450 pela primeira vez em 1980, relacionada à existência de isoformas cineticamente distintas e diferentes locais de ligação do substrato (TORRES; ABURTO, 2005).

2.3.4 Fração não ligada às proteínas plasmáticas e microssomais

No estudo de ligação às proteínas microssomais foram empregadas as condições de V₀ no momento da incubação, com isso a concentração de 0,45 mg mL⁻¹ e o tempo de incubação de 16 minutos foram aplicados; após a etapa de incubação o meio foi adicionado ao dispositivo de ultrafiltração. A fração livre no meio microssomal (fu_{mic}) foi de 0,76, enquanto que no plasma (fu_{plasma}) foi de 0,07.

Na predição do clearance in vivo a partir dos resultados in vitro com microssomas hepáticos, alguns fatores devem ser levados em consideração a fim de fornecer resultados confiáveis. Verificou-se que não apenas os fatores relacionados a correção de escala são importantes, mas também a ligação não específica às proteínas microssomais e plasmáticas (BALLARD; ROWLAND, 2011, WATERS; OBACH; DI, 2014).

2.3.5 Predição dos parâmetros farmacocinéticos da PPT in vivo

A estratégia para predição do clearance in vivo baseada nos dados obtidos do clearance intrínseco foi descrita por Houston em 1994 e aperfeiçoada por Obach em 1999; desde então, vários artigos vem descrevendo a capacidade de predição do clearance através do uso de dados obtidos em ensaios in vitro. Estes experimentos, geralmente, utilizam microssomas ou hepatócitos de ratos e também microssomas humanos (CHIBA; ISHII; SUGIYAMA, 2009).

Na predição do clearance in vivo alguns fatores são levados em consideração a fim de aproximar a condição que ocorre realmente no organismo. A Equação empregada para o cálculo do clearance foi descrita anteriormente (Equação 7). Nessa equação CL corresponde ao Clearance; Q indica o fluxo sanguíneo hepático que é

estimado em 20 mL min ⁻¹ kg ⁻¹ para humanos; A corresponde a quantidade, em miligramas, de microssoma por grama de fígado, sendo o valor 40 mg g⁻¹ o mais utilizado nos trabalhos; B descreve a quantidade em grama de fígado por quilograma de peso corporal, representado pelo valor médio de 20 g kg ⁻¹, considerando um adulto com 70 kg; fu_{plasma} é a fração do fármaco livre no plasma e fu_{mic} a fração livre no meio microssomal. Finalmente, CL_{int} corresponde ao clearance intrínseco obtido experimentalmente in vitro (AUSTIN et al., 2005, OBACH, 1999, SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). Os parâmetros farmacocinéticos preditos estão descritos na Tabela 7. O clearance hepático foi calculado empregando-se a Equação 8.

Tabela 7- Parâmetros farmacocinéticos preditos.

PPT (µmol L ⁻¹)	fu _{plasma} ª	fu _{mic} ^b	Clearance intrínseco (CL _{int}) (µL min ⁻¹ mg ⁻¹)	Clearance in vivo predito (CL) ^c (mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	Clearance Hepático (CL _H) (mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	Extração Hepática (E)
127,70	0,07	0,76	22,68	19,79	1,89	0,09

 ^a fu_{plasma}: fração livre do composto no plasma
 ^b fu_{mic}: fração livre do composto no meio microssomal.
 ^c Q, fluxo sanguíneo hepático, 20 mL min ⁻¹ kg⁻¹; A, quantidade em miligramas de microssomas por grama de fígado, 40 mg g⁻¹; B, quantidade em gramas de fígado por quilograma de peso corporal, 20 g kg⁻¹.

Como pode ser observado, a partir dos dados demonstrados na Tabela 7, considerando-se que o fluxo sanguíneo hepático em um indivíduo normal corresponde à 20 mL min-1 kg-1, o clearance calculado foi de 19,79 mL min-1 kg-1. A taxa de extração hepática calculada, de acordo com a Equação 9, foi de 0,09, o qual indica uma baixa extração da PPT pelo fígado durante o efeito de primeira passagem, correspondendo a um efeito desejável, uma vez que a PPT não terá sua biodisponibilidade significativamente diminuída por tal efeito, chegando ao sistema circulatório em altas concentrações, e posteriormente distribuído para o local de ação. Estes dados corroboram com os parâmetros farmacocinéticos obtidos para a PPT em camundongos que demonstraram uma alta biodisponibilidade após administração oral (FOFARIA et al. 2016). A baixa extração hepática (EH < 0,3) aliada à alta ligação às proteínas plasmáticas (fup < 0,2) indica que o clearance hepático da PPT depende tanto da extensão da ligação às proteínas plasmáticas quanto do clearance hepático intrínseco da fração não ligada. Fármacos com esta característica não possuem problemas na disposição quando o fluxo hepático é alterado como, por exemplo, em algumas doenças como na insuficiência cardíaca, no entanto, eles são altamente afetados por mudanças na ligação às proteínas, e indução e inibição das enzimas do metabolismo, tornando-se uma etapa limitante no clearance hepático (TOZER; ROWLAND, 2006).

O uso da fração não ligada à proteína durante a predição tem possibilitado uma predição acurada do clearance (RILEY; MCGINNITY; AUSTIN, 2005, AUSTIN et al., 2005). No entanto, a inclusão deste fator no cálculo apenas deve ser levado em consideração quando na situação in vivo este fenômeno também ocorre, isto é, parte do fármaco é sequestrado por proteínas e/ou macromoléculas teciduais, ficando indisponível para sofrer o metabolismo. Outros fatores devem ser levados em consideração para a obtenção de uma predição condizente com a situação in vivo (OBACH; SCOTT, 1999). Primeiramente, o clearance metabólico deve ser a principal rota de eliminação da substância, quando comparada com outras vias, tais como a bile e os rins; além disso, o fígado deve ser o principal órgão envolvido na eliminação. Outra condição importante é que o metabolismo oxidativo realizado pelas enzimas do CYP450 deve ser majoritário frente as demais reações de metabolismo, uma vez que apenas esta via de metabolismo está sendo estudada. Finalmente, as taxas de metabolismo e de atividade enzimática in vitro devem refletir a situação in vivo. Outro

fator que também não é considerado com o modelo microssomal é a atividade dos transportadores de membrana no processo do metabolismo. Com isso, apenas respeitando todos estes requisitos é possível obter uma predição eficaz. Os estudos envolvendo a farmacocinética e metabolismo da PPT ainda são escassos para afirmar que todas estas condições foram respeitadas para a predição, no entanto, com os dados expostos até o momento e nas demais seções do presente trabalho, sabe-se que o fígado é determinante na eliminação da PPT e, neste contexto, as enzimas da família CYP450 possuem papel crucial na excreção de tal substância.

2.4 CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos é possível inferir que o método cromatográfico empregado é adequado para a análise da PPT no meio contendo HLM, uma vez que demonstrou uma seletividade adequada combinada a um método de extração que possibilitou uma limpeza adequada da amostra e, dessa forma, ausência de interferentes nos tempos de retenção da PPT e do padrão interno.

O método foi validado para quantificação da PPT no meio microssomal seguindo parâmetros preconizados por agências reguladoras, tais como FDA e ANVISA, demonstrando precisão e exatidão desejáveis para a quantificação de tal substância.

A cinética enzimática obtida demonstrou um comportamento sigmoidal das enzimas microssomais frente à PPT; com os parâmetros cinéticos calculados $V_{max} = 5.5 \pm 0.5$ nmol mg proteína ⁻¹ min ⁻¹ e S₅₀ = 127,70 µmol L⁻¹ indicando a metabolização desta por isoforma(s) contendo múltiplos sítios ativos e/ou a metabolização por diferentes isoformas, resultando em uma cinética de saturação sigmoidal (SEIBERT; TRACY, 2014).

O clearance intrínseco calculado foi de 22,68 µL min -1 mg -1. O estudo da fração não ligada às proteínas microssomais e plasmáticas foram aplicadas para predição do clearance total, do clearance hepático e da taxa de extração, que são parâmetros farmacocinéticos importantes, uma vez que estimam a depuração do fármaco do organismo. Com os parâmetros obtidos é possível afirmar que a depuração hepática é uma importante via de eliminação da PPT do organismo, além

disso, a PPT possui uma baixa extração de primeira passagem pelo fígado, sendo considerado uma característica desejável durante o desenvolvimento de um novo fármaco.

Reunindo as informações obtidas nesta etapa, foi possível obter o perfil cinético das enzimas do CYP450 após metabolismo da PPT e predizer alguns parâmetros farmacocinéticos. Além disso, o parâmetro cinético enzimático S₅₀ obtido é de grande importância durante outros estudos cinéticos, tais como o estudo de inibição enzimática e fenotipagem.

CAPÍTULO 3
Estudo de inibição das enzimas do CYP450 pela piplartina

CAPÍTULO 3

Estudo de inibição das enzimas do CYP450 pela piplartina

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo Geral

Determinar, através do estudo in vitro utilizando os microssomas hepáticos humanos, a capacidade de inibição da PPT sobre as principais isoformas do CYP450, possibilitando a predição de possíveis interações medicamentosas.

3.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar o IC₅₀ (Concentração inibitória capaz de inibir 50% da atividade enzimática) da PPT frente cada isoforma do CYP450 avaliada;
- Determinar o modo de inibição dose-dependente e a constante de inibição (K_i)
 da(s) isoforma(s) do CYP450 significativamente inibida(s) pela PPT;
- Calcular os parâmetros cinéticos de inativação (K_I e k_{inact}) da(s) isoforma(s) do
 CYP450 inibida(s) de modo dose-, tempo- e NADPH-dependente pela PPT;
- Avaliar o modo de inibição tempo-dependente.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Materiais

3.2.1.1 Sistema Cromatográfico

O equipamento para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência empregado nestes estudos foi o mesmo descrito na seção 2.

3.2.1.2 Inibidores, substratos e marcadores do CYP450

Nos estudos in vitro de inibição foram empregados os seguintes substratos, inibidores e marcadores: fenacetina, diclofenaco, acetaminofeno, nifedipina, α-naftoflavona, sulfafenazol, cetoconazol, quinidina e ácido valproico, todos obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA). Bufuralol, 1-hidroxibufuralol, deidronifedipina, 4-

hidroxidiclofenaco obtidos da Toronto Research Chemicals (TRC) (Toronto, ON, Canadá). Os padrões internos cafeína, diazepam e metoprolol foram adquiridos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA).

3.2.1.3 Soluções-estoque e soluções-trabalho

A solução-estoque e as soluções-trabalho da PPT foram diluídas em 100% de acetonitrila. Na determinação do IC $_{50}$ da PPT sob cada isoforma do CYP450 as soluções-trabalho foram preparadas conforme a concentração final requerida para um volume final de 400 µL de meio de incubação, sendo essas: 127,7 µmol L $^{-1}$ (equivalente ao S $_{50}$ da PPT), 95,8 µmol L $^{-1}$ (3/4 S $_{50}$), 63,9 µmol L $^{-1}$ (1/2 S $_{50}$), 31,9 µmol L $^{-1}$ (1/4 S $_{50}$), 16,0 µmol L $^{-1}$ (1/8 S $_{50}$), 5,3 µmol L $^{-1}$ (1/24 S $_{50}$) e 2,0 µmol L $^{-1}$ (1/64 S $_{50}$).

Todas as soluções-estoque e soluções-trabalho dos substratos, metabólitos e inibidores seletivos de cada isoforma do CYP450 avaliadas foram preparadas em 100% de metanol de acordo com a faixa de concentração requerida, a qual está descrita nas seções correspondentes.

Todas as soluções foram armazenadas a – 20 °C e protegidas da luz.

3.2.1.4 Programas utilizados no processamento de dados

O mecanismo de inibição dose-dependente foi estimado graficamente empregando o gráfico de Lineweaver-Burk (duplo-recíproco), obtido através do programa SigmaPlot Versão 12.0 (San Jose, CA, EUA) e observando o local onde as retas se cruzam. Os valores das constantes de inibição foram determinados plotando o coeficiente angular (slope) da equação gerada do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração do inibidor (gráfico secundário). O gráfico de decaimento log-linear da atividade enzimática com o tempo foi obtido empregando-se o logaritmo natural da porcentagem da atividade remanescente *versus* tempo de pré-incubação. O gráfico secundário foi obtido plotando-se os coeficientes angulares do primeiro gráfico *versus* a concentração de inibidor. Na obtenção de ambos os gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism Versão 3.03 (San Diego, CA, EUA).

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Preparo das amostras e análise cromatográfica dos analitos

As condições de preparo de amostra empregando a extração líquido-líquido e a condição cromatográfica utilizada para cada isoforma do CYP450 estudada foram minuciosamente descritas por Habenschus (2016). O procedimento geral de extração líquido-líquido consistiu no interrompimento da reação de metabolismo pela adição de 2 mL de solvente orgânico. Em seguida foi adicionado o padrão interno e as amostras foram submetidas ao processo de extração, sendo agitadas a 1500 rpm por 10 min em agitador do tipo Vibrax® e centrifugadas a 943 xg por 5 min. Posteriormente, as fases orgânicas foram coletadas e evaporadas sob fluxo de ar comprimido, exceto para as reações envolvendo o monitoramento da deidronifedipina (CYP3A4) no qual a fase orgânica foi evaporada a vácuo empregando o sistema Speed Vacuum RVC 2-18 CD plus (Christ-Osterode, Alemanha). A Tabela 8 resume as condições de preparo de amostras empregando a extração líquido-líquido.

Tabela 8- Condições de preparo de amostras empregando-se a extração líquido-líquido.

Isoforma CYP450	Solvente Orgânico	Aditivo	Padrão Interno	Volume coletado (μL)
CYP1A2	Acetato de etila	-	Cafeína, 640 µmol L ⁻¹	1800
CYP2C9	Clorofórmio	240 μ L HCl 0,5 mol L ⁻¹	Diazepam, 492 µmol L ⁻¹	1800
CYP3A	Acetato de etila	-	Diazepam, 492 µmol L ⁻¹	1400
CYP2D6	Acetato de etila	400 μL NaOH 1 mol $L^{\text{-1}}$	Metoprolol, 524 µmol L ⁻¹	1600

As separações cromatográficas dos analitos empregados nos estudos de inibição foram realizadas no mesmo equipamento descrito na seção 2. As condições empregadas nas análises estão descritas na Tabela 9, sendo que em todas as análises foi empregada a coluna Ascentis Express Fused Core C₁₈ (100 mm x 4,6 mm; 2,7 μm) e coluna de guarda Ascentis Express C₁₈ (3,0 mm x 4,6 mm; 2,7 μm). O volume de injeção foi de 10 μL. As metodologias de separação cromatográfica foram adaptadas a partir das referências indicadas na Tabela 9.

Tabela 9- Condições cromatográficas para o estudo de cada isoforma do CYP450.

Isoforma CYP450	Reação	Fase Móvel	Vazão (mL/min); Temperatura (°C)	Tipo de eluição	Comprimento de onda de detecção (nm) Marcador; Padrão Interno	Referências
CYP1A2	O-deetilação fenacetina	KH ₂ PO ₄ , (0,05 mol L ⁻¹) + 0,1 % de trietilamina (pH 3,6) (Solvente A): Metanol (Solvente B)	0,6; 23	Gradientea	245; 272	SUN; LIU; WANG, 2006
CYP2C9	4-hidroxilação do diclofenaco	Solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (Solvente A): Metanol (Solvente B) (40:60; v/v)	0,9; 32	Isocrático	270; 310	ASFAK et al., 2007
СҮРЗА	Oxidação da nifedipina	Água (Solvente A): Metanol (Solvente B)	0,9; 32	Gradiente ^b	270; 310	PATKI; VON MOLTKE; GREEBLATT, 2003
CYP2D6	1-hidroxilação do bufuralol	Solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,1% (Solvente A) +Acetonitrila (Solvente B)	0,7; 32	Gradiente ^c	252; 225	SAXENA et al. 2014

^a Gradiente: 0-10 min manteve-se 20% de solvente B, aumentando no intervalo 10-12 min para 80%, permanecendo até 17 min e durante 17-19 min retomou-se a condição inicial de 20% de solvente B, com um tempo de reequilíbrio de 6 min.

^b Gradiente: 0-6 min manteve-se 50% de solvente B e no intervalo de 6-8 min aumentou-se para 60%, novamente aumentando a força cromatográfica com 70% de solvente B no intervalo 8-10 min, esta condição foi mantida até 15 min e de 15-17 min retornou-se para a condição inicial com um tempo de reequilíbrio de 3 min.

c Gradiente: 0-5 min manteve-se 18% de solvente e no intervalo de 5-8 min aumentou-se para 40%, novamente de 8-12 min aumentou-se para 100%, permanecendo esta condição até 15 min. No intervalo de 15-18 min retomou-se a condição inicial e o tempo de reequilíbrio foi de 20 min.

3.2.2.2 Isoformas do CYP450 estudadas

A Tabela 10 resume as isoformas estudadas e seu respectivo substratopadrão, marcador e inibidor seletivo empregado no estudo. A Figura 25
demonstra a estrutura química dos substratos e marcadores de cada isoforma e
a Figura 26 refere-se às estruturas químicas dos inibidores seletivos. Estas
isoformas foram avaliadas no presente estudo baseadas nas principais
isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo de PNs (Figura 7)
(MOREIRA et al. 2016a).

Tabela 10- Isoformas do CYP450 de humanos e seus respectivos substratos padrões, marcadores de reação e inibidores seletivos.

Isoforma	Substrato	Reação	Marcador	Inibidor
CYP1A2	Fenacetina	O-deetilação da fenacetina	Acetaminofeno	α-naftoflavona
CYP2C9	Diclofenaco	4-hidroxilação do diclofenaco	4'-Hidroxidiclofenaco	Sulfafenazol
CYP3A	Nifedipina	Oxidação da nifedipina	Deidronifedipina	Cetoconazol
CYP2D6	(±)-Bufuralol	1-hidroxilação do bufuralol	1'-Hidroxibufuralol	Quinidina

Figura 25- Substratos e marcadores da reação específica de cada isoforma do CYP450 avaliada.

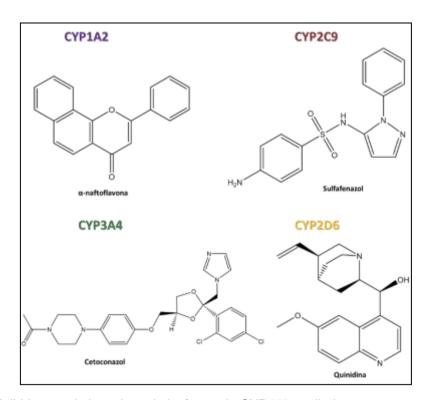


Figura 26- Inibidores seletivos de cada isoforma do CYP450 avaliada.

Inicialmente, o K_m de cada substrato padrão foi determinado através da regressão não-linear da concentração do substrato *versus* velocidade,

empregando-se condições de velocidade inicial com uma taxa mínima de decaimento do substrato. O K_m obtido foi empregado nas demais etapas. A determinação do K_m de cada substrato padrão foi descrito anteriormente por Habenschus (2016).

A segunda etapa caracterizou-se pela obtenção do IC₅₀ de cada inibidor seletivo do CYP450, empregando-se uma faixa de concentração adequada do inibidor para obtenção do IC₅₀ frente ao K_m do substrato padrão determinado na etapa anterior.

Em seguida, o IC $_{50}$ da PPT foi determinado variando sua concentração de 2,0 a 127,7 µmol L $^{-1}$ (baseado no valor de S $_{50}$ obtido nos estudos de cinética da PPT) frente ao K $_{m}$ do substrato padrão. O IC $_{50}$ foi determinado através de um gráfico de log da concentração do inibidor *versus* a porcentagem da atividade enzimática remanescente, na qual foi obtida comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (A $_{i}$) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (controle) (A $_{0}$), de acordo com a Equação 15.

% Atividade Enzimática Remanescente =
$$\frac{A_1}{A_0} x 100$$
 Equação 15

Os estudos que apresentaram um valor de IC₅₀ da PPT menor ou igual a 100 µmol L⁻¹ foram selecionados para o estudo de inibição enzimática, determinando-se a constante de inibição e o mecanismo de inibição dosedependente (reversível), no qual foi avaliado o perfil de inibição: inibição competitiva, incompetitiva, não-competitiva ou mista (SEIBERT; TRACY, 2014). Além disso, a inibição tempo- e NADPH-dependente foi avaliada. O valor de IC₅₀ menor ou igual à 100 µmol L⁻¹ foi considerado no estudo, uma vez que não existem estudos clínicos envolvendo a PPT e não se sabe sua concentração efetiva dentro do organismo, portanto, assumiu-se esta faixa de concentração como capaz de provocar uma interação medicamentosa in vivo relevante.

3.2.2.3 Procedimento geral para determinação do IC₅₀

A determinação do IC₅₀ dos inibidores seletivos de cada isoforma estudada bem como o da PPT foi realizada de acordo com o protocolo descrito a seguir. A reação de metabolismo foi realizada adicionando-se inicialmente 5 μL do substrato padrão na concentração correspondente ao valor de K_m e 5 μL do inibidor seletivo em estudo em uma faixa de concentração específica para cada inibidor (Tabela 11). Em seguida foram adicionados a solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 e 20 μL da solução A e 4 μL da solução B de regeneração do sistema NADPH. Posteriormente essa mistura foi pré-incubada a 37°C por 5 min. O metabolismo in vitro foi iniciado adicionando-se HLM em uma concentração proteica final e tempo de incubação específicos para cada reação monitorada (Tabela 11). O volume final do meio microssomal foi de 400 μL e cada reação foi interrompida de acordo com as condições descritas anteriormente na Tabela 10.

Tabela 11- Condições empregadas na determinação do IC₅₀.

Isoforma	Substrato	Concentração do Substrato (µmol L ⁻¹)	Tempo de incubação (min); Concentração de proteínas microssomal (mg mL ⁻¹)	Inibidor Seletivo	Concentração Inibidor seletivo (µmol L ⁻¹)	Concentração da PPT (µmol L ⁻¹)
CYP1A2	Fenacetina	12	30; 0,3	α-naftoflavona	0,005 - 0,12	2,0 - 127,7
CYP2C9	Diclofenaco	47	20; 0,1	Sulfafenazol	0,050 - 4,00	2,0 - 127,7
CYP3A	Nifedipina	7	15; 0,15	Cetoconazol	0,004 - 0,60	2,0 - 127,7
CYP2D6	Bufuralol	5	30; 0,25	Quinidina	0,005 - 0,30	2,0 - 127,7

3.2.2.4 Validação do método analítico de quantificação do acetaminofeno

Uma metodologia analítica foi validada para a quantificação do acetaminofeno, empregado como marcador da reação da CYP1A2, no meio microssomal. Os parâmetros avaliados foram: seletividade, linearidade, precisão e exatidão (ANVISA, 2012, FDA 2013).

3.2.2.5 Determinação do mecanismo e da constante de inibição dosedependente (K_i)

O valor de IC₅₀ calculado menor que 100 µmol L⁻¹ indica uma potencial inibição in vitro que deve ser avaliada minuciosamente, dentro desta premissa o mecanismo e a constante de inibição (K_i) da PPT sobre a isoforma CYP1A2 foi caracterizada.

O estudo de inibição dose-dependente foi realizado em meio microssomal com volume final de 400 μL. Neste ensaio foram empregados controle (sem adição de PPT) e diferentes concentrações de PPT variadas ao redor do IC₅₀ obtido (2 x IC₅₀; IC₅₀; IC₅₀/2 e IC₅₀/4). A faixa de concentração de fenacetina aplicada no estudo compreendeu valores próximos ao K_m (8 K_m; 6 K_m; 4 K_m; 2 K_m; K_m e K_m/2).

O estudo de inibição empregou concentrações fixas da PPT frente a concentrações variáveis da fenacetina. Em seguida, foram adicionados ao tubo a solução tampão 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 em volume adequado e o sistema de regeneração do NADPH, posteriormente a amostra foi pré-incubada durante 5 minutos e a reação iniciada com a adição de HLM na concentração final de proteínas microssomais de 0,3 mg mL⁻¹ incubando-se a amostra por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de solvente orgânico e realizando-se a extração do analito de acordo com a Tabela 10. Finalmente, a amostra foi solubilizada em 80 μL de fase móvel e injetada no sistema cromatográfico.

A determinação do perfil de inibição foi realizada através da quantificação do metabólito da fenacetina formado, o acetaminofeno; para tanto, foi construída uma curva analítica de acetaminofeno no intervalo de 0,05 a 8,28 μmol L⁻¹ em meio microssomal. Um gráfico de Lineweaver-Burk foi obtido correlacionando-se 1/Concentração de fenacetina (μmol L⁻¹) *versus* 1/Velocidade Inicial (μmol

acetaminofeno/mg proteína/min), permitindo assim a determinação do tipo de inibição dose-dependente. Em seguida, os coeficientes angulares das retas obtidas foram plotados *versus* a concentração do inibidor (µmol L⁻¹) (gráfico secundário), obtendose o valor de K_i.

3.2.2.6 Determinação da inibição baseada no mecanismo (IBM) e da constante de inibição tempo-dependente (K_I)

Além do estudo dose-dependente, para as condições em que o IC $_{50}$ da PPT foi menor que 100 μ mol L $^{-1}$, avaliou-se também a influência do tempo na inibição da CYP1A2 pela PPT.

O estudo de IBM foi realizado empregando-se uma concentração fixa de fenacetina no valor de K_m e uma concentração variável de PPT ao redor do seu IC₅₀ (2 x IC₅₀; IC₅₀; IC₅₀/2 e IC₅₀/4), além de um controle sem adição de PPT. Para tanto, inicialmente, foi adicionado ao tubo 5 μL de PPT na concentração desejada, solução tampão 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 no volume adequado, sistema de regeneração do NADPH e HLM (0,3 mg mL⁻¹) (GAO et al., 2014). Em seguida, a pré-incubação foi realizada variando-se o tempo, 0; 5; 10 e 15 min. A reação de metabolismo da fenacetina foi iniciada com a adição de 5 μL de fenacetina 12 μmol L⁻¹, incubando-se a mistura durante 30 min a 37°C em um banho sob agitação. A reação foi interrompida com a adição de 2000 μL de acetato de etila e a extração realizada de acordo com a Tabela 10.

A determinação do perfil de inibição foi realizada através da quantificação do metabólito da fenacetina formado, o acetaminofeno; para tanto, foi construída uma curva analítica de acetaminofeno no intervalo de 0,05 a 8,28 µmol L⁻¹ em meio microssomal. A atividade enzimática remanescente obtida em cada condição foi calculada de acordo com a Equação 16.

% Atividade Enzimática Remanescente =
$$\frac{A_1}{A_0} x 100$$
 Equação 16

Na equação, A₁ corresponde à atividade enzimática obtida para cada condição de incubação e A₀ indica a atividade enzimática para o controle negativo no tempo zero de pré-incubação (MOHOTSKY; HALL, 2014).

Um gráfico foi obtido correlacionando-se o tempo de pré-incubação (min) *versus* Ln % da atividade remanescente do CYP450. Em seguida, os coeficientes angulares das retas obtidas foram plotados *versus* a concentração do inibidor (µmol L-1) (gráfico secundário), obtendo-se o valor de K_I.

3.2.2.7 Determinação da inibição NADPH-dependente

O estudo de inibição NADPH-dependente foi realizado adicionando-se 5 μL de PPT na concentração correspondente a ½ IC₅₀, solução tampão fosfato 0,1 mol L-1, pH 7,4 no volume adequado e HLM (0,3 mg mL-1) (GAO et al., 2014). O sistema de regeneração de NADPH foi adicionado e a mistura foi pré-incubada durante 0 e 30 min. Alíquotas de 20 μL da mistura de pré-incubação foram removidas e adicionadas a outro tubo contendo fenacetina (concentração 10 x K_m), NADPH e solução tampão fosfato 0,1 mol L-1, pH 7,4 em um volume final de 200 μL. A mistura foi incubada durante 30 min e posteriormente a reação foi interrompida com acetato de etila e a extração foi realizada de acordo com a Tabela 10. O protocolo foi adaptado de CHAPRON et al. (2015). O gráfico foi expresso dividindo-se as áreas da amostra pelas áreas obtidas com controles sem adição de PPT. Os dados foram expressos como média do desvio padrão, diferenças estatísticas foram verificadas empregando-se teste ANOVA e considerado significante p < 0,05.

3.2.2.8 Natureza da inibição baseada no mecanismo

3.2.2.8.1 Complexo Metabólico Intermediário (MIC)

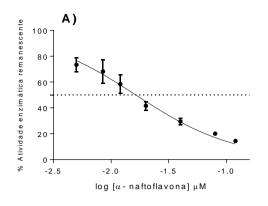
A possível formação do MIC em função do tempo foi monitorada utilizando um espectrofotômetro UV-VIS da Agilent modelo 8453 (Waldbroon, Alemanha). O espectro de absorção foi obtido na faixa de comprimento de onda de 180 a 820 nm, sendo que a formação do MIC foi baseada no deslocamento espectral entre 455-490 nm (PERSHING; FRANKLIN, 1982, WANG et al., 2005).

Em um volume final de 1000 μ L, foi adicionado inicialmente a PPT em uma concentração final correspondente ao S₅₀ (127,7 μ mol L⁻¹), solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4 e o sistema de regeneração NADPH. A mistura foi pré-incubada durante 5 min a 37 °C. Em seguida, foi adicionado HLM na concentração final de 0,3 mg mL⁻¹ e a reação foi monitorada nos intervalos de tempo de 1, 5, 10, 20, 30 e 40 min. Um controle sem a adição do sistema de regeneração NADPH foi monitorado nas mesmas condições. Um branco, sem adição de HLM, foi utilizado para ajustar o equipamento em zero de absorbância.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Estudos de inibição sobre a CYP1A2

A Figura 27 demonstra o perfil de IC₅₀ obtido para o inibidor seletivo da CYP1A2 (α-naftoflavona) e a PPT. Segundo os principais guias de estudos de inibição (BJORNSSON et al, 2003; FDA, 2012; OGILVIE et al, 2014), um controle positivo deve ser realizado juntamente com o experimento teste para assegurar condições ideais de reação (OGILVIE et al., 2014). A α-naftoflavona é um potente inibidor da CYP1A2, além de possuir uma boa seletividade para essa isoforma (NETTLETON; EINOLF, 2011). A α-naftoflavona também inibe a CYP1A1 em uma intensidade 10 vezes menor em relação a CYP1A2, no entanto, esta é uma isoforma predominantemente extra-hepática, incapaz de interferir nos estudos com HLM (TASSANEEYAKUL et al., 1993).



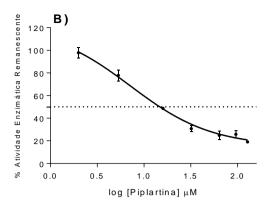


Figura 27- Avaliação da inibição sobre a CYP1A2. Determinação do IC₅₀ **A)** do inibidor seletivo α-naftoflavona e **B)** da PPT. Condições empregadas no experimento: 0,3 mg mL⁻¹ de proteínas microssomais, 30 min de tempo de incubação e 12 μmol L⁻¹ de fenacetina.

O IC₅₀ obtido para a α-naftoflavona foi de 0,02 μmol L⁻¹, semelhante aos valores descritos na literatura (DINGER; MEYER; MAURER, 2014), o que indica que o modelo está funcionando adequadamente. A PPT demonstrou uma capacidade inibitória relevante com o valor de IC₅₀ de 7,2 µmol L⁻¹ sobre a CYP1A2. O valor de IC₅₀ têm sido muito empregado em triagens iniciais de estudo de inibição uma vez que é uma medida rápida e que permite determinar a potência inibitória do composto em estudo, diferentemente da obtenção do Ki que envolve diversas análises e sua determinação é mais demorada; no entanto, este último provê informações mais precisas a respeito do mecanismo de inibicão. Portanto, o IC₅₀ é utilizado como uma ferramenta inicial na determinação da capacidade de inibição (OGILVIE et al., 2014). É preferível que a decisão para realizar a determinação do Ki seja baseada não apenas no IC₅₀ obtido, mas também na concentração clínica do fármaco em estudo (OGILVIE et al., 2014). No entanto, como ainda não existem estudos clínicos da PPT em humanos, considerou-se um IC₅₀ menor ou igual a 100 µmol L⁻¹ relevante para o prosseguimento do estudo. Assim, o valor de IC₅₀ de 7,2 µmol L⁻¹ determinado sobre a CYP1A2 foi considerado relevante, com uma potencial inibição pela PPT sobre tal isoforma.

3.3.1.1 Validação do método para quantificação do acetaminofeno em HLM

O método desenvolvido foi seletivo para a análise do acetaminofeno e o padrão interno empregado (cafeína), no qual não foram observados interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse (Figura 28).

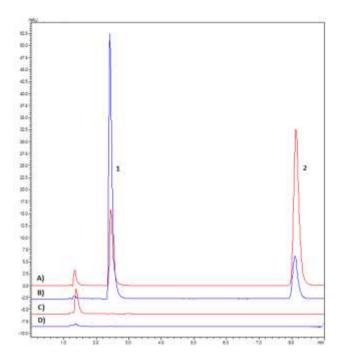


Figura 28- Cromatogramas obtidos após extração líquido-líquido dos analitos em HLM. Pico 1, acetaminofeno e pico 2, cafeína em **A)** 245 nm e **B)** 272 nm, branco de meio microssomal em **C)** 245 nm e **D)** 272 nm; Condições cromatográficas: vazão de 0,6 mL min⁻¹, com o uso de forno a 23 °C. 10 μL da amostra foi injetada na coluna Ascentis[®] Express C18 (10 cm x 4,6 mm, 2,7 μm) e a fase móvel constituída de KH₂PO₄, (0,05 mol L⁻¹) + 0,1 de trietilamina (pH 3,6) (Solvente A) e Metanol (Solvente B). A eluição por gradiente foi a seguinte: em uma corrida de 25 min iniciando-se em 20% B e mantendo-se por 10 min, em seguida, aumentando-se para 80% B em 2 min e mantendo-se 80% B por 5 min; durante a fase de reestabelecimento das condições iniciais, a força foi diminuída para 20% B em 2 min e, subsequentemente, mantida a 20% B por 6 min.

A Tabela 12 apresenta os dados da linearidade do método para quantificação do acetaminofeno no meio microssomal. Como pode ser observado, todos os valores apresentados estão de acordo com as exigências da legislação vigente para análise de fármacos em matrizes biológicas (ANVISA, 2012, FDA, 2013).

Tabela 12- Linearidade do método desenvolvido para análise do acetaminofeno em HLM.

Analito			Lack	of fit	
	Faixa (µmol L ⁻¹) ^a	Equação Linear ^b	r ^c	F^{d}	Pe
Acetaminofeno	0,05 - 8,28	y= 0,16972x - 0,00014	0,999	0,60	0,670

^a Ponderação 1/x

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados empregando quatro concentrações: LIQ, CQB, CQM e CQA de acordo com os requisitos preconizados pela ANVISA (2012). Os ensaios de exatidão e precisão intraensaio foram realizados em um mesmo dia (n = 5); já durante os ensaios interensaio, os experimentos foram realizados em três dias consecutivos (n = 3). Deve ser destacado que a cada dia de ensaio era realizada uma nova curva analítica para a quantificação das amostras. Como pode ser observado na Tabela 13, todos os valores para precisão, representado pelo desvio padrão relativo (DPR%) e exatidão, representado pelo erro relativo (ER%) estão inferiores ao recomendado pela legislação (15%).

Tabela 13- Precisão e exatidão para análise do acetaminofeno em HLM.

Parâmetro	Conc. Nominal (µmol L ⁻¹)	Conc. Obtida (µmol L ⁻¹)	Erro Relativo (%) ^a	DPR (%) ^b
LIQ	0,05	0,05	4	1
	0,05	0,05	4	1
Precisão e Exatidão	0,66	0,64	-4	1
Intraensaio	1,66	1,70	3	2
	8,28	8,21	-1	9
	0,05	0,05	-1	7
Precisão e Exatidão	0,64	0,63	-4	7
Interensaio	1,70	1,71	3	5
	8,21	8,53	3	7

a: Erro Relativo expresso em porcentagem

^b Os erros relativos para cada ponto da curva foram abaixo de 15%.

^c Coeficiente de Correlação

^d F_{valor (0,60)} < F_{tabelado (18,51)}

e nível de significância p ≤ 0,05

b: Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

A estabilidade do acetaminofeno não foi avaliada no presente trabalho, mas pode-se afirmar que as amostras permaneceram estáveis durante os estudos, baseando-se em trabalhos já descritos na literatura (YAO et al. 2007).

3.3.1.2 Determinação do K_i e do modo de inibição dose-dependente sobre a CYP1A2

A determinação do K_i é conduzida, essencialmente, da mesma maneira do que o IC $_{50}$ em relação as condições de incubação (tipo de solução tampão, concentração de proteínas microssomais, tempo de incubação) e método analítico. A diferença é que aquela inclui o uso de concentrações de substrato distintas e ao redor de K_m e a escolha do inibidor em algumas concentrações em torno do IC $_{50}$, sempre levando em consideração a solubilidade de tais compostos no meio microssomal (OGILVIE et al., 2014). A determinação do K_i consiste na interpretação de dois gráficos. Primeiramente, os dados podem ser determinados através de análise de regressão não-linear ou através da respectiva transformação em um gráfico de Lineweaver-Burk. Ambas as representações permitem diferenciar o modo de inibição reversível. Em seguida, plotando-se os coeficientes angulares das retas obtidas com Lineweaver-Burk, é obtido um gráfico secundário, no qual o ponto onde a reta cruza o eixo x corresponde ao K_i .

Portanto, as representações gráficas do perfil de inibição dose-dependente da PPT sobre a CYP1A2 são demonstradas na Figura 29.

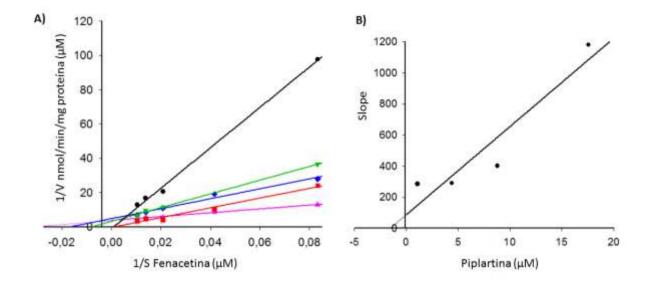


Figura 29- A) Gráfico de Lineweaver-Burk obtido do estudo cinético da *O*-deetilação da fenacetina frente à CYP1A2. Condições de incubação: 30 min de incubação, 0,3 mg mL⁻¹ de proteínas microssomais e PPT nas seguintes concentrações: 0 μmol L⁻¹ (controle) ♠, 2 x IC50 ♠, IC50 ▼, IC50/2 ♠ e IC50/4 ■ e fenacetina nas concentrações: 3, 6, 12, 24 e 48 μmol L⁻¹. B) Gráfico Secundário obtido através dos coeficientes angulares do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração de PPT (inibidor). Fonte: MOREIRA et al. 2016b.

A partir do perfil obtido com o gráfico de Lineweaver-Burk é possível dizer que o mecanismo de inibição reversível que ocorre entre a PPT e a CYP1A2 é a inibição competitiva, na qual substrato e inibidor competem pelo mesmo sítio ativo da enzima. Uma vez que a V_{max} não é afetada pela adição de inibidor e as retas interceptam próximo ao eixo y. Em contraste, a diferença entre os coeficientes angulares do gráfico (K_m/V_{max}) mostra o efeito do aumento do K_m em concentrações crescentes de inibidor (GILBERT, 2000). Este efeito pode ser prevenido com o aumento da concentração do substrato o que eleva sua afinidade pela enzima (GILBERT, 2000). A inibição competitiva pode ser demonstrada pela equação clássica de Michaelis-Menten adicionando-se o inibidor competitivo que altera a relação dos componentes de acordo com a Equação 17 (SEGEL, 1975).

$$v = \frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{K_m}{|S|}\right)\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$
 Equação 17

Na equação, [I] indica a concentração do inibidor e K_i, a constante de inibição que descreve a constante de equilíbrio de dissociação entre a enzima livre e o inibidor e, entre o complexo E-I.

A partir do gráfico secundário foi obtido um valor de K_i igual a 1,5 μmol L⁻¹ referente a inibição da PPT sobre CYP1A2, indicando uma forte ação inibitória da PPT sobre tal isoforma. Um trabalho realizado com um alcaloide da mesma classe da PPT também demonstrou uma atividade inibitória sobre a CYP1A2, indicando que alcaloides isolados de plantas do gênero *Piper* tem a capacidade de inibição competitiva sobre a isoforma 1A2 (SONG et al., 2014).

Durante estágios mais avançados do estudo de novos fármacos, dados obtidos a partir de um estudo bem delineado de interação medicamentosa in vitro são necessários a fim de suplementar a bula do medicamento. Uma vez que estes dados podem afetar diretamente a segurança do paciente, tais dados precisam ser obtidos com a maior precisão e rigor possíveis (KREMERS, 2002). Com isso, alguns documentos veiculados pelo FDA e PhRMA (*Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*), funcionam como guias essenciais para realização de tais estudos (OGILVIE et al., 2014). Ressalta-se que o presente trabalho foi delineado segundo estas recomendações a fim de servir como uma importante ferramenta durante o estudo deste promissor candidato a fármaco.

3.3.1.3 Determinação do K_I e do k_{inact} e do modo de inibição tempo-dependente sobre a CYP1A2

Recomenda-se que substâncias que apresentam uma relevante inibição dosedependente devem ser avaliadas quanto à capacidade de IBM, na qual a substância deve ser capaz de inibir a enzima alvo através dos modos dose- tempo- e NADPHdependente (SEIBERT; TRACY, 2014). No entanto, deve-se ressaltar que em algumas situações o fármaco pode apresentar um valor de IC₅₀ alto (> 100 µmol L⁻¹), mas uma inibição tempo-dependente relevante, por exemplo, pode-se citar a inibição dependente do tempo da enzima CYP19 (aromatase) pela metadona (LU et al., 2010).

A inibição tempo-dependente deriva de uma ligação irreversível ou quasiirreversível à enzima, na qual a magnitude da inibição aumenta com o tempo. Dois tipos de experimentos são comumente empregados para identificar a inibição tempodependente in vitro. O primeiro tipo de experimento é chamado "Deslocamento do IC₅₀" ou "IC₅₀ shift" e corresponde a uma simples extensão do IC₅₀ empregado para quantificar a inibição reversível (MOHUTSKY; HALL, 2014). Durante esta determinação, o IC50 de uma amostra contendo substrato e inibidor coincubados é comparado com o IC₅₀ obtido em uma amostra em que o inibidor é pré-incubado sozinho por um período de tempo antes da adição do substrato. Uma diferença relevante (maior que 1,5 vezes) entre os valores obtidos durante as duas determinações indica uma inibição tempo-dependente (MOHUTSKY; HALL, 2014). O segundo tipo de avaliação da inibição tempo-dependente é mais complexo e permite a estimação das constantes K_I e k_{inact} envolvidas. Durante o delineamento do experimento, várias concentrações do inibidor são escolhidas a fim de obter uma adequada curva de inativação. O substrato padrão é empregado na concentração de K_m e as condições empregadas na reação são aquelas ideais para uma catálise eficiente do substrato pela enzima. Nesse experimento, o inibidor é pré-incubado empregando uma faixa de tempo a fim de demonstrar a relação entre a capacidade de inibição e o tempo (MOHUTSKY; HALL, 2014). O logaritmo natural (Ln) da % da atividade remanescente versus o tempo de pré-incubação é plotado para a geração da taxa de pseudo-primeira-ordem da constante de inativação para cada concentração de inibidor empregada (MOHUTSKY; HALL, 2014). O coeficiente angular de cada curva é plotado versus a concentração de inibidor em um gráfico secundário também denominado de Kiltz-Wilson (KITZ; WILSON, 1962). O perfil tempo-dependente da CYP1A2 na presença da PPT está demonstrado na Figura 30A, assim como o gráfico secundário (Figura 30B) que permitiu o cálculo das constantes KI e o kinact.

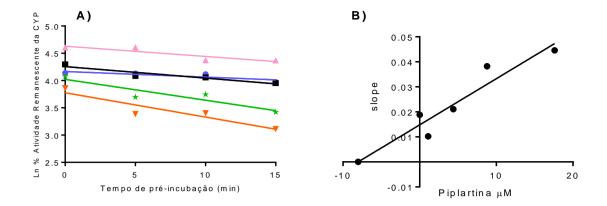


Figura 30- A) Gráfico de decaimento Log-linear da atividade da CYP1A2 *versus* tempo de préincubação com a PPT. Condições de incubação: fenacetina 12 μmol L⁻¹, tempo de incubação de 30 min e concentração de proteínas microssomais de 0,3 mg mL⁻¹. Concentrações de PPT: 0 μmol L⁻¹ (controle) $\stackrel{\bot}{A}$, 2 x IC₅₀ $\stackrel{\blacktriangledown}{\blacktriangledown}$, IC₅₀/2 $\stackrel{\blacksquare}{\blacksquare}$ e IC₅₀/4 $\stackrel{\bullet}{\bullet}$ e tempo de incubação de 0, 5, 10 e 15 min. **B)** Gráfico Secundário obtido a partir dos coeficientes angulares do gráfico de decaimento log-linear da atividade da CYP1A2 *versus* concentração de PPT. Fonte: MOREIRA et al. 2016b.

Assim, os dados obtidos foram K_I no valor de 8 µmol L⁻¹ e k_{inact}, 0,014 min⁻¹. O k_{inact} representa a taxa de formação da enzima inativa. O K_I corresponde a concentração do inibidor que causa 50% da taxa máxima de inibição. Com estes resultados pode-se concluir que além de uma relevante capacidade de inibição dosedependente, a PPT também exerce inibição tempo-dependente sobre a CYP1A2.

A pesquisa do modo de inibição tempo-dependente é extremamente importante, uma vez que a maioria de casos de danos hepáticos medicamentosos decorre do uso de fármacos capazes de formarem metabólitos reativos (MRs) e tóxicos através da inibição baseada no mecanismo (FENG; HE, 2013. CORSINI; BORTOLINI, 2013). Estes MRs acumulam-se no fígado e através de mecanismos distintos podem causar hepatotoxicidade. Dimensionando o problema, em um estudo avaliando os 207 medicamentos orais mais comumente prescritos nos EUA foi demonstrado que 62 a 69% dos compostos com formação de MRs estão associados a danos hepáticos (LAMMERT et al., 2010). Dentro deste contexto, o CYP450 é a principal família de enzimas capazes de produzir os MRs. Estes MRs, ou menos frequentemente os fármacos precursores, podem causar hepatotoxicidade através de (i) estresse celular direto, (ii) da alteração da função mitocondrial e/ou (iii) pela ativação de reações imunes específicas (RUSSMANN et al., 2009).

3.3.1.4 Determinação da inibição NADPH-dependente

O terceiro e último fator necessário para que o mecanismo de inibição sobre uma enzima seja classificado como IBM é a dependência do NADPH (OGILVIE et al., 2014). A influência deste fator sobre a inibição da CYP1A2 está demonstrada na Figura 31.

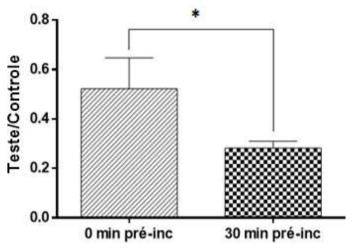


Figura 31- Estudo da influência do NADPH e do tempo de pré-incubação sobre a taxa de inibição da CYP1A2 pela PPT monitorando-se a quantidade de acetaminofeno produzido. Dados são expressos como média do desvio padrão, diferenças estatísticas foram verificadas empregando-se teste ANOVA e considerado significante *p < 0,05.

Como pode ser verificado, o modo de inibição da PPT sobre a isoforma CYP1A2 é NADPH-dependente. Assim, a PPT possui uma inibição dose-, tempo- e NADPH-dependente, indicando que exerce uma inibição baseada no mecanismo sobre a CYP1A2, uma vez que atende as três exigências para ser classificada em tal grupo.

3.3.1.5 Pesquisa da formação do MIC

A fim de determinar a natureza da IBM da CYP1A2 pela PPT, foi pesquisada a formação de uma ligação quasi-irreversível com o grupo prostético heme do CYP450, denominado MIC. A formação do MIC resulta na formação de um complexo estável com o ferro que desloca o espectro de UV em uma região próxima ao comprimento de onda de 450 nm (OGILVIE et al., 2014). Os espectros de UV-VIS em cada tempo monitorado estão demonstrados na Figura 32 e uma visão aproximada da faixa onde

é visualizado o deslocamento no espectro (390-510 nm) está demonstrado na Figura 33.

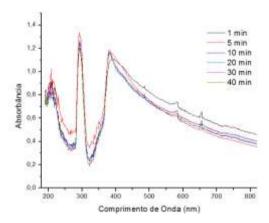


Figura 32- Espectro de UV-VIS monitorado durante a reação de metabolismo da PPT monitorada em uma faixa de tempo de 1 a 40 min.

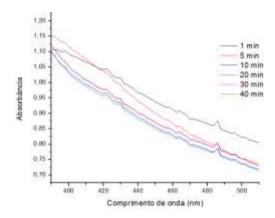


Figura 33- Destaque na região de 390 a 510 nm no espectro de UV-VIS monitorado durante a reação de metabolismo da PPT, região em que ocorre o deslocamento no espectro para moléculas que se ligam quasi-irreversivelmente à CYP450.

A Figura 34 compara o espectro obtido para o controle (sem o sistema NADPH) e para a amostra.

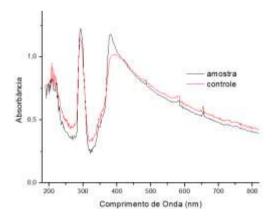


Figura 34- Espectro de UV-VIS obtido para um controle (vermelho), sem adição de NADPH e para uma amostra (preto) que sofreu metabolismo.

Como pode ser verificado através dos gráficos, nenhuma mudança no espectro foi observada, concluindo-se que a PPT não é capaz de se ligar quasi-irreversivelmente à CYP1A2. Geralmente, substâncias contendo as estruturas metilenodioxifenil (Figura 35A), hidrazina (Figura 35B) e alquil amina (Figura 35C) são capazes de realizar este tipo de ligação (KAMEL; HARRIMAN, 2013).

Figura 35- Grupamentos químicos geralmente relacionados com a inibição quasi-irreversível do CYP450 estão destacados em vermelho. **A)** metilenodioxifenil, **B)** hidrazina e **C)** alguil amina.

Excluída a hipótese de ligação quasi-irreversível, conclui-se que a IBM ocorre através da ligação irreversível da PPT à CYP1A2, consistindo, então, de uma inibição irreversivelmente verdadeira. Este modo de inibição pode ser resultado de duas ações distintas, (i) a reação do MR com os átomos de nitrogênio contidos no sítio ativo porfirínico, provocando reações de alquilação ou arilação no grupo heme ou (ii) ligação covalente a aminoácidos presentes no sítio ativo do CYP450 (apoproteína) (KAMEL; HARRIMAN, 2013).

3.3.1.6 Piplartina: potencial interação medicamentosa sobre a CYP1A2

Os resultados obtidos a partir do estudo de inibição enzimática estão resumidos na Tabela 14. Sumarizando os dados obtidos da inibição da CYP1A2 pela

PPT, pode-se afirmar que a PPT tem um grande potencial para interação medicamentosa se administrada juntamente com substâncias que utilizam a CYP1A2 como principal via de eliminação.

Tabela 14- Inibição da CYP1A2 pela PPT.

Natureza da Inibição	Resultado	
Dose-dependente	Sim	
	Modo: Competitivo	
	IC ₅₀ : 7,2 μmol L ⁻¹	
	K _i : 1,5 μmol L ⁻¹	
Tempo-dependente	Sim	
	K _{i:} 8 μmol L ⁻¹	
	k _{inact:} 0,014 min ⁻¹	
NADPH-dependente	Sim	
Mecanismo Baseado na Inibição	Ligação Irreversível	

Como é possível verificar, inúmeros medicamentos de diversas classes farmacológicas utilizam a CYP1A2 como via de eliminação. Possíveis interações com a PPT, um candidato a novo medicamento antitumoral, podem ocorrer ao nível da CYP1A2, especialmente em pacientes idosos sob o tratamento de câncer, que além da terapia para esta enfermidade é usual a administração concomitante de outras classes de medicamentos (LEES; CHAN, 2011). A CYP1A2 é expressa em altos níveis apenas no fígado e estima-se que sua abundância média em tal local é de ~18 a 25 pmol por mg de proteína microssomal, representando ~4 a 16% do total de enzimas do CYP450 hepáticas (ZANGER; SCHWAB, 2013). A CYP1A2 é responsável por 8,9% do total das reações de metabolismo do CYP450 sendo considerada uma isoforma de grande importância durante o estudo de um novo medicamento (ZANGER; SCHWAB, 2013). A CYP1A2 exerce um significante papel no metabolismo de vários medicamentos clinicamente significantes tais como analgésicos e antipiréticos (acetaminofeno, fenacetina e lidocaína), antipsicóticos (olanzapina e clozapina), medicamentos cardiovasculares (propranolol), entre outros (ZANGER; SCHWAB, 2013). Alguns exemplos de substratos in vivo da CYP1A2 estão demonstrados na Tabela 15 (IUPUI, 2016).

Tabela 15- Substratos da CYP1A2 que participam de interações medicamentosas clinicamente relevantes (IUPUI, 2016).

Substratos da CYP1A2

Cafeína, clozapina, ciclobenzaprina, duloxetina, fluvoxamina, haloperidol, imipramina, mexiletina, nabumetona, naproxeno, olanzapina, riluzol, tacrina, teofilina, tizanidina, triamtereno, zileuton e zolmitriptan

Seguindo a perspectiva do FDA para predição de possíveis interações medicamentosas in vivo, a razão concentração máxima alcançada in vivo ([I]) dividida pelo K_i obtido in vitro deve ser maior que 1,0 para indicar uma potencial interação in vivo (FDA, 2012). A concentração máxima de PPT após administração intravenosa em camundongos é de 4339,6 ng mL⁻¹ (FOFARIA et al., 2016), que equivale a 13,7 µmol L⁻¹, dividindo-se este valor pelo K_i de 1,5 µmol L⁻¹, obtém-se o valor 9,1, que equivale a uma interação clinicamente relevante possível.

3.3.2 Estudos de inibição sobre a CYP3A

A subfamília CYP3A é composta majoritariamente pela CYP3A4, seguida da CYP3A5. Uma vez que ainda não existem protocolos com inibidores e substratos estritamente específicos para cada uma delas, o estudo foi delineado considerando ambas as isoformas (GILBERT, 2000). No entanto, sabe-se que a CYP3A4 é a isoforma mais abundante no fígado com uma fração entre 25 a 30% (GILBERT, 2000).

A Figura 36 demonstra o perfil de IC₅₀ obtido para o inibidor seletivo cetoconazol e da PPT sobre a CYP3A. O cetoconazol é um potente inibidor da CYP3A apresentando uma ampla faixa de valores de K_i na literatura, de 0,0037 a 0,1300 μ mol L⁻¹. No entanto, esta substância é seletiva para a CYP3A apenas em concentrações sub-micromolares. Em altas concentrações ele pode inibir a isoforma 2A6 em uma faixa de K_i de 7-24 μ mol L⁻¹ e IC₅₀ \geq 50 μ mol L⁻¹, a isoforma 2B6 em valores de IC₅₀ variando entre 3,2 a 81,0 μ mol L⁻¹ e a isoforma 2C8, obtendo-se valores de K_i entre 2,5 e 11,8 μ mol L⁻¹ (KHOJASTEH et al., 2011). Além disso, este fármaco também possui uma ação inibitória minoritária sobre a CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19 e CYP2E1 (KHOJASTEH et al., 2011). Portanto, o estudo de inibição da CYP3A

dependente da concentração do cetoconazol foi delineado empregando-se concentrações sub-micromolares de cetoconazol, em uma faixa de 0,004 a 0,600 µmol L-1 de cetoconazol.

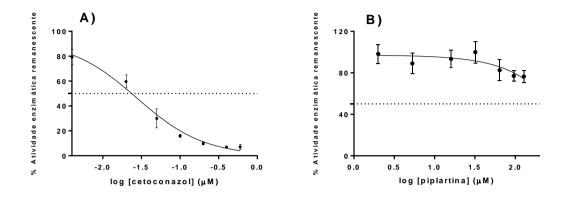


Figura 36- Avaliação da inibição sobre a CYP3A. Determinação do IC₅₀ **A)** do inibidor seletivo cetoconazol e **B)** da PPT. Condições empregadas no experimento: 0,15 mg mL⁻¹ de proteínas microssomais, 15 min de tempo de incubação e 7 µmol L⁻¹ de nifedipina.

O IC₅₀ obtido para o cetoconazol foi de 0,02 μmol L⁻¹, indicando a intensa atividade inibitória desta substância sobre a CYP3A e corroborando com os dados da literatura. Por outro lado, como pode ser observado através do gráfico, a PPT não demonstrou capacidade inibitória relevante sobre a CYP3A, apresentando um IC₅₀ >>> 100 μmol L⁻¹, não sendo considerado clinicamente relevante. Uma vez que os estudos foram realizados sob condições de V₀ e bem delineados, acredita-se que não se trata de um resultado falso negativo. As indústrias têm adotado esta prática a fim de evitar que um medicamento chegue ao mercado sem ter sido conduzido os estudos de interação medicamentosa in vivo devido à obtenção de um resultado falso negativo durante a etapa pré-clínica. Esta técnica adotada pelas indústrias é denominada Boas Práticas de Laboratório Rigorosas aplicada aos estudos de inibição sobre o CYP450, e tem sido recomendada por autoridades no assunto tais como a PhRMA (*Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*) (OGILVIE et al., 2014, BAJPAI; ESMAY, 2002, WALSKY; OBACH, 2004).

3.3.3 Estudos de inibição sobre a CYP2C9

O estudo de inibição da CYP2C9 dependente da concentração do sulfafenazol e da PPT está demonstrado na Figura 37. O sulfafenazol é um potente inibidor da CYP2C9 apresentando valores de K_i ou IC₅₀ entre 0,3 a 1,5 μmol L⁻¹ (DINGER; MEYER; MAURER, 2014) e uma fraca potência inibitória sobre as demais isoformas da CYP2C. Assim, possui um K_i de 29 μmol L⁻¹ para a CYP2C18, valores de K_i de 10 e 14 μmol L⁻¹ para a CYP2C19, enquanto que para a CYP2C8 foi demonstrado um IC₅₀ de 50 μmol L⁻¹ (KHOJASTEH et al., 2011). Para as demais isoformas o sulfafenazol apresenta um valor de IC₅₀ acima de 100 μmol L⁻¹ (KHOJASTEH et al., 2011). Com estes dados, verifica-se que o sulfafenazol é um potente e seletivo inibidor da CYP2C9, sendo selecionado como controle positivo no estudo.

O IC₅₀ do sulfafenazol obtido foi de 1,7 μmol L⁻¹, indicando-se a potente atividade inibitória deste controle positivo sobre a CYP2C9 e corroborando com os dados da literatura. Como pode ser observado na Figura 37, a PPT não foi capaz de inibir a CYP2C9 de forma dose-dependente, apresentando um IC₅₀ >>>> 100 μmol L⁻¹.

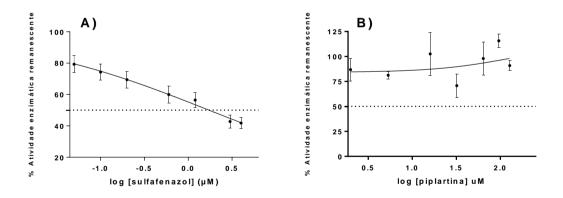


Figura 37- Avaliação da inibição sobre a CYP2C9. Determinação do IC $_{50.}$ **A)** do inibidor seletivo sulfafenazol e **B)** da PPT. Condições empregadas no experimento: 0,1 mg mL $^{-1}$ de proteínas microssomais, 20 min de tempo de incubação e 47 µmol L $^{-1}$ de diclofenaco.

3.3.4 Estudos de inibição sobre a CYP2D6

O estudo de inibição da CYP2D6 dependente da concentração da quinidina e da PPT está demonstrado na Figura 38. A quinidina é o principal inibidor in vitro

empregado para a CYP2D6. Este composto inibe tal isoforma em uma faixa de K_i de 0,03 a 0,40 µmol L⁻¹ (TESTINO, PATONAY, 2003). A quinidina é altamente seletiva para a CYP2D6, no entanto, é um fraco inibidor da CYP3A, uma vez que é metabolizado por esta isoforma (KHOJASTEH et al., 2011).

O IC₅₀ obtido para a quinidina foi de 0,04 μmol L⁻¹ valor portanto dentro dos reportados na literatura (TESTINO, PATONAY, 2003). Como pode ser observado na Figura 38, a PPT não demonstrou atividade inibitória relevante sobre a CYP2D6 na faixa de concentração empregada apresentando um IC₅₀ >>>> 100 μmol L⁻¹.

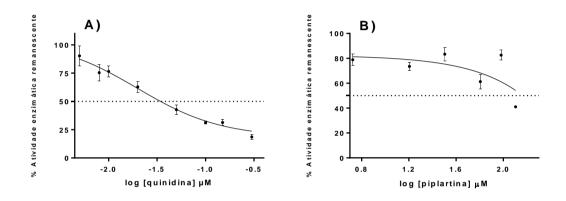


Figura 38- Avaliação da inibição sobre a CYP2D6. Determinação do IC₅₀. **A)** do inibidor seletivo quinidina e **B)** da PPT. Condições empregadas no experimento: 0,25 mg mL⁻¹ de proteínas microssomais, 30 min de tempo de incubação e 5 µmol L⁻¹ de bufuralol.

3.4 CONCLUSÕES

Com esta etapa do trabalho foi possível concluir que a PPT é um inibidor competitivo dose dependente da CYP1A2, apresentando um valor de K_i de 1,5 µmol L⁻¹. Além disso, a PPT apresentou uma inibição tempo-dependente sobre a CYP1A2 com valores de K_I de 8 µmol L⁻¹ e k_{inact} de 0,014 min⁻¹. A inibição dose-, NADPH- e tempo-dependente confirmam uma inibição baseada no mecanismo em que o modo pelo qual a PPT liga-se à enzima é irreversível. Este modo de inibição é extremamente relevante na prática clínica, uma vez que ele é fonte de produção de metabólitos reativos que podem causar hepatotoxicidade, além de outros danos ao organismo. Além disso, uma vez que a PPT liga-se irreversivelmente à enzima, é necessária a produção de novas enzimas a fim de retomar a atividade. Isso constitui um grande

problema caso a PPT venha ser administrada concomitantemente com outros fármacos que utilizam a CYP1A2 como via de metabolismo. As demais isoformas avaliadas, CYP3A, CYP2C9 e CYP2D6, não foram inibidas pela PPT dosedependentemente. Assim, conclui-se através deste estudo in vitro que a PPT é um inibidor potencial da CYP1A2 e esta informação deve ser levada em consideração em futuros estudos clínicos de interação medicamentosa in vivo da PPT.

CAPÍTULO 4

Elucidação estrutural dos metabólitos da piplartina gerados através da reação com enzimas do CAP450

CAPÍTULO 4

Elucidação estrutural dos metabólitos da piplartina gerados através da reação com enzimas do CYP450

4.1 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar os metabólitos da PPT produzidos a partir da reação in vitro com enzimas do CYP450 presentes nos microssomas hepáticos humanos.

4.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar os metabólitos da PPT produzidos empregando-se técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas ou à ressonância magnética nuclear;
- Propor as estruturas dos metabólitos baseando-se no conjunto de resultados obtidos através da análise empregando diferentes equipamentos.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

4.2.2.1 Reagentes

Para a reação de derivatização da PPT e seus metabólitos foram empregados os seguintes reagentes: O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e clorometiltrimetilsilano (TMCS; 98%) da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e piridina (P.A.) da Vetec Química Fina (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Os demais reagentes utilizados estão descritos na seção anterior.

4.2.1.2 Análises Cromatográficas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por arranjo de diodos (CLAE-DAD)

O equipamento empregado na separação foi anteriormente descrito na seção 2.

4.2.1.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

O sistema para cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM) empregado na determinação dos metabólitos foi da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo GCMS-QP 2010, com um auto amostrador modelo AOC-5000, também da Shimadzu (Kyoto, Japão). Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-1MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). 1 μL de solução foi injetado no modo splitless com temperatura de injeção de 250°C, o intervalo de massas analisado foi de *m/z* 40-500 e energia de ionização de 70 eV. As análises foram realizadas no modo *Full Scan*, sendo empregado hélio como gás de arraste, a uma velocidade linear de 41 cm s⁻¹. A temperatura da fonte de íons e da interface foi de 250 e 280°C, respectivamente. A temperatura inicial de análise foi de 100°C, sendo mantida durante 5 minutos e foi aumentada a 5°C min⁻¹ até atingir 290°C e mantida por mais 7 min.

4.2.1.4 Cromatografia liquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CL-EM-IT)

Durante a análise dos metabólitos foi empregado um sistema para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UFLC) da Shimadzu (Kyoto, Japão) (modelo 20A) acoplado ao espectrômetro de massas MS-Bruker Amazon SL (Billerica, MA, EUA) contendo como fonte de ionização o eletrospray (ESI) e analisador *Ion Trap* (IT). A coluna utilizada na separação foi Ascentis Express C18 (10 cm x 4,6 mm; 2,7 μm) (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). O modo de eluição estabelecido foi o isocrático com a mesma proporção de solventes empregados em CLAE, acetonitrila: água (40:60, v/v), apenas acrescentando 0,1% de ácido acético (v/v) para promover a ionização dos analitos. Após uma transposição de métodos da

CLAE para a CLUE, determinou-se a vazão de 0,5 mL min⁻¹ e a injeção de 10 µL (MALDANER; JARDIM, 2009).

As condições empregadas no espectrômetro de massas foram a utilização de eletrospray com energia de ionização no capilar de 3500 V, 60 psi de gás nebulizador, gás de secagem a 11 L min⁻¹ e temperatura de secagem de 330°C. O analisador foi empregado na amplitude de 0,6 V.

4.2.1.5 Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (CL-EM-TOF)

Foi empregado um sistema para cromatografia liquida da Shimadzu (modelo 20A) (Kyoto, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas micro TOFII (Bruker), com fonte de ionização por eletrospray e analisador TOF (Tempo de voo, do inglês *Time of Flight*), que permite análises em alta resolução. As massas acuradas foram obtidas empregando-se uma solução de TFA-Na+ (ácido trifluoroacético sodiado) para calibração das massas. Foi empregado o gás nitrogênio para dessolvatação, tensão do capilar de 3500 V, nebulizador 4 Bar e o Skimmer 1 e 2 foram ajustados em 40 e 22 V, respectivamente. A temperatura de secagem foi de 200°C e gás de secagem a 9 L min-1. Foram empregadas as mesmas condições de separação descritas na seção 4.2.1.4. Os dados foram adquiridos empregando o Software Hystar and Data Analysys 4.0 da Bruker Daltonics (Bremen, Alemanha).

4.2.1.6 Cromatografia Líquida acoplada a Extração em Fase Sólida e Ressonância Magnética Nuclear (CL-EFS-RMN)

A PPT e seus respectivos metabólitos foram separados e pré-concentrados empregando um sistema para cromatografia liquida da Agilent Technologies (modelo 1260 infinit) (Santa Clara, CA, EUA) composto de uma bomba quaternária G1311B, injeção automática e detector por arranjo de diodos, G1329B. Um coletor Prospekt 2 (Spark, Emmen, Holanda) contendo módulo de extração em fase sólida foi acoplado ao sistema cromatográfico a fim de coletar e armazenar a PPT e os metabólitos percolados pela coluna analítica. A separação cromatográfica seguiu as condições

descritas na seção 4.2.1.4 e os analitos foram eluídos em cartuchos para extração em fase sólida C-18 e transferidos para tubo de RMN (177,8 mm x 3 mm, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA).) com CD₃OD para análise no espectrômetro modelo Bruker Avance III (14.1 T) (Billerica, EUA).

4.2.1.6.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os experimentos ¹H foram realizados empregando a sequência de pulso lcpnf2-LC1D12, aplicando uma supressão dupla em cada sinal de solvente (água residual do metanol e CHD₂OD). Os parâmetros LC1D12 usados para cada experimento foram os seguintes: tempo de reciclagem de 1,0 s, janela espectral de -4,2 a 10,8 ppm, 32000 pontos e 3,62 s de tempo de aquisição. O pós-processamento foi realizado a utilizando um fator de multiplicação de exponencial de 0,3 Hz (linha de alargamento), fase e linha de base foram corrigidas manualmente. Os experimentos de ¹H- ¹H COSY (cosygpppqf) foram realizados empregando a janela espectral entre 0 e 13 ppm, tempo de aquisição de 0,127 s, tempo de reciclagem de 2,0 s e 16 "scans" por 128 incrementos. O acoplamento direto de ¹H e ¹³C foi obtido para o metabólito M3 através de experimento 1H-13C HSQC (hsqcedetgpsisp 2.3), empregando uma janela espectral de -4,2 a 10,8 ppm para a dimensão F2 (1H) e 0 a 160 ppm para a dimensão F1 (13C). Tempo de aquisição de 0,14 s, tempo de reciclagem (d1) de 2 s e 128 "scans" para 256 incrementos foram os parâmetros empregados besta análise. Além disso, um acoplamento médio entre 1H e 13C em 145 Hz (Cnst2) foi usado.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Procedimento de incubação para a determinação estrutural dos produtos da reação da PPT no meio microssomal

Na pesquisa de metabólitos, um procedimento de metabolismo in vitro foi realizado adicionando a PPT na concentração final de 283,6 μmol L⁻¹. Em seguida, adicionou-se a solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 diluído a partir da solução tampão fosfato 0,5 mol L⁻¹ pH 7,4 adquirido da BD Biosciences (Nova Jersey, EUA). Posteriormente, foi adicionado a 10 μL da solução A de regeneração do sistema

NADPH (1,3 mmol L⁻¹ NADP+ e 3,3 mmol L⁻¹ glicose-6-fosfato) e 2 μL da solução B de regeneração do sistema NADPH (0,4 U/mL glicose-6-fosfato desidrogenase). Esta mistura foi pré-incubada durante 5 min a 37 °C. Subsequentemente, foi adicionado HLM na concentração final de 2 mg mL⁻¹, sendo a amostra em um volume final de 200 μL incubada durante 50 minutos a 37 °C em um banho sob agitação.

4.2.2.2 Estratégia adotada na elucidação estrutural

As estruturas dos produtos do metabolismo in vitro da PPT foram determinadas utilizando dados obtidos por espectros gerados por 4 instrumentos: (i) CG-EM com ionização por impacto de elétrons e analisador quadrupolo, (ii) CL-EM-IT com ionização através do eletrospray e analisador o *ion trap*, (iii) CL-EM-TOF de alta resolução, contendo fonte de ionização o eletrospray e analisador tempo de voo e, finalmente (iv) CL-EFS-RMN. Além disso, os resultados foram comparados com dados reportados na literatura.

Para melhor visualização dos produtos formados, a extração líquido-líquido foi realizada adicionando-se 1000 µL de acetato de etila ao tubo contendo a reação de metabolismo (seção 4.2.2.1). Em seguida, a amostra foi submetida a agitação no agitador orbital a 1500 rpm durante 10 minutos e posteriormente foi submetida à centrifugação durante 5 minutos a 2860 xg. Sucessivamente, 750 µL da fase extratora foram coletados. Os estudos empregando os espectrômetros de massas foram realizados em escala ampliada, incubando 10 amostras independentes e, em seguida, concentrando-as em um único tubo, utilizando-se o ar comprimido para concentração das amostras que, posteriormente foram solubilizadas em solvente adequado para a análise. Para o estudo empregando RMN foi realizada a concentração de 50 reações independentes em um único tubo de ensaio. Nas análises realizadas por CG-EM, após a concentração da amostra, um processo de derivatização foi realizado. Para tanto, foi empregado 200 µL de BSTFA adicionado de 2% de TMCS e 50 µL de piridina; esta mistura foi então submetida ao aquecimento a 75°C por um tempo de 120 min a fim de introduzir o grupamento trimetilsilil nas hidroxilas dos produtos do metabolismo formados.

A estratégia adotada para a elucidação estrutural incluiu o emprego de instrumentos diversificados que proporcionaram informações complementares, auxiliando na caracterização das estruturas dos metabólitos.

Inicialmente, optou-se pelo emprego do CG-EM, este instrumento é composto por analisador do tipo ionização por elétrons em que as moléculas são bombardeadas por um feixe de elétrons com energia típica de 70 eV, assim além da formação do íon molecular ocorre uma fragmentação extensiva, permitindo a identificação do composto através da análise dos fragmentos produzidos a partir de mecanismos racionais de fragmentação e também por comparação espectral e consulta a bibliotecas de espectros (SILVERSTEIN; WEBSTER, KIEMLE, 2006). Assim, é possível a comparação dos dados obtidos com alguns trabalhos descritos na literatura a respeito da elucidação estrutural de metabólitos da PPT (MARQUES et al., 2014; SCHAAB et al., 2010), Os metabólitos produzidos a partir das reações catalisadas pelo CYP450 são frequentemente mais polares do que o fármaco precursor, consequentemente, apresentam maior temperatura de ebulição. Diante desta informação, adotou-se o processo de derivatização das amostras que consistiu na substituição de um hidrogênio ativo por um grupamento apolar trimetilsilil, aumentando a volatilidade e permitindo a análise por CG-EM.

O CL-EM-IT possui um analisador que permite análises em modo sequencial, portanto, ele foi empregado a fim de fornecer informações mais detalhadas sobre a via de fragmentação da PPT e seus metabólitos. A fonte de ionização por eletrospray permitiu análises tanto no modo positivo quanto negativo gerando informações adicionais a respeito das estruturas químicas.

O CL-EM-TOF possui um analisador que permite análises em alta resolução. A massa acurada calculada leva em consideração a diferença entre a massa exata (teórica) e a massa medida (acurada) em relação à massa teórica, expressa em ppm (partes por milhão). Erros abaixo de 5 ppm são usualmente aceitos na determinação de uma composição elemental definitiva (LANÇAS, 2013).

Finalmente, o CL-EFS-RMN foi empregado na determinação da posição exata onde ocorreu a reação de metabolismo, uma vez que os instrumentos de espectrometria de massas determinaram apenas a região da modificação (região lactâmica ou cinâmica) e o tipo de reação de metabolismo (por exemplo, hidroxilação

ou epoxidação). Assim, os espectros gerados dos metabólitos foram comparados com o espectro da PPT. Apesar deste estudo ter sido realizado em uma escala ampliada (50 amostras), a elucidação estrutural dos metabólitos da PPT empregando o RMN sofreu limitações devido à baixa produção dos metabólitos a partir do metabolismo in vitro.

4.2.2.3 Modelo computacional empregado em combinação com os dados obtidos com o CL-EM-IT

Os mecanismos de fragmentação para a PPT protonada foi sugerido com base no sítio de protonação obtido pela análise do mapa do potencial eletrostático molecular. Inicialmente, a geometria da PPT foi otimizada usando o modelo B3LYP/6-31+G (KOHN; BECKE; PARR, 1996) implementado no programa Gaussian 03. O mapa do potencial eletrostático foi gerado a partir da densidade eletrônica usando o programa Molekel 5.4.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Identificação e caracterização estrutural da PPT e seus metabólitos

4.3.1.1 Análises por CLAE-DAD

Inicialmente, os metabólitos da PPT foram visualizados a partir da reação das enzimas microssomais sobre a PPT, empregando-se o detector de arranjo de diodos, no qual, a diminuição da área da PPT metabolizada quando comparada com o controle (amostras sem cofator e, portanto, que não sofreram metabolismo) (Figura 39A e B) foi monitorada além da formação de novos compostos com um perfil de espectro de absorção no UV semelhante ao da PPT (Figura 40). As condições para promover o metabolismo usadas neste estudo foram tempo de incubação de 40 minutos e concentração de proteínas microssomais de 2 mg mL-1, gerando uma porcentagem de metabolismo de 77%. Uma única amostra (n = 1) foi extraída com acetato de etila de acordo com o protocolo descrito na seção 4.2.2.1 e injetada no equipamento de CLAE-DAD.

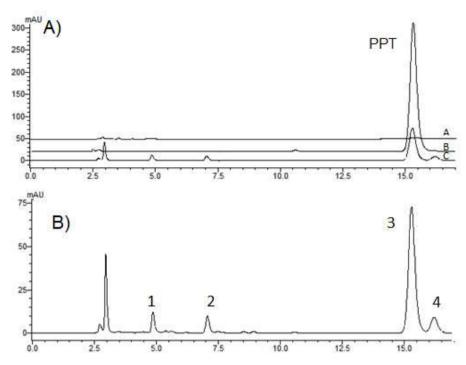


Figura 39- A) (A) Cromatograma representativo do branco microssomal sem a adição de PPT, (B) controle sem o cofator NADPH, (C) amostra que sofreu metabolismo. Condições do metabolismo: Concentração final no meio microssomal de 289,6 μmol L^{-1} de PPT, 2 mg m L^{-1} de proteína microssomal e tempo de incubação de 40 min. **B)** Cromatograma ampliado da amostra de PPT que sofreu metabolismo, com destaque para os metabólitos formados 1, 2 e 4 e a PPT (3). Condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS Shimadzu[®] (250 mm x 4,6 mm x 5 μm), vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹. O comprimento de onda foi fixado em 220 nm. Volume injetado: 20 μL. Fase móvel acetonitrila:água 40:60, (v/v). Temperatura de análise 32°C.

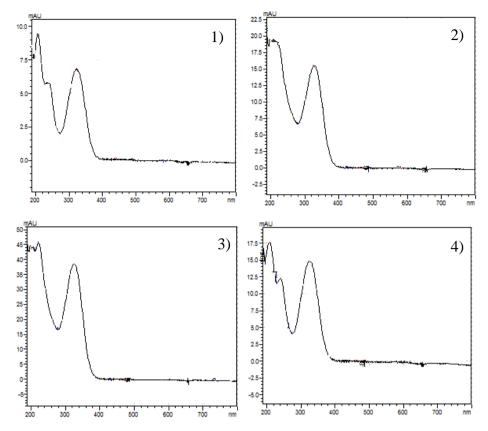


Figura 40- Espectros de absorção no UV-Vis. Número 3) corresponde à PPT e números 1), 2) e 4) aos prováveis metabólitos. Intervalo de absorção: 190 a 800 nm.

Portanto, a partir desta análise inicial empregando o detector DAD, verificouse a produção de novos compostos a partir da reação de metabolismo da PPT com HLM. Com isso, iniciou-se o estudo de elucidação estrutural destes metabólitos formados utilizando-se diversos instrumentos de cromatografia acoplados a espectrômetros de massas e ressonância magnética nuclear.

4.3.1.2 Análises por CG-EM

A incubação da PPT com HLM resultou na formação de 4 metabólitos, denominados M1, M2, M3 e M4 (Figura 41). Estes metabólitos não foram observados após a incubação de amostras controles sem adição de NADPH.

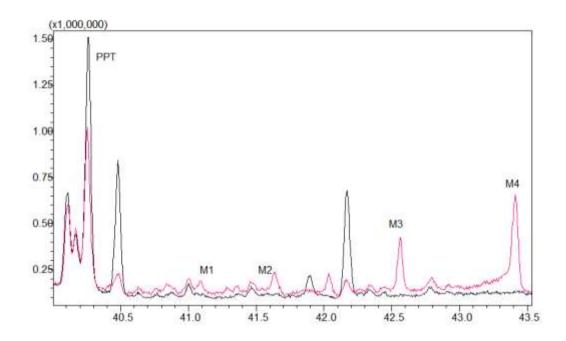


Figura 41- Cromatograma obtido através da análise por CG-EM para análise da piplartina e seus metabólitos. Condições cromatográficas: coluna DB-1MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm). Foi utilizado o modo "*Full Scan*" analisando o intervalo de m/z 50-600 com splitless, gás de arraste hélio com uma velocidade linear de 42,9 cm s⁻¹. T_{injeção}=250°, T_{fonte de fons}= 250°C e T_{interface}= 280°C. A temperatura inicial de análise foi de 100°C, sendo mantida durante 5 minutos e foi aumentada a 5°C min⁻¹ até atingir 290°C. (_):Controle sem adição de NADPH, (_): Amostra após metabolismo com HLM. Foi empregado um pool de 10 replicatas a partir da concentração de 283,6 μmol L⁻¹ de piplartina: (PPT) Piplartina, t_R 40,26 min; (M1) O-desmetilado, t_R 41,37 min; (M2) epoxidado, t_R 41,64 min; (M3) mono-hidroxilado, t_R 42,57 min; (M4) diidroxilado mais redução, t_R 43,41 min.

A partir da comparação dos cromatogramas da amostra controle, que não sofreu metabolismo, e a amostra teste que reagiu com as enzimas do CYP450 é possível verificar que houve decaimento da área da PPT após o metabolismo, indicando que a substância é metabolizada pelas enzimas presentes nos microssomas, gerando os produtos M1, M2, M3 e M4, além disso verificou-se a presença de um quinto metabólito no tempo de retenção de 42,04 min que trata-se de um metabólito mono-hidroxilado gerado a partir da reação no anel lactâmico da PPT (**Apêndice 1**). Com o objetivo de determinar a estrutura destes novos compostos produzidos a partir da reação de metabolismo, os espectros da PPT e dos metabólitos foram analisados. Na análise dos produtos gerados foi empregada a derivatização das amostras, com isto foi introduzida uma massa molar de 72 g/mol em cada hidroxila presente nas estruturas.

A porcentagem relativa da PPT e seus metabólitos formados durante a reação com HLM estão demonstrados na Tabela 16. Como é possível verificar o metabólito

M4 forma-se em maior quantidade em relação aos demais metabólitos em um tempo de reação de 50 min.

Tabela 16- Porcentagem relativa da PPT e seus metabólitos durante a reação de metabolismo microssomal.

Composto ^a	t _R (min)	Area	% Relativa
PPT	40,26	2197166	44,21
M1	41,37	66350	1,33
M2	41,64	368916	7,42
М3	42,57	766463	15,42
M4	43,41	1570076	31,59

^a As condições empregadas para a obtenção dos dados foram as mesmas descritas na Figura 42.

4.3.1.2.1 Análise Estrutural da PPT

Com o objetivo de propor a estrutura dos metabólitos formados inicialmente foi necessário caracterizar a estrutura da PPT através da análise do espectro obtido. A PPT possui o íon molecular m/z 317 e íon base m/z 221, que neste estudo foi considerado um íon diagnóstico, facilitando a elucidação estrutural da PPT e seus respectivos metabólitos, uma vez que através da manutenção ou não deste íon é possível afirmar o local da molécula que sofreu modificação. A molécula da PPT possui duas porções principais conectadas através de uma dupla ligação na geometria trans, a porção cinâmica e a porção lactâmica (Figura 42) (BOLL et al., 1984).

Figura 42- Estrutura da PPT e seu respectivo íon-produto, o qual é usado para o diagnóstico, *m/z* 221. Fonte: MOREIRA et al. 2016b.

Os principais íons observados a partir da fragmentação da PPT por ionização por elétrons são *m/z* 302, 221, 274, 190 e 163 (Figura 43) e os íons podem ter sido formados de acordo com o proposto na Figura 44.

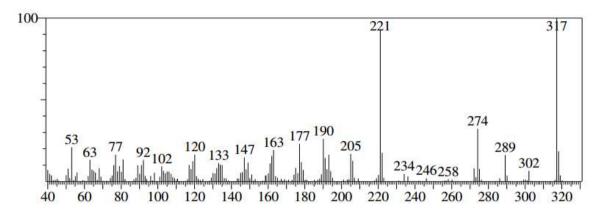


Figura 43- Espectro de massas da PPT, t_R 40,26 min (PPT), obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons.

Figura 44- Proposta de fragmentação para os íons da PPT empregando o impacto de elétrons, t_R 40,26 min. Baseado em (MARQUES, 2013).

A via A resulta na formação do íon m/z 302 através de uma cisão homolítica entre a metila e o oxigênio da metoxila na posição para em relação à cadeia lateral (MARQUES, 2013). O íon m/z 302 sofre contração de anel no anel lactâmico devido à perda de CO (via J), produzindo o íon m/z 274.

A via B leva a produção de íon através da perda de CO presente no anel lactâmico, resultando no íon m/z 289. A partir deste fragmento é possível produzir o íon m/z 221 (via E) pela perda de C₄H₆N. Além disso, este íon pode ser o precursor do íon m/z 274 (via D) através da perda de sua metila na posição *para*.

Uma cisão homolítica entre o nitrogênio e o oxigênio da função amida (via C) leva a formação do íon acílio m/z 221. A desmetoxilação da estrutura que produz o fragmento m/z 190 (via G) pode ter ocorrido tanto em C-12 quanto em C-14, devido a simetria existente no anel benzênico. Em seguida, ocorre uma eliminação de CO (via I) formando o íon m/z 163. A desmetilação da metoxila do anel benzênico (via F) leva a formação do íon m/z 206, esta perda ocorre na posição *para* em relação a cadeia lateral, devido à estabilização do anel (MARQUES, 2013). O íon m/z 221 ainda é precursor do fragmento m/z 193 pela perda de CO (via H).

4.3.1.2.2 Análise Estrutural do metabólito M1

O metabólito M1, que tem seu espectro de massas demonstrado na Figura 45, corresponde a um produto de metabolismo resultante de uma *O*-desmetilação na porção 3,4,5-trimetoxicinâmica da estrutura da PPT (Figura 46).

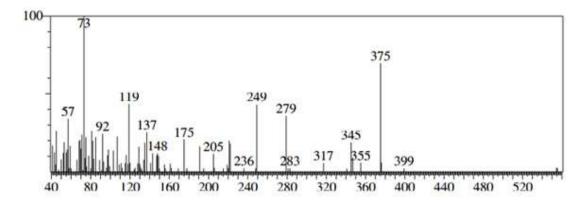


Figura 45- Espectro de massas do composto *O*-desmetilado, t_R 41,37 min (M1) obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons.

Para facilitar a interpretação dos resultados dos metabólitos M1, M2, M3 e M4 e a fim de comparação com outros trabalhos, nas figuras os valores das razões massa/carga demonstradas correspondem ao valor real, subtraindo-se a massa adicionada pela reação de derivatização, o valor real obtido devido à derivatização da amostra encontra-se entre parênteses.

Figura 46- Proposta de fragmentação para os íons do metabólito *O*-desmetilado da PPT (M1) empregando o impacto de elétrons, t_R 41,37 min.

As fragmentações são semelhantes àquelas apresentadas por Schaab et al. (2010), na qual propôs o íon molecular m/z 303 e os fragmentos m/z 275 (via B), correspondendo a perda de um monóxido de carbono e o íon m/z 207 (via C) (SCHAAB et al., 2010). No presente trabalho outros fragmentos foram identificados além daqueles descritos por Schaab et al. (2010). A partir da análise das vias de fragmentação de M1 é possível afirmar que a modificação da estrutura não ocorre na porção lactâmica da molécula, uma vez que o íon diagnóstico m/z 221 não é formado, mas sim o íon acílio m/z 207 (via C), de fundamental importância para a caracterização do perfil de oxidação da molécula. A via B retrata a contração do anel lactâmico devido à descarbonilação no citado anel, resultando no fragmento m/z 275. A via N corresponde à porção do anel lactâmico ligado ao grupamento carbonila, sendo que a carga se estabiliza sobre o oxigênio deste último grupamento (íon m/z 124). Este último fragmento sofre perda de CO (via O) produzindo o íon m/z 96.

Finalmente, a via K corresponde a uma abertura no anel lactâmico devido a um rearranjo na estrutura. Uma cisão homolítica entre o nitrogênio e o oxigênio produz o íon m/z 81 (via L). Este último sofre uma descarbonilação (via M), produzindo o íon m/z 53.

4.3.1.2.3 Análise Estrutural do metabólito M2

O metabólito M2, que tem seu espectro demonstrado na Figura 47, foi produzido a partir de uma epoxidação no anel lactâmico da PPT. Como mostrado na Figura 48, a via A corresponde a uma perda de grupamento metil na porção 3,4,5-trimetoxicinâmica resultando no fragmento m/z 318. Este fragmento sofre uma descarbonilação no anel lactâmico, resultando no íon m/z 290 (via J). A via B corresponde a uma perda de CO no anel lactâmico, produzindo o íon m/z 305. Finalmente, a via C corresponde a formação do íon diagnóstico m/z 221. A partir deste íon, várias vias de fragmentação são geradas (vias F, G e H), produzindo os fragmentos demonstrados na Figura 48.

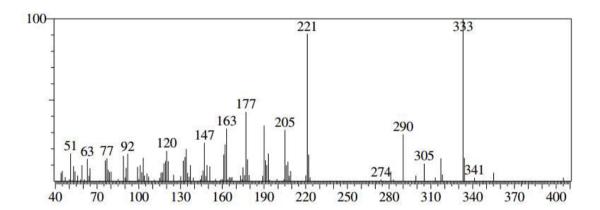


Figura 47- Espectro de massas do composto epoxidado, t_R 41,64 min (M2) obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons.

Figura 48- Proposta de fragmentação para os íons do metabólitoepoxidado (M2) empregando o impacto de elétrons, t_R 41,64 min.

4.3.1.2.4 Análise Estrutural do metabólito M3

O metabólito M3, espectro de massas representado na Figura 49, é resultado de uma mono-hidroxilação no anel lactâmico, gerando o íon molecular m/z 333 (Figura 50). Os fragmentos observados também foram similares aos descritos por Marques et al. (2014) e Marques (2013). A via A corresponde a uma perda de grupamento metil na porção 3,4,5-trimetoxicinâmica resultando no fragmento m/z 318. Este fragmento sofre uma descarbonilação no anel lactâmico, resultando no íon m/z 290 (via J). A via B corresponde a uma perda de CO no anel lactâmico, produzindo o íon m/z 305. A via C é responsável pela formação do íon diagnóstico m/z 221. A partir deste íon são gerados diversos íons a partir das vias F, G e H, produzindo os fragmentos demonstrados na Figura 50.

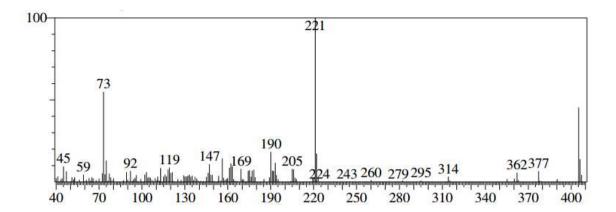


Figura 49- Espectro de massas do composto mono-hidroxilado, t_R 42,57 min (M3) obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons.

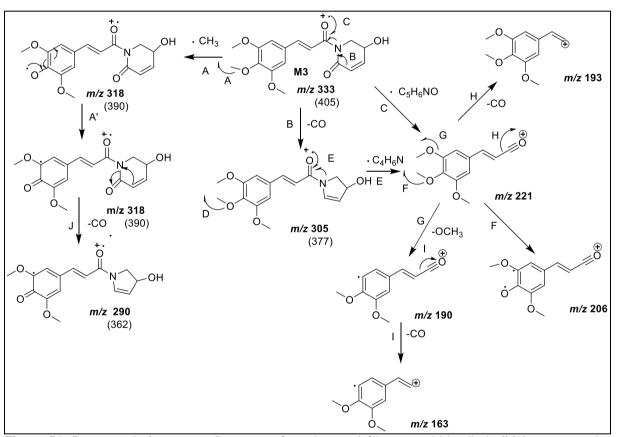


Figura 50- Proposta de fragmentação para os íons do metabólito mono-hidroxilado (M3) empregando o impacto de elétrons, t_R 42,57 min.

4.3.1.2.5 Análise Estrutural do metabólito M4

O último produto observado foi o metabólito M4 (espectro de massas demonstrado na Figura 51), resultante de uma redução no anel lactâmico e inserção de duas hidroxilas no mesmo anel (Figura 52). O íon molecular *m/z* 351 é precursor

de três vias de fragmentação A, B e C. A via A é gerada pela perda de um grupamento metila na porção 3,4,5-trimetoxicinâmica formando m/z 336 que sofre duas perdas de CO consequentes, resultando nos fragmentos m/z 308 (via J) e m/z 280 (via P). A via C corresponde à formação do íon m/z 221 e seus fragmentos resultantes das vias F, G e H, já descritos anteriormente.

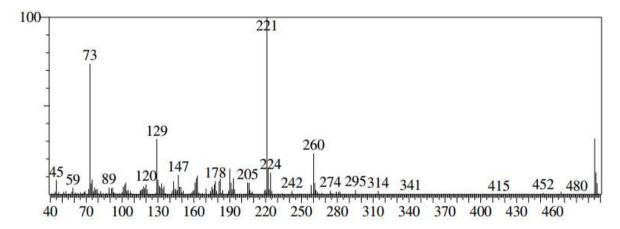


Figura 51- Espectro de massas do composto di-hidroxilado seguido de redução, t_R 43,41 min (M4) obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons.

Figura 52- Proposta de fragmentação para os íons do metabólitoque sofreu redução e di-hidroxilação (M4) empregando o impacto de elétrons, t_R 43,41 min.

A partir da análise destes resultados, foi possível propor a possível estrutura dos metabólitos gerados, no entanto, apenas com essa ferramenta não é possível afirmar o local exato das modificações. Assim, com o objetivo de obter uma elucidação estrutural mais acurada foram empregados outros instrumentos de espectrometria de massas a fim de complementar os resultados obtidos a partir da análise por CG-EM.

4.3.1.2.6 Resumo dos resultados obtidos com CG-EM

Durante a caracterização estrutural usando o CG-EM, devido o processo de derivatização, verifica-se a adição de 72 unidades de massa a cada grupamento hidroxila presente na estrutura dos metabólitos, como pode ser observado na Tabela 17 que contém os principais íons formados e sua respectiva intensidade no espectro.

Tabela 17- Principais fragmentos obtidos com CG-EM para a PPT e seus respectivos metabólitos.

Análise CG-EM				
Analitos	Tempo de retenção (min)	Íons fragmentos ^a		
PPT	40,26	318 (18) 317 (100) 302 (7) 274 (32) 221 (93) 206 (13) 190 (26) 163 (19)		
M 1	41,37	375 (70) 347 (9) 279 (36) 249 (43) 222 (18) 221 (20) 175 (21) 137 (25)		
M2	41,64	334 (14) 333 (100) 290 (29) 221 (91) 206 (10) 190 (34) 177 (43)		
М3	42,57	405 (45) 362 (6) 221 (100) 206 (8) 190 (18) 163 (9)		
M4	43,41	496 (12) 495 (31) 260 (23) 221 (100) 206 (7) 190 (14)		

a m/z (intensidade relativa)

A partir da interpretação dos espectros de massas obtidos, a estrutura química proposta para cada metabólito está demonstrada na Figura 54. Considerando que a identificação do íon diagnóstico m/z 221 foi essencial durante a proposta de fragmentação dos metabólitos. Sucintamente, após observar e analisar os espectros obtidos pode-se sugerir que os metabólitos foram produzidos a partir das seguintes reações: (i) desmetilação no anel 3,4,5-trimetoxicinâmico (M1), (ii) epoxidação no anel lactâmico (M2), (iii) uma simples oxidação no anel lactâmico (M3) e, finalmente, (iv) duas oxidações com uma redução no anel lactâmico (M4) (Figura 53).

$$\begin{bmatrix} -CH_2 \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 10 \\ 9 \\ 8 \\ 7 \\ N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 5 \\ 4 \\ OCH_3 \\ M2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M3 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ H_3CO \\ 13 \\ 14 \\ OCH_3 \\ M4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ +O \end{bmatrix} \begin{bmatrix} +O \end{bmatrix} \\ +O$$

Figura 53- Estruturas químicas propostas a partir da análise por CG-EM dos metabólitos da PPT após metabolismo por HLM. O pontilhado envolvendo parte da molécula corresponde aos possíveis locais onde podem ocorrer a reação química.

4.3.1.3 Análises por CL-EM-IT

4.3.1.3.1 Estudo computacional de reatividade da PPT

A fim de compreender a reatividade da PPT e, consequentemente de seus metabólitos formados, foi utilizada uma ferramenta da química computacional com o objetivo de predizer os sítios de protonação da molécula. Apesar de alguns dados físico-químicos da PPT serem encontrados na literatura, tais como o pKa de -1,88 (SCIFINDER), tais dados consideram a molécula em solução, não correspondendo à situação encontrada durante a ionização da molécula em um instrumento de espectrometria de massas, no qual a substância em estudo encontra-se na fase de vapor. Nesta situação algumas propriedades como, por exemplo, a ordem de basicidade das aminas e de acidez dos álcoois, pode ser inversa àquela verificada em solução. Com isso, a predição do sítio mais susceptível à protonação ou à desprotonação torna-se difícil (VESSECCHI et al., 2008). Neste contexto, o estudo computacional de reatividade é importante como ferramenta durante o estudo de fragmentação de uma molécula.

A Figura 54 apresenta o mapa de potencial eletrostático molecular da PPT, este descritor indica os sítios mais prováveis de protonação, onde as regiões em vermelho indicam regiões nucleofílicas, capazes de acomodar um próton. Este resultado sugere que as carbonilas C2 e C7 são os possíveis sítios de protonação.

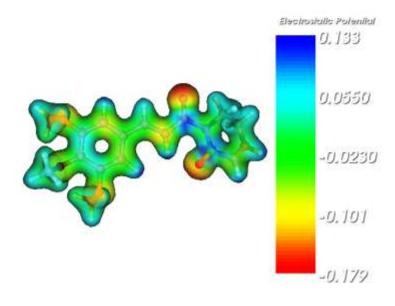


Figura 54- Mapa de potencial eletrostático molecular da piplartina.

4.3.1.3.2 Estudo de fragmentação da PPT e seus metabólitos empregando CL-EM-IT

A fim de confirmar os dados obtidos através do CG-EM e obter mais informações a respeito da estrutura dos metabólitos, um aparelho de CL-EM-IT equipado com analisador do tipo *Ion Trap* foi empregado. A vantagem deste analisador de massas é que ele permite obter espectros de massas sequenciais, consequentemente uma via de fragmentação mais detalhada é alcançada, auxiliando na elucidação estrutural do composto em estudo. A Figura 55 corresponde ao cromatograma de uma amostra metabolizada, contendo a PPT e seus produtos de metabolismo.

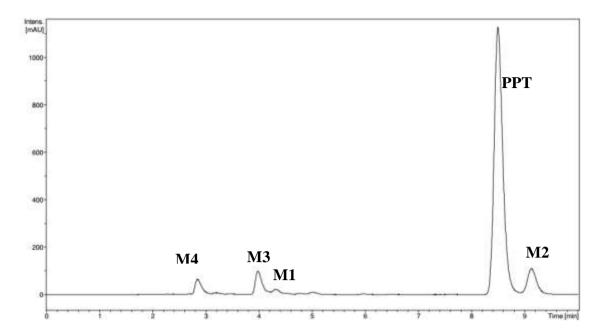


Figura 55- Cromatograma de CL obtido a 325 nm, correspondendo à análise da PPT após reação com HLM. CL-EM-IT operando no modo positivo e negativo. Condições cromatográficas: Coluna Ascentis Express® C18 (10 cm x 4,6 mm, 2,7 µm tamanho da partícula) e água:acetonitrila (60:40, v/v), ambos contendo 0,1% ácido acético (v/v) como fase móvel. Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 20 µL. Condições no EM: O gás nebulizador (60 psi) e de secagem (11 L/min, 330 °C) foi o nitrogênio. Voltagem do capilar de 3500 V. Compostos: M4 t_R 3,1 min, M3 t_R 4,2 min, M1 t_R 4,8 min, PPT t_R 8,8 min e M2 t_R 9,5 min.

A partir da análise dos espectros, tanto no modo positivo quanto do modo negativo, foi possível verificar os mesmos metabólitos visualizados com o instrumento anterior. A Tabela 18 resume os principais fragmentos obtidos através do modo MRM (monitoramento de reações múltiplas), tanto no modo positivo quanto no negativo, empregando um instrumento de CL-EM-IT.

Tabela 18- Resumo dos fragmentos obtidos no modo positivo e negativo para a PPT e seus produtos de metabolismo empregando-se CL-EM-IT.

	CL-EM-IT					
Analitos	Tempo de retenção (min)	modo	íon precursor*	íon produto*		
PPT	8,8	positivo	318 (0)	221 (100) 206 (45) 193 (50) 190 (100) 189 (60) 163 (60) 301 (100) 286 (90) 258 (100)		
		negativo	316 (80)	243 (20) 229 (10) 216 (90) 148 (5)		
M1	4,8	positivo	304 (0)	302 (5) 207 (80) 175 (100) 190 (8) 163 (7) 147 (7) 119 (12)		
IVI	4,0	negativo	302 (0)	205 (100) 190 (5)		
	9,5	positivo	334 (0)	305 (5) 221 (100) 190 (100) 164 (20)		
M2		negativo	-	-		
М3	4,2	008000 334 00	221 (100) 193 (100) 190 (90) 206 (34) 174 (38) 163 (32) 142 (20)			
IVIS	+ ,∠	negativo	332 (20)	314 (30) 236 (100) 220 (75) 152 (40)		
M4	3,1	positivo	352 (0)	221 (100) 193 (100) 190 (70) 206 (50) 178 (20) 164 (10)		
		negativo	332 (40)	317 (15) 289 (10)		

^{*} Razão m/z (intensidade)

4.3.1.3.2.1 Análise estrutural da PPT

As Figuras 56 e 57 apresentam o espectro de fragmentação da PPT no modo positivo e negativo, respectivamente.

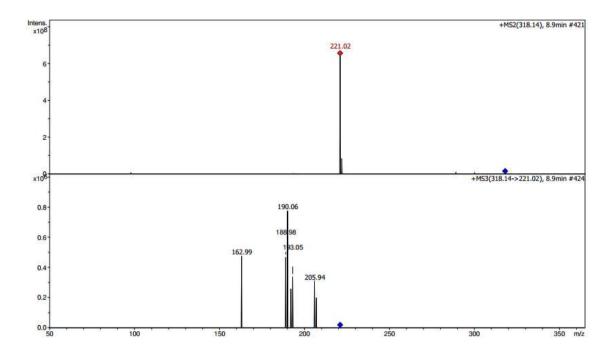


Figura 56- Espectro de massas no modo positivo da PPT, através da análise por CL-EM-IT.

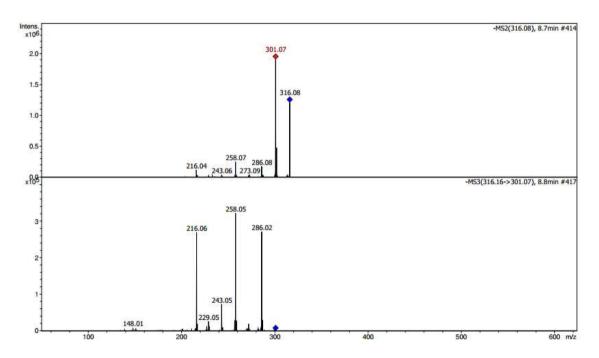


Figura 57- Espectro de massas no modo negativo da PPT, através da análise por CL-EM-IT.

Empregando-se o eletrospray, os íons fragmentos formados a partir do íon diagnóstico m/z 221 da PPT no modo positivo correspondem a fragmentos semelhantes aos obtidos através do impacto de elétrons. Foram observadas três vias de fragmentação principais a partir do íon acílio formado (vias a, b e c) (Figura 58). As reações que produzem os fragmentos obtidos nas vias a, b e c são

descarboxilação, desmetilação da metoxila e desmetoxilação, respectivamente (SILVA-JÚNIOR, 2013). Diferentemente do comportamento observado em técnicas de ionização brandas, as vias b e c não obedecem à regra do elétron-par e produzem fragmentos cátions radicais (SILVA-JÚNIOR, 2013; VESSECCHI et al., 2010). A ocorrência deste tipo de ligação resulta do sistema de ressonância que envolve as ligações C-O, tornando-as susceptíveis a cisões homolíticas devido ao enfraquecimento de tais ligações (SILVA-JÚNIOR, 2013).

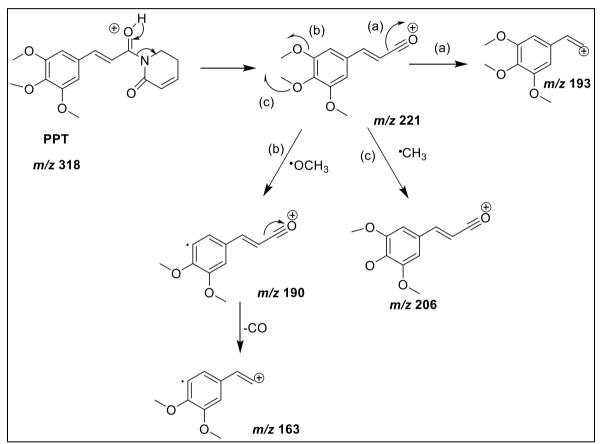


Figura 58- Via de fragmentação da PPT protonada, através do emprego do CL-EM-IT.

4.3.1.3.2.2 Análise estrutural do metabólito M1

Os espectros de fragmentação do metabólito M1 no modo positivo e negativo estão demonstrados nas Figuras 59 e 60, respectivamente. Analisando os dados obtidos, confirma-se através da falta do íon diagnóstico m/z 221 que o metabólito M1 é formado a partir de uma modificação no anel 3,4,5-trimetoxifenil, gerando o íon produto m/z 207 no modo positivo a partir da molécula protonada ([M1+H]+, m/z 304)

(Figura 61). No modo negativo, o espectro da molécula desprotonada exibe o fragmento m/z 205 como pico base, correspondendo a um íon produzido a partir de um rearranjo sigmatrópico através da formação de um anel de 6 membros O(2)-C3-C4-C5-C6-H (SARTORI et al., 2014) (Figura 62).

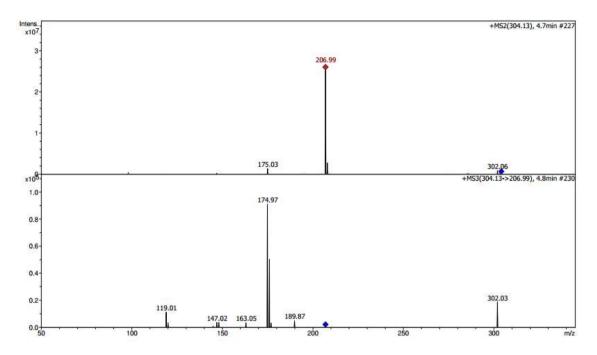


Figura 59- Espectro de massas no modo positivo de M1, através da análise por CL-EM-IT.

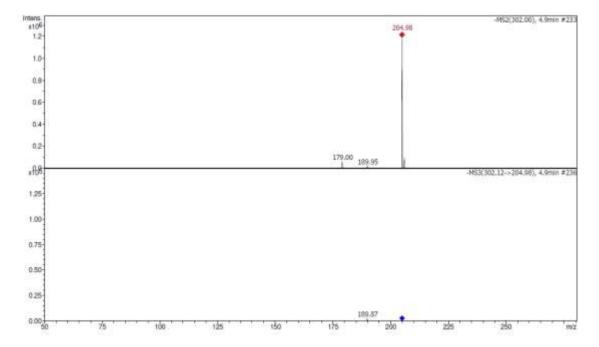


Figura 60- Espectro de massas no modo negativo de M1, através da análise por CL-EM-IT.

Figura 61- Mecanismo de fragmentação para o metabólito M1 protonado, através do emprego do CL-EM-IT.

Figura 62- Mecanismo de fragmentação para o metabólito M1 desprotonado, através do emprego do CL-EM-IT.

4.3.1.3.2.3 Análise estrutural do metabólito M2

A Figura 63 apresenta o espectro de fragmentação obtido através do emprego do CL-EM-IT no modo positivo. O metabólito M2 deriva de uma reação de epoxidação no anel lactâmico da PPT, a partir da molécula protonada ([M2+H]+, m/z 334) é produzido o íon diagnóstico m/z 221 (Figura 64). Os fragmentos formados a partir do íon diagnóstico foram idênticos aos observados para a PPT. Durante a análise no modo negativo não foi possível obter fragmentação de tal molécula devido à falta de um grupamento hidroxila na estrutura, confirmado também pela ausência de eliminação de molécula neutra de água.

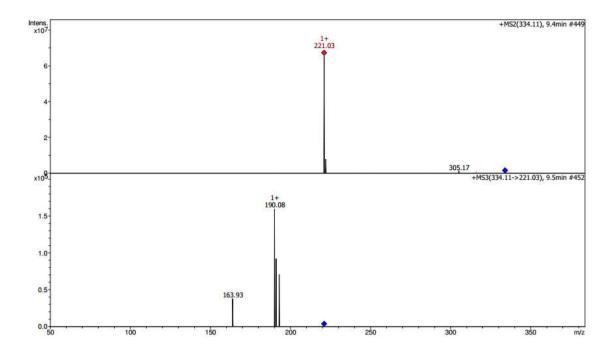


Figura 63- Espectro de massas no modo positivo de M2, através da análise por CL-EM-IT.

Figura 64- Mecanismo de fragmentação para o metabólito M2 protonado, através do emprego do CL-EM-IT.

O metabólito M2 possui em sua estrutura, um grupamento eletrofilicamente reativo, o epóxido. A formação de metabólitos eletrofilicamente reativos (MRs) é considerada indesejável durante a etapa de desenvolvimento de um novo medicamento. Os MRs estão relacionados à inibição baseada no mecanismo que pode causar ligações irreversíveis à enzima do CYP450, resultando em interações medicamentosas graves. Além disso, os MRs estão associados a reações idiossincráticas que podem ser causadas pela interação covalente do metabólito reativo (MR) com proteínas celulares, acarretando em uma disfunção celular ou uma resposta imune via formação de um hapteno, além de estar relacionado a

modificações covalentes no DNA, resultando em mutagenicidade (KALGUTKAR; DALVIE, 2015). Considerando as graves consequências dos MRs ao organismo, alguns fármacos protótipos, capazes de gerar tais substâncias tóxicas, foram retirados ou ainda permanecem com restrições no mercado (*Black Box Warning*), dando lugar a sucessores estruturalmente relacionados, mas com uma segurança marcadamente comprovada (STEPAN et al. 2011). Como exemplo, pode-se citar o antipsicótico clozapina o qual tem seu uso limitado devido a alta incidência de agranulocitose, hepatotoxicidade e miocardite. Enquanto que seus análogos estruturais, quietiapina e loxapina, não estão associados a estes efeitos adversos (LIU; UETRECHT, 1995). Njuguna et al. (2012) destacam o atrito entre a descoberta de novos fármacos a partir de produtos naturais e a presença de produtos reativos formados a partir da biotransformação, o qual trata-se de um evento relativamente comum (NJUGUNA et al., 2012).

Os MRs além de ligarem-se covalentemente aos compontentes nucleofílicos das células gerando danos eles podem formar ligações tioéter ou tioéster com os resíduos de cisteína da molécula de GSH. Esta conjugação pode ou não requerer a catálise pela enzima GST. A molécula de GSH hidrofílica aumenta substancialmente a polaridade do composto original. Posteriormente, o grupo amino do resíduo de cisteína presente no conjugado é acetilado pela ação de N-acetiltransferases intracelulares para formar o correspondente ácido mercaptúrico que é eliminado pela urina (COLLEMAN, 2005; TANG; ZHANG, 2012). Uma possível via de detoxificação do metabólito M2 a partir da conjugação com GSH está demonstrada na Figura 65.

Figura 65- Mecanismo hipotético de detoxificação de M2 a partir da conjugação com GSH. Baseado em Colleman (2005).

4.3.1.3.2.4 Análise estrutural do metabólito M3

As Figuras 66 e 67 contêm os espectros de fragmentação do metabólito M3 no modo positivo e negativo, respectivamente. Uma oxidação no anel lactâmico da PPT resultou na formação do metabólito M3 ([M3+H]+, m/z 334), o qual apresenta o mesmo íon diagnóstico m/z 221 no modo positivo, como pode ser observado na proposta de fragmentação do metabólito M3 apresentado na Figura 68. A análise no modo negativo mostra a perda de uma molécula de H₂O a partir do anel lactâmico de m/z 332 [M-H-], produzindo o íon fragmento m/z 314. Além disso, a partir do mesmo íon precursor foi formado o íon m/z 236 após uma abertura do anel e a migração de um hidrogênio contido em C3, resultando em uma perda neutra de C₄H₄O₂ (Figura 69).

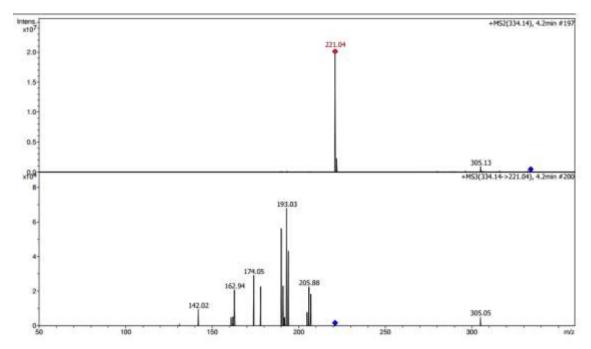


Figura 66- Espectro de massas no modo positivo de M3, através da análise por CL-EM-IT.

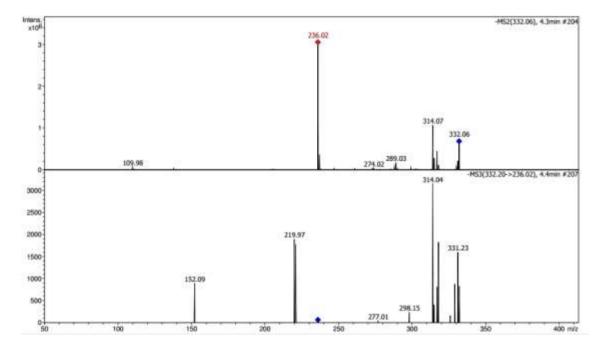


Figura 67- Espectro de massas no modo negativo de M3, através da análise por CL-EM-IT.

Figura 68- Mecanismo de fragmentação para o metabólito M3 protonado, através do emprego do CL-EM-IT.

Figura 69- Mecanismo de fragmentação para o metabólito M3 desprotonado, através do emprego do CL-EM-IT.

4.3.1.3.2.5 Análise estrutural do metabólito M4

As Figuras 70 e 71 contêm os espectros de fragmentação do metabólito M4 no modo positivo e negativo, respectivamente. Finalmente, o último metabólito identificado (M4) foi produzido a partir da adição de dois átomos de oxigênio e dois de hidrogênio no anel lactâmico da PPT. Através da análise empregando-se CL-EM-IT, o metabólito M4 (*m/z* 352 [M4+H]+) foi fragmentado a *m/z* 221 no modo positivo, similarmente aos demais metabólitos que sofreram modificações no anel lactâmico (M2 e M3), mas sem modificações na porção cinâmica (Figura 72). O metabólito M4 no modo negativo ([M-H]-, *m/z* 350) mostrou um íon fragmento *m/z* 332 derivado de uma perda neutra de H₂O. Além disso, o íon *m/z* 317 pode ter sido formado pela perda

de um radical metila a partir do íon m/z 350. O íon fragmento m/z 289 é gerado pela perda neutra de CO a partir do íon m/z 350 (Figura 73).

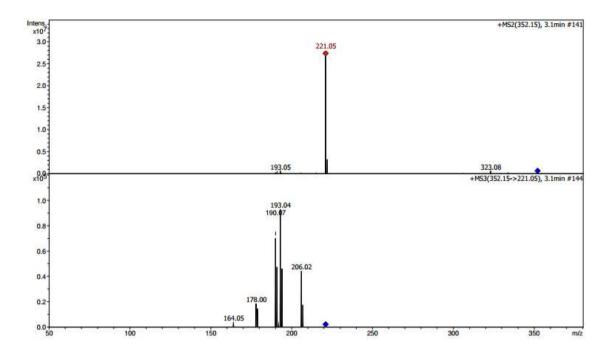


Figura 70- Espectro de massas no modo positivo de M4, através da análise por CL-EM-IT.

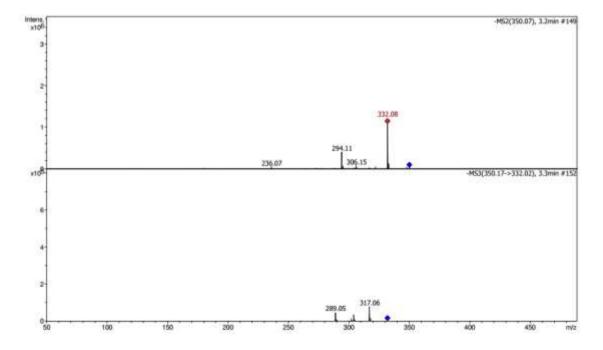


Figura 71- Espectro de massas no modo negativo de M4, através da análise por CL-EM-IT.

Figura 72- Mecanismo de fragmentação para o metabólito M4 protonado, através do emprego do CL-EM-IT.

$$H_3CO$$
 H_3CO
 H_3C

Figura 73- Mecanismo de fragmentação para o metabólito M4 desprotonado, através do emprego do CL-EM-IT.

4.3.1.4 Análises por CL-EM-TOF

O último instrumento empregado durante a caracterização estrutural dos metabólitos formados foi o CL-EM-TOF, o qual apresenta um analisador em alta resolução, capaz de atribuir a massa exata dos compostos em análise. A Figura 74 apresenta o cromatograma de EM obtido a partir do TIC (*Total lon Chromatogram*) no modo positivo, enquanto que a Tabela 19 resume os principais fragmentos obtidos com o emprego do CL-EM-TOF. O **Apêndice 2** contém os espectros de massas obtidos com estas análises.

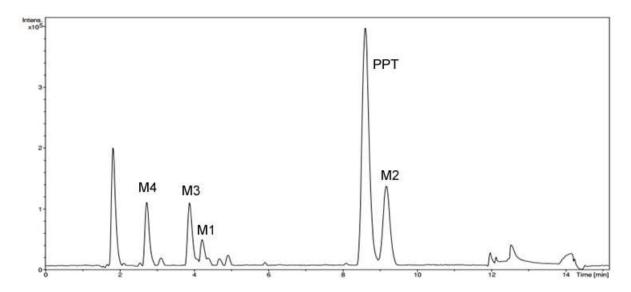


Figura 74- Cromatograma de EM obtido a partir do TIC no modo positivo, correspondendo a análise da PPT após o metabolismo com HLM. Condições no CL-EM-TOF: Condições cromatográficas: Coluna Ascentis Express C18 (10 cm x 4,6 mm, 2,7 μ m tamanho de partícula) e água:acetonitrila (60:40, v/v), ambos contendo 0,1% ácido acético (v/v) como fase móvel. Vazão de 0,5 mL/min; volume de injeção: 20 μ L. Condições no EM: voltage no capilar de 3500 V. Nitrogênio foi usado como gás nebulizador (4 bar) e de secagem (9 L/min and 200°C). O Skimmer 1 e 2 foram mantidos a 40 e 22 V, respectivamente. Compostos: M4 t_R 2,9 min, M3 t_R 4,1 min, M1 t_R 4,8 min, PPT t_R 8,5 min e M2 t_R 9,4 min.

A massa exata observada para a PPT e cada metabólito, quando comparada com a massa calculada, apresentou um erro abaixo de 5 ppm, indicando a eficácia na obtenção da massa exata a partir da análise empregando CL-EM-TOF (Tabela 19).

Tabela 19- Dados da massa exata da PPT e seus metabólitos empregando-se CL-EM-TOF.

Analito	Massa exata	Massa acurada	Erro (ppm)	Fórmula Molecular
-				
PPT	318,13359	318,13289	2,2	$C_{17}H_{20}NO_5^+$
M1	304,11795	304,11084	1,0	C ₁₆ H ₁₈ NO ₅ +
M2	334,13359	334,12685	5,0	$C_{17}H_{20}NO_6^+$
M3	334,12851	334,12820	3,8	$C_{17}H_{20}NO_6^+$
M4	352,13908	352,13782	3,6	$C_{17}H_{22}NO_7^+$

4.3.1.5 Análise da PPT por RMN

4.3.1.5.1 Análise da PPT e seus metabólitos por CL-EFS-RMN

As análises empregando a espectrometria de massas possibilitaram a determinação da região das reações do CYP450 sobre a PPT, porção cinâmica ou porção lactâmica, enquanto que os experimentos com o RMN determinaram as posições exatas das modificações. Com isso, esta última técnica foi empregada como auxiliar na determinação das estruturas propostas. Os espectros de RMN obtidos estão demonstrados no **Apêndice 3**.

Baseado nos sinais de RMN de ¹H observados para M1 (Tabela 20), é possível confirmar a mesma estrutura proposta para a PPT, exceto pela desalquilação do grupo metila da metoxila na posição meta, representado pela diminuição da integração de 6H para 3H em δ 3,89 (s, 3H) (Tabela 20). A função epóxido proposta para M2 foi avaliada pela comparação dos sinais correspondentes ao anel lactâmico tendo a PPT como padrão (Tabela 20). Foi verificada para M2 uma formação de epóxido na configuração cis entre C-3 e C-4. Enquanto os hidrogênios em δ 6,03 (1H; dt, 9,7 Hz; 1,8 Hz; H-3) e 7,10 (1H; dt; 9,7 Hz; 1,9 Hz; H-4) correspondem à ligação dupla $\Delta^{3,4}$ da PPT, o sinal de H-3 em δ 3,59 (1H; d; 4,1 Hz) e o sinal de H-4 em δ 2,46 (1H, m) corroboram a presença do grupo epóxido em M2 (Tabela 20). Os H-5 de M2 não são equivalentes, portanto é observado para H-5a um duplo dupleto em δ 2,13 (1H; dd; 13,5 Hz; 5,7 Hz) e para H-5b um duplo dupleto em δ 2,10 (1H; dd; 13,5 Hz; 5,7 Hz). O duplo duplo tripleto em δ 4,30 é um sinal associado ao H-6 com constantes de acoplamento de 13,4 Hz dos hidrogênios geminais e 5,7 e 1,3 Hz associados aos acoplamentos pseudo axial-axial e pseudo axial-equatorial. A hidroxilação proposta para M3 ocorre no C-5 (Tabela 20) e pode ser confirmada pela presença de um duplo dupleto em δ 6.06 ,correspondente ao H-3 com um acoplamento em cis entre o H-3 e H-4 e um acoplamento a longa distância entre o H-3 e H-5 (1H; 9,8 Hz; 1,0 Hz). O sinal em δ 7,01 associado ao H-4 também corroborou para o acoplamento visualizado ente H-4, H-3 e H-5 (1H; dd; 9,8 Hz; 4,1 Hz). O deslocamento químico mais desblindado no H-5 em δ 4,48 e a multiplicidade em duplo tripleto (1H; 4,2 Hz; 1,0 Hz) determina a hidroxilação para esta posição. Adicionalmente, a análise de HSQC para M3 revelou uma variação no deslocamento químico entre o C-5 e C-6 comparado à PPT (Tabela 21). A presença de um diol em M4 pode ser sugerido pelas diferenças nos deslocamentos químicos no H-3 atribuídos ao dupleto em δ 4,17 (1H; 8,4 Hz) associado a um acoplamento do tipo pseudo axialaxial indicando uma substituição na ligação *cis* para um substituinte não-hidrogênio no C-4 (Figura A3.5).

Tabela 20- Dados de RMN de ¹H das substâncias: PPT, M1, M2, M3 e M4 em CD₃OD.

D!-~-	¹H δ (multiplicidade; <i>J</i> em Hz)						
Posição	PPT*	M1	M2	М3	M4		
2	-	-	-	-	-		
3	6,03 (1H; dt; 9,7; 1,8)	6,03 (1H; dt; 9,7; 1,8)	3,59 (1H; d; 4,1)	6,06 (1H; dd; 9,8; 1,0)	-		
4	7,10 (1H; dt; 9,7, 4,2)	7,09 (1H; dt; 9,7; 4,2)	2,46 (1H; m)	7,01 (1H; dd; 9,7; 4,1)	-		
5	2,53 (2H; m)	2,52 (2H; m)	2,13 (1H; dd; 13,5; 5,7)	4,48 (1H; dt-overlapped; 4,2; 1,0)	-		
5b	-	-	2,10 (1H; dd 13,5; 5,7)	-	-		
6	4,01 (2H; t; 6,4)	4,01 (2H; t; 6,4)	4,30 (2H; ddt; 13,4; 5,7; 1,3)	4,04 (1H; ddd; 13,5; 5,7; 0,5)	-		
6b	-	-	-	4,00 (1H; dd 13,5; 4,7)	-		
7	-	-	-	-	-		
8	7,40 (1H; d; 15,6)	7,36 (1H; d; 15,6)	7,47 (1H; d; 15,6)	7,44 (1H; d; 15,6)	7,31 (1H; d; 15,6)		
9	7,63 (1H; d; 15,6)	7,57 (1H; d; 15,6)	7,65 (1H; d; 15,6)	7,66 (1H; d; 15,6)	7,64 (1H; d; 15,6)		
10	-	-	-	-	-		
11	6,94 (1H; s)	6,93 (1H; s)	6,95 (1H, s)	6,95 (1H, s)	6,94 (1H; s)		
12	-	-	-	-	-		
13	-	-	-	-	-		
14	-	-	-	-	-		
15	6,94 (1H; s)	6,96 (1H; s)	6,95 (1H, s)	6,95 (1H; s)	6,94 (1H; s)		
<i>m</i> -OCH₃	3,90 (6H; s)	3,89 (3H; s)	3,90 (6H; s)	3,90 (6H; s)	3,89 (6h; s)		
<i>p</i> -OCH₃	3,82 (3H; s)	3,84 (3H; s)	3,82 (3H; s)	3,82 (3H; s)	3,82 (3H; s)		

s, singleto; d, dupleto; m, multipleto; dd, duplo dupleto; dt, duplo tripleto; ddt, duplo duplo tripleto. * PPT foi caracterizada baseada em (Duh et al., 1990)

Tabela 21- Dados de RMN de ¹³C da PPT e de M3 em CD₃OD.

Doo!oão	δ ¹³ C		
Posição	PPT ^a	M3 ^b - HSQC (dqf)	
2	166,7	-	
3	126,5 (CH)	126,1 (CH)	
4	146,5 (CH)	148,1 (CH)	
5	25,2 (CH ₂)	62,8 (CH)	
6	42,1 (CH ₂)	49,0 (CH ₂)	
7	169,7	-	
8	121,7 (CH)	12,0 (CH)	
9	144,5 (CH)	-	
10	131,3	-	
11	106,0 (CH)	106,5 (CH)	
12	154,1	-	
13	141,5	-	
14	154,1	-	
15	106,0 (CH)	106,5 (CH)	
<i>m</i> -OCH₃	56,6 (CH ₃) 56,4 (CH		
<i>p</i> -OCH₃	61,5 (CH ₃)	60,9 (CH ₃)	

^{*} PPT foi caracterizada baseada em (Duh et al., 1990)

Os locais de modificação na molécula original da PPT (porção cinâmica ou porção lactâmica) foram determinadas com as ferramentas de CG-EM e CL-EM-IT, a massa exata de cada um dos compostos foi obtida com CL-EM-TOF, enquanto que os locais exatos de modificação apenas foram confirmados com o RMN. Portanto, as estruturas químicas dos metabólitos foram determinadas e estão expostas na Figura 75, resumindo: (i) desmetilação na posição meta do anel 3,4,5-trimetoxicinâmico (M1), (ii) epoxidação entre o C3 e C4 do anel lactâmico (M2), (iii) uma simples oxidação no C5 do anel lactâmico (M3) e, finalmente, (iv) duas oxidações com uma redução nos carbonos 3 e 4 do anel lactâmico (M4).

Figura 75- Estrutura química da PPT, M1, M2, M3 e M4.

4.4 CONCLUSÕES

A partir do metabolismo in vitro da PPT empregando HLM foram observados 4 produtos de metabolismo que tiveram suas estruturas propostas de acordo com os resultados obtidos através do emprego do CG-EM, CL-EM-IT, CL-EM-TOF e CL-EFS-RMN. O CG-EM foi empregado para determinar o local de modificação na estrutura original da PPT (porção cinâmica ou lactâmica), através de uma análise detalhada dos fragmentos gerados. O CL-EM-IT foi uma ferramenta auxiliar nesta determinação, uma vez que através da análise sequencial (MS³) foi possível determinar os diferentes estágios de fragmentação. Adicionalmente, o CL-EM-TOF possibilitou a aquisição da massa acurada de cada um dos compostos e, consequentemente a determinação da composição química. Por último, o CL-EFS-RMN foi o único instrumento capaz de identificar o local exato de reação. Portanto, foi possível caracterizar a estrutura de 4 metabólitos distintos resultantes da catálise por enzimas de metabolismo presentes na fração microssomal do fígado, na qual destaca-se as enzimas do CYP450, responsáveis pelas reações de funcionalização. Assim, foram caracterizados os metabólitos M1 (desmetilação na posição *meta* do anel 3,4,5-trimetoxicinâmico), M2 (epoxidação entre o C3 e C4 do anel lactâmico), M3 (oxidação no C5 do anel lactâmico) e, finalmente, M4 (reação trans-diidrodiol entre C3 e C4). A importância da descoberta destes metabólitos consiste na predição dos metabólitos formados in vivo que são responsáveis pela eliminação da PPT do organismo através da formação de substâncias mais polares e compatíveis à excreção. Por outro lado, tais metabólitos podem estar relacionados à produção de efeitos adversos devido às propriedades tóxicas geradas no organismo. O metabólito M2 por possuir um grupo eletrofílico epóxido, demonstra potencial em causar uma reação idiossincrática in vivo, portanto, estudos de toxicidade mais elaborados devem ser realizados no futuro. A etapa de identificação e caracterização dos metabólitos da PPT digna-se como um guia para estudos de eficácia e segurança desta molécula promissora.

CAPÍTULO 5

Determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo da piplartina (fenotipagem enzimática)

CAPÍTULO 5

Determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo da piplartina (fenotipagem enzimática)

5.1 OBJETIVOS

5.1.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo de fenotipagem empregando as enzimas do CYP450 a fim de determinar a contribuição de cada isoforma no metabolismo da piplartina.

5.1.2 Objetivos Específicos

- Formação dos metabólitos da PPT com o tempo de incubação (*Time course*);
- Estudo com inibidores químicos específicos das isoformas do CYP450;
- Estudo com as isoformas recombinantes do CYP450.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

5.2.1.1 Reagentes

Os inibidores específicos do CYP450 utilizados foram sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4), ticlopidina (CYP2C19), α-naftoflavona (CYP1A2), quinidina (CYP2D6) dietilcarbamato (CYP2E1), orfenadrina (CYP2B6), pilocarpina (CYP2A6), ácido valproico (epóxido hidrolase) e montelukast (CYP2C8), obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA).

As isoformas recombinantes do CYP450 de humanos foram obtidas da Corning Life Science (Woburn, EUA), sendo essas: rCYP2D6, rCYP2E1, rCYP2B6, rCYP2C8, rCYP3A4, rCYP1A1, rCYP1A2, rCYP2C19 e rCYP2C9, assim como o controle negativo constituído de células de inseto.

Os demais solventes, reagentes e equipamentos empregados foram descritos anteriormente.

5.2.1.2 Análises Cromatográficas

As análises cromatográficas dos metabólitos formados a partir da reação de metabolismo da PPT foram realizadas empregando-se o CLAE-DAD ou CG-EM de acordo com condições descritas previamente.

5.2.1.3 Programa utilizado no processamento de dados

GraphPad Prism Versão 3.03 (San Diego, EUA) foi empregado na obtenção dos gráficos.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Monitoramento da produção de metabólitos com o tempo

A formação dos metabólitos da PPT foi monitorada variando-se o tempo de incubação a fim de investigar a rota de formação dos metabólitos. O método de incubação constituiu-se da adição, inicialmente, de 5 μL da solução de PPT na concentração correspondente à S₅₀. Em seguida, adicionou-se a solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 até obter o volume final de 200 μL de meio de incubação. Posteriormente, foi adicionado 10 μL da solução A de regeneração do sistema NADPH e 2 μL da solução B de regeneração do sistema NADPH. A mistura foi pré-incubada durante 5 min e a reação foi iniciada pela adição de HLM na concentração proteica final de 2 mg mL⁻¹. A reação foi interrompida com acetato de etila nos tempos de 5, 10, 20, 40 e 50 min. Em seguida, a amostra foi submetida a agitação no agitador orbital a 1500 rpm durante 10 minutos e posteriormente foi submetida à centrifugação durante 5 minutos a 2860 *xg*. Posteriormente, 900 μL do solvente orgânico foi coletado e evaporado sob fluxo de ar comprimido. Com o objetivo de melhorar a resposta observada, 4 amostras independentes foram concentradas em um único tubo.

5.2.2.2 Estudo de Fenotipagem

5.2.2.2.1 Inibidores químicos seletivos do CYP450

Com o objetivo de avaliar as principais isoformas do CYP450 envolvidas no metabolismo da PPT, os seguintes inibidores químicos seletivos para cada isoforma

foram empregados: sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4), ticlopidina (CYP2C19), α-naftoflavona (CYP1A2), quinidina (CYP2D6), dietilcarbamato (CYP2E1), orfenadrina (CYP2B6), pilocarpina (CYP2A6) e montelukast (CYP2C8), sendo que as concentrações de cada inibidor utilizadas foram 2, 2, 10, 1, 2, 50, 20, 50 e 5 µmol L⁻¹, respectivamente (BARTH et al., 2015; FANG et al., 2011; FENG et al., 2014; HAO et al., 2010; ZHAO et al., 2012; WUSTROW et al., 2012). O protocolo de incubação foi o mesmo para todos inibidores, exceto a reação com a orfenadrina, que foi pré-incubada durante 15 minutos com os demais reagentes a 37°C, antes que a reação fosse iniciada com a adição do substrato (HAO et al., 2010). Por se tratar de um inibidor tempo-dependente, é necessária esta pré-incubação prévia da orfenadrina na ausência da PPT. O protocolo empregado consistiu da adição de 5 µL de PPT, na concentração correspondente a ½ S₅₀ (63,9 µmol L⁻¹), seguida da adição de 5 µL de inibidor na concentração descrita acima e de cofatores que geram o NADPH, sendo a mistura pré-incubada durante 5 minutos a 37°C e finalizando com a adição de HLM na concentração proteica final de 2 mg mL⁻¹. O volume final de 400 µL foi atingido com solução tampão fosfato pH 7,4 (0,1 mol L⁻¹). Para todos os inibidores, a mistura foi incubada a 37°C sob agitação. A reação foi interrompida inicialmente durante 10 min e em um segundo experimento, a fim de visualização do metabólito M4, no tempo de 50 min. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de acetato de etila e processada como descrito no item 5.2.2.1, sendo que 4 amostras foram concentradas em um único tubo. Finalmente, a amostra foi analisada por CLAE-DAD ou CG-EM de acordo com os protocolos descritos anteriormente. Controles na ausência dos inibidores seletivos foram avaliados.

A atividade enzimática remanescente das isoformas CYP450 foi calculada através da Equação 18.

$$\%$$
 Atividade Enzimática Remanescente= $100 - \left(\frac{A_1}{A_0}x\ 100\right)$ Equação 18

A₁ corresponde à atividade enzimática obtida na presença dos inibidores seletivos e A₀ é a atividade enzimática obtida para o controle negativo na ausência do inibidor. Uma inibição maior ou igual a 40% foi considerada como relevante na determinação da isoforma que participa da reação (HABENSCHUS, 2016).

5.2.2.2 Estudo com as isoformas recombinantes do CYP450

A capacidade de determinar as principais isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo da PPT foi avaliada com as isoformas humanas recombinantes da CYP (rhCYP). Para tanto. PPT, na concentração correspondente à S₅₀ foi adicionada em um volume final de incubação de 200 µL contendo a isoforma CYP3A4, 1A2, 2C9, 2B6, 2D6 ou 2C19 na concentração de 50 pmol mL-1 e 25 pmol mL-1 para CYP2C8 e 2E1 (concentrações finais no meio de incubação), sistema de regeneração do NADPH, solução A (1,3 mmol L-1 NADP+ e 3,3 mmol L-1 glicose-6-fosfato), sistema de regeneração do NADPH, solução B (0,4 U/mL glicose-6-fosfato desidrogenase), solução tampão fosfato pH 7,4 (0,1 mol L⁻¹), exceto para a CYP2C9, em que a solução tampão fosfato foi substituída pela solução tampão tris pH 7,5 (0,1 mol L-1). Posteriormente, as amostras foram pré-incubadas durante 5 min e após a adição do rhCYP as amostras foram mantidas durante 10 min ou 50 min em um banho-maria sob agitação. As reações foram interrompidas de acordo com o protocolo descrito no item 5.2.2.1, sendo que 4 amostras foram concentradas em um único tubo. Finalmente, a amostra foi analisada por CLAE-DAD ou CG-EM de acordo com os protocolos descritos anteriormente. Os resultados foram expressos através da área correspondente a cada metabólito formado. Um controle negativo contendo apenas o conteúdo do inseto no qual as enzimas isoladas do CYP450 são expressas foi empregado.

5.2.2.3 Inibidor seletivo da epóxido hidrolase

A fim de avaliar o envolvimento da enzima epóxido hidrolase na formação do metabólito M4, um experimento foi realizado de acordo com o descrito na seção 5.2.2.2.1, empregando-se o inibidor específico ácido valpróico na concentração final de 550 µmol L-1. O resultado foi expresso como porcentagem de atividade remanescente e comparado com um controle na ausência do inibidor.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Monitoramento da produção dos metabólitos com o tempo

A formação dos metabólitos da PPT com o tempo de incubação está demonstrada na Figura 76.

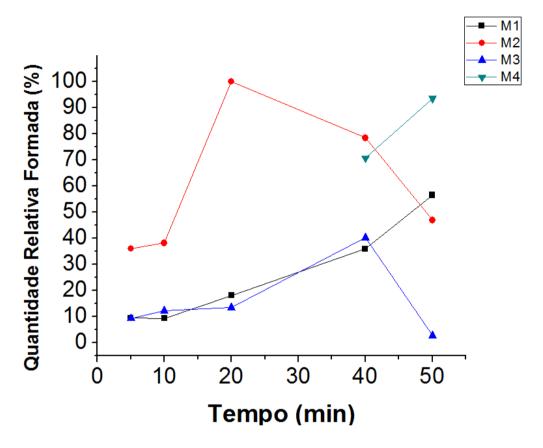


Figura 76- Formação relativa dos metabólitos da PPT com o tempo de incubação (*Time Course*). Fonte: MOREIRA et al. 2016b.

Os metabólitos M1 e M3 são produzidos em proporções semelhantes até 40 min. O metabólito M2 é produzido em uma maior proporção até 20 min, ocorrendo uma diminuição drástica ao atingir-se 50 min de incubação. Verifica-se que M4 só é produzido a partir de 40 min de incubação, exatamente quando a quantidade dos metabólitos M2 e M3 começam a diminuir. Este dado sugere que M4 constitui um metabólito secundário da PPT, sendo que a provável rota é a sua formação a partir de M2, através da hidrólise do anel epóxido levando a produção de um composto trans-diidrodiol mais estável e não-tóxico (Figura 77) (ORTIZ DE MONTELLANO; NELSON, 2011).

Figura 77- Formação do metabólito secundário M4 a partir da hidrólise de M2.

5.3.2 Estudo de Fenotipagem

O estudo com os inibidores químicos seletivos na presença de microssomas hepático humanos foram realizados a fim de determinar as isoformas do CYP450 que participam do metabolismo da PPT (Figura 78A). Entre os inibidores químicos empregados, apenas a α-naftoflavona (inibidor da CYP1A2) mostrou uma forte inibição na formação do metabólito M1. O metabólito M2 foi inibido com uma taxa de inibição de 83% na presença de cetoconazol (inibidor da CYP3A4), assim como o metabólito M3, cuja sua produção foi drasticamente reduzida na presença de tal inibidor. Um perfil semelhante foi observado com as isoformas recombinantes do CYP450 (Figura 78B), apresentando uma produção maior de M1 na presença do CYP1A2, enquanto que o CYP3A4 participou majoritariamente da formação de M2 e M3.

Como é possível verificar no perfil de produção dos metabólitos com o tempo (Figura 76), o metabólito M4 só é produzido em uma quantidade detectável a partir de 40 min. Portanto, a fim de determinar as isoformas responsáveis pela produção de tal metabólito, o mesmo experimento foi realizado sob um tempo de incubação de 50 min (Figura 79).

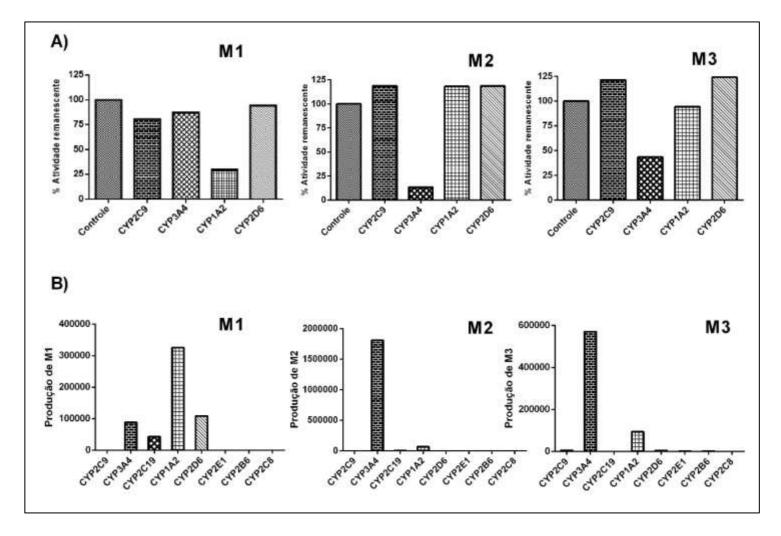


Figura 78- Estudo de Fenotipagem sob tempo de incubação de 10 min. A) Inibição do metabolismo da PPT por inibidores seletivos. Inibidores químicos respectivos (CYP inibida): sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4), α-naftoflavona (CYP1A2), quinidina (CYP2D6). B) Formação dos metabólitos da PPT através da reação com as isoformas humanas recombinantes do CYP450. Fonte: MOREIRA et al. 2016b.

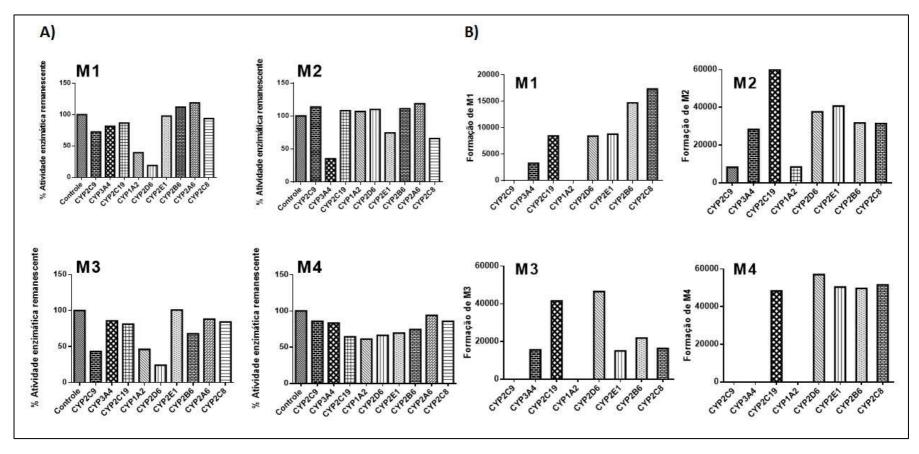


Figura 79- Estudo de Fenotipagem sob tempo de incubação de 50 min. A) Inibição do metabolismo da PPT por inibidores seletivos. Inibidores químicos respectivos (CYP inibida): sulfafenazol (CYP2C9), cetoconazol (CYP3A4), ticlopidina (CYP2C19), α-naftoflavona (CYP1A2), quinidina (CYP2D6), dietilcarbamato (CYP2E1), orfenadrina (CYP2B6), pilocarpina (CYP2A6), montelukast (CYP2C8). B) Formação dos metabólitos da PPT através da reação com as isoformas humanas recombinantes do CYP450.

Outras isoformas participam da produção dos metabólitos da PPT com um tempo de incubação mais longo. Este comportamento pode ser verificado em ambos os experimentos. A explicação provável é que ao longo do tempo, isoformas que possuem atuação minoritária no metabolismo exerçam sua ação devido ao esgotamento da principal via de biotransformação. A catálise através de diversas isoformas para a formação de um metabólito constitui uma vantagem, uma vez que durante a administração simultânea com um segundo fármaco, que utiliza a mesma via de eliminação, o metabólito ainda pode ser produzido através de uma segunda via, não prejudicando a sua eliminação pelo organismo.

O metabólito M4 não foi inibido consideravelmente na presença de seletivos, enquanto que ele foi formado pelas recombinantes CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2B6 e CYP2C8. No entanto, deve-se ressaltar que este estudo empregou concentração final similar (50 ou 25 pmol mL⁻¹) para todas as isoformas avaliadas, diferentemente do fígado humano, no qual tais isoformas possuem quantidade de proteínas e atividade significantemente diferentes entre elas (Figura 6A) (OGILVE et al., 2014). Além disso, como pode ser visualizado a metabolização da PPT pelas isoformas recombinantes do CYP450, em geral, não foi seletiva; demonstrando que na ausência da isoforma predominante, as demais isoformas conseguem realizar a mesma reação. Uma possível explicação para este fenômeno é que o conteúdo das rhCYPs não é o mesmo encontrado nos microssomas ou hepatócitos. Os níveis de NADPH-CYP redutase são muito maiores do que aqueles encontrados em microssomas (OGILVIE et al., 2014; FENG et al., 2014). Isto pode acarretar em uma atividade artificial e exacerbada da enzima recombinante. Assim, esta diferença de conteúdo pode levar a uma subestimação ou uma sobrestimação da atividade enzimática (OGILVIE et al., 2014, RODRIGUES, 1999, SCHROER et al., 2010).

Considerando que a polifarmácia é uma prática relativamente comum, especialmente em pacientes idosos, o risco de interações medicamentosas envolvendo a PPT deve ser considerado para tais isoformas (LEES; CHAN, 2011). Como reportado anteriormente, a PPT tem um grande potencial para tornar-se um medicamento antitumoral, assim o uso deste novo fármaco com

outros medicamentos rotineiramente administrados durante a prática clínica é de grande relevância. Pacientes idosos necessitam além da terapia anticâncer, muitas vezes, de anti-hipertensivos, de anticoagulantes, de medicamentos para redução do colesterol, entre outros (LEES; CHAN, 2011, POPA et al., 2014). O gerenciamento da administração concomitante de tais fármacos com outros que utilizam a mesma via deve ser considerado (LEES; CHAN, 2011). A Erva-de-São-João (Hypericum perforatum) é usada no tratamento de depressão moderada e é um fitoterápico popular entre pacientes com câncer. No entanto, vários estudos têm demonstrado sua ação sobre a CYP3A4, uma importante isoforma no metabolismo da PPT. Por exemplo, a administração concomitante da Erva-de-São-João e do agente quimioterápico irinotecano diminui a área sob a curva (AUC) do metabólito ativo do irinotecano em 42%, resultando em uma diminuição da eficácia terapêutica (GOEY et al., 2013, MATHIJSSEN, 2002). Considerando que a CYP3A4 é a enzima mais importante no metabolismo de fármacos, possíveis interações medicamentosas devem ser preditas e evitadas. A segunda isoforma predominante no metabolismo da PPT é a CYP1A2, responsável pela detoxificação de 10 a 20% dos xenobióticos (RENDIC; GUENGERICH, 2015). Esta enzima pode ter sua atividade induzida através da ativação metabólica por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHAs) presentes na fumaça do tabaco. Este fator resulta em duas consequências clínicas, a diminuição da eficácia de medicamentos metabolizados pela CYP1A2 devido a diminuição das concentrações plasmáticas, além da toxicidade mediada pela ativação destes compostos tóxicos e carcinógenos (MA; LU, 2007).

Além do problema da família CYP450 envolvendo as interações medicamentosas, o polimorfismo das isoformas do CYP450 tem implicado em uma relevante variabilidade no perfil de metabolismo de um fármaco, podendo levar a uma falha durante o tratamento terapêutico ou reações adversas em uma sub-população que apresenta tal modificação genética (KUMAR; SURAPANENI, 2001). As principais isoformas que apresentam o polimorfismo genético são CYP2A6, CYP2C19, CYP2C9 e CYP2D6, CYP1A2 e CYP3A5 sendo que estas duas últimas estão envolvidas no metabolismo da PPT (INGELMAN-SUNDBERG; OSCARSON; MCLELLAN, 1999). Uma classificação baseada no

perfil farmacocinético obtido para cada fenótipo é utilizada, no qual os "metabolizadores pobres" (MP) correspondem àqueles sujeitos homozigotos ou heterozigotos que carregam alelos com a completa falta de função (alelo nulo). Os "metabolizadores extensos" referem-se ao fenótipo normal, usualmente encontrado na maioria da população; o "metabolizador intermediário" é aquele que carrega um alelo normal e outro com uma função deficiente. O último perfil é o "metabolizador ultrarrápido" em que o sujeito apresenta ganho de função com alelo extra (ZANGER; SCHWAB, 2013). Uma vez que o CYP450 possui um papel determinante na eliminação de fármacos destinados ao câncer, incluindo a PPT, a extensa diferença interindividual quanto a capacidade de metabolização dos agentes antitumorais pode ter consequências relevantes no efeito terapêutico (INGELMAN-SUNDBERG; OSCARSON; MCLELLAN, 1999). Exemplificando, o tamoxifeno, um fármaco comumente empregado no tratamento e profilaxia do câncer de mama, é metabolizado pela CYP2D6. Uma vez que a atividade desta isoforma é altamente variável na população, a administração concomitante de tamoxífeno e fármacos inibidores desta enzima deve ser cuidadosamente monitorada (BORGES et al., 2006). Outro exemplo interessante a respeito do impacto do polimorfismo do CYP450 sobre o tratamento do câncer é o paclitaxel, um fármaco extensamente metabolizado através das 6α- e 3´-p-hidroxilações catalisadas pela CYP2C8 e CYP3A4, respectivamente. Α formação do metabólito 6α-hidroxipaclitaxel aproximadamente 30 vezes menos tóxico do que o composto de origem, a diferença na eficácia e segurança do tratamento com tal fármaco tem sido atribuído ao polimorfismo da CYP2C8 (NAKAJIMA et al., 2005; INGELMAN-SUNDBERG; OSCARSON; MCLELLAN, 1999).

5.3.3 Emprego do inibidor seletivo da epóxido hidrolase

Uma vez que não está claro quais são as enzimas envolvidas na produção de M4, uma segunda teoria foi verificada. Uma plausível explicação é que a produção de M4 não é dependente da ação da família de enzimas do CYP450, mas sim da enzima epóxido hidrolase, encontrada no fígado de mamíferos. Esta enzima, considerada basicamente uma enzima de detoxificação, hidrolisa óxidos

de areno altamente reativos, gerados através das reações de oxidação do CYP450, em metabólitos trans-diidrodiol inativos e insolúveis (FRETLAND; OMIECINSKI, 2000; BUXTON, 2011).

A enzima epóxido hidrolase microssomal faz parte da família de enzimas hidrolíticas, quem inclui esterases, proteases, lipases e desalogenases, apresentando um papel crucial na biotransformação de diversos fármacos dentro do organismo (VÁCLAVÍKOVÁ; HUGHES; SOUČEK, 2015). Alguns epóxidos reativos são responsáveis por reações eletrofílicas sobre alvos biológicos tais como DNA e proteínas provocando mutagenicidade, toxicidade e efeitos carcinógenos. Com isso, as enzimas epóxido hidrolases constituem uma rota favorável à detoxificação (MORISSEAU; HAMMOCK, 2005). A fim de avaliar a participação dessa enzima na catálise de M4 a partir de M2 um inibidor seletivo da epóxido hidrolase, ácido valproico, foi empregado em uma concentração correspondente ao seu Ki (SPIEGELSTEIN et al., 2000; LIN et al., 2014) (Figura 80).

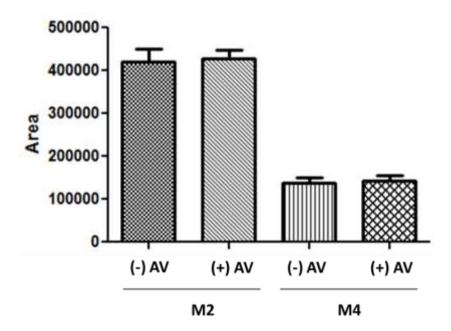


Figura 80- Formação de M2 e M4 após incubação da PPT com HLM na presença (+) e ausência (-) de ácido valproico (AV) (inibidor da epóxido hidrolase). Os dados estão expressos considerando o desvio padrão da média, nenhuma diferença estatística entre os grupos foi verificada empregando-se o teste ANOVA, *p < 0,05.

Através do estudo pode-se confirmar a não correlação da epóxido hidrolase na catálise avaliada. Esta informação sugere que a formação de M4

ocorre a partir de enzimas do CYP450 ou ainda através de hidrólise nãoenzimática. No entanto, um estudo mais detalhado empregando apenas M2 deve ser realizado a fim de avaliar a rota para a formação de M4.

Resumindo, é possível afirmar que a CYP1A2 é a principal enzima envolvida na produção de M1, a CYP3A4 participa da formação de M2 e M3 e diversas isoformas podem estar envolvidas na formação de M4 (Figura 81).

Figura 81- Enzimas da família CYP450 hepáticas envolvidas no metabolismo da PPT. Fonte: MOREIRA et al. 2016b.

5.4 CONCLUSÕES

O estudo da formação dos metabólitos com o tempo demonstrou que o metabólito M4 é formado tardiamente (após 40 min de reação) e provavelmente é um metabólito secundário produzido a partir de M2 através de uma reação trans-diidrodiol.

O estudo de fenotipagem demonstrou que as principais isoformas que contribuem para o metabolismo da PPT são a CYP1A2 (formação de M1) e a

CYP3A4 (formação de M2 e M3). O emprego das isoformas recombinantes demonstrou um potencial de diversas isoformas sobre a reação que leva a formação de M4, as isoformas são CYP2C19, CYP2C8, CYP2D6, CYP2B6 e CYP2E1. Com um tempo maior de incubação verifica a participação de isoformas minoritárias no metabolismo da PPT na formação dos demais metabólitos. Além disso, conclui-se que a enzima epóxido hidrolase não catalisa a reação transdiidrodiol, tal como ocorre com diversos fármacos. A produção de metabólitos primários e secundários e a catálise por diversas enzimas do CYP450 caracteriza um metabolismo complexo da PPT. A presença de múltiplas vias de eliminação constitui uma vantagem para um candidato a fármaco, uma vez que durante o bloqueio de uma via majoritária de metabolismo, outras vias minoritárias podem ser utilizadas para a catálise.

CONCLUSÕES FINAIS

Conclusões Finais

Inicialmente, a determinação do perfil cinético demonstrou um comportamento sigmoidal, indicando que a PPT é metabolizada por isoformas do CYP450 que apresentam múltiplos sítios ativos e/ou metabolizada por diversas enzimas concomitantemente. A caracterização dos parâmetros cinético enzimáticos S₅₀ e V_{max} permitiram o cálculo do CL_{int}, além disso, o S₅₀ calculado foi aplicado em estudos posteriores. O CL_{int} foi empregado em equações específicas para predição de parâmetros farmacocinéticos, indicando que a PPT sofre uma eliminação essencialmente hepática por ação das enzimas do CYP450, além de não sofrer um metabolismo de primeira passagem extenso pelo fígado. Adicionalmente, a baixa taxa de extração hepática aliada à baixa fração não ligada às proteínas plasmáticas indicam que o clearance hepático é influenciado por mudanças na fração ligada às proteínas plasmáticas e por fatores que alteram a atividade das isoformas do CYP450 envolvidos no metabolismo da PPT.

O estudo de inibição in vitro da PPT sobre as principais isoformas do CYP450 envolvidos no metabolismo de PNs (CYP3A, CYP1A2, CYP2D6 e CYP2C9) demonstrou uma inibição dose- tempo- e NADPH-dependente sobre a CYP1A2. Esta inibição é classificada como uma inibição baseada no mecanismo e ocorre de forma irreversível, necessitando da síntese de novas enzimas para reestabelecer a atividade. A implicação clínica da inibição sobre a CYP1A2 reside no fato de que esta é uma isoforma importante no metabolismo de fármacos, tais como antidepressivos e antipsicóticos, sendo responsável por aproximadamente 9% do total das reações do CYP450. A administração concomitante da PPT com tais fármacos resultará em um aumento das concentrações plasmáticas destes últimos, podendo gerar toxicidade.

A identificação de metabólitos é essencial mesmo nas etapas iniciais de desenvolvimento de um fármaco, uma vez que eles estão diretamente relacionados com a toxicidade e eficácia do fármaco. O estudo dos metabólitos produzidos a partir da reação de metabolismo in vitro demonstrou a presença de 4 metabólitos majoritários, denominados M1, M2, M3 e M4. M2 corresponde a

um metabólito epóxido eletrofílico, capaz de ligar-se irreversivelmente a estruturas celulares nucleofílicas. Esta ligação covalente pode ocorrer não apenas sobre às isoformas do CYP450, tal como a inibição irreversível demonstrada sobre a CYP1A2, mas também sobre outras estruturas celulares, causando reações adversas graves como a hepatotoxicidade. Diante disso, recomenda-se a realização de estudos futuros a respeito da possível toxicidade gerada por M2.

Finalmente, o estudo de fenotipagem enzimática forneceu a via de eliminação da PPT indicando que a CYP1A2 e a CYP3A4 são as principais envolvidas. Este resultado corrobora com o perfil cinético sigmoidal visualizado, uma vez que a CYP1A2 e a CYP3A4 são isoformas que possuem múltiplos sítios ativos. A determinação da principal via de eliminação tem implicações clínicas diretas sobre questões como a polifarmácia, uma vez que ao conhecer a rota de eliminação do fármaco do organismo é possível realizar uma prescrição mais racional, evitando interações medicamentosas indesejáveis. A segunda implicação clínica consiste em questões relacionadas aos polimorfismos genéticos do CYP450. Sabe-se que uma fração da população pode apresentar uma expressão alterada (expressão aumentada ou diminuída) de algumas isoformas do CYP450, isto terá consequências clínicas diretas sobre a eficácia e toxicidade.

A caracterização detalhada do perfil metabólico da PPT frente às enzimas do CYP450 foi realizada pela primeira vez empregando estudos de metabolismo in vitro. Os dados produzidos com este trabalho ajudam a elucidar questões relacionadas à toxicidade e eficácia deste candidato a fármaco e, possivelmente, servirá de guia para estudos clínicos futuros.

RIEIFIERÉNCIAS

REFERÊNCIAS

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**, New York, v. 774, p. 215–222, 2002.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO RDC N.º 27, DE 17 DE MAIO DE 2012 Métodos Bioanalíticos**. 2012. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded 4db/RDC+27+12+-

Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?M OD=AJPERES >. Acesso em: 16 Ago. 2015.

ASFAK, V. et al. Simultaneous Determination of Diclofenac Sodium and Rabeprazole Sodium in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form by LC. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 66, p. 941- 943, 2007.

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

AUSTIN, R. P. et al. The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physicochemical properties. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 33, n. 3, p. 419-425, 2005.

BAJPAI, M.; ESMAY, J. D. In vitro studies in drug discovery and development: an analysis of study objectives and application of good laboratory practices (GLP). **Drug Metabolism Reviews,** New York, v. 34, n. 4, p. 679-89, 2002.

BALLARD, P.; ROWLAND, M. Correction for Nonspecific Binding to Various Components of Ultrafiltration Apparatus and Impact on Estimating In Vivo Rat Clearance for a Congeneric Series of 5-Ethyl, 5-n-Alkyl Barbituric Acids. **Drug Metabolism and Disposition,** Bethesda, v. 39, n. 12, p. 2165-2168, 2011.

BARTH, T. et al. In vitro metabolism of the lignan (-)-grandisin, an anticancer drug candidate, by human liver microsomes. **Drug Testing and Analysis**, New York, v. 7, n. 9, p. 780–786, 2015.

BEZERRA, D. P. et al. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). **Eur Journal of Pharmaceutical Sciences,** Washington, v. 48, n. 3, p. 453-463, 2013.

BHARADWAJ, U. et al. Drug-repositioning screening identified piperlongumine as a direct STAT3 inhibitor with potent activity against breast cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 34, n. 11, p. 1341-1353, 2015.

BHARDWAJ, C.; HANLEY, L. Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species. **Natural Product Reports,** London, v. 31, n. 6, p. 756-767, 2014.

BJORNSSON, T. D. et al. the conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a pharmaceutical research and manufacturers of america (PhRMA) perspective. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 31, p. 815–832, 2003

BLANCHARD, N. et al. Qualitative and Quantitative Assessment of Drug-Drug Interaction Potential in Man, Based on Ki, IC50 and Inhibitor Concentration. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 5, p. 147-156, 2004.

BODIWALA, H. S., et al. Antileishmanial amides and lignans from Piper cubeba nd Piper retrofractum. **Journal of Natural Medicine**, New York, v. 61 p. 418–421, 2007.

BOGAARDS, J. J. et al. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. **Xenobiotica**, London, v. 30, n. 12, p. 1131-1152, 2000

BOLL, P. M. et al. Synthesis and molecular structure of piplartine (=piperlongumine). **Tetrahedron**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 171-175, 1984.

BONFILIO, R. et al. Analytical Validation of Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis: A Practical Approach. **Critical Reviews in Analytical Chemistry,** New York, v. 42, n. 1, p. 87-100, 2012.

BORGES, S. et al. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 80, n. 1, p. 61-74, 2006.

BRANTLEY, S. J. et al. Herb-drug interactions: challenges and opportunities for improved predictions. **Drug Metabolism and Disposition,** Bethesda, v. 42, n. 3, p. 301-317, 2014.

- BUSBY, W. F.; ACKERMANN, J. M.; CRESPI, C. L. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. **Drug Metabolism and Disposition,** Bethesda, v. 27, n. 2, p. 246-249, 1999.
- BUXTON, I. L. O.; BENET, L. Z. Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: BRUNTON, L. C., B.; KNOLLMAN, B. (Ed.). **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.** 12^a ed. New York: McGraw-Hill Professional, 2011. cap. 1, p.17-40.
- CALDWELL, G. W.; YAN, Z. Rapidly Distinguishing Reversible and Time-Dependent CYP450 Inhibition Using Human Liver Microsomes, Co-incubation, and Continuous Fluorometric Kinetic Analyses. In: CALDWELL, G. W. e YAN, Z. (Ed.). **Optimization in Drug Discovery: In vitro Methods**. New York: Humana Press, 2014. cap. 17, p.281-303.
- CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova,** São Paulo, v. 32, p. 1021- 1030, 2009.
- CHACKO, S. A. et al. Hybrid Mass Analyzers in Drug Metabolism Applications. In: LYUBIMOV., A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. New York: John Wiley & Sons, 2012. cap. 7, p.1-29.
- CHANG, S. Y. et al. Liver and Kidney on Chips: Microphysiological Models to Understand Transporter Function. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, New york, v. 100, n. 5, p. 464-478, 2016.
- CHAPRON, B. et al. Reversible, Time-Dependent Inhibition of CYP3A-Mediated Metabolism of Midazolam and Tacrolimus by Telaprevir in Human Liver Microsomes. **Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, Edmonton, v. 18, n. 1, p. 101 111, 2015.
- CHAURET, N; GAUTHIER, A.; NICOLL-GRIFFITH, D. A. Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome p450-Mediated metabolic activities in human liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 26, n. 1, 1998.
- CHIBA, M.; ISHII, Y.; SUGIYAMA, Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, Arlington, v. 11, n. 2, p. 262-276, 2009.

- CLARKE, S. E.; JONES, B. C. Human Cytochromes P450and Their Role in Metabolism-Based Drug-Drug Interactions. In: RODRIGUES, A. D. (Ed.). **Drug-drug interactions**. 2^a ed. New York: Informa Healthcare USA, 2008. cap. 3, p.53-86.
- COE, K. J.; KOUDRIAKOVA, T. Metabolic Stability Assessed by Liver Microsomes and Hepatocytes. In: CALDWELL, G. W. e YAN, Z. (Ed.). Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods, Methods in Pharmacology and Toxicology. 2^a ed. New York: Springer, 2014. cap. 6, p.87-100.
- COLLEMAN, M. D. **Human Drug Metabolism: An Introduction**. 2^a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 360 p.
- CORSINI, A.; BORTOLINI, M. Drug-induced liver injury: the role of drug metabolism and transport. **Journal of Clinical Pharmacology,** London, v. 53, n. 5, p. 463-474, 2013.
- COSTA, A.; SARMENTO, B.; SEABRA, V. An evaluation of the latest in vitro tools for drug metabolism studies. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology,** London, v. 10, n. 1, p. 103-119, 2014.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products,** Cincinnati, v. 77, n. 3, p. 703-723, 2014.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- DINGER, J.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Development of an in vitro cytochrome P450 cocktail inhibition assay for assessing the inhibition risk of drugs of abuse. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 1, p. 28-35, 2014.
- DUH, C. Y.; WU, Y. C.; WANG, S. K. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of Piper aborescens. **Journal of Natural Products,** Cincinnati, v. 53, n. 6, p. 1575-1577, 1990.
- ESCH, E. W.; BAHINSKI, A; HUH, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. **Nature**, London, v. 14, p. 248-260, 2015.

EVERS, R. et al. Critical review of preclinical approaches to investigate cytochrome p450-mediated therapeutic protein drug-drug interactions and recommendations for best practices: a white paper. **Drug Metabolism and Disposition,** Bethesda, v. 41, n. 9, p. 1598-1609, 2013.

EXARCHOU, V. et al. LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. **Magnetic Resonance in Chemistry,** London, v. 43, n. 9, p. 681-687, 2005.

FANG, Z.-Z. et al. Identification of cytochrome P450 (CYP) isoforms involved in the metabolism of corynoline, and assessment of its herb–drug interactions. **Phytotherapy Research**, London, v. 25, 256–263, 2011.

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.

FDA, Food and Drug Administration. **Safety Testing of Drug Metabolites: Guidance for Industry.** 2016. Disponível em: https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm079266.pdf>. Acesso em: 23 Fev. 2017.

_____. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 2013.

Disponível em: <
http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/
guidances/ucm368107.pdf >. Acesso em: 16 Ago. 2015.

_____. Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. 2012. Disponível em: < http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf >. Acesso em: 11 Ago. 2015.

FELIPE, C. B. et al. Piplartine, an amide alkaloid from Piper tuberculatum, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 14, n. 9, p. 605-612, 2007.

FENG, S.; HE, X. Mechanism-based Inhibition of CYP450: An Indicator of Druginduced Hepatotoxicity. **Current Drug Metabolism,** Hilversum, v. 14, n. 9, p. 921-945, 2013.

FENG, R. et al. In vitro identification of cytochrome P450 isoforms responsible for the metabolism of 1-hydroxyl-2,3,5-trimethoxy-xanthone purified from Halenia elliptica D. Don. **Chemico-Biological Interactions,** Amsterdam, v. 210, p. 12–19, 2014.

FOFARIA, N. M. et al. Nanoemulsion formulations for anti-cancer agent piplartine-Characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 498, n. 1-2, p. 12-22, 2016.

FRETLAND, A. J.; OMIECINSKI, C. J. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 129, n. 1-2, p. 41-59, 2000.

GAO, N. et al. Inhibition of baicalin on metabolism of phenacetin, a probe of cyp1a2, in human liver microsomes and in rats. **PLos One**, San Francisco, v. 26, n. 2, p. 1-8, 2014.

GENOVESE, S. et al. In vitro effects of natural prenyloxycinnamic acids on human cytochrome P450 isozyme activity and expression. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 18, n. 7, p. 586-591, 2011.

GENTEST. Manual Tf000017 Rev 1.0 Mammalian Liver Microsomes Guidelines For Use Catalog 2013.

GILBERT, H. F. Enzyme Kinetics. In: GILBERT, H. F. (Ed.). **Basic concepts in biochemistry: a student's survival guide.** 2ª ed. New York: McGrall Hill, 2000. p. 95-122.

GOEY, A. K. et al. Relevance of in vitro and clinical data for predicting CYP3A4-mediated herb-drug interactions in cancer patients. **Cancer treatment reviews**, New York, v. 39, n. 7, p. 773-783, 2013.

GÓMEZ-GÓNZALEZ, B. et al. Neuronal-Glial-Endotelial Interactions Regulate Central Nervous System Homeostasis. In: HERRERA, E. M.;PHILLIPS-FARFÁN, B. V., et al (Ed.). Endothelial Cell Plasticity in the Normal and Injured Central Nervous System. Boca Raton: CRC press, 2015. cap. 3, p. 36-75.

GUENGERICH, F. P. Mechanisms of Cytochrome P450-Mediated Reactions. In: LYUBIMOV, A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. New York: John Wiley & Sons, v.1, 2012. cap. 7.

HABENSCHUS, M. D. Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural (-)-grandisina utilizando microssomas hepáticos de humanos. 2016. 127 p. (Mestrado). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

HAN, S. S. et al. Piperlongumine inhibits proliferation and survival of Burkitt lymphoma in vitro. **Leukemia Research**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 146-154, 2013.

HAO, H. et al. Microsomal cytochrome p450-mediated metabolism of protopanaxatriol ginsenosides: metabolite profile, reaction phenotyping, and structure-metabolism relationship. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 38, p. 1731–1739, 2010.

HEDAYA, M. A. Physiological Approach to Hepatic Clearance. In: HEDAYA, M. A. (Ed.). **Basic Pharmacokinetics**. 2^a ed. New York: CRC Press, 2012. p.237-252.

HOUSTON, B. J. 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, S.-M.; LESKO, L. J.; TEMPLE, R. An Integrated Approach to Assessing Drug-Drug Interactions: A Regulatory Perspective. In: RODRIGUES, A. D. (Ed.). **Drug-drug interactions**. 2^a ed. New York: Informa healthcare, 2014. cap. 16, p.665-686.

INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M.; MCLELLAN, R. A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends in pharmacological sciences**, Amsterdam, v. 20, n. 8, p. 342-349, 1999.

INTEGRITY, T. R. **Piperlongumine Patents**. 2015. Disponível em: < https://integrity.thomson-

pharma.com/integrity/xmlxsl/pk_qcksrch.show_records?sessionID=1&history=& query=piperlongumine&abbreviation=PAT&language=en >. Acesso em: 07 Ago. 2015.

IUPUI, Indiana University. **Flockhart Table: P450 drug interactions**. 2016. Disponível em: < http://medicine.iupui.edu/CLINPHARM/ddis/clinical-table>. Acesso em: 18 Set. 2016.

JONES, H. M.; HOUSTON, J. B. Substrate depletion approach for determining in vitro metabolic clearance: time dependencies in hepatocyte and microsomal incubations. **Drug Metabolism and Disposition,** Bethesda, v. 32, n. 9, p. 973-982, 2004.

KALGUTKAR, A. S.; DALVIE, D. Predicting toxicities of reactive metabolite-positive drug candidates. **Annual review of pharmacology and toxicology**, Palo Alto, v. 55, p. 35-54, 2015.

KAMEL, A.; HARRIMAN, S. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI). **Drug Discovery Today Technology,** Oxford, v. 10, n. 1, p. e177-189, 2013.

KHOJASTEH, S. C. et al. Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics,** Paris, v. 36, n. 1, p. 1-16, 2011

KIM, S. J. et al. Selective inhibitory effects of machilin A isolated from Machilus thunbergii on human cytochrome P450 1A and 2B6. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 22, n. 6, p. 615-620, 2015.

KITZ, R.; WILSON, I. B. Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase. **Journal Of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 237, n. 10, p. 3245-3249, 1962.

KOHN, W.; BECKE, A.; PARR, R. Density Functional Theory of Electronic Structure. Journal of Physical Chemistry, Washington, v. 100, n. 31, p 12974–12980, 1996

KRAMER, M. A.; TRACY, T. S. Enzyme Kinetics of Drug-Metabolizing Reactions and Drug-Drug Interactions. In: LYUBIMOV., A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. New York: Wiley, v.1, 2012. cap. 3.

KREMERS, P. In vitro tests for predicting drug-drug interactions: the need for validated procedures. **Pharmacology and Toxicology,** Copenhagen, v. 91, n. 5, p. 209-217, 2002.

KUMAR, G. N.; SURAPANENI, S. Role of Drug Metabolism in Drug Discovery and Development. **Medicinal Research Reviews**, New york, v. 21, n. 5, p. 397-411, 2001.

- LAM, W. W. et al. Metabolite Identification in Drug Discovery. In: CALDWELL, G. W. e YAN, Z. (Ed.). **Optimization in Drug Discovery In Vitro Methods**. 2^a ed. New York: Human Press, 2014. cap. 26, p.445-460.
- LAMMERT, C. et al. Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events. **Hepatology**, Baltimore, v. 51, n. 2, p. 615-620, 2010.
- LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas. **Scientia Chromatographica**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 27-46, 2013.
- LEE, H-A. et al. Heme Oxygenase-1 Determines the Differential Response of Breast Cancer and Normal Cells to Piperlongumine. **Mol. Cells**, Seoul, v. 38, n. 4, p. 327-335, 2015.
- LEE, M. et al. High-throughput Screening of Inhibitory Effects of Bo-yang-hwano-tang on Human Cytochrome P450 Isoforms in vitro Using UPLC/MS/MS. **Analytical Sciences,** Tokyo, v. 28, n. 12, p. 1197-1201, 2012.
- LEES, J.; CHAN, A. Polypharmacy in elderly patients with cancer: clinical implications and management. **Lancet Oncology**, London, v. 12, n. 13, p. 1249-1257, 2011.
- LIN, L. et al. Metabolism and pharmacokinetics of allitinib in cancer patients: the roles of cytochrome P450s and epoxide hydrolase in its biotransformation. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 42, n. 5, p. 872-884, 2014.
- LINDSTROM, A. O. C.; LYNCH, M.; BLUMENTHAL, M. Herb supplement sales increase 5.5% in 2012: herbal supplement sales rise for 9th consecutive year; turmeric sales jump 40% in natural channel. **HerbalGram**, Austin, v. 99, 2013.
- LIPSCOMB, J. C.; POET, T. S. In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 118, n. 1, p. 82-103, 2008.
- LIU, Z. C., UETRECHT, J. P. Clozapine is oxidized by activated human neutrophils to a reactive nitrenium ion that irreversibly binds to the cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore v. 275, p. v1476–1483, 1995.

LU, W. J. et al. Methadone: A Substrate and Mechanism-Based Inhibitor of CYP19 (Aromatase). **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 38, p. 1308–1313, 2010

MA, Q.; LU, A. Y. H. CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 35, p. 1009-1016, 2007.

MAKOID, M. C.; VUCHETICH, P. J.; BANAKAR, U. V. Clearance. In: MAKOID, M. C.; VUCHETICH, P. J., et al (Ed.). **Basic Pharmacokinetics**. 1^a ed. Indianapolis: Virtual University Pres, 1996. cap. 9, p.1-71.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 214-222, 2009.

MARQUES, L. M. M. et al. In vitro metabolism of the alkaloid piplartine by rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** Oxford, v. 95, p. 113-120, 2014.

MARQUES, L. M. M. Estudo de metabolismo in vitro do alcaloide piplartina empregando microssomas hepático de ratos. 2013. 97 p. (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M. M.; DE 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.

MATHIJSSEN, R. H. J. Effects of St. John's Wort on Irinotecan Metabolism. **Journal of the national cancer institute**, Cary, v. 94, n. 16, p. 1247-1249, 2002

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

MOHUTSKY, M.; HALL, S. D. Irreversible Enzyme Inhibition Kinetics and Drug–Drug Interactions. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. (Ed.). **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism: Fundamentals and Applications**. New York: Humana Press, 2014. cap. 5, p.57-92.

MORAES, J. et al. Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. **Experimental Parasitology**, New York, v. 127, n. 2, p. 357-364, 2011.

MORAES, J. et al. In Vitro Synergistic Interaction Between Amide Piplartine and Antimicrobial Peptide Dermaseptin Against Schistosoma mansoni Schistosomula and Adult Worms. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 20, p. 301-309, 2013.

MOREIRA, F. L. et al. In vitro metabolism studies of natural products are crucial in the early development of medicines . **Phytochemistry Reviews**. New York. 2016a DOI: 10.1007/s11101-016-9482-0.

MOREIRA, F. L. et al. Metabolic profile and safety of piperlongumine. **Scientific Reports**, London, v. 6, 2016b.

MOREIRA, F. L. et al. A non-michaelian behavior of the in vitro metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyrins by employing rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 84, p. 14-19, 2013.

MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Epoxide hydrolases: mechanisms, inhibitor designs, and biological roles. **Annual review of pharmacology and toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 311-333, 2005.

NAKAJIMA, M. et al. Pharmacokinetics of Paclitaxel in Ovarian Cancer Patients and Genetic Polymorphisms of CYP2C8, CYP3A4, and MDR1. **Journal of Clinical Pharmacology**, London, v. 45, p. 674–682, 2005.

NARITOMI, Y. et al. Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 29, p. 1316–1324, 2001.

NAVICKIENE, H. M. D. et al. Antifungal amides from Piper hispidum and Piper tuberculatum. **Phytochemistry**, New York, v. 55, p. 621-626, 2000.

NETTLETON, D. O.; EINOLF, H. J. Assessment of cytochrome p450 enzyme inhibition and inactivation in drug discovery and development. **Current topics in medicinal chemistry,** Hilversum, v. 11, n. 4, p. 382-403, 2011.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products,** Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NIESSEN, W. M. A. LC-MS IN DRUG METABOLISM STUDIES. In: NIESSEN, W. M. A. (Ed.). **Liquid Chromatography–Mass Spectrometry**. 3^a ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. cap. 10, p.257-287.
- NJUGUNA, N. M.; MASIMIREMBWA, C.; CHIBALE, K. Identification and characterization of reactive metabolites in natural products-driven drug discovery. **Journal of Natural Products,** Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 507-513, 2012.
- OBACH, R. S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. **Drug Metabolism and Disposition,** Bethesda, v. 27, n. 11, p. 1350-1359,1999.
- OBACH, R. S.; REED-HAGEN, A. E. Measurement of Michaelis constants for cytochrome P450-mediated biotransformation reactions using a substrate depletion approach. **Drug Metabolism and Disposition,** Bethesda, v. 30, n. 7, p. 831-837, 2002.
- OGILVIE, B. W. et al. In Vitro Approaches for Studying the Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes and Identifying the Drug-Metabolizing Enzymes Responsible for the Metabolism of Drugs (Reaction Phenotyping) with Emphasis on Cytochrome P450. In: RODRIGUES, A. D. (Ed.). **Drug-drug interactions**. New York: Informa Healthcare USA, 2014. cap. 7, p.231-358.
- OKUBO, M. et al. The CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. **Journal of Toxicological Sciences,** Sapporo, v. 38, n. 3, p. 349-354, 2013.
- ORR, S. T. et al. Mechanism-based inactivation (MBI) of cytochrome P450 enzymes: structure-activity relationships and discovery strategies to mitigate drug-drug interaction risks. **Journal of Medicinal Chemistry,** Washington, v. 55, n. 11, p. 4896-933, 2012.
- ORTIZ DE MONTELLANO, P. R.; NELSON, S. D. Rearrangement reactions catalyzed by cytochrome P450s. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 507, n. 1, p. 95-110, 2011.

PARMENTIER, Y. et al. Direct and quantitative evaluation of the human CYP3A4 contribution (fm) to drug clearance using the in vitro SILENSOMES model. **Xenobiotica**, London, 2016. DOI: 10.1080/00498254.2016.1208854.

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova,** São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

PATKI, K. C.; VON MOLTKE, L. L.; GREEBLATT, D. J. In vitro Metabolism of Midazolam, Triazolam, Nifedipine, and Testosterone by Human Liver Microsomes and Recombinant Cytochromes P450: Role of CYP23A4 and CYP3A5. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 31, n. 7, p. 938- 944, 2003.

PERSHING, L. K.; FRANKLIN, M. R. Cytochrome P-450 metabolic-intermediate complex formation and induction by macrolide antibiotics; a new class of agents. **Xenobiotica,** London, v. 12, n. 11, p. 687-699, 1982.

POPA, M. A. et al. Potential drug interactions and chemotoxicity in older patients with cancer receiving chemotherapy. **Journal of Geriatry Oncology**, New York, v. 5, n. 3, p. 307-314, 2014

POULIN, P. et al. In vitro-in vivo extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** Washington, v. 101, n. 2, p. 838-851, 2012.

RAJ, L. et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, London, v. 475, n. 7355, p. 231-234, 2011.

RENAULT, H. et al. Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges. **Current Opinion in Plant Biology,** London, v. 19, p. 27-34, 2014.

RENDIC, S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 34, p. 83–448, 2002.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova,** São Paulo, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RILEY, R. J.; MCGINNITY, D. F.; AUSTIN, R. P. A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 33, n. 9, p. 1304-1311, 2005.

RODRIGUES, A. D. Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 465-480, 1999.

RUSSMANN, S.; KULLAK-UBLICK, G. A.; GRATTAGLIANO, I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 16, n. 23, p. 3041-3053, 2009.

SARTORI, L. R. et al. A systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 28, n. 7, p. 723-730, 2014.

SAXENA, A. et al. In vitro metabolism of a novel antithrombotic compound, S002-333, and its enantiomers: quantitative cytochrome P450 phenotyping, metabolic profiling and enzyme kinetic studies. **Xebobiotica**, London, v. 44, n. 4, p. 295-308, 2014.

SCHAAB, E. H. et al. Biomimetic oxidation of piperine and piplartine catalyzed by iron(III) and manganese(III) porphyrins. **Biological and pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 33, n. 5, p. 912-916, 2010.

SCHROER, K.; KITTELMANN, M.; LUTZ, S. Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis. **Biotechnology and bioengineering**, New York, v. 106, n. 5, p. 699-706, 2010.

SEGEL, I. H. Enzymes Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. New York: John Wiley & Sons, 1975.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Fundamentals of Enzyme Kinetics In: NAGAR, S., ARGIKAR, U., TWEEDIE, D. (Ed.). **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism**. New York: Springer, 2014. p.9-22.

SENSENHAUSER, C. In Vitro CYP/FMO Reaction Phenotyping. In: CALDWELL, G. W. e YAN, Z. (Ed.). **Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods**. 2^a ed. New York: Humana Press, 2014. cap. 9, p.137-170.

SHRIVASTAVA, S. et al. Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3 K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells. **Apoptosis**, London, v. 19, n. 7, p. 1148-1164, 2014.

SILVA, J. M.; NICOLL-GRIFFITH, D. A. In Vitro Models for Studying Induction of Cytochrome P450 Enzymes. In: RODRIGUES, A. D. (Ed.). **Drug-drug interactions**. New York: Informa Healthcare USA, 2014. cap. 6, p.205-230.

SILVA-JÚNIOR, E. A. **Estudos de metabolismo in vitro de produtos naturais: biotransformação microbiana da piplartina**. 2013. 141 p. (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. (Ed.) Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7ª ed. São Pauo: LTC, 2006. 508 p.

SINZ, M. A. In Vitro and In Vivo Models of Drug Metabolism. In: LYUBIMOV, A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. 1^a ed. New York: John Wiley & Sons, 2012. p.1-31.

SONG, M. et al. In vitro inhibitory effect of piperlonguminine isolated from Piper longum on human cytochrome P450 1A2. **Archives of pharmacal research**, Seoul, v. 37, n. 8, p. 1063-1068, 2014.

SPIEGELSTEIN, O. et al. Structure activity relationship of human microsomal epoxide hydrolase inhibition by amide and acid analogues of valproic acid. **Pharmaceutical research**, New York, v. 17, n. 2, p. 216-221, 2000.

SUBRAMANIAN, M.; TRACY, T. Methods for Determination of Enzyme Kinetics and Metabolic Rates. In: LYUBIMOV, A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. 1^a ed. New York: John Wiley & Sons, 2012. cap. 9, p.1-22.

SUN, S.; LIU, G.; WANG, Y. Simultaneous determination of acetaminophen, caffeine and chlorphenamine maleate in paracetamol and chlorphenamine maleate granules. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 64, p. 719-724, 2006.

- SWIFT, B.; PFEIFER, N. D.; BROUWER, K. L. Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. **Drug Metabolism Reviews,** New York, v. 42, n. 3, p. 446-471, 2010.
- TANG, W.; ZHANG, Z. Bioactivation and reactive metabolite assays. In: LYUBIMOV, A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. 1a ed. New York: John Wiley & Sons, 2012. cap. 22, p.1-30.
- TASSANEEYAKUL, W. et al. Specificity of Substrate and Inhibitor Probes for Human Cytochromes P450 1Al and 1A2. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** Baltimore, v. 265, n. 1, p. 401-407, 1993.
- TESTINO, S. A.; PATONAY, G. High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography—tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 30, n. 1. p. 1459-1467, 2003.
- TOLONEN, A.; PELKONEN, O. Analytical challenges for conducting rapid metabolism characterization for QIVIVE. **Toxicology**, Amsterdam, v. 332, p. 20–29, 2015.
- TORRES, E.; ABURTO, J. Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 4,6-dimethyldibenzothiophene as dimer complexes: Evidence for kinetic cooperativity. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** New York, v. 437, n. 2, p. 224-232, 2005.
- TOZER, T. N.; ROWLAND, M. Input-Exposure Relationships. In: TOZER, T. N. e ROWLAND, M. (Ed.). Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The quantitative basis of drug therapy. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p.15-26.
- TUCKER, G. T.; HOUSTON, J. B.; HUANG, S. M. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential towards a consensus. **British Journal of Clinical Pharmacology,** London, v. 52, n. 1, p. 107-117, 2001.
- USTA, O. B. et al. Microengineered cell and tissue systems for drug screening and toxicology applications: Evolution of in-vitro liver technologies, **Technology**, London, v. 3, n. 1, 2015.

VÁCLAVÍKOVÁ, R.; HUGHES, D. J.; SOUČEK, P. Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene, structure, function, and role in human disease. **Gene**, Amsterdam, v. 571, n. 1, p. 1-8, 2015.

VENKATAKRISHNAN, K.; OBACH, L. L. V. M. R. S.; GREENBLATT, D. J. Microsomal Binding of Amitriptyline: Effect on Estimation of Enzyme Kinetic Parameters In Vitro. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** Baltimore, v. 293, n. 2, p. 343-350, 2000.

VESSECCHI, R. et al. Fragmentation studies and electrospray ionization mass spectrometry of lapachol: protonated, deprotonated and cationized species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 24, n. 14, p. 2101-2108, 2010.

VESSECCHI, R. et al. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 840-853, 2008.

XU, C. et al. Effects of the CYP2B6*6 allele on catalytic properties and inhibition of CYP2B6 in vitro: implication for the mechanism of reduced efavirenz metabolism and other CYP2B6 substrates in vivo. **Drug Metabolism and Disposition,** Bethesda, v. 40, n. 4, p. 717-725, 2012.

WALSKY, R. L.; OBACH, R. S. Validated assays for human cytochrome P450 activities. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 6, p. 647-660, 2004.

WILK-ZASADNA, I. et al. Biotransformation in vitro: An essential consideration in the quantitative in vitro-to-in vivo extrapolation (QIVIVE) of toxicity data. **Toxicology,** Amsterdam, v. 332, p. 8-19, 2015.

WALSKY, R. L.; OBACH, R. S. Validated assays for human cytochrome P450 activities. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 32, n. 6, p. 647-660, 2004.

WANG, Y. H.; JONES, D. R.; HALL, S. D. Differential mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 by verapamil. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 33, n. 5, p. 664-671, 2005.

WATERS, N. J.; OBACH, R. S.; DI, L. Consideration of the Unbound Drug Concentration in Enzyme Kinetics. In: SWATI, N.;UPENDRA, A., et al (Ed.). **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism**. Berlin: Springer, 2014. p.119-145.

- WU, B. Substrate inhibition kinetics in drug metabolism reactions. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 43, n. 4, p. 440-456, 2011.
- WUSTROW, I. et al. In vitro identification of the cytochrome P450 isozymes involved in the N-demethylation of the active opioid metabolite nortilidine to bisnortilidine. Naunyn Schmiedebergs archives of pharmacology, Berlin, v. 385, p. 633–639, 2012.
- YANG, K. et al. Sandwich-Cultured Hepatocytes as a Tool to Study Drug Disposition and Drug-Induced Liver Injury. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 105, n. 2, p. 443-459, 2016.
- YAO, M. et al. Development and full validation of six inhibition assays for five major cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes using an automated 96-well microplate incubation format and LC–MS/MS analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, 44:211-223
- ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology and Therapeutics,** Oxford, v. 138, n. 1, p. 103-41, 2013.
- ZHAO, K. et al. In-vitro metabolism of glycyrrhetinic acid by human and rat liver microsomes and its interactions with six CYP substrates. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 64, p. 1445–1451, 2012.
- ZHOU, S. F. et al. Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, New York, v. 29, n. 6, p. 687-710, 2007.
- ZHOU, H. et al. CYP450 1A2 and multiple UGT1A isoforms are responsible for jatrorrhizine metabolism in human liver microsomes. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, Chichester v. 34, p. 176-185, 2013.
- ZIENTEK, M. A.; YOUDIM, K. Reaction Phenotyping: Advances in the Experimental Strategies Used to Characterize the Contribution of Drug-Metabolizing Enzymes. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 43, n. 1, p. 163-181, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE 1- Espectro de Massas obtido através de CG-EM do composto monohidroxilado, t_R 42,04 min.

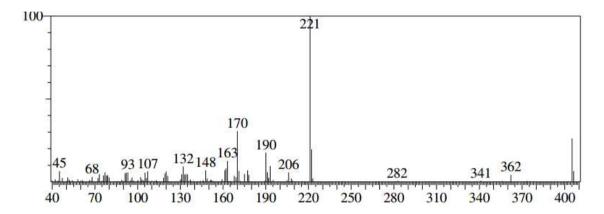


Figura A.1: Espectro de massas do composto mono-hidroxilado, t_R 42,04 min obtido a partir da fonte de ionização de ionização por elétrons.

APÊNDICE 2: Espectros de Massas obtidos através da análise por CL-EM-TOF.

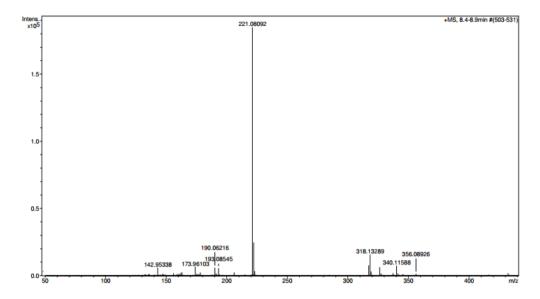


Figura A.2.1: Espectro de massas da PPT $[M + H]^+$ m/z 318,13289., através da análise ESI-MS-TOF.

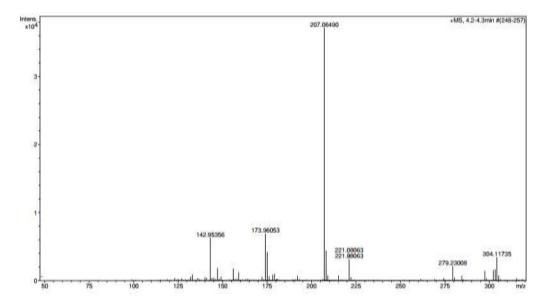


Figura A.2.2: Espectro de massas de M1 [M + H] $^+$ m/z 304,11735, através da análise ESI-MS-TOF.

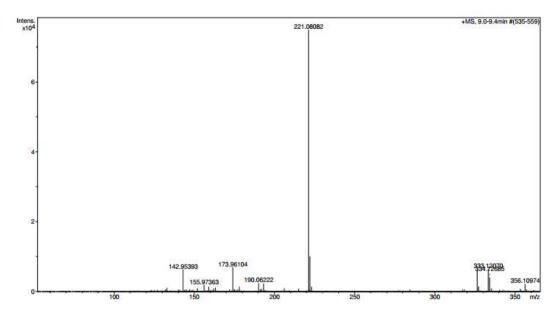


Figura A.2.3: Espectro de massas de M2 [M + H] $^+$ m/z 334,12685, através da análise ESI-MS-TOF.

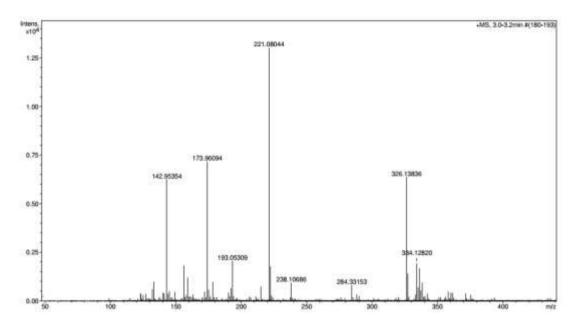


Figura A.2.4: Espectro de massas de M3 [M + H] $^+$ m/z 334,12820, através da análise ESI-MS-TOF.

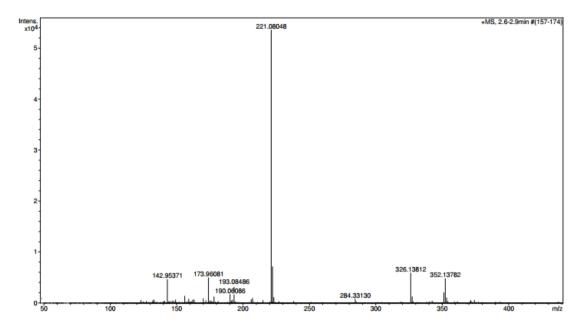


Figura A.2.5: Espectro de massas de M4 [M + H]⁺ m/z 352,13782, através da análise ESI-MS-TOF.

APÊNDICE 3- Espectros de RMN dos metabólitos da PPT.

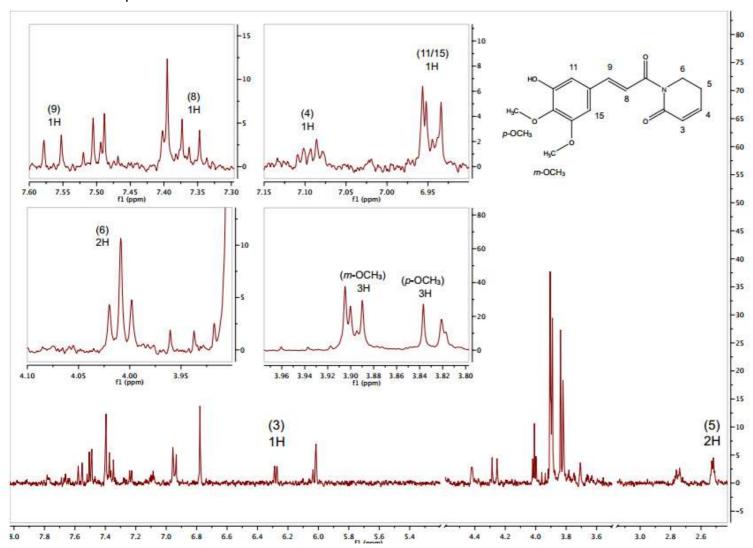


Figura A3.1: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) de M1.

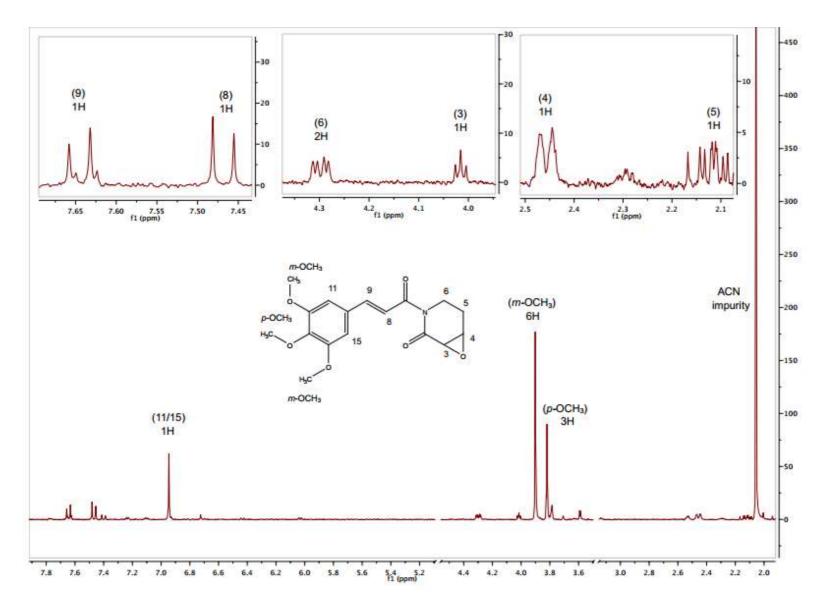


Figura A3.2: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) de M2.

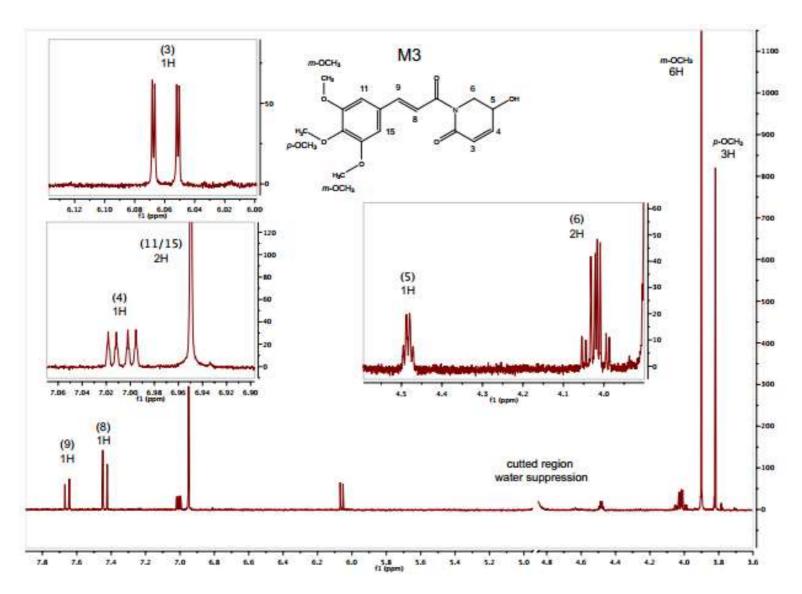


Figura A3.3: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) de M3.

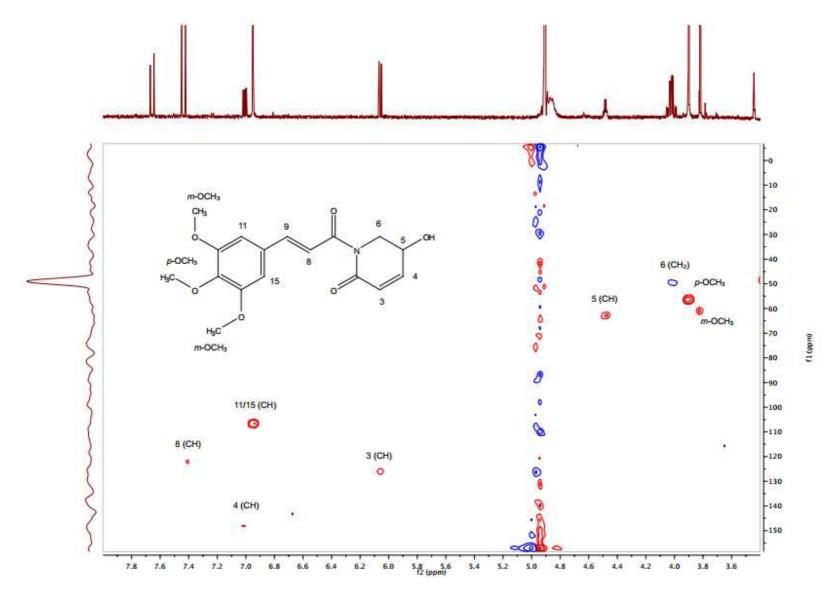


Figura A3.4: Mapa de contorno de HSQC (600 MHz, CD₃OD) de M3.

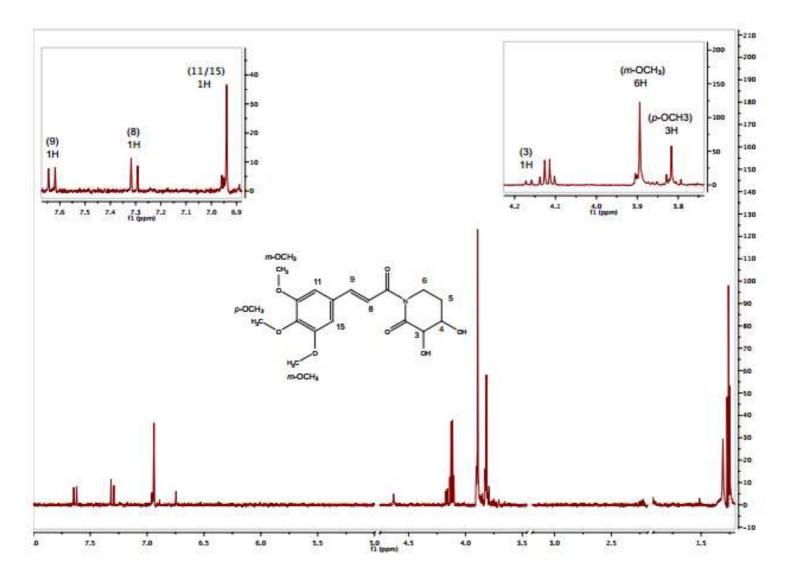


Figura A3.5: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) M4.



ANEXO

ANEXO 1: Análise terceirizada da pureza e identificação da PPT.

Versão: 00 Página: 1 de 7

Código: XPI 01-15

ANEXO 03 RELATÓRIO DE ANÁLISE II

POP_047 EXECUÇÃO DE SERVIÇOS



Certificado de Análise

Empresa solicitante: Fernanda de Lima Moreira

Endereço: Avenida do Café s/nº, Bairro Monte Alegre

Contato: Fernanda de Lima Moreira

e-mail / telefone: fer_unifal@yahoo.com.br/ 16 3615-0388

Data de Emissão Inicial: 09/03/2015

Histórico de Alterações: Emissão inicial

Aprovado em: 09/03/2015 Responsável:

Prof. Dr. José Norberto Callegari Lopes

Dados da Amostra

Nome: Piplartina

CAS: 20069-09-4 Estrutura química:

Código: NF

Fórmula molecular: C17H15NO5

Fabricante: NF Lote: NF

Prazo de validade: NF

Data de recebimento: 09/02/2015

Condições de estocagem: Frasco fechado, protegido da luz (IF)

Observações:

NF: não informado; (IF): informado pelo cliente / fornecedor

Resultados	
Análises qualitativas	Análises quantitativas
EM, EM/EM: Conforme	Voláteis: 0 % (TGA até 120°C)
IV: Conforme	Pureza cromatográfica: 99,54%
RMN ¹ H: Conforme (IF)	Pureza ajustada* ou potência: 99,54 %
RMN ¹³ C: Conforme (IF)	

^{*} Cálculo da pureza ajustada: [100% - (Voláteis%)] x pureza cromatográfica% / 100

Rua Ångelo Mestriner, 263 Ribeirão Preto – SP CEP 14030-090 16 3610-4109 / 16 3610-4806 atendimento@lychnoflora.com.br