UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de metabolismo *in vitro* do alcalóide Piplartina empregando
microsomas hepático de ratos**

Lucas Maciel Mauriz Marques

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de metabolismo *in vitro* do alcalóide Piplartina empregando
microsomas hepático de ratos**

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado: Lucas Maciel Mauriz Marques

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo
Moraes de Oliveira

Ribeirão Preto
2013

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.

Marques, Lucas Maciel Mauriz

Estudo de metabolismo *in vitro* do alcalóide Piplartina empregando microsomas hepático de ratos. Ribeirão Preto, 2013.

97 p.; 30cm.

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

Orientador: de Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes.

1. Cinética enzimática. 2. Cooperatividade. 3. Metabolismo *in vitro*. 4. Microsomas hepático de ratos. 5. Perfil sigmoidal. 6. Piplartina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lucas Maciel Mauriz Marques

Estudo de metabolismo *in vitro* do alcalóide Piplartina empregando microsomas hepático de ratos

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

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigo
Moraes de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*A **Deus**, fortaleza, refúgio, sustento do meu ser, fonte da minha Fé e Amor, por sempre me mostrar o caminho a ser trilhado, dando-me discernimento para cada decisão e entusiasmo em cada descoberta.*

*A **minha Família**, especialmente minha mãe Maria do Carmo, que deixei no Piauí a me observar alçando vôos para concretização dos meus sonhos, pelas palavras de firmeza e sabedoria, pela garra e coragem de ser mãe e mulher como ela é.*

*A **Rívia**n, companheira fiel, presente do Céu, por sua paciência, alegria, carinho e estímulo para continuar em frente. Obrigado por estarmos compartilhando esta conquista juntos. Seus olhos azuis me cativam e sempre serão luzeiros para quando as trevas surgirem.*

*Aos **amigos do Piauí**, que na verdade estão lá e também espalhados pelo Brasil, pois descobri que o tamanho da distância só não foi maior que os laços que nos unem e a amizade que só cresce.*

*Aos **amigos que descobri na minha nova casa (Ribeirão Preto)**, pois quando se está longe do ninho materno, descobrimos a dureza do mundo real, porém melhor é quando descobrimos que mesmo assim tem quem nos acolha, sendo presença nas dificuldades do dia-a-dia.*

*Ao **Grupo de Oração Filhos da Luz**, por meio dos qual descobri pessoas maravilhosas, as quais me proporcionam momentos de profunda intimidade com Deus.*

Agradecimentos

*Ao professor **Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira**, por ter me recebido no seu laboratório, no seu grupo de pesquisa e por meio do qual as portas me foram abertas na USP, ficam aqui minha gratidão, respeito e admiração pela sua postura e competência tanto na condução do trabalho, como também na minha construção profissional. Obrigado pela orientação que transcedeu o sentido usual da palavra e que transpôs as barreiras do laboratório.*

*A todos que compõe o **Laboratório de Metabolismo in vitro e Técnicas de Separação**, que direta ou indiretamente me auxiliaram (Bruno, Simone, Nayara, Marcela, Daniel, Fernanda, Lucas, Liana, Mariana, Lídia, Gisele e a todos os que um dia passaram), à Prof^a Dr^a Marilda e ao técnico Thiago Cavassani. Ao aluno de IC Renan Santos pelo auxílio na etapa de validação.*

*A todos que compõe o **Laboratório de Química de Micro-organismos**, com os quais tive a oportunidade de conviver. Gisele Baraldi pela ajuda nos estudos iniciais e ao cara da Piplartina: Eduardo Júnior, pelos diversos momentos de dúvidas, estudos, pesquisas e questionamentos.*

*Ao **Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos**, colegas, funcionários e técnicos: Dayana Rubio, Ricardo Vesseccchi, José Thomaz, Jacqueline Nakau e Izabel Cristina pelo auxílio na parte de espectrometria de massas, em nome deles estendo meus cumprimentos a todos.*

*Ao **Centro de Cromatografia de Eletroforese Capilar**, pois foi lá onde fui apresentado ao mundo cromatográfico, obrigado Prof^a Pierina Bonato por ter aberto as portas, Valquíria Jabor e Luciana, pela disponibilidade e também aos ex-alunos que passaram por lá e com os quais pude “estagiar”.*

*Aos **amigos e colegas** que pude fazer ao longo destes anos de mestrado na USP, pela convivência na sala de aula e nos corredores.*

Ao Técnico Mário Ogasawara, por sua disponibilidade.

*Ao **Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas**, funcionários e técnicos administrativos, pela oportunidade oferecida.*

*Ao **Departamento de Química** da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras-USP Ribeirão Preto, pelo espaço de trabalho.*

*A **FAPESP** e a **CAPES** pelo auxílio financeiro.*

Meu filho, aceita a instrução desde teus jovens anos; ganharás uma sabedoria que durará até a velhice. Vai ao encontro dela, como aquele que lavra e semeia, espera pacientemente seus excelentes frutos, terás alguma pena em cultivá-la, mas, em breve, comerás os seus frutos (Eclo 6, 18-20).

RESUMO

MARQUES, L. M. M. **Estudo de metabolismo *in vitro* do alcalóide Piplartina empregando microssomas hepático de ratos**. 2013. 97f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O gênero *Piper* pertencente à família Piperaceae, encontra-se distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Estudos químicos têm demonstrado diversidade de metabólitos secundários com atividade biológica. Os alcalóides são metabólitos característicos. A piplartina, (*E*)-1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acriloil)-5,6-diidropiridin-2(1H)-ona, é um alcalóide encontrado em muitas espécies. Tem atividade citotóxica contra células de linhagem tumoral, ansiolítica, antidepressiva, antifúngica e antiagregação plaquetária, sendo dessa forma, uma molécula candidata a um novo fármaco. O conhecimento do metabolismo de um candidato a fármaco é um fator importante na avaliação da sua segurança e eficácia. Ensaio *in vitro* estão crescentemente sendo utilizados como *screening* e os microssomas hepáticos representam o sistema *in vitro* mais utilizado. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo determinar os parâmetros cinéticos enzimáticos *in vitro* da piplartina utilizando microssomas de fígado de ratos, bem como a determinação dos possíveis metabólitos formados. Para tanto, foi desenvolvido um método de quantificação da piplartina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Como condição de análise, empregou-se uma coluna C18, fase móvel acetonitrila:água (40:60, v/v) e vazão de 1 mL min⁻¹. Para extração da piplartina dos microssomas hepático de ratos foi empregado a extração líquido-líquido utilizando 4,0 mL de hexano como solvente extrator. Após otimização da extração, o método foi validado, mostrando-se linear na faixa de 2,4-157,7 µM, obtendo-se uma equação da reta $y = 0,0934x + 0,0027$, ($r = 0,99$) e limite de quantificação de 2,4 µM. A recuperação média foi de 85%. A precisão e exatidão apresentaram resultados dentro do recomendável pela ANVISA. A piplartina manteve-se estável até 50 minutos em condições de incubação, e até 6h sob a bancada. Após validação da metodologia, estabeleceram-se as condições lineares para a quantidade de proteínas microssomais: 0,28 mg mL⁻¹ e para o tempo de incubação: 16 minutos no consumo da piplartina no meio microssomal, e então efetuou-se a determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos da piplartina empregando as condições de V_0 . Nesse estudo foi observado um $V_{max} = 4,74 \pm 0,26 \mu\text{M}/\mu\text{g mL}^{-1}/\text{min}$, $h = 2,53 \pm 0,37$, $S_{50} = 44,69 \pm 0,32 \mu\text{M}$ e $CL_{max} = 0,054 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, um perfil cinético indicativo de cooperatividade. Um estudo qualitativo para determinação dos possíveis metabólitos foi feito utilizando-se a espectrometria de massas, por meio da qual foi possível identificar a formação de dois produtos hidroxilados. Deste modo, os microssomas mostraram-se uma ferramenta útil, rápida e simples para determinação da cinética enzimática, e na condução dos estudos preliminares de metabolismo *in vitro*.

Palavras-chave: Cinética enzimática; Cooperatividade; Metabolismo *in vitro*; Microssomas hepático de ratos; Perfil sigmoidal; Piplartina.

ABSTRACT

MARQUES, L. M. M. ***In vitro* metabolism study of the piplartine alkaloid using rats liver microsomes.** 2013. 97f. Dissertation (Master's degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The genus *Piper* belongs to the Piperaceae family and includes species that are widely distributed throughout the tropical and subtropical regions of the world. Chemical studies have shown diversity of secondary metabolites with biological activity. The alkaloids are characteristic metabolites. The piplartine, (*E*)-1-(3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acryloyl)-5,6-diidropiridin-2(1H)-one is an alkaloid found in many species. It shows cytotoxic activity against tumor cell lines, anxiolytic, antidepressant, antifungal, and antiplatelet therapy, thus being a drug candidate. The knowledge regarding the oxidative metabolism is an important tool in assessing the safety and efficacy of a drug candidate. *In vitro* assays are increasingly being used as a screening tool and liver microsomes represent the most widely *in vitro* system used for that. This study aims to determine the *in vitro* enzymatic kinetic parameters for piplartine by cytochrome P450 enzymes (CYP) present in the rat liver microsomes, and the determination of possible metabolites. To accomplish, it was developed a method to quantify the piplartine using high performance liquid chromatography. The analysis was carried out employing a C18 column, mobile phase: acetonitrile: water (40:60, v/v) at a flow rate of 1 ml min⁻¹. To extract piplartine from rat liver microsomes it was employed the liquid-liquid extraction (4.0 mL of hexane). The method was validated and proved to be linear in the range of 2.4 to 157.7 µM, the equation for calibration curve was: $y = 0.0934x + 0.0027$ ($r = 0.99$), and a limit of quantification of 2.4 µM. The mean recovery was 85%. The precision and accuracy were in agreement with ANVISA guidelines. The piplartine remained stable until 50 minutes of incubation conditions, and until 6 hours under the bench. Once validated, it was set the conditions for the linear amount of microsomal protein: 0.28 mg mL⁻¹ and to the incubation time: 16 minutes, then it was performed the determination of enzymatic kinetic parameters, that revealed a sigmoidal profile with $V_{max} = 4.74 \pm 0.26$ µM/mg mL⁻¹/min, $h = 2.53 \pm 0.37$, $S_{50} = 44.69 \pm 0.32$ µM, and $CL_{max} = 0.054$ µL/min/mg protein, indicating a cooperativity behavior. A qualitative study to determine possible metabolites carried out using mass spectrometry, through which it was possible to identify the formation of two hydroxylated products. To conclude, the microsomes showed to be a useful, fast and simple tool to determination of enzymatic kinetics and *in vitro* metabolism studies.

Keywords: Enzymatic Kinetic; Cooperativity; *In vitro* metabolism; Hepatic rat microsomes; Sigmoidal profile; bioanalytical validation; Piplartine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química da Piplartina. 3
- Figura 2** - Principais classes de oxidações realizadas pelas enzimas do citocromo P450. Adaptado de FELIPUCCI NETO, C. A. **Mn(III)profirinas sintéticas como modelos químicos do citocromo P450: a O-desalquilação oxidativa de aril éteres substituídos como modelos de drogas por iodosilbenzeno**. Dissertação (Mestrado em Química)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. 10
- Figura 3** - Estrutura geral do citocromo P450. Na figura estão ilustrados os quatro ligantes nitrogenados do macrociclo de porfirina, o cátion radical da porfirina e o ligante tiolato cisteína. Adaptado de JUNG, C. The mystery of cytochrome P450 Compound I A mini-review dedicated to Klaus Ruckpaul. **Biochimica et Biophysica Acta**, Berlin, v.1814, n. 1, p. 46–57, 2011. 11
- Figura 4** - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por uma enzima. Legenda: $a = V_{max}$, $b = K_m$, eixo $x = [\text{substrato}]$, eixo $y = V_o$. Adaptado de JUKIC, D.; SABO, K.; SCITOVSKI, R. Total least squares fitting Michaelis–Menten enzyme kinetic model function. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, Amsterdam, v. 201, n. 1, p.230–246, 2007. 14
- Figura 5** - Condições cromatográficas obtidas para análise da piplartina. Coluna C8(2) (250 mm x 4,6 mm), vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹. O comprimento de onda foi fixado em 325 nm. Volume injetado: 20 µL. Fase móvel acetonitrila:água 70:30, (v/v) (—), 50:50, (v/v) (—), 40:60, (v/v) (—). Concentração da amostra: 100 µg mL⁻¹ (—) (—) e 1000 µg mL⁻¹ (—). 39
- Figura 6** - Gráfico de avaliação dos solventes para extração da piplartina. Em todos foi utilizado volume de 4 mL, tempo de agitação de 15 minutos, velocidade de agitação 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado 20 µL. Concentração da piplartina: 100 µg mL⁻¹. Condições cromatográficas descritas na Figura 5. 40
- Figura 7** - Extrações empregando clorofórmio (—), diclorometano (—), hexano:isopropanol (80:20 v/v) (—) e hexano (—) 4 mL. Tempo de agitação 15 minutos. Velocidade de agitação 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado 20 µL. Concentração da piplartina: 100 µg mL⁻¹. Condições cromatográficas descritas na Figura 5. 41
- Figura 8** - Avaliação do volume de solvente para extração da piplartina. Tempo de agitação de 15 minutos, velocidade de agitação 1000 rpm. 41

Detecção em 325 nm. Volume injetado 20 µL. Concentração da piplartina: 100 µg mL⁻¹. Condições cromatográficas descritas na Figura 5.

Figura 9 - Avaliação do tempo de agitação para extração da piplartina. 42
Velocidade de agitação 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado 20 µL. Concentração da piplartina: 100 µg mL⁻¹. Condições cromatográficas descritas na Figura 5.

Figura 10 - Avaliação do efeito *salting out* na extração da piplartina. 42
Volume de solvente extrator: 4 mL. Tempo de extração: 15 minutos. Velocidade de agitação: 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado: 20 µL. Concentração da piplartina: 100 µg mL⁻¹. Condições cromatográficas descritas na Figura 5.

Figura 11 - Intervalo linear para o consumo da piplartina em função da 53
concentração de proteínas microsossomais no meio de incubação. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4, tempo de incubação 50 minutos. Equação da reta: $y = -0,4122x + 1,354$, $r = 0,97$. Condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS Shimadzu® (250 mm x 4,6 mm, 4,6 µm), vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹. Volume injetado: 20 µL. Fase móvel acetonitrila:água 40:60, (v/v).

Figura 12 - Definição do intervalo linear para o consumo da piplartina em 54
função do tempo de incubação. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4, concentração de proteínas microsossomais 0,8 mg mL⁻¹ de meio de incubação. Equação da reta: $y = -0,006911x + 1,1212$, $r = 0,98$. Condição cromatográfica descrita na Figura 11.

Figura 13 - Grafico da cinética enzimática após incubação da piplartina 55
por 16 minutos, empregando 0,28 µg mL⁻¹ de proteínas microsossomais. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Condição cromatográfica descrita na Figura 11.

Figura 14 - Gráfico de Eadie-Hofstee para cinética da piplartina. Condição 57
cromatográfica descrita na Figura 11.

Figura 15 - Perfil cromatográfico do metabolismo *in vitro* da piplartina 59
empregando microsossomas hepático de ratos. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7 µm BEH de 2,1 x 50 mm e fase móvel composta por acetonitrila e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (gradiente: 10% a 100% de ACN, em 5 minutos), e uma vazão de 0,3 mL min⁻¹ em CLUE-DAD. Solvente extrator: hexano.

Figura 16 - Espectro de EM/EM da piplartina, obtido na análise realizada 60
em CLUE.

Figura 17 - Fragmentação da piplartina protonada em IES-EM/EM. 61

Figura 18 - Proposta para o mecanismo de fragmentação dos principais íons da piplartina por CLUE-EM/EM, empregando ionização por eletrospray (IES). 62

Figura 19 - Perfil cromatográfico do metabolismo *in vitro* da piplartina empregando microsomas hepático de ratos. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7 µm BEH de 2,1 x 50 mm e fase móvel composta por acetonitrila e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (gradiente: 10% a 100% de ACN, em 5 minutos), e uma vazão de 0,3 mL min⁻¹ em CLUE-DAD. Solvente extrator: acetato de etila. 64

Figura 20 - Espectro EM/EM dos produtos do metabolismo oxidativo da piplartina, obtidos nas análises realizadas em CLUE-EM/EM. 65

Figura 21 - Perfil cromatográfico da piplartina. Obtido em equipamento CG, utilizando coluna capilar DB-1MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm). Condições de análise: modo *scan* com *splitless* de 1:50, gás de arraste: hélio, velocidade linear de 42,9 cm s⁻¹, T_{fonte de íons} = 250°C, T_{fonte da interface} = 280°C, T_{análise} = 100°C sendo mantida durante 5 minutos, então aumentada 290 °C com taxa de 5°C min⁻¹. 66

Figura 22 - Espectro de massas da piplartina, obtido por ionização por elétrons (IE-EM). 67

Figura 23 - Proposta para o mecanismo de fragmentação dos principais íons da piplartina por CG-EM, empregando ionização por elétrons (IE-EM). 68

Figura 24 - Cromatograma da piplartina no meio microsomal obtido para o *pool* de 10 replicatas. Condições cromatográficas descritas na Figura 21. 70

Figura 25 - Sobreposição (ampliação x10000000) dos cromatogramas do meio microsomal (___), controle (___) e branco (___) obtidos para o *pool* de 10 replicatas. A seta indica o produto de oxidação formado em t_R = 39,9 minutos. 70

Figura 26 - Espectro de massas do produto do metabolismo oxidativo da piplartina, obtido por ionização por elétrons (IE-EM). 71

Figura 27 - Análise dos produtos de oxidação no modo SIM. Condições cromatográficas descritas na Figura 21. 71

Figura 28 - Cromatograma da piplartina no meio microsomal obtido para o *pool* de 30 replicatas, aparecimento de P2 em t_R = 41 minutos. 72

Condições cromatográficas descritas na Figura 21.

Figura 29 - Espectro de massas do segundo produto do metabolismo oxidativo da piplartina, obtido por ionização por elétrons (IE-EM). 72

Figura 30 - Proposta para o mecanismo de fragmentação dos produtos de biotransformação microssomal da piplartina por CG-EM, empregando ionização por elétrons (IE-EM). 73

Figura 31 - Cromatograma da piplartina no meio microssomal: t_R = 7,1 minutos (produtos de oxidação) e t_R = 15,4 minutos (piplartina). Condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS Shimadzu® (250 mm x 4,6 mm, 4,6 μ m), vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹. O comprimento de onda foi fixado em 220 nm. Volume injetado: 20 μ L. Fase móvel acetonitrila:água 40:60, (v/v). 75

Figura 32 - Análise dos produtos de oxidação isolados no modo SIM. Condições cromatográficas descritas na Figura 21. 76

Figura 33 - Estrutura química do produto 1, a partir do metabolismo *in vitro* da piplartina empregando fração microssomal hepática de ratos. (E)-5-hidroxi-1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilóil)-5,6-diidropiridin-2(1H)-ona. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alterações mais comuns introduzidas na massa molecular de uma substância por meio de reações de Fase I (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009).	19
Tabela 2 - Linearidade do método ($n = 8$).	46
Tabela 3 - Limite de quantificação ($n = 8$).	46
Tabela 4 - Precisão e Exatidão intra-ensaio ($n = 8$).	47
Tabela 5 - Precisão e Exatidão interensaio ($n = 8$).	48
Tabela 6 - Recuperação ($n = 5$).	49
Tabela 7 - Estabilidade de bancada, de incubação e de auto-injetor ($n = 5$).	50
Tabela 8 - Estabilidade de incubação, comparativamente a amostras não incubadas, em diferentes tempos ($n = 5$).	51
Tabela 9 - Estabilidade de bancada ($n = 5$).	51
Tabela 10 - Estabilidade de 30 dias ($n = 5$).	52
Tabela 11 - Principais íons observados no espectro de IES-EM da piplartina.	60
Tabela 12 - Íons dos produtos observados nos espectros de IES-EM em alta resolução da piplartina após biotransformação microssomal.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[S]	concentração inicial do substrato
ACN	acetonitrila
CG	cromatografia gasosa
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CL_{int}	<i>clearance</i> intrínseco
CL_{max}	<i>clearance</i> máximo
CLUE	cromatografia líquida de ultra eficiência
CLUE-DAD-EM/EM	cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos acoplada a espectrometria de massas sequencial
CYP	citocromo P450
ELL	extração líquido-líquido
EM	espectrometria de massas
IE	ionização por elétrons
IES	ionização por eletrospray
K_m	constante de Michaelis-Menten
LIQ	limite inferior de quantificação
NADP	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
PI	padrão interno
PNs	produtos naturais
t_R	tempo de retenção
V_0	velocidade inicial
V_{max}	velocidade máxima

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	 1
1.1 Produtos naturais e piplartina	1
1.2 Estudos de biotransformação e metabolismo <i>in vitro</i>	4
1.3 Citocromo P450	9
1.4 Cinética enzimática no metabolismo de fármacos	12
1.5 Técnicas cromatográficas empregadas em estudos de metabolismo	15
<i>in vitro</i>	
1.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG)	15
1.5.2 Espectrometria de massas	17
2 OBJETIVOS	21
3 PARTE EXPERIMENTAL	22
3.1 Materiais	22
3.1.1 Reagentes e solventes	22
3.1.2 Equipamentos	23
3.1.3 Análises cromatográficas	23
3.1.3.1 Sistemas cromatográficos empregados na otimização da separação e validação da metodologia	23
3.1.3.2 CLUE-DAD-EM/EM	24
3.1.3.3 CG-EM	25
3.1.3.4 Análise por CLAE-DAD-EM	26
3.2 Métodos	27
3.2.1 Preparo dos microssomas	27
3.2.2 Procedimento de incubação para o estudo de metabolismo <i>in vitro</i> e preparo das amostras	28

3.2.3 Procedimento para determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos	29
3.2.4 Análise da piplartina e dos produtos do seu metabolismo <i>in vitro</i> por CLUE-DAD-EM/EM, CG-EM e CLAE-EM de alta resolução	31
3.2.5 Validação da Metodologia Bioanalítica	32
3.2.5.1 Seletividade	33
3.2.5.2 Linearidade	33
3.2.5.3 Limite de quantificação	34
3.2.5.4 Exatidão inter- e intra-ensaio	34
3.2.5.5 Precisão inter e intra-ensaio	35
3.2.5.6 Recuperação	36
3.2.5.7. Estabilidade	36
3.2.6 Determinação estrutural dos produtos da reação no meio microssomal	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1 Otimização de um método para análise da piplartina por cromatografia líquida de alta eficiência	38
4.2 Otimização de um método de preparação de amostras para extração da piplartina de microssomas hepático de ratos	39
4.3 Validação da metodologia analítica	43
4.3.1 Seletividade	44
4.3.2 Linearidade	44
4.3.3 Limite inferior de quantificação (LIQ)	46
4.3.4 Precisão e Exatidão intra-ensaio e interensaio	47
4.3.5 Recuperação	48
4.3.6 Estabilidade	49
4.4 Metabolismo <i>in vitro</i>	52
4.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos	52
4.4.2 Determinação estrutural da piplartina e de seus produtos de oxidação por IES-EM/EM e EI-EM	59
4.4.2.1 Análises por IES-EM de alta resolução e IES-EM/EM	59
4.4.2.2 Análises por IE-EM	66

5 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APENDICES	90

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Produtos naturais e piplartina

A natureza sempre despertou fascínio no homem, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. Desde tempos antigos, diversos povos têm utilizado as plantas e seus derivados na busca pela cura de suas enfermidades. Os produtos naturais (PNs) têm sido utilizados como fonte de medicamentos e sempre tiveram impacto sobre a cultura e a vida de muitas civilizações, desempenhando um importante papel no tocante ao processo de descoberta e de desenvolvimento de novos fármacos (BANERJEE; SINGH; RAHMAN, 2012; LEE et al., 2013; LI; VEDERAS, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2007, 2012; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O conhecimento do arsenal químico da natureza, a convivência e o aprendizado entre os diferentes grupos étnicos trouxeram contribuições para o desenvolvimento da pesquisa com PNs, do conhecimento da relação íntima entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas e da inter-relação animais/insetos/plantas. Exemplos notáveis incluem os narcóticos do ópio (preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*), digitálicos da dedaleira (*Digitalis* sp.), salicilatos da casca do salgueiro, quinino da casca da árvore de espécies de *Chinchona* e a cocaína das folhas da coca (HURKO, 2012; VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os PNs tem tido um papel central na descoberta de agentes anticancerígenos, antifúngicos e antibacterianos. Dentre todos os fármacos

cl clinicamente utilizados nestas categorias, 60-80% são de origem natural (KEERTHI et al., 2013). Conforme estudo de Newman e Cragg (2012), de todas as novas entidades químicas aprovadas para todas as doenças no mundo entre 1981-2010, apenas 29% delas foram de origem totalmente sintética, as demais provieram de PNs, micro-organismos ou compostos sintéticos cuja estrutura foi baseada em PNs.

Os PNs fornecem um grande número de moléculas que podem ser utilizadas na busca de um potencial agente terapêutico. Uma planta contém centenas de componentes químicos, porém apenas alguns são bioativos, por conseguinte é essencial identificá-los e isolá-los (WU et al., 2013).

O gênero *Piper* pertencente à família Piperaceae, encontra-se distribuído nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo e está presente na medicina popular da China, Índia e América Latina (no Brasil há 260 espécies) para tratamento de distúrbios respiratórios, desordens do trato gastrointestinal, dentre outras. Há relatos na literatura de propriedades ansiolíticas, vasodilatadoras, analgésicas, anti-inflamatórias, citotóxica, imunomodulatória, antimicrobiana, antifúngica e promissora atividade antitumoral (BEZERRA et al., 2008; MORAES et al., 2011; RAJ et al., 2011; RODRIGUES et al., 2009). Estudos químicos conduzidos em algumas espécies pertencentes ao gênero *Piper* tem demonstrado diversidade de metabólitos secundários com atividade biológica, entre eles estão: piranonas, flavonas, terpenos, lactonas, cromonas, chalconas, lignanas, neolignanas, alcalóides e propenilfenóis (FACUNDO et al., 2008; LIMA et al., 2012).

A pipartina, (*E*)-1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilóil)-5,6-diidropiridin-2(1H)-ona (Figura 1), é um alcalóide encontrado em muitas espécies do gênero *Piper*. Este metabólito secundário tem significativa atividade citotóxica contra células de linhagem tumoral, especialmente células da linhagem da leucemia humana, como

HL-60, *K562*, *Jurkat* e *Molt-4*, ansiolítica, antidepressiva, antifúngica e antiagregação plaquetária (BEZERRA et al., 2007, 2008, 2009; BEZERRA, 2008; COTINGUIBA et al., 2009; MORAES et al., 2011).

Figura 1 - Estrutura química da Piplartina.

A piplartina inibiu o crescimento espontâneo de tumores malignos na mama e a metástase associada em camundongos (RAJ et al., 2011). Bezerra e col. (2006) estudaram a atividade antitumoral da piplartina em camundongos transplantados com sarcoma 180 (um tipo de tumor frequentemente utilizado em linhagem celular para análise da atividade antitumoral). Nesse estudo foi descoberto seu efeito antiproliferativo *in vitro* e *in vivo*.

Jyothi e col. (2009) avaliaram os efeitos citotóxicos da *E*- e *Z*-piplartina em diferentes células tumorais: células embrionárias de camundongos, macrofágicas, linfócitos T e células do neuroblastoma humano. Nesse estudo, foi encontrado resultados positivos ao utilizar a *E*-piplartina ao contrário da *Z*- que falhou na indução da citotoxicidade. A magnitude do efeito foi comparada com o diferuloilmetano, um típico agente anti-cancerígeno empregado em estudos *in vitro*. Como conclusão, os autores indicaram que a *E*-piplartina é um promissor agente no combate ao câncer.

Moraes e col. (2011) realizaram estudos *in vitro* com a pipartina visando sua eficácia contra o parasita *Schistosoma mansoni*, responsável pela esquistossomose, uma doença endêmica de algumas regiões do Brasil. O estudo foi realizado comparando seu efeito frente ao praziquantel. A alta taxa de mortalidade, os efeitos de diminuição sobre a aptidão reprodutiva e as extensas alterações morfológicas no tegumento dos vermes adultos mostraram sua promissora atividade anti-helmíntica.

Felipe e col. (2007) demonstram uma potente atividade ansiolítica, mediante “avaliação em campo aberto” (teste para avaliação do estado emocional da cobaia). O efeito foi comparável ao do diazepam. Assim, os animais retirados de suas gaiolas climatizadas e colocados em um novo ambiente, expressaram medo e ansiedade, por conta da alteração ambiental, tais como diminuição da deambulação e imobilização de exploração, aumento da micção e defecação devido à atividade autonômica aumentada. Porém, estes padrões de comportamento foram atenuados após administração da pipartina, igualmente aos agentes ansiolíticos conhecidos. Embora a literatura apresente outros estudos sobre os diversos efeitos biológicos para a família Piperaceae (FACUNDO et al., 2008; NAVICKIENE et al., 2003; ZAVERI et al., 2010) há poucos estudos sistematizados para um componente isolado, como a pipartina (FELIPE et al., 2007).

1.2 Estudos de biotransformação e metabolismo *in vitro*

Os seres humanos são expostos durante a vida a uma ampla variedade de componentes exógenos (xenobióticos) os quais sofrem metabolismo através da biotransformação enzimática. O metabolismo é definido como uma modificação estrutural do composto em questão pelo sistema enzimático por meio de reações de

Fase I, onde compostos apolares são convertidos em compostos mais polares por meio de reações de oxidação, redução e hidrólise e de Fase II, onde ocorrem reações de conjugação que incluem glicuronidação, sulfatação ou sulfonação, acetilação, metilação, conjugação com glicina e glutatona, facilitando sua eliminação do organismo (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; LIN et al., 2007; SEVIOR; PELKONEN; AHOKAS, 2012; VANDENBERGHE et al., 2013).

O conhecimento do metabolismo é fator importante na avaliação da segurança e eficácia de qualquer candidato a fármaco, para melhor entendimento de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, bem como chave para determinação da sua toxicidade, sendo importante na decisão de avançar, manter ou encerrar estes estudos. Deste modo, nas duas últimas décadas, houve crescimento nas taxas de sucesso, o que pode ser atribuído a pelo menos duas razões: primeiro a incorporação destes estudos na rotina da pesquisa, em segundo têm-se uma melhor compreensão das diferenças entre espécies e indivíduos, transportadores e enzimas biológicas, e para tanto, estratégias estão sendo formadas, melhoradas e aplicadas como o avanço na instrumentação para fazer previsões mais confiáveis entre dados *in vitro* e *in vivo* (MANSUY, 2007; PAKHUNG, 2009; SCHAAB et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

Além disso, o conhecimento do candidato a fármaco frente às enzimas oxidativas, sua afinidade e velocidade de metabolização é crítico para seu desenvolvimento, principalmente em investigações de interações medicamentosas a fim de se minimizar sua ocorrência (ASHA; VIDYAVATHI, 2009; HARIPARSAD et al., 2006; PEREZ, 2007; ZIENTEK et al., 2008), visto que aproximadamente 50% de todos os fármacos apresentam alguma falha na fase pós-aprovacional relacionada a uma toxicidade inesperada, fatores genéticos, ambientais ou mesmo nutricionais

(SEVIOR; PELKONEN; AHOKAS, 2012). Esses estudos são essenciais para fornecer informações quanto às rotas metabólicas, envolvendo para tanto a elucidação dos metabólitos formados, sua determinação estrutural e identificação da(s) enzima(s) responsável(is) pela biotransformação nas Fases I e II (HARIPARSAD et al., 2006; TINGLE; HELSBY, 2006).

O estudo pode ser feito empregando modelos *in vivo* (animais, voluntários saudáveis, pacientes) ou *in vitro*. A busca pelo desenvolvimento de modelos *in vitro* se sustenta em aspectos éticos, científicos e econômicos, são mais simples e particularmente úteis para seleção racional de espécies animais, para estudos toxicológicos e comparação de perfis metabólicos. Os principais modelos de estudos *in vitro* incluem o uso da fração S9, microsomas hepáticos, superssomas e hepatócitos (CALIXTO, 2012; SIMÕES, 2012; TINGLE; HELSBY, 2006; WU et al., 2012).

A fração hepática S9 é uma preparação contendo ambas as frações microsomal e citosólica. Há a necessidade de se suplementar o meio com os cofatores e os equivalentes redutores (mesma estratégia utilizada com os microsomas) a fim que o processo enzimático seja desencadeado, portanto, dependendo do cofator adicionado, têm-se as reações de Fase I (principalmente enzimas do meio microsomal) ou de Fase II (frequentemente enzimas citosólicas) ou uma combinação de ambas. A fração S9 é essencialmente utilizada em associação com o Teste de Ames para detecção de mutagenicidade de produtos químicos. Sua desvantagem reside no fato de conter menor atividade enzimática comparativamente aos microsomas e superssomas (CALIXTO, 2012; PLANT, 2004; SIMÕES, 2012; ZHANG et. al., 2012).

O superssoma é obtido por engenharia genética de células de inseto infectadas por baculovírus, o qual é capaz de expressar a isoforma desejada do citocromo P450 (CYP). Pode ser empregado em estudos de polimorfismos, bem como também na avaliação da interação entre fármacos. Uma importante questão feita é se estas isoformas possuem as mesmas características das que são naturalmente expressas no fígado. Comparações da atividade metabólica de superssomas e microssomas sugerem que aqueles são um modelo razoavelmente preciso da situação *in vivo* com respeito à determinação do K_m , embora muitas vezes o V_{max} não seja reprodutivo. Com isto, este sistema é utilizado frequentemente para examinar os achados das frações microssomais, confirmando e caracterizando o envolvimento de determinada isoforma no metabolismo (CALIXTO, 2012; PLANT et al., 2004).

Os hepatócitos, as células do parênquima do fígado, podem ser considerados como o “padrão ouro” para o sistema celular *in vitro*, representando o modelo mais próximo do comportamento *in vivo*. Sua vantagem, assim como os microssomas, é a possibilidade de estudar, por exemplo, variações entre indivíduos, sexos ou idades. Contudo, como desvantagem, há redução, com o tempo, na expressão das enzimas do CYP, acarretando na perda de algumas características, comprometendo a exatidão do modelo quando comparado ao que é visto *in vivo* (SEVIOR; PELKONEN; AHOKAS, 2012).

Os microssomas hepáticos representam o sistema *in vitro* mais utilizado para pesquisa do perfil metabólico de uma substância candidata a fármaco (de OLIVEIRA et al., 2009; MESSIANO et al., 2013; ZHOU et al., 2011), são utilizados, na determinação qualitativa da identidade do metabólito, no fornecimento de informações sobre estabilidade metabólica, sendo úteis no auxílio quanto ao foco

nos ensaios clínicos (TINGLE; HELSBY, 2006). São obtidos por meio de centrifugação diferencial e consistem de vesículas do retículo endoplasmático liso. Como vantagens, esse modelo apresenta: baixo custo, simplicidade, facilidade de armazenamento (atividade enzimática pode ser mantida por um longo período sob congelamento) e possibilidade de avaliação da variação inter-individual. Como desvantagem pode-se citar o enriquecimento enzimático com determinadas enzimas do CYP em detrimento de outras (por exemplo: ausência de glutathione-S-transferase e N-acetiltransferase) e, portanto, falta de competição, resultando em altas taxas de biotransformação ou não aparecimento de determinados metabólitos comparada ao ambiente *in vivo* ou mesmo com sistemas celulares intactos como os hepatócitos e frações do fígado (HARIPARSAD et al., 2006; SIMOES, 2012). As condições de incubação *in vitro* (pH do meio de incubação, força iônica e adição de solventes orgânicos) necessitam ser estritamente controladas (CALIXTO, 2012). O destaque dado é que por conter esta relativa concentração de enzimas do CYP, este sistema é útil para estudos de determinação dos parâmetros cinéticos de uma enzima (ZHANG et al., 2012).

Por conseguinte, ensaios *in vitro* estão crescentemente sendo utilizados como *screening* para novas entidades químicas e predição qualitativa e quantitativa da biotransformação em humanos; no entanto, exige-se cautela ao se correlacionar dados *in vivo* e *in vitro* devido a significativa diferença nos perfis metabólicos (BRANDON et al., 2003; SIMOES, 2012).

1.3 Citocromo P450

A introdução do oxigênio em processos bioquímicos trouxe um salto evolutivo na história da vida, pelo qual muitos organismos evoluíram para utilizá-lo como parte do processo de sustentação da vida e, ao mesmo tempo criaram meios para reduzir seus efeitos tóxicos. Um desses meios é através das enzimas do CYP, uma heme proteína que foi cientificamente descoberta por Omura e Sato em 1964. Dentro de um curto espaço de tempo, tornou-se claro que se trata de uma superfamília com mais de 8000 isoformas presentes em uma diversidade de organismos, distribuídas nos três domínios filogenéticos (archaea, bacteria, eukarya), com mais de 14000 sequências genômicas identificadas, presentes no processo de biossíntese de hormônios, vitaminas e co-fatores como os eicosanóides, bem como na detoxificação de substratos endógenos e exógenos pela utilização de oxigênio e de dois equivalentes redutores fornecidos pelo NAD(P)H, catalizando múltiplas reações com ampla especificidade de substrato. As enzimas do CYP encontram-se divididas em famílias, para as quais a identidade na sequência de emparelhamento de aminoácidos entre membros individuais é > 40%, e subfamílias para as quais esta mesma identidade é ≥ 55% (DENISOV; FRANK; SLIGAR, 2009; GROOT et al., 2009; HRYCAY; BANDIERA, 2012; HLAVICA, 2013; ZANGER, SCHWAB, 2013). A equação geral que descreve o processo é mostrada a baixo (1):

Onde A representa o substrato e AO o produto mono-oxigenado resultante (HRYCAY; BANDIERA, 2012; SHAIK et al., 2010).

São as mais importantes enzimas no metabolismo de fármacos e outros compostos exógenos (KORZEKWA et al., 1998), podendo catalisar várias reações oxidativas (Figura 2), dentre as quais a hidroxilação de hidrocarbonetos e compostos aromáticos, oxidação e desalquilação de heteroátomos, epoxidação de alcenos e clivagem oxidativa de ligações C=S, C=N, e C-C (DENISOV; FRANK; SLIGAR, 2009).

Figura 2 - Principais classes de oxidações realizadas pelas enzimas do citocromo P450. Adaptado de FELIPUCCI NETO, C. A. **Mn(III)profinas sintéticas como modelos químicos do citocromo P450: a O-desalquilação oxidativa de aril éteres substituídos como modelos de drogas por iodosilbenzeno**. Dissertação (Mestrado em Química)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

São cataliticamente ativas por conterem um grupo prostético heme (ferro protoporfirina IX). O ferro ferroso reduzido tem afinidade pelo O_2 , mas liga-se ao CO

com maior afinidade, produzindo o complexo ferro ferroso–CO que exibe uma absorção máxima em 450 nm (banda de *Soret*). Esta propriedade espectral característica é de onde deriva o nome (o '*P*' em P450 significa pigmento). A porção heme contém um átomo de ferro central ligado a seis ligantes, quatro dos quais são átomos de nitrogênio do anel de porfirina planar. O quinto ligante axial (próximo) é normalmente um ânion tiolato contribuído por um resíduo de cisteína (Cys) desprotonada localizada na região C-terminal da cadeia polipeptídica. Esta arquitetura é única e parece ser perfeitamente adaptada para ativação de oxigênio, para a ligação dos parceiros redox e para os requerimentos estereoquímicos de reconhecimento do substrato. O sexto sítio de coordenação (distante) é normalmente ocupado por uma porção de água facilmente substituível, deslocada pelo substrato durante a catálise (JUNG, 2011), conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Estrutura geral do citocromo P450. Na figura estão ilustrados os quatro ligantes nitrogenados do macrociclo de porfirina, o cátion radical da porfirina e o ligante tiolato cisteína. Adaptado de JUNG, C. The mystery of cytochrome P450 Compound I A mini-review dedicated to Klaus Ruckpaul. *Biochimica et Biophysica Acta*, Berlin, v.1814, n. 1, p. 46–57, 2011.

1.4 Cinética enzimática no metabolismo de fármacos

No campo do metabolismo de fármacos, há um esforço significativo no tocante à correlação das características farmacocinéticas *in vivo* a partir de dados *in vitro*. Se válida, pode ser utilizada na predição de propriedades farmacocinéticas e o potencial para interação fármaco-fármaco, bem como variabilidades genotípicas e fenotípicas na população. Um componente útil para esta correlação é o conhecimento do perfil de saturação por um fármaco, sendo, portanto, crucial a caracterização de uma enzima de acordo com os seus parâmetros cinéticos (BEZERRA; DIAS, 2007; GOLICNIK, 2011b; KORZEKWA et al., 1998).

Leonor Michaelis e Maud Menten (1913), publicaram um conjunto de equações que acreditavam governar a determinação dos parâmetros cinéticos, baseado no conceito de uma enzima formando um complexo não-covalente com seu substrato antes de catalisar a reação, e, em seguida, dissociando-se a partir do produto, fazendo com que o comportamento cinético de uma enzima seja caracterizado em termos das taxas iniciais de concentração em diferentes substratos (ATAÍDE; HITZMANN, 2009; GOLICNIK, 2010, 2011a; JOHNSON; GOODY, 2011). Este esquema é mostrado na equação 2, abaixo:

Assim, Michaelis-Menten criaram uma teoria que provava ser adequada para esta caracterização, definindo a relação entre velocidade inicial (V_0) e concentração de substrato $[S]$, fator-chave, por meio da análise do efeito de cada um dos fatores que influencia a atividade enzimática, como por exemplo, a concentração da enzima e dos cofatores, pH e temperatura (BEZERRA; FRAGA; DIAS, 2013; JIA; LIU, 2007).

A equação da velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente e com único substrato é uma expressão da relação quantitativa entre a velocidade inicial (V_0), velocidade máxima (V_{max}) e a concentração inicial do substrato $[S]$, todas relacionadas através da constante de Michaelis-Menten (K_m) que é equivalente a concentração de substrato na qual V_0 é igual à metade de V_{max} , e indica a afinidade de uma enzima pelo seu substrato. Quanto menor for o valor de K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. E V_{max} é a taxa máxima de conversão do substrato em produto na concentração de saturação (BLOKH et al., 2007; CALIXTO, 2012), a equação final adaptada por Briggs e Haldane (1925) está mostrada em (3):

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

O efeito da variação de $[S]$ sobre V_0 quando a concentração da enzima é mantida constante está mostrado na Figura 4, (NELSON; COX, 2011), demonstrando-se, assim, uma cinética de saturação, onde a relação entre a velocidade de reação e a concentração de substrato é estabelecida na equação de Michaelis-Menten (GOLICNIK, 2011a; 2011b).

Figura 4 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial de uma reação catalisada por uma enzima. Legenda: $a = V_{max}$, $b = K_m$, eixo x = [substrato], eixo y = V_0 . Adaptado de JUKIC, D.; SABO, K.; SCITOVSKI, R. Total least squares fitting Michaelis–Menten enzyme kinetic model function. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, Amsterdam, v. 201, n. 1, p.230–246, 2007.

Como pode ser visto até agora, um dos pressupostos de Michaelis-Menten é o de que a interação enzima-substrato ocorra por meio de um único sítio ativo, e por muitos anos esse modelo foi utilizado na descrição dos dados cinéticos *in vitro*. No entanto, tornou-se cada vez mais comum o aparecimento de modelos atípicos (não-Michaelis-Menten), como o fenômeno da cooperatividade presente em determinadas enzimas, o qual não pode ser facilmente interpretado utilizando-se o modelo de sítio único e cujas características cinéticas exigem a adoção de um modelo com múltiplos sítios (HOUSTON; GALETIN, 2005; HOUSTON; KENWORTHY, 2000).

Deste modo, Hill (1913) já havia descrito sua equação (4), para caracterizar a ligação cooperativa por meio de um parâmetro, o coeficiente de Hill (h), o qual reflete o número médio de sítios de ligação presentes em uma enzima. Isto porque, originalmente, esta equação foi utilizada na descrição da ligação cooperativa do oxigênio (O_2) e do monóxido de carbono (CO) à hemoglobina, assumindo que ela é composta de muitas subunidades às quais se ligam simultaneamente.

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]^h}{(S_{50})^h + [S]^h} \quad (4)$$

S_{50} é uma constante que compreende a totalidade dos fatores de interação e as constantes de dissociação intrínsecas do complexo enzima-substrato nos h sítios de ligação e que já não é igual ao K_m descrito na equação 3, exceto se $h=1$, sendo utilizada como indicativo de cinética cooperativa (HILL; EISENBERG; CHALOVICH, 1981). Por meio desta equação é possível se obter um comportamento ajustado aos novos fenômenos, evitando a ocorrência de sub ou superestimação da cinética quando se força a aplicação de um modelo hiperbólico como o michaeliano (HOUSTON; GALETIN, 2005; HOUSTON; KENWORTHY, 2000).

1.5 Técnicas cromatográficas empregadas em estudos de metabolismo *in vitro*

1.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG)

Estudos de metabolismo *in vitro* e de caracterização dos parâmetros cinéticos enzimáticos são uma tarefa desafiadora, para tanto, diversos métodos analíticos têm sido empregados, a vantagem advinda de cada um deles dependerá do propósito experimental requerido. Devido à diversidade estrutural apresentada pelos PNs, do ponto de vista da separação, os métodos cromatográficos são eficientes (CHOE et al., 2012; KOSTIAINEN et al., 2003; WU et al., 2013).

O emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) deve-se à sua habilidade em separar e detectar uma ampla gama de compostos presentes em diversos tipos de amostras, por meio da utilização de colunas recheadas (fase estacionária) e uma fase móvel (FM), eluída sob altas pressões (JARDIM, COLLINS, GUIMARAES, 2006). Sua tecnologia está se tornando mais confiável e de fácil utilização, como aprimoramentos podem-se citar: desenvolvimento de diferentes detectores, a diminuição do tamanho das partículas da coluna cromatográfica, a estabilidade química de novas colunas e melhor aceitabilidade de amostra, garantindo melhores separações, tendo como resultado geral maior eficiência, permitindo coletar informações quantitativas e estruturais (MASUDA et al., 2013; PEREZ, 2007; THEODORIDIS et al., 2012; TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009).

A necessidade da realização de análises cada vez mais rápidas levou ao desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), a qual se baseia nos mesmos princípios da CLAE, porém utiliza volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, bombas), detectores com celas que não gerem dispersão da amostra e com altas taxas de aquisição, colunas resistentes a altas pressões, contendo partículas menores que 2 μm , fatores estes que aumentam a resolução e a detectabilidade e diminuem o tempo de análise em comparação a CLAE (CHIARADIA, 2009; MALDANER; JARDIM, 2009), permitindo separações com boa capacidade de pico para matrizes complexas como plasma, urina e fezes, sem perda da resolução cromatográfica e aumento da eficiência de separação (expressa pelo número de pratos teóricos, N), que é inversamente proporcional ao tamanho de partícula (PEREZ, 2007).

Além da cromatografia líquida, emprega-se também a cromatografia gasosa (CG) que é uma técnica analítica bem estabelecida, comumente utilizada para a caracterização e identificação de compostos voláteis. Possui excelente poder de resolução, tornando possível, muitas vezes a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra. Além da excelente resolução, os detectores empregados (ionização de chama ou espectrometria de massa) permitem, muitas vezes, a obtenção de baixos limites de detecção, fator importante na detecção de metabólitos e tornando-a uma ferramenta útil para a análise de amostras biológicas complexas (BONATO, 2006; TISTAERT; DEJAEGHER; HEYDEN, 2011).

Seu princípio de separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). A amostra por meio de um sistema de injeção é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação dessas substâncias (BONATO, 2006).

1.5.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM), devido sua alta sensibilidade analítica, especificidade e exatidão na detecção, é uma abordagem bem sucedida para a

elucidação estrutural de espécies orgânicas (DE JONG; DE VRIES; KEMA, 2011). A utilização da CLAE, bem como a cromatografia gasosa, acopladas a espectrometria de massas (CLAE-EM e CG-EM), permitem a identificação e caracterização de fármacos e seus metabólitos, devido a seletividade apresentada pela primeira (KORFMACHER, 2005; SHI et al., 2013; XU et al., 2012) e o poder de resolução, sensibilidade, reprodutibilidade da segunda (CHOE et al., 2012; FIEHN, 2008; KOPKA, 2006; XIAO; ZHOU; RESSOM, 2012; ZIAREK; VOLKMAN, 2012).

A EM é uma técnica que detecta íons gasosos da amostra de acordo com suas razões massa/carga (m/z). De maneira geral, existem três processos químicos principais pelos quais os íons gasosos podem ser gerados: remoção/adição de um elétron, resultando em íons radicais ($M^{+\bullet}$ ou $M^{\bullet-}$); protonação/desprotonação, levando à formação de moléculas protonadas ($[M+H]^+$)/desprotonadas ($[M+H]^-$) e, cationização/anionização, que resultam em moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$)/anionizadas ($[M+Cl]^-$) (VESSECCHI et al., 2008).

As fontes de ionização mais utilizadas são: ionização por elétrons (IE) e ionização por eletrospray (IES). A primeira gera íons com elevado conteúdo de energia residual interna, com grande número de íons fragmentos, o que é interessante do ponto de vista da elucidação estrutural. Na segunda, o modo de ionização é denominado “suave”, porque uma pequena quantidade de energia é transferida para a amostra, o que resulta em íons com energia residual interna relativamente baixa não sendo suficiente para gerar uma fragmentação significativa. Os espectros se caracterizam pela presença de poucos íons fragmentos e de íons precursores relativamente intensos (CHIARADIA, 2009; VESSECCHI et al., 2008).

Para as reações de biotransformação, a detecção do íon molecular permite a identificação da mudança ocorrida na massa molecular, as mais comuns estão mostradas na Tabela 1, abaixo:

Tabela 1 - Alterações mais comuns introduzidas na massa molecular de uma substância por meio de reações de Fase I (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009).

Biotransformação (Fase 1)	Mudança na fórmula molecular	Mudança de massa (Da)
Descarboxilação	-CO ₂	-43,9898
Desidratação	-H ₂ O	-18,0106
Desmetilação	-CH ₃	-14,0157
Desidrogenação	-H ₂	-2,0157
Hidroxilação	+O	+15,9949
N/S-oxidação	+O	+15,9949
Epoxidação	+O	+15,9949
Hidratação	+H ₂ O	+18,0106

Vários analisadores de massas têm sido utilizados para as análises destas reações de biotransformação, incluindo quadrupolos, armadilhas de íons (*íon trap*), analisador por tempo de voo (TOF), *orbitrap* e analisadores por transformada de Fourier (FTMS). A informação de cada um destes é um pouco diferente, por exemplo, os dados obtidos com quadrupolos e armadilhas de íons (*íon trap*) são de baixa resolução (os íons são distinguidos por uma unidade de massa atômica), enquanto que a partir de TOF, Orbitrap e FTMS é de alta resolução (íons distinguidos com precisão de 0,0001 unidade de massa atômica), fornecendo medições precisas de massas (< 3-5 ppm) que ajudam na interpretação dos dados (KORFMACHER, 2005; PEREZ, 2007; WU et al., 2013) e com isto, tornam-se adequados para determinação do perfil metabólico de um composto, permitindo a

identificação das alterações ocorridas por meio das reações de biotransformação (TOLONEN; TURPEINEN; PELKONEN, 2009), conforme Tabela 1.

A dificuldade em se obter informações estruturais empregando métodos de ionização “brandos” por meio da EM em um único estágio impulsionou o desenvolvimento da espectrometria de massas sequencial (EM/EM), o qual utiliza dois estágios de EM, em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro para estabelecer uma relação entre este íon e os que foram gerados a partir da sua decomposição induzida, sendo utilizado para tal diversas metodologias, como: a varredura dos íons produto (“product-ion scan”), varredura dos íons precursores (“precursor-ion scan”), varredura da contante perda de íons neutros (“constant-neutral-loss scan”) e o monitoramento seletivo de reação (“selected-reaction monitoring”). A EM/EM é amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (CHIARADIA, 2009; VESSECCHI et al., 2008; WU et al., 2013).

2 OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivos determinar os parâmetros cinéticos enzimáticos *in vitro* da piplartina utilizando a fração microssomal de fígado de ratos assim como a determinação de possíveis metabólitos formados, por meio de(a):

- Otimização de uma técnica analítica para quantificação da piplartina;
- Otimização de uma técnica de preparo de amostra para extração da piplartina de microssomas hepático de ratos;
- Validação da metodologia analítica para análise da piplartina em microssomas hepático de ratos;
- Aplicação do método bioanalítico desenvolvido em um estudo de metabolismo *in vitro* visando a determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos da piplartina;
- Determinação e elucidação estrutural dos metabólitos formados.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e solventes

- O alcalóide piplartina empregado nesse projeto foi isolado e fornecido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato (Instituto de Química-USP), a partir de *Piper tuberculatum*.
- O padrão interno (PI) carbamazepina foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Lanchote (Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP Ribeirão Preto).
- Solventes utilizados: hexano, diclometano, clorofórmio, isopropanol, acetato de etila e metanol grau HPLC ou PA (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA; Panreac, Barcelona, Espanha; Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- A água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).
- D-Glicose 6-fosfato monossódico, glicose 6-fosfato desidrogenase tipo VII, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo foram obtidos da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha).
- Fosfato de sódio monobásico anidro PA, NaH_2PO_4 , foi obtido da Synth (Diadema, SP, Brasil).
- HEPES: $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_8$, Tris (base): $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, foram obtidos da J.T. Baker (Phillipsburg, EUA).

3.1.2 Equipamentos

- Agitador de tubos Phoenix AP56 (Araraquara, SP, Brasil).
- Agitador modelo VXR da IKA[®], (Staufen, Alemanha).
- Balanças analíticas (Marte modelo As1000, São Paulo, SP, Brasil; MettlerToledo modelo AG 245, Suíça).
- Banho ultrasom (Unique, modelo Ultracleaner 4050, Piracicaba, SP, Brasil).
- Centrífuga Hitachi CF16RXII, Himac compact centrifuges RXII series (Tóquio, Japão).
- pHmetro (Gehaka, modelo PG1800, Diadema, São Paulo, Brasil).
- Sistema para purificação de água Milli-Q, (Millipore, Bedford, EUA).

3.1.3 Análises cromatográficas

3.1.3.1 Sistemas cromatográficos empregados na otimização da separação e validação da metodologia

Para a otimização do método de análise foi empregado o equipamento de CLAE da marca Shimadzu[®], composto de uma bomba LC-6AD operando a uma vazão de 1 mL min⁻¹, injetor com amostrador de 20 µL, detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M10A VP (190 a 800 nm), controladora SCL-10A VP e forno para coluna modelo CTO-10A VP. As injeções foram realizadas manualmente e o programa

empregado na aquisição dos dados foi o Class VP (Shimadzu, Kioto, Japão). Utilizou-se a coluna cromatográfica Phenomenex[®], Luna C8(2) (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m), no modo fase reversa e a coluna de guarda Agilent[®] (12,5 mm x 4,6 mm d.i., 5 μ m). Como fase móvel, foi utilizado modo de eluição isocrático empregando acetonitrila:água (50:50, v/v).

Para validação da metodologia, determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos e isolamento dos metabólitos foi empregado o equipamento de CLAE da marca Shimadzu[®] (Kioto, 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 diodo SPD-M20A (190 a 800 nm), controladora CBM-20A e forno para coluna modelo CTO-20A. As injeções foram realizadas automaticamente (20 μ L) e o programa empregado na aquisição dos dados foi o Software LC solution, SPD-M20A PDA *utility* (Shimadzu[®], Kioto, Japão).

Utilizou-se a coluna cromatográfica Shim-pack VP-ODS Shimadzu[®] (250 mm x 4,6 mm d.i., 4.6 μ m) e coluna de guarda Shim-pack GVP-ODS Shimadzu[®] (10 mm x 4,6 mm d.i., 4.6 μ m) (Kioto, Japão). Como fase móvel, foi utilizado modo de eluição isocrático acetonitrila 40% e água 60% (v/v).

3.1.3.2 CLUE-DAD-EM/EM

Para a identificação dos metabólitos foi utilizado equipamento de CLUE: Acquity UPLC™-DAD-EM/EM da Waters[®] Corporation (Milford, Massachusetts, EUA), coluna Acquity™ UPLC BEH C18 (*Bridged Ethylsiloxane Hybrid*) (50 mm x 2,1mm, 1,7 μ m) e temperatura de análise de 35°C. Como fase móvel, foi utilizado modo de

eluição por gradiente empregando acetonitrila e água ambos com 1% de ácido acético (v/v), que iniciava com 10% de ACN e atingia 100% em 4 minutos. A vazão empregada foi de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e o volume de injeção de $5 \mu\text{L}$.

As análises por EM foram realizadas no modo positivo utilizando a ionização por *eletrospray* (IES) e um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQ Detector, Waters®). As voltagens do cone e capilar foram, respectivamente, 15 volts e 3 kvolts. A energia de colisão foi de 20 ev e o argônio foi utilizado como gás de colisão. As temperaturas de dessolvatação e da fonte foram, respectivamente, 350°C e 150°C . O programa empregado na aquisição dos dados foi o MassLynx versão 3.5 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.1.3.3 CG-EM

As análises sequenciais de identificação dos metabólitos foram feitas em equipamento CG-EM QP2010 série C704643, equipado com auto injetor AOC-5000, ambos da Shimadzu® (Kioto, Japão). Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida, DB-1MS (30 m x 0,25 mm, $0,25 \mu\text{m}$, Agilent Technologies, J & W Scientific, Folsom, CA, EUA). $1 \mu\text{L}$ foi injetado no modo splitless com temperatura de injeção de 250°C , o intervalo de massas analisadas foi de m/z 40-400, energia de ionização de 70 eV. As análises das amostras teste foram feitas no modo *scan*, sendo empregado hélio como gás de arraste, a uma velocidade linear de $42,9 \text{ cm s}^{-1}$. 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. Após, a temperatura foi aumentada a $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 290°C , permanecendo por 7 minutos. Para as

análises dos metabólitos isolados, foram mantidas as mesmas condições, porém empregando-se modo *split*. Para as análises em modo SIM foram monitorados os íons de m/z 317, m/z 302, m/z 289, m/z 274, m/z 221 para a piplartina, e os íons de m/z 334, m/z 333, m/z 318, m/z 305, m/z 290, para os produtos oxidados.

3.1.3.4 Análise por CLAE-DAD-EM

As análises de identificação dos metabólitos também foram realizadas em equipamento de CLAE da marca Shimadzu® (Kioto, Japão), composto de bombas de alta pressão modelo LC-20AD operando a uma vazão de 1 mL min^{-1} , degaseificador DGU-20A₅, injetor com amostrador de $100 \text{ }\mu\text{L}$ SIL-10AF, detector espectrofotométrico de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A (200 a 600 nm), módulo de comunicação CBM-20A e forno para coluna modelo CTO-20A. As injeções foram realizadas automaticamente ($20 \text{ }\mu\text{L}$). Utilizou-se a coluna cromatográfica Shim-pack VP-ODS Shimadzu® (250 mm x 4,6 mm d.i.), tamanho de partícula $4,6 \text{ }\mu\text{m}$ e coluna de guarda Shim-pack GVP-ODS Shimadzu® (10 mm x 4,6 mm d.i.) (Kioto, Japão). Como fase móvel, foi utilizado um gradiente de acetonitrila e água ambos com 1% de ácido acético (v/v), que iniciava com 10% de ACN e atingia 100% em 30 minutos, a uma vazão de 1 mL min^{-1} .

O equipamento de CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massas micrOTOF II - IES-TOF da marca Bruker Daltonics (Billerica, Massachusetts, EUA). O aparelho utilizado é de alta resolução necessitando de calibração interna antes da realização das análises. Para tanto, foi utilizado uma solução de NA-TFA (ácido trifluoroacético sodiado) na concentração de 10 mg mL^{-1} . Os espectros de IES-EM

foram adquiridos operando em modo positivo, sendo utilizadas as seguintes condições de análise: voltagem do capilar 3500 volts, voltagem do cone (1) 40 volts e do cone (2) 22 volts, temperatura gás de secagem 300°C, a um fluxo de 6,5 L min⁻¹ e pressão de 4,5 Bar. Foi utilizado gás nitrogênio, tanto para nebulização como para secagem. O programa empregado na aquisição dos dados foi o software *Bruker Compass DataAnalysis 4.0* (Bremen, Germany).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo dos microssomas

Seis ratos machos da raça Wistar, pesando entre 180-220 g, com 40 dias de idade, fornecidos pelo biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, foram utilizados para obtenção da fração microssomal dos fígados de ratos. Os animais foram ambientados a 25°C com ciclos de luz de 12 horas, na manhã seguinte foram sacrificados pelo método de decaptação (Protocolo CEUA nº 11.1.1047.53.4, Apêndice 1). Assim, o fígado fresco foi removido e colocado em um béquer com solução tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4), contendo 0,15 mol L⁻¹ KCl. Os fígados foram triturados e lavados três vezes com tampão Tris-HCl. Após isto, estes pedaços foram homogeneizados em homogeneizador tipo “Potter” modelo MA 181 (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil).

Em seguida, o fígado homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 4 °C a 10.000 g (modelo Himac CF16RXII, Hitachi, Tóquio, Japão). O sobrenadante foi coletado e centrifugado em ultracentrífuga a 4 °C por 60 minutos a uma velocidade

de 100.000 g (modelo XL-70, Beckman, Carlsbad, EUA). O *pellet* contendo os microsossomas foi ressuspendido em solução tampão Hepes-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4), contendo 0,001 mol L⁻¹ EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e 20% de glicerol, mantido a -170 °C até o momento do uso. O conteúdo protéico presente na fração microsossomal foi dosado pelo método do biureto empregando o kit para dosagem de proteínas totais (Labtest, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.2.2 Procedimento de incubação para o estudo de metabolismo *in vitro* e preparo das amostras

A mistura de incubação (1 mL) consiste de: 725 µL de tampão fosfato de sódio 0,25 mol L⁻¹ (pH 7,4), 250 µL da solução de incubação contendo NADP⁺ (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) (0,25 mM), glicose-6-fosfato (5 mM) e glicose-6-fosfato desidrogenase (0,5 unidades mL⁻¹) em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4) com 0,15 mol L⁻¹ KCl (MESSIANO et al., 2013), utilizou-se excesso de co-fator, a fim de que não houvesse depleção dos mesmos durante os experimentos.

Adicionou-se a fração microsossomal do fígado de rato, a fim de obter uma concentração protéica de 1 mg mL⁻¹. Este meio foi fortificado com 25 µL das soluções-padrão da piplartina em diferentes concentrações e o procedimento de metabolismo *in vitro* iniciado. A incubação foi realizada sob agitação a 37°C, em banho-maria, modelo SL 157 (Solab, Piracicaba, SP, Brasil) durante 90 minutos.

Decorrido o tempo de incubação, a reação foi encerrada ao adicionar-se 4 mL de solvente orgânico extrator; após agitou-se utilizando o agitador de soluções

modelo AP56 (Phoenix®, Piracicaba, SP, Brasil), durante 20 segundos e, em seguida, no sistema de agitação orbital Vibrax (modelo VRX, IKA®, Staufen, Alemanha) durante 15 minutos a 1000 rpm. Após esta etapa, centrifugaram-se os tubos a 2000 g durante 5 minutos a 5°C, em uma centrífuga modelo Himac CF16RXII (Hitachi, Tóquio, Japão). Retirou-se 3 mL de solvente orgânico e transferiu-o para outro tubo. Por fim, as amostras foram evaporadas até secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos secos foram ressuspensos em 100 µL de fase móvel e levados para análise.

Amostras controles foram realizados contendo microssomas inativos e sem o sistema de regeneração de NADPH, amostras branco também foram realizadas sem adição da piplartina. Ambas foram submetidas ao mesmo procedimento de incubação anteriormente descrito. A diferença entre os valores obtidos com e sem NADPH foi considerada CYP450 mediada.

3.2.3 Procedimento para determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos

A mistura de incubação (1 mL) consiste de: 735 µL de tampão fosfato de sódio 0,25 mol L⁻¹ (pH 7,4), 250 µL da solução de incubação contendo NADP⁺ (fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) (0,25 mM), glicose-6-fosfato (5 mM) e glicose-6-fosfato desidrogenase (0,5 unidades mL⁻¹) em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4) com 0,15 mol L⁻¹ KCl (MESSIANO et al., 2013), utilizou-se excesso de co-fator, a fim de que não houvesse depleção dos mesmos durante os experimentos.

Adicionou-se a fração microssomal do fígado de rato, a fim de obter uma concentração protéica de $0,28 \text{ mg mL}^{-1}$ e o meio foi fortificado com $25 \text{ }\mu\text{L}$ das soluções-padrão da piplartina nas concentrações de: 2,4; 3,9; 6,3; 7,9; 15,8; 19,7; 23,7; 31,6; 39,4; 78,9; 118,3 e $157,7 \text{ }\mu\text{M}$. A incubação foi realizada sob agitação a 37°C , em banho-maria, modelo SL 157 (Solab, Piracicaba, SP, Brasil) durante 16 minutos. Decorrido o tempo de incubação, a reação foi encerrada ao adicionar-se o solvente extrator, hexano. O padrão interno carbamazepina na concentração de $500 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ foi acrescentado nesta etapa. Todo o ensaio foi feito em triplicata sob condição de depleção até o limite de 10% da concentração de substrato (NATH; ATKINS, 2006).

Decorrido o tempo de incubação, a reação foi encerrada ao adicionar-se 4 mL de solvente orgânico extrator, agitou-se utilizando o agitador de soluções modelo AP56 (Phoenix®, Piracicaba, SP, Brasil), durante 20 segundos e, em seguida, no sistema de agitação orbital Vibrax (modelo VRX, IKA®, Stafuen, Alemanha) durante 15 minutos a 1000 rpm. Após esta etapa, centrifugaram-se os tubos a 2000 g durante 5 minutos a 5°C , em uma centrífuga modelo Himac CF16RXII (Hitachi, Tóquio, Japão). Retirou-se 3 mL de solvente orgânico e transferiu-o para outro tubo. Por fim, as amostras foram evaporadas até secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos secos foram ressuspensos em $100 \text{ }\mu\text{L}$ de fase móvel e levados para análise.

3.2.4 Análise da piplartina e dos produtos do seu metabolismo *in vitro* por CLUE-DAD-EM/EM, CG-EM e CLAE-EM de alta resolução

Para determinação do perfil cromatográfico e análise dos produtos do metabolismo *in vitro* empregando CLUE-DAD-EM/EM, utilizou-se uma concentração nominal de piplartina de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração no meio de $19,7 \mu\text{M}$), seguindo-se o procedimento geral descrito no item 3.2.2. Após evaporação do solvente extrator, os resíduos foram solubilizados em acetonitrila:água (1:1, v/v) e levados para análise. Pela análise dos resultados (pouca formação do(s) metabólito(s)) houve a necessidade de alterar o solvente extrator para acetato de etila e o tempo de incubação para 50 minutos.

Para determinação do perfil cromatográfico e análise dos produtos do metabolismo *in vitro* empregando CG-EM, utilizou-se uma concentração nominal de piplartina de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração no meio de $157,7 \mu\text{M}$). A fim de se conseguir detectar os produtos formados, foram realizados experimentos em escala ampliada. Dessa forma, foi inicialmente preparado um *pool* de 10 replicatas para as amostras teste, controle e branco seguindo-se o procedimento geral descrito no item 3.2.2. Acetato de etila foi utilizado como solvente extrator e, o tempo de incubação foi de cinquenta minutos. Após evaporação do solvente extrator, os resíduos foram solubilizados em $100 \mu\text{L}$ de acetato de etila e encaminhados para análise. Pela análise dos resultados houve a necessidade de aumentar a concentração dos produtos na amostra, então se repetiu o experimento, porém agora com *pool* de 30 replicatas.

Para determinação do perfil cromatográfico e análise dos produtos do metabolsimo *in vitro* empregando CLAE-EM em alta resolução, utilizou-se uma

concentração nominal de piplartina de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração no meio de $157,7 \mu\text{M}$). A fim de se conseguir detectar os produtos formados, foi preparado um *pool* de 10 replicatas para as amostras teste, controle e branco seguindo-se o procedimento geral descrito no item 3.2.2. Acetato de etila foi utilizado como solvente extrator e o tempo de incubação foi de cinquenta minutos. Após evaporação do solvente extrator, os resíduos foram solubilizados em $100 \mu\text{L}$ de acetato de etila e encaminhados para análise.

3.2.5 Validação da Metodologia Bioanalítica

A metodologia bioanalítica para quantificação da piplartina em microssomas hepático de ratos foi desenvolvida e validada segundo os critérios definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) pela avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade. Na validação foi empregada a padronização interna, sendo utilizado para isto a carbamazepina como padrão interno (BEZERRA, 2008, BEZERRA et al., 2012).

Toda validação foi realizada empregando microssomas hepático de ratos “branco” como matriz e a ELL previamente otimizada. As soluções-padrão de piplartina utilizadas foram preparadas em metanol, na concentração de 30; 100; 250; 500 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de uma solução estoque também preparada em metanol na concentração de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram armazenadas a temperatura de -18°C e protegidas da ação da luz. A solução padrão de carbamazepina foi preparada em metanol na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.5.1 Seletividade

A seletividade refere-se à habilidade de um método em determinar um analito específico em uma mistura complexa, sem a interferência de outros componentes presentes. Segundo a ANVISA (2012), os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do limite inferior de quantificação (LIQ) e as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito e do PI devem ser inferiores a respectivamente 20% e 5% da resposta do analito nas amostras do LIQ. Com a finalidade de avaliar a capacidade do procedimento de preparo de amostra em eliminar interferentes, foram analisados brancos da fração microssomal de fígado de ratos sem a adição do analito e do PI.

3.2.5.2 Linearidade

A linearidade do método proposto foi avaliada através da fortificação de 1 mL do meio microssomal com 25 μL das soluções-padrão de piplartina nas concentrações de 30; 100; 250; 500; 1000 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo-se assim concentrações finais no meio de 2,4; 7,9; 19,7; 39,4; 78,9 e 157,7 μM respectivamente. Após fortificação, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração e analisadas por CLAE/DAD. O quociente área do pico do analito pela área do pico do PI foi determinado e colocado no eixo das ordenadas e as concentrações do analito foram colocadas no eixo das abcissas. A análise de regressão utilizada foi a dos mínimos quadrados, onde a variável independente refere-se à concentração teórica da piplartina na matriz. A regressão foi

representada pela equação da reta e pelo coeficiente de correlação (r). Além disso, a linearidade da curva analítica foi avaliada pela análise do teste F para a falta de ajuste (*Lack of Fit*) utilizando um valor de p de 0,05 como estatisticamente significativo. Os cálculos estatísticos foram realizados empregando o programa MINITAB Release versão 14.1 (State College, PA EUA).

3.2.5.3 Limite de quantificação

Os resultados das corridas analíticas, foram determinados a partir da fortificação de 1 mL de meio microssomal com solução padrão de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de piplartina resultando em uma concentração final no meio de $2,4 \mu\text{M}$. Essas amostras foram analisadas com base em uma curva analítica preparada contemplando a faixa constante no item 3.2.5.2.

3.2.5.4 Exatidão inter- e intra-ensaio

A exatidão foi determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-ensaio) e em três corridas diferentes (exatidão interensaio). Os ensaios de exatidão inter- e intra-ensaio foram realizados empregando quatro concentrações: (i) LIQ, (ii) baixa ($7,9 \mu\text{M}$), (iii) média ($39,4 \mu\text{M}$) e (iv) alta ($78,9 \mu\text{M}$) ($n = 8$). Em cada dia de ensaio era realizada uma nova curva analítica para a quantificação das amostras. A exatidão foi expressa pelo erro relativo padrão (E,%), conforme a Equação 5, não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o

qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal, (ANVISA, 2012). Os cálculos para avaliar a exatidão intra- e interensaio foram baseados em curvas analíticas, processadas diariamente da mesma forma que as amostras.

$$E (\%) = \frac{(\text{valor obtido} - \text{valor real})}{\text{valor real}} \times 100 \quad (5)$$

3.2.5.5 Precisão inter e intra-ensaio

A precisão foi determinada em uma mesma corrida (precisão intra-ensaio) e em três corridas diferentes (precisão interensaio). Os ensaios de precisão inter- e intra-ensaio foram realizados empregando quatro concentrações: i) LIQ, (ii) baixa (7,9 μM), (iii) média (39,4 μM) e (iv) alta (78,9 μM) ($n = 8$). Em cada dia de ensaio era realizada uma nova curva analítica para a quantificação das amostras. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR), conforme a Equação 6, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (ANVISA, 2012).

$$\text{DPR} (\%) = (s/M) \times 100 \quad (6)$$

- S- desvio padrão absoluto de replicatas para cada concentração.
M- média aritmética dos valores obtidos das replicatas para cada concentração.

3.2.5.6 Recuperação

A recuperação do analito extraído do meio microssomal nas concentrações de 7,9; 39,4 e 78,9 μM ($n = 5$) foi determinada comparando-se as áreas obtidas destas amostras com as áreas dos analitos não submetidos à extração ($n = 3$) destas mesmas concentrações e seu resultado foi expresso em percentagem de extração do analito, conforme a equação 7. Os resultados da recuperação foram também avaliados pelo desvio padrão relativo (DPR), sendo considerados aceitável valores inferiores a 15% (ANVISA, 2012).

$$\text{Recuperação (\%)} = (M_1 \times 100 / M_2) / 0,75 \quad (7)$$

M_1	Média das áreas do analito submetido a extração;
M_2	Média das áreas do analito não submetidos a extração;
0,75	Valor de correção uma vez que foram pipetados 4 ml de solvente extrator e utilizados apenas 3 ml após centrifugação.

3.2.5.7 Estabilidade

Foram avaliadas as estabilidades de bancada, de incubação e de auto-injetor para as concentrações baixa (7,9 μM) e alta (78,9 μM). Essas amostras foram quantificadas empregando uma curva analítica preparada no dia de análise e os resultados obtidos foram expressos como erro relativo (E,%) e desvio padrão relativo (DPR,%). Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata para cada concentração avaliada.

Para avaliar a estabilidade de bancada, as amostras no meio microssomal foram mantidas a temperatura ambiente ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) durante 7 horas, para só então seguirem com o procedimento de extração e análise. A estabilidade de incubação foi

avaliada utilizando amostras incubadas a 37°C durante 90 minutos, em meio microssomal e ao fim procedendo-se com a extração e análise. Para a estabilidade de auto-injetor, as amostras foram preparadas concomitantemente à curva analítica, mantidas dentro do amostrador e só então injetadas 24h após a análise da última corrida do dia. Foi investigada também a estabilidade do analito e do PI nas soluções-estoque. Para tanto, as análises foram realizadas após 30 dias de preparo. Os resultados obtidos foram comparados com as soluções estoque recém-preparadas.

3.2.6 Determinação estrutural dos produtos da reação no meio microssomal

As estruturas dos produtos do metabolismo *in vitro* da piplartina foram determinadas utilizando dados obtidos em espectros de massas de baixa resolução (CLUE-DAD-EM/EM) com ionização por eletrospray; cromatografia gasosa (CG-EM) com ionização por elétrons e espectros de massas em alta resolução (micrOTOF II - IES-TOF) com ionização por eletrospray, a fim de confirmar a estrutura dos compostos através de sua massa exata. Além disso, os resultados foram comparados frente aos reportados na literatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização de um método para análise da piplartina por cromatografia líquida de alta eficiência

Na otimização do método para análise cromatográfica foram avaliadas diferentes composições da fase móvel (acetonitrila:água), para uma mesma coluna (Phenomenex[®], Luna 5u C8(2)). A melhor condição, com menor tempo, foi obtida empregando fase móvel composta por acetonitrila:água (50:50, v/v), vazão de 1 mL min⁻¹ e controle de temperatura de 32°C. Nessas condições, o tempo de retenção (t_R) da piplartina foi de 7 minutos. Para a condição acetonitrila:água (70:30, v/v), o analito apresentou t_R = 4 minutos, muito próximo ao volume morto da coluna. A condição acetonitrila:água (40:60, v/v), analito em t_R = 13 minutos, também poderia ser escolhida, porém um maior tempo representa maior interação com a coluna e possibilidade da ocorrência de alargamento de pico; estes resultados estão mostrados na Figura 5 e Apêndice 2. Dessa forma, a condição escolhida para análise da piplartina, inicialmente, foi acetonitrila:água (50:50, v/v).

Figura 5 - Condições cromatográficas obtidas para análise da piplartina. Coluna C8(2) (250 mm x 4,6 mm), vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹. O comprimento de onda foi fixado em 325 nm. Volume injetado: 20 µL. Fase móvel acetonitrila:água 70:30, (v/v) (—), 50:50, (v/v) (—), 40:60, (v/v) (—). Concentração da amostra: 100 µg mL⁻¹ (—) (—) e 1000 µg mL⁻¹ (—).

4.2 Otimização de um método de preparação de amostras para extração da piplartina de microssomas hepático de ratos

Fixada a melhor condição cromatográfica para análise da piplartina, foi necessário estabelecer uma técnica para sua extração da fração microssomal de fígado de ratos. Para tanto, foi avaliado a ELL, considerando-se a quantidade recuperada do analito do meio microssomal e a presença de interferentes no cromatograma após a extração com cada solvente.

Dessa forma, foram avaliados os seguintes solventes: hexano, clorofórmio, diclorometano e a mistura hexano:isopropanol (80:20, v/v). O melhor resultado obtido foi empregando o hexano como solvente extrator, Figura 6. Na análise do

branco (extração realizada com microssomas inativos, sem a presença do analito), não foi observado qualquer interferente no tempo de retenção da piplartina.

O hexano mostrou-se mais seletivo, comparativamente aos outros solventes, não apresentando interferentes no cromatograma. Empregando o clorofórmio ocorreu a formação de emulsão, a qual dificultou a recuperação da fase orgânica, além disso, apareceram muitos interferentes, em uma região onde poderia aparecer o analito e/ou metabólitos, não sendo possível a extração da piplartina em nenhuma das triplicatas analisadas, Figura 7.

Partindo-se destes resultados, efetuou-se uma nova extração utilizando somente hexano, a fim de se otimizar o volume do solvente extrator, o tempo de extração e analisar o efeito *salting out*, conforme mostrado nas Figuras 8, 9 e 10 respectivamente. Para cada uma destas análises, foi efetuado um branco em duplicata para verificação da presença de algum interferente.

Figura 6 - Gráfico de avaliação dos solventes para extração da piplartina. Em todos foi utilizado volume de 4 mL, tempo de agitação de 15 minutos, velocidade de agitação 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado 20 μL . Concentração da piplartina: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas na Figura 5.

Figura 7 - Extrações empregando clorofórmio (—), diclorometano (—), hexano:isopropanol (80:20 v/v) (—) e hexano (—) 4 mL. Tempo de agitação 15 minutos. Velocidade de agitação 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado 20 μL . Concentração da piplartina: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas na Figura 5.

Figura 8 - Avaliação do volume de solvente para extração da piplartina. Tempo de agitação de 15 minutos, velocidade de agitação 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado 20 μL . Concentração da piplartina: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas na Figura 5.

Figura 9 - Avaliação do tempo de agitação para extração da piplartina. Velocidade de agitação 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado 20 μL . Concentração da piplartina: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas na Figura 5.

Figura 10 - Avaliação do efeito *salting out* na extração da piplartina. Volume de solvente extrator: 4 mL. Tempo de extração: 15 minutos. Velocidade de agitação: 1000 rpm. Detecção em 325 nm. Volume injetado: 20 μL . Concentração da piplartina: 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Condições cromatográficas descritas na Figura 5.

Pelos resultados apresentados, percebeu-se que com volume de 4 mL e tempo de agitação de 15 minutos, obteve-se uma melhor extração da piplartina do

meio microssomal. A análise do branco não mostrou nenhum interferente. Em relação ao efeito *salting out*, Figura 10, não houve diferença significativa entre as extrações realizadas com diferentes percentuais de NaCl. Tal efeito está baseado na capacidade do sal em diminuir a solubilidade de uma substância orgânica em água e consequentemente aumentar sua distribuição no solvente orgânico (WANG; CAI; XU, 2011).

Ao final destas avaliações, definiu-se como condição ótima: utilização de 4 mL de hexano, tempo de agitação de 15 minutos, a 1000 rpm. Após extração, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2000 g e 3 mL do sobrenadante foi evaporado até a secura total. Toda otimização foi realizada em triplicata, na ausência de PI.

4.3 Validação da metodologia analítica

Métodos bioanalíticos incluem os métodos utilizados no monitoramento de fármacos em fluidos biológicos para diferentes propósitos: 1) avaliar a farmacocinética e o metabolismo de candidatos a fármacos, 2) comparar os perfis farmacocinéticos de novas formulações, 3) estabelecer esquemas apropriados de dosagem, a fim de se minimizar efeitos adversos e 4) determinar fármacos de abuso e seus metabólitos em ciência forense. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos que sejam rápidos e efetivos, preenchendo os requerimentos estabelecidos nos guias de validação (ICH, 2005; NOVÁKOVÁ; VLCKOVÁ, 2009). Desta forma, a validação deve demonstrar que o método responde de forma adequada para o propósito ao qual é aplicado. É essencial que

os estudos de validação sejam representativos, cobrindo uma ampla faixa de concentrações dentro do escopo do método (ARAUJO, 2009).

4.3.1 Seletividade

Após otimização da condição de extração, partiu-se para a validação do método, iniciando-se com a avaliação da seletividade, por meio da análise de meios microssomais sem a adição do analito e do PI, a fim de se verificar a presença de algum interferente eluindo no mesmo tempo de retenção dos mesmos. Como pode ser observado no Apêndice 3, a técnica de preparação de amostras foi seletiva, possibilitando uma limpeza adequada da mesma, como pode ser evidenciado pela ausência de interferentes nos tempos de retenção do analito e PI, Apêndice 4.

4.3.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método, dentro de um determinado intervalo de concentração, em obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ARAUJO, 2009).

Devem ser construídas e avaliadas, no mínimo, três curvas de calibração que incluam a análise da amostra branco, da amostra zero e de, no mínimo 6 amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de PI. Apresentar a equação que representa a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito. Caso a variância do erro não seja

constante em toda a faixa de quantificação do método analítico, deve ser utilizada a ponderação que apresentar o menor valor para soma dos erros relativos dos valores nominais dos padrões de calibração *versus* seus valores obtidos pela equação da curva. Os padrões de calibração estão aprovados quando apresentarem desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para os padrões do LIQ, e desvio menor ou igual a 15% em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração (ANVISA, 2012).

Mediante a análise de resíduos da curva, a mesma apresentou comportamento heterocedástico e para tanto os valores precisaram ser ponderados (peso = $1/x$). O método atendeu às especificações descritas, tendo sido linear nas concentrações avaliadas, com coeficiente de correlação maior que 0,99. A equação da reta obtida foi $y = 0,0934x + 0,0027$, onde y representa a razão entre a área do pico da piplartina e do PI, e x representa a concentração da piplartina. As análises dos seis padrões de calibração ($n = 8$) apresentaram desvio menor que 20% em relação à concentração nominal do LIQ (2,4 μM) e desvio menor que 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva analítica, conforme preconizado pela ANVISA (2012). Além disso, o teste para falta de ajuste (*Lack of Fit*) apresentou valor F inferior ao recomendado, indicando que não há falta de ajuste. A Tabela 2 mostra a equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 2 - Linearidade do método ($n = 8$).

Analito	<i>Lack of Fit</i> ^b				
	Faixa (μM)	Equação Linear	r^a	F	p
Pipltartina	2,4 – 157,7	$y = 0,0934x + 0,0027$	0,9975	1,87	0,138

^a Coeficiente de Correlação.^b $F_{\text{valor}} = 1,87 < F_{\text{tabelado}} = 3,69$.

4.3.3 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação (LIQ) é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão (expressa pelo desvio padrão relativo-DPR,%) e exatidão (expressa pelo erro relativo padrão-E,%), inferiores a 20% pela análise de amostras de concentração conhecida do analito e estabelecendo-se o nível mínimo (ALEGRE; ROMERO; BROCH, 2012).

Os resultados das corridas analíticas, fortificadas com 2,4 μM de pipltartina ($n = 8$), permaneceram dentro dos critérios exigidos pela ANVISA, sendo esta resposta identificável e reprodutível com desvio padrão relativo e erro relativo inferior a 20% (Tabela 3).

Tabela 3 - Limite de quantificação ($n = 8$).

Analito	Limite de Quantificação			
	Concentração	Concentração Obtida	E, % ^a	DPR, % ^b
Pipltartina	(μM)	(μM)		
	2,4	2,4	0	7

^a Erro Relativo expresso em porcentagem.^b Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

4.3.4 Precisão e Exatidão intra-ensaio e interensaio

A exatidão é o grau de concordância entre o valor verdadeiro ou de referência aceito e o valor encontrado. Assim, a determinação da exatidão permite estimar o grau em que os erros sistemáticos afetam um método em especial (ALEGRE; ROMERO; BROCH, 2012). A precisão expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea sob as condições prescritas. É geralmente expressa como estimativa desvio padrão relativo ou coeficiente de variação de uma série de medições (ALEGRE; ROMERO; BROCH, 2012).

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados empregando quatro concentrações: LIQ, baixa, média e alta ($n = 8$), conforme descrito nas seções 3.2.5.4 e 3.2.5.5. Como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5, todos os valores para precisão e exatidão ficaram inferiores ao recomendado pela legislação (ANVISA, 2012).

Tabela 4 - Precisão e Exatidão intra-ensaio ($n = 8$).

Analito	Concentração (μM)	Concentração Obtida (μM)	E, % ^a	DPR, % ^b
Piplartina	2,4	2,4	0	7
	7,9	7,8	-1	5
	39,4	41,3	5	5
	78,9	76,5	-3	8

^a Erro Relativo expresso em porcentagem.

^b Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

Tabela 5 - Precisão e Exatidão interensaio ($n = 8$).

Analito	Concentração (μM)	Concentração Obtida (μM)	E, % ^a	DPR, % ^b
Piplartina	2,4	2,4	0	6
	7,9	8,0	1	5
	39,4	38,9	-1	7
	78,9	77,4	-2	7

^a Erro Relativo expresso em porcentagem.^b Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

4.3.5 Recuperação

O ensaio de recuperação foi realizado para avaliar a eficiência do método de extração da amostra, refletindo a quantidade de analito que é recuperado em um procedimento de extração em relação à quantidade real presente na amostra. Isto porque durante o procedimento de preparo de amostras podem ocorrer perdas por extração incompleta, adsorção, perda de volume ou co-precipitação. Uma boa otimização das condições de extração pode diminuir as perdas dos analitos durante o procedimento (BORGES, 2010).

A recuperação do analito extraído do meio microssomal nas concentrações de 7,9; 39,4 e 78,9 μM ($n = 5$) foi determinada comparando-se as áreas obtidas destas amostras com as áreas dos analitos não submetidos à extração ($n = 3$) destas mesmas concentrações. Em todas as concentrações avaliadas o DPR (%) foi inferior ao recomendável pela legislação (Tabela 6).

Tabela 6 - Recuperação ($n = 5$).

Piplartina (μM)	Recuperação	Precisão
	(%)	DPR, % ^a
7,9	83	6
39,4	81	3
78,9	91	6

^a Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

4.3.6 Estabilidade

Segundo a ANVISA (2012), as condições de realização dos estudos de estabilidade devem reproduzir as condições de armazenamento, preparo e análise das amostras em estudo, devendo utilizar um conjunto de amostras de matriz biológica adicionadas de soluções do analito e PI. Devem ser empregadas no mínimo três amostras de controle de qualidade nas concentrações baixa e alta, as quais devem ser analisadas imediatamente após sua preparação e após serem submetidas às condições de ensaio aplicáveis. Devem ser empregadas apenas amostras cujo resultado da análise imediatamente após sua preparação estiver dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal, as concentrações das amostras devem ser determinadas por meio de uma curva analítica recém-preparada e assim, a estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal (ALEGRE; ROMERO; BROCH, 2012).

Foram avaliadas as estabilidades de bancada, de incubação e de auto-injetor para as concentrações baixa (7,9 μM) e alta (78,9 μM). Essas amostras foram quantificadas empregando uma curva analítica preparada no dia da análise e os

resultados obtidos foram expressos como erro relativo (E,%) e desvio padrão relativo (DPR,%). Todos os experimentos foram realizados em quintuplicata para cada concentração avaliada. Nesses ensaios, somente a estabilidade de auto-injetor apresentou valores de E,% $\leq 15\%$, Tabela 7.

Tabela 7 - Estabilidade de bancada, de incubação e de auto-injetor ($n = 5$).

Piplartina (μM)	Bancada 7h		37 °C, 90 minutos		Auto-injetor (24h)	
	E ^a ,%	DPR ^b ,%	E,%	DPR,%	E,%	DPR,%
7,9	-18	12	-30	4	-4	7
78,9	-20	5	-28	7	-7	4

^a Erro Relativo expresso em porcentagem.

^b Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

Em virtude da estabilidade de incubação (37°C, 90 minutos) e de bancada terem apresentado valores de E,% acima do limite preconizado, partiu-se para a análise de uma nova estabilidade de incubação comparando-se as mesmas concentrações (7,9 e 78,9 μM) concomitantemente submetidas à incubação e não submetidas para os tempos de 0, 10, 30, 50, 70 e 90 minutos. Além disso, uma nova estabilidade de bancada foi realizada, onde foram deixadas sob a bancada durante 5 e 6 horas, a fim de se verificar até onde a piplartina no meio microssomal, manter-se-ia estável.

Conforme mostrado na Tabela 8, até o tempo de incubação de 50 minutos a amostra mantém-se estável, apresentando valores de E,% dentro do preconizado. Para os tempos de 70 e 90 minutos, as amostras confirmaram sua instabilidade à 37°C (Tabela 8). Já os novos resultados da estabilidade de bancada confirmaram que a piplartina é estável somente até 6 horas em contato com os microssomas

hepáticos, apresentando valores de E,% dentro do aceitável pela legislação (Tabela 9).

Tabela 8 - Estabilidade de incubação, comparativamente a amostras não incubadas, em diferentes tempos ($n=5$).

CONDICÃO	NÃO INCUBADAS				INCUBADAS			
	7,9 μ M		78,9 μ M		7,9 μ M		78,9 μ M	
	E,% ^a	DPR,% ^b	E,%	DPR,%	E,%	DPR,%	E,%	DPR,%
TEMPO (minutos)								
0	0	7	-2	4	-	-	-	-
10	-10	8	-5	8	-11	1	-9	4
30	-11	2	-2	6	-12	6	-8	4
50	-13	5	12	5	-8	3	-3	6
70	-11	12	-15	6	-23	1	-20	2
90	-13	11	-14	6	-28	2	-16	5

^a Erro Relativo expresso em porcentagem.

^b Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

Tabela 9 - Estabilidade de bancada ($n=5$).

Piplartina (μ M)	Bancada		Bancada		Bancada	
	7h		6h		5h	
	E ^a ,%	DPR ^b ,%	E,%	DPR,%	E,%	DPR,%
7,9	-18	12	2	10	-7	11
78,9	-20	5	-12	3	-15	3

^a Erro Relativo expresso em porcentagem.

^b Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

Avaliou-se também a estabilidade destas soluções após 30 dias do seu preparo, e como pode ser observado na Tabela 10, o erro e desvio padrão ficaram dentro do aceitável, $\leq 15\%$.

Tabela 10 - Estabilidade de 30 dias ($n=5$).

Analito	Concentração	(E,%) ^a	DPR,% ^b
	(μM)	Estabilidade de 30 dias	
Piplartina	7,9	-8	6
	78,9	-15	5

^a Erro Relativo expresso em porcentagem.^b Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem.

4.4 Metabolismo *in vitro*

4.4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos

Devido o fato de [S] modificar-se durante uma reação *in vitro* na medida em que é convertido em produto, e dada a possibilidade de ocorrência de reações no sentido inverso e inibição da enzima pelos produtos formados, em cinética enzimática é habitual medir-se a taxa inicial de uma reação (V_0), monitorando-se as taxas de consumo do substrato, utilizando uma ampla faixa de concentração, sob condições que obedeçam ao requerimento de menos que 10% de sua depleção e que sejam lineares com respeito ao tempo de incubação e à concentração de proteínas microssomais, pois se apenas o início for monitorado, a mudança em [S], limita-se a alguns poucos por cento, sendo considerada constante (BEZERRA; FRAGA; DIAS, 2013; MOHUTSKY et al., 2006; NATH; ATKINS, 2006).

Uma vez validado o método, partiu-se para a determinação dos parâmetros cinéticos da piplartina frente às enzimas do CYP presentes na fração microssomal de fígado de ratos e assim obteve-se uma indicação do seu perfil metabólico.

A concentração de proteínas no meio microssomal é um indicativo da concentração de enzimas do citocromo P450. As velocidades do metabolismo mediado pelo CYP normalmente apresentam comportamentos lineares em relação à concentração de proteínas na faixa de 0,2 - 2,0 mg mL⁻¹ (CALIXTO, 2012; SIMOES, 2012; ZHANG; KAMINSKI, 2008). Para a definição de um intervalo linear, foi realizado experimento avaliando as seguintes concentrações de proteína: 0; 0,025; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 mg mL⁻¹ ($n = 3$). A concentração nominal de substrato utilizada foi de 250 µg mL⁻¹ (concentração no meio 19,7 µM). A carbamazepina foi utilizada como PI na concentração de 500 µg mL⁻¹. Nesse intervalo avaliado, o consumo de substrato foi linear ($r = 0,97$) (Figura 11). A fim de se chegar à condição de V_0 , escolheu-se o valor na reta correspondente a depleção de substrato de 10%, o qual correspondeu a 0,28 mg mL⁻¹ de concentração protéica.

Figura 11 - Intervalo linear para o consumo da piplartina em função da concentração de proteínas microssomais no meio de incubação. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4, tempo de incubação 50 minutos. Equação da reta: $y = -0,4122x + 1,354$, $r = 0,97$. Condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS Shimadzu® (250 mm x 4,6 mm, 4,6 µm), vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹. Volume injetado: 20 µL. Fase móvel acetonitrila:água 40:60, (v/v).

Definida a concentração de proteínas microsossomais, o próximo passo foi estabelecer o intervalo linear para o tempo de incubação. Para tanto, foi empregado, inicialmente, o seguinte intervalo de tempo: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 minutos ($n = 3$). A concentração nominal de substrato utilizada nestes experimentos foi de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração no meio $19,7 \mu\text{M}$). A carbamazepina foi utilizada como PI na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nesse experimento, o melhor valor de linearidade foi atingido no intervalo entre 10-50 minutos o qual resultou em uma equação da reta com coeficiente de correlação de 0,98 (Figura 12). A fim de se chegar à condição de V_0 , escolheu-se o valor na reta correspondente a depleção de substrato de 10%, o qual resultou em 16 minutos.

Figura 12 - Definição do intervalo linear para o consumo da piplartina em função do tempo de incubação. Temperatura de incubação 37°C , pH do meio 7,4, concentração de proteínas microsossomais $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ de meio de incubação. Equação da reta: $y = -0,006911x + 1,1212$, $r = 0,98$. Condição cromatográfica descrita na Figura 11.

Estabelecidas as condições lineares para a quantidade de proteínas microsossomais ($0,28 \text{ mg mL}^{-1}$), bem como para o tempo de incubação (16 minutos),

partiu-se para a determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos, conforme descrito no item 3.2.3.

A plotagem da taxa de reação (V_0) *versus* a concentração $[S]$ de piplartina apresentou um perfil de saturação sigmoidal (Figura 13), desviando-se da cinética hiperbólica descrita por Michaelis–Menten. Os valores das constantes cinéticas foram estimados por meio do ajuste não linear da curva (*non-linear curve-fitting*).

Figura 13 - Gráfico da cinética enzimática após incubação da piplartina por 16 minutos, empregando $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas microsossomais. Temperatura de incubação 37°C , pH do meio 7,4. Condição cromatográfica descrita na Figura 11.

Este desvio do comportamento hiperbólico descrito por Michaelis-Menten, indica que efeitos de cooperatividade podem ter lugar no metabolismo oxidativo da piplartina. A cooperatividade no citocromo P450 foi observada em 1980 e é relacionada à existência de isoformas cineticamente distintas e diferentes locais de ligação do substrato (TORRES; ABURTO, 2005). A cooperatividade utilizando modelo microsossomal já foi demonstrada em outros trabalhos (DI MARCO et al.,

2005; NIWA et al., 2008; MOREIRA et al., 2013). Por conseguinte, este perfil pode estar relacionado com a multiplicidade de ligação da piplartina dentro do sítio ativo da enzima (FERNANDO; HALPERT; DAVYDOV, 2006).

Os parâmetros cinéticos apresentaram os seguintes valores: $S_{50} = 44,69 \pm 0,32 \mu\text{M}$, $V_{max} = 4,74 \pm 0,26 \mu\text{M}/\mu\text{g mL}^{-1}/\text{min}$ e coeficiente de Hill = $2,53 \pm 0,37$. No presente caso, $S_{50} = 44,69 \pm 0,32 \mu\text{M}$ é a concentração de substrato para a qual a enzima está hemisaturada e em que a velocidade (V_0) é metade de $V_{max} = 4,74 \pm 0,26 \mu\text{M}/\mu\text{g mL}^{-1}/\text{min}$, porém não é uma constante de ligação por si só, mas uma combinação das constantes de ligação reais. O coeficiente de Hill, $h = 2,53 \pm 0,37$, indica o número mínimo de sítios de ligação na enzima e não o real, o qual não pode ser inferior a ele (DENISOV; FRANK; SLIGAR, 2009). No presente caso, a isoenzima possui no mínimo 3 sítios para ligação com a piplartina.

De fato, vários autores descobriram que as enzimas do CYP são capazes de acomodar substratos de diferentes tamanhos, desde moléculas com pesos moleculares $> 1000 \text{ Da}$, até duas ou três moléculas orgânicas menores ao mesmo tempo em seu sítio ativo, devido à presença de “bolsos” de ligação grandes e flexíveis. Os substratos podem ser da mesma molécula ou de diferentes sendo que, a partir disto, diferencia-se a cinética cooperativa em homotrópica ou heterotópica, respectivamente (DENISOV; FRANK; SLIGAR, 2009; TORRES; ABURTO, 2005).

A fim de se confirmar este comportamento foi realizado um ajuste para o gráfico de Eadie-Hofstee, o qual relaciona a velocidade da reação enzimática pela razão entre a velocidade e a concentração de substrato. Para uma enzima que apresenta comportamento do tipo Michaelis-Menten é esperado que seja formada uma reta com inclinação $-K_m$, intersecção nos eixos x (V_{max}/K_m) e y (V_{max}). No entanto, quando ocorre desvio da linearidade, sugere-se que o substrato interfere na

ligação de outro com a enzima, levando ao fenômeno da cooperatividade (SOARES, 2011). Quando os valores de $h > 1$ (cooperação positiva) o gráfico de Eadie-Hofstee apresenta-se convexo (HOUSTON; GALETIN, 2003), como apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Gráfico de Eadie-Hofstee para cinética da piplartina. Condição cromatográfica descrita na Figura 11.

Para a medida da atividade de uma enzima frente a uma substância e posterior correlação *in vitro-in vivo*, utiliza-se o valor do *clearance* intrínseco (CL_{int}), porém devido ao desvio do comportamento Michaeliano apresentado, há necessidade de adequação do cálculo. A alternativa utilizada é a determinação do *clearance* máximo (CL_{max}), mostrado na Equação 8, o qual fornece uma estimativa do *clearance* quando a enzima é completamente ativada antes que ocorra a saturação (HOUSTON; KENWORTHY, 2000; HOUSTON; GALETIN, 2003; HUANG et al., 2004), no presente caso, o $CL_{max} = 0,054 \mu\text{L/min/mg}$ proteína.

$$CL_{\max} = \frac{V_{\max}}{S_{50}} \times \frac{(n-1)}{n(n-1)^{1/n}} \quad (8)^*$$

*onde tem n , leia-se h (coeficiente de Hill).

A maioria dos exemplos relatados contendo comportamento cooperativo tem sido atribuídos à isoforma CYP3A4, embora algumas CYP's como a CYP1A2, CYP2C9 e a CYP2E1 também tenham demonstrado (DENISOV et al., 2007; DENISOV; FRANK; SLIGAR, 2009; TORRES; ABURTO, 2005; STONE et al., 2003). A maioria das isoformas presentes em ratos são CYP3A2, CYP2C11, CYP1A1/1A2, CYP2E1, CYP2D1 e CYP2B1/2. Entre elas, a CYP3A2 (correspondente a CYP3A4 humana), a CYP2C11 (correspondente a CYP2C9 humana) and CYP1A1/1A2 (correspondente a CYP1A2 humana) representam mais de 60% do total das enzimas do CYP presentes (BROWN; REISFELD; MAYENO, 2008; MESSIANO et al., 2013), as quais podem estar envolvidas na biotransformação da piplartina. Contudo, estudo mais detalhado, empregando isoformas isoladas ou inibidores para isoformas específicas deve ser feito e assim se chegar à respectiva isoforma responsável pelo metabolismo.

4.4.2 Determinação estrutural da piplartina e de seus produtos de oxidação por IES-EM/EM e EI-EM

4.4.2.1 Análises por IES-EM de alta resolução e IES-EM/EM

Conforme pode ser visto nos cromatogramas (Figura 15) há um pico em $t_R = 2,79$ minutos nas amostras teste e controle, que não apareceu na amostra branco e cuja fragmentação por IES-EM/EM (Figura 16), apresenta um pico íon molecular de m/z 318 e um pico base de m/z 221 (íon acílio), referentes à piplartina. A maioria dos picos base se refere a íons em cuja carga está estabilizada pela interação de um orbital de um heteroátomo (N ou O) com o orbital vazio de C adjacente (LOURENÇO, 2009).

Figura 15 - Perfil cromatográfico do metabolismo *in vitro* da piplartina empregando microsossomas hepático de ratos. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7 μ m BEH de 2,1 x 50 mm e fase móvel composta por acetonitrila e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (gradiente: 10% a 100% de ACN, em 5 minutos), e uma vazão de 0,3 mL min⁻¹ em CLUE-DAD. Solvente extrator: hexano.

Figura 16 - Espectro de EM/EM da piplartina, obtido na análise realizada em CLUE.

As análises de IES-EM obtidas em baixa resolução foram feitas em alta resolução, e os resultados foram comparados. Os íons observados no espectro de IES-EM obtido através de um analisador por tempo-de-vôo (TOF) são semelhantes aos observados nas análises em baixa resolução: apresenta os íons de m/z 318, referente à piplartina protonada $[M+H]^+$, m/z 340 referente à piplartina cationizada com sódio $[M+Na]^+$, m/z 356 referente à piplartina cationizada com potássio $[M+K]^+$ e de m/z 221 referente ao íon acílio, Apêndice 5. A Tabela 11, apresenta os dados de massa teórica e cálculo de erro (em ppm), para confirmação das fórmulas moleculares.

Tabela 11 - Principais íons observados no espectro de IES-EM da piplartina.

Fórmula molecular	Massa observada	Massa Teórica	Erro (ppm)
$C_{12}H_{13}O_4^+$	221,0814	221,0808	2,71
$C_{17}H_{20}NO_5^+$	318,1328	318,1336	2,51
$C_{17}H_{19}NO_5Na^+$	340,1153	340,1155	0,59
$C_{17}H_{19}NO_5K^+$	356,0912	356,0895	4,77

Segundo LOURENÇO (2009), nos casos em que a estrutura da substância é conhecida e se deseja estabelecer as rotas de fragmentação, o primeiro passo é determinar a estrutura do íon inicialmente formado. Do ponto de vista clássico, moléculas contendo funções amidas são protonadas preferencialmente no átomo de oxigênio carbonílico (CAREY; SUNDBERG, 2007; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010).

Silva Júnior (2013), por meio do estudo de mapas de potenciais eletrostáticos moleculares (descriptor que serve como indicativo para os sítios mais prováveis de protonação), bem como pela análise da afinidade protônica (descriptor da estabilidade das espécies protonadas) da piplartina, mostrou que o sítio mais favorável é o átomo de oxigênio da carbonila da porção 3,4,5-trimetoxicinâmica, a qual pode ser atribuída a estabilidade do íon formado por ressonância. A partir deste conhecimento, o mecanismo sugerido é a dissociação da piplartina a partir da protonação na carbonila, o qual está de acordo com os dados sequenciais obtidos nas análises por IES-EM/EM, Figura 17.

Figura 17 - Fragmentação da piplartina protonada em IES-EM/EM.

Conforme mostrado na Figura 18, após protonação (via “A”) ocorreria a formação do íon acílio por meio da migração do próton presente na carbonila em C-7 para o átomo de nitrogênio, e o par de elétrons do oxigênio migraria para o átomo de carbono em C-7, ocorrendo a liberação do íon acílio de forma neutra (SILVA JÚNIOR, 2013). Uma vez formado, três possíveis vias de fragmentação foram

identificadas (B, C e D). Em “B” (formação de m/z 190) ocorre desmetoxilação, a qual pode ter ocorrido em tanto C-12 como em C-14, devido a simetria existente entre eles. Em “C” (formação de m/z 206) ocorre desmetilação da metoxila, sugere-se que seja a metoxila na posição *para* em relação à cadeia lateral, devido à estabilização do radical formado no anel, pois segundo Smith e Jerry (2007) e Sykes (1981), a estabilidade de um radical aumenta à medida que aumenta a extensão da deslocalização potencial e as fragmentações com perda de CH_3 ocorrem devido à forte influência do sistema de ressonância no enfraquecimento das ligações C-O, as quais podem sofrer cisão homolítica (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2010; SILVA JUNIOR, 2013). Em ambas as vias há formação de cátions-radicais que não obedecem à regra do elétron par (CHEN et al., 2008; LEVSEN et al., 2007; VESSECCHI et al., 2011). Em “D” ocorre uma descarboxilação levando à formação de m/z 193.

Figura 18 - Proposta para o mecanismo de fragmentação dos principais íons da piplartina por CLUE-EM/EM, empregando ionização por eletrospray (IES).

Entretanto, com estas análises iniciais não se percebeu o aparecimento de metabólitos, possivelmente devido ao solvente não tê-los extraído por diferenças de polaridade. Desta forma, utilizou-se acetato de etila no processo de extração, uma vez que com sua polaridade maior que a do hexano, há possibilidade de melhor extração de produtos polares. Alterou-se também o tempo de incubação para cinquenta minutos e não mais os noventa, como no protocolo inicial, devido aos resultados com a estabilidade de incubação.

Percebeu-se, o aparecimento de dois picos no cromatograma da amostra teste, em $t_R = 2,00$ e $2,23$ minutos, os quais não apareceram nas amostras controle e branco (Figura 19), com íon molecular para ambos de m/z 334. Foram realizados EM/EM do íon m/z 334 destes compostos que poderiam ser produtos do metabolismo microssomal da piplartina. Assim, os dois picos apresentaram íons de m/z 221, m/z 206, m/z 193 e de m/z 190 (Figura 20), indicando que houve alteração na porção derivada do anel lactâmico e não na porção 3,4,5-trimetoxifenil, e no caso a diferença é de 16Da em relação à piplartina protonada, podendo ter ocorrido uma epoxidação ou hidroxilação, as quais são possíveis para o sistema microssomal (BOURDON et al., 2013; PHAM et al., 2012).

Figura 19 - Perfil cromatográfico do metabolismo *in vitro* da piplartina empregando microsomas hepático de ratos. Coluna C₁₈ ACQUITY 1,7 μ m BEH de 2,1 x 50 mm e fase móvel composta por acetonitrila e água ambos com 1% de ácido acético (v/v) (gradiente: 10% a 100% de ACN, em 5 minutos), e uma vazão de 0,3 mL min⁻¹ em CLUE-DAD. Solvente extrator: acetato de etila.

Figura 20 - Espectro EM/EM dos produtos do metabolismo oxidativo da piplartina, obtidos nas análises realizadas em CLUE-EM/EM.

A metodologia de análise foi a mesma empregada por Silva Júnior (2013), através da qual foi possível identificar que os presentes produtos do metabolismo microssomal apresentam os mesmos tempos de retenção, bem como perfil de fragmentação que os por ele analisados, produzidos por biotransformação microbiana da piplartina.

Os resultados para o espectro de massas de alta resolução em modo positivo (Apêndice 6) obtido para o metabolismo microssomal, foram semelhantes àqueles obtidos nas análises em baixa resolução, sendo observados os íons principais de m/z 221 (íon acílio) e m/z 334 referente aos produtos de oxidação, os dados de massa teórica e cálculo de erro (em ppm), para confirmação das fórmulas moleculares estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Íons dos produtos observados nos espectros de IES-EM em alta resolução da piplartina após biotransformação microssomal.

Fórmula molecular	Massa observada	Massa Teórica	Erro (ppm)
$C_{17}H_{20}NO_6^+$ (produtos 1 e 2)	334,1283	334,1285	0,60

A ionização por *eletrospray* é “branda” para a geração de íons, ocasionando pouca fragmentação, o que a limita a princípio a elucidação estrutural de compostos (CROTTI, 2005; WU et al., 2012). A fim de se melhor visualizar a fragmentação da piplartina e dos metabólitos, partiu-se para a análise por CG-EM, empregando ionização por elétrons (IE).

4.4.2.2 Análises por IE-EM

Na análise do perfil cromatográfico da solução padrão de piplartina (Figura 21) é possível verificar a presença de um pico em $t_R = 38,7$ minutos, o respectivo espectro de massas, obtido por IE, apresenta o íon molecular de m/z 317, e os íons fragmentos de m/z 302, m/z 289, m/z 274, m/z 206, m/z 190 e m/z 163 sendo o pico base em m/z 221 (Figura 22).

Figura 21 - Perfil cromatográfico da piplartina. Obtido em equipamento CG, utilizando coluna capilar DB-1MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m). Condições de análise: modo *scan* com *splitless* de 1:50, gás de arraste: hélio, velocidade linear de 42,9 cm s^{-1} , $T_{\text{fonte de íons}} = 250^\circ\text{C}$, $T_{\text{fonte da interface}} = 280^\circ\text{C}$, $T_{\text{análise}} = 100^\circ\text{C}$ sendo mantida durante 5 minutos, então aumentada 290°C com taxa de 5°C min^{-1} .

Figura 22 - Espectro de massas da piplartina, obtido por ionização por elétrons (IE-EM).

Estes íons podem ter sido formados conforme proposto na Figura 23 e discutido a seguir:

Figura 23 - Proposta para o mecanismo de fragmentação dos principais íons da piplartina por CG-EM, empregando ionização por elétrons (IE-EM).

Uma cisão homolítica (via “A”) entre o nitrogênio e o carbono da função amida, leva a formação do íon acílio de m/z 221 (SCHAAB, 2008). Uma vez formado, ocorre a formação dos íons de m/z 190 e de m/z 206, os quais também

apareceram por IES e já foram explicados anteriormente. Pela via “B” ainda ocorre uma descarboxilação formando o íon de m/z 163.

A formação do íon de m/z 302 (via “E”), ocorreria por meio da cisão homolítica entre a metila e o oxigênio da metoxila na posição *para* em relação à cadeia lateral, pela mesma razão que a apresentada anteriormente para a formação de m/z 206. Este íon sofreria uma contração de anel na porção lactâmica com perda de CO, formando o íon de m/z 274. Além deste íon, pode ocorrer a formação do íon de m/z 289 (via “F”), a partir do íon M^{+} , por meio de outra contração no anel lactâmico, e a formação do íon de m/z 221 (via A’).

Estabelecido o tempo de retenção para a piplartina e de posse do conhecimento do seu mecanismo de fragmentação, partiu-se para análise dos metabólitos formados no meio microssomal. O cromatograma do meio reacional apresenta um pico em $t_R = 39,9$ minutos, Figura 24, o qual não apareceu nas amostras controle e branco (Figura 25), relacionado à formação de um produto de oxidação, os demais referem-se a interferentes graxos. Pela análise do seu espectro de massas, este produto apresenta o íon molecular de m/z 333 (Figura 26), correspondente à adição de um átomo de oxigênio no anel lactâmico.

Figura 24 - Cromatograma da piplartina no meio microssomal obtido para o *pool* de 10 replicatas. Condições cromatográficas descritas na Figura 21.

Figura 25 - Sobreposição (com ampliação $\times 10000000$) dos cromatogramas: meio microssomal (—), controle (—) e branco (—) obtidos para o *pool* de 10 replicatas. A seta indica o produto de oxidação formado em $t_R=39,9$ minutos.

Figura 26 - Espectro de massas do produto do metabolismo oxidativo da piplartina, obtido por ionização por elétrons (IE-EM).

A análise em modo SIM mostrou que há outro produto em $t_R = 41,5$ minutos, com os mesmos íons fragmentos selecionados, também relacionado à oxidação na porção do anel lactâmico, Figura 27. O qual, porém, não apareceu como um pico simétrico no cromatograma, por provavelmente forte interação com a coluna cromatográfica, Apêndice 7.

Figura 27 - Análise dos produtos de oxidação no modo SIM. Condições cromatográficas descritas na Figura 21.

A fim de se melhor visualizar este segundo produto e aumentar sua concentração, empregou-se um novo *pool* de 30 replicatas. Conforme pode ser visto

na Figura 28 e ampliação no Apêndice 8, o cromatograma apresenta este segundo produto em $t_R = 41$ minutos, mais definido e com maior intensidade, comparativamente a anteriormente mostrado. Pela análise do seu espectro de massas, há também a presença do íon molecular de m/z 333, Figura 29.

Figura 28 - Cromatograma da piplartina no meio microssomal obtido para o *pool* de 30 replicatas, aparecimento de P2 em $t_R = 41$ minutos. Condições cromatográficas descritas na Figura 21.

Figura 29 - Espectro de massas do segundo produto do metabolismo oxidativo da piplartina, obtido por ionização por elétrons (IE-EM).

Pela análise dos espectros dos dois produtos formados (Figuras 26 e 29), comparativamente ao da piplartina (Figura 22), os íons fragmentos podem ter sido formados conforme proposto na Figura 30 e discutido a seguir:

Figura 30 - Proposta para o mecanismo de fragmentação dos produtos de biotransformação microssomal da piplartina por CG-EM, empregando ionização por elétrons (IE-EM).

Os mecanismos para as vias “A”, “B” e “C” são os mesmos discutidos anteriormente. A presença dos íons de m/z 290 e de m/z 305, formados pelas vias “E” (desmetilação da metoxila *para* em relação à cadeia lateral, levando à formação de m/z 318, seguido de contração do anel lactâmico, com eliminação de CO) e “F” (contração do anel lactâmico, com eliminação de CO), respectivamente, indicam que não houve alteração na dupla ligação do anel lactâmico, descartando-se a hipótese de ocorrência de uma epoxidação, porém há a possibilidade de ter ocorrido adição de uma hidroxila nas demais posições do anel para cada produto.

Tentou-se isolá-los por cromatografia semi-preparativa (condição descrita no item 3.2.4), preparando-se 30 replicatas como descrito anteriormente e coletando o pico correspondente ao metabólito formado. De acordo com o cromatograma do meio reacional (Figura 31), a piplartina apresentou t_R = 15,4 minutos e apareceu apenas um pico referente aos produtos em t_R = 7,1 minutos, demonstrando que os mesmos co-eluíram por terem mecanismos semelhantes de interação com a fase estacionária, devido provavelmente serem isômeros de posição.

Figura 31 - Cromatograma da piplartina no meio microssomal: $t_R = 7,1$ minutos (produtos de oxidação) e $t_R = 15,4$ minutos (piplartina). Condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS Shimadzu® (250 mm x 4,6 mm, 4,6 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).

Uma vez isolado o pico, procedeu-se sua análise novamente por CG o qual confirmou que havia dois compostos, com o mesmo perfil de fragmentação, Figura 32.

Figura 32 - Análise dos produtos de oxidação isolados no modo SIM. Condições cromatográficas descritas na Figura 21.

Devido à dificuldade de obtenção destes produtos isolados e purificados em grande quantidade empregando microssomas e assim poder-se confirmar suas estruturas, partiu-se para a comparação dos resultados anteriormente mostrados com dados da literatura. Em estudo da piplartina empregando biotransformação microbiana, Silva Júnior (2013), identificou estes mesmos produtos, bem como suas respectivas fórmulas com base em análise de massas de alta resolução. Conseguiu isolar um deles e determinar sua estrutura por meio de dados de RMN (ressonância magnética nuclear) de ^1H , ^{13}C , HMQC (*heteronuclear multiple quantum coherence*), HMBC (*heteronuclear multiple bond coherence*) e COSY (*correlation spectroscopy*). Portanto, um dos produtos do metabolismo microssomal *in vitro* da piplartina é hidroxilado na posição 5 do anel lactâmico, conforme apresentado na Figura 33.

Figura 33 - Estrutura química do produto obtido a partir do metabolismo *in vitro* da piplartina empregando fração microsomal hepática de ratos. (*E*)-5-hidroxi-1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilóil)-5,6-diidropiridin-2(1H)-ona.

5 CONCLUSÃO

A extração líquido-líquido, após a otimização dos parâmetros, mostrou-se seletiva para a extração da piplartina, proporcionando uma limpeza adequada da amostra para análise por CLAE-DAD. A metodologia analítica desenvolvida foi completamente validada e demonstrou ser um método simples e seletivo.

A plotagem da taxa de reação *versus* a concentração de piplartina apresentou um perfil de saturação sigmoidal, confirmado pelo formato convexo do gráfico de Eadie-Hofstee, desviando-se da cinética hiperbólica descrita por Michaelis–Menten, indicando comportamento cooperativo. A isoforma responsável pela sua biotransformação apresenta pelo menos dois sítios ativos de ligação.

Após incubação da piplartina no meio microsomal, dois produtos hidroxilados de fase I foram formados e identificados por meio da análise dos espectros gerados por CLUE-DAD-EM/EM, CLAE-DAD-EM de alta resolução, empregando IES e CG-EM, empregando IE. A estrutura de um deles foi confirmada por meio de dados comparativos com a literatura e trata-se do (*E*)-5-hidroxi-1-(3-(3,4,5-trimetoxifenil)acrilóil)-5,6-diidropiridin-2(1H)-ona.

Dessa forma, a fração microsomal de fígado de ratos confirmou ser um método útil, rápido, simples para o estudo preliminar de metabolismo *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012. **Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 de maio de 2012.

ALEGRE, M. R.; ROMERO, J. E.; BROCH, S. C. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, Castelló, v. 1232, p.101–109, 2012.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, Bergen, v.877, n. 23, p.2224–2234, 2009.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - a review. **Biotechnology Advances**, Andhra Pradesh, v. 27, n. 1, p. 16-29, 2009.

ATAÍDE, F.; HITZMANN, B. When is optimal experimental design advantageous for the analysis of Michaelis–Menten kinetics?. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Hannover, v. 99, n. 1, p. 9–18, 2009.

BANERJEE, S.; SINGH, S.; RAHMAN, L. U. Biotransformation studies using hairy root cultures - a review. **Biotechnology Advances**, Lucknow, v. 30, n. 3, p. 461–468, 2012.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F. O.; ALVES, A. P. N. N.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; LOTUFO, L. V. C. *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Fortaleza, v. 39, n. 6, p. 801-807, 2006.

BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C. G.; CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; ELMIRO, F. J. M.; LOTUFO, L. V. C. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicology in vitro**, Fortaleza, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2007.

BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A. Utilization of integrated Michaelis-Menten equation to determine kinetic constants. **Biochemistry And Molecular Biology Education**, Vila Real, v. 35, n. 2, p. 145–150, 2007.

BEZERRA, D. P.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; VASCONCELLOS, M. C.; SILVA, A. C. R.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; HENRIQUES, J. A. P.; LOTUFO, L. V. C.; SAFFI, J. Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkamide of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research**, Fortaleza, v. 652, n. 2, p. 164–174, 2008.

BEZERRA, D. P. **Estudo das propriedades anticâncer da Piplartina**. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BEZERRA, D. P.; VASCONCELLOS, M. C.; MACHADO, M. S.; VILLELA, I. V.; ROSA, R. M.; MOURA, D. J.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; AQUINO, N. C.;

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

HENRIQUES, J. A. P.; SAFFI, J.; LOTUFO, L. V. C. Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. **Mutation Research**, Alagoas, v. 677, n. 1/2, p. 8–13, 2009.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; GOUVEA, D. R.; JABOR, V. A. P.; LOPES, N. P.; BORGES, K. B.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Sensitive method for determination of piplartine, an alkaloid amide from *Piper* species, in rat plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 460–465, 2012.

BEZERRA, R. M. F.; FRAGA, I.; DIAS, A. A. Utilization of integrated michaelis–menten equations for enzyme inhibition diagnosis and determination of kinetic constants using solver supplement of Microsoft office excel. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, Vila Real, v. 109, n. 1, p. 26–31, 2013.

BLOKH, D.; STAMBLER, I.; AFRIMZON, E.; SHAFRAN, Y.; KORECH, E.; SANDBANK, J.; ORDA, R.; ZURGIL, N.; DEUTSCH, M. The information-theory analysis of Michaelis–Menten constants for detection of breast cancer. **Cancer Detection and Prevention**, Ramat Gan, v. 31, n. 6, p. 489–498, 2007.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed da Unicamp, 2006, p. 203–270, 1ª Ed.

BORGES, K. B. **Análise estereosseletiva de fármacos com aplicação em estudos de biotransformação empregando fungos**. Tese (Doutorado em Toxicologia)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

BOURDON, F.; LECOEUR, M.; VERONES, V.; VACCHER, C.; LEBEGUE, N.; DINE, T.; KAMBIA, N.; GOOSSENS, J. F. *In vitro* pharmacokinetic profile of a benzopyridooxathiazepine derivative using rat microsomes and hepatocytes: Identification of phases I and II metabolites. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Lille, v. 80, p. 69–78, 2013.

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

BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. **The Botanical and Biochemical Laboratories**, Cambridge, v. 19, p. 338–340, 1925.

BROWN, C. M.; REISFELD, B.; MAYENO, A. N. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. **Drug Metabolism Reviews**, Colorado, v. 40, n. 1, p. 1–100, 2008.

CALIXTO, L. A. **Métodos de análise da rosiglitazona e pioglitazona e de seus principais metabólitos: aplicações em estudos de metabolismo *in vitro***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry**. New York: Springer Science, 2007. 5th ed.

CHEN, K.; RANNULU, N. S.; CAI, Y.; LANE, P.; LIEBL, A. L.; REES, B. B.; CORRE, C.; CHALLIS, G. L.; COLE, R. B. Unusual odd-electron fragments from even-electron protonated prodiginine precursors using positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, New Orleans, v. 19, n. 12, p. 1856-1866, 2008.

CHIARADIA, M. C. **Desenvolvimento, validação e aplicação de métodos para análise multirresidual de agrotóxicos em suco de laranja e tangerina utilizando CLAE-DAD, CL-EM/EM e CLUE-DAD**. Tese (Doutorado em Ciências)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

CHOE, S.; WOO, S. H.; KIM, D. W.; PARK, Y.; CHOI, H.; HWANG, B. Y.; LEE, D.; KIM, S. Development of a target component extraction method from GC-MS data with an in-house program for metabolite profiling. **Analytical Biochemistry**, Yangsan, v. 426, n. 2, p. 94-102, 2012.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINI, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypansomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, Araraquara, v. 18, n. 9, p. 703-711, 2009.

CROTTI, A. E. M. **Estudo da fragmentação de substâncias orgânicas de baixo peso molecular ionizadas por electrospray empregando espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas**. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

DENISOV, I. G.; BAAS, B. J.; GRINKOVA, Y. V.; SLIGAR, S. G. Cooperativity in Cytochrome P450 3A4: linkages in substrate binding, spin state, uncoupling, and product formation. **Journal of Biological Chemistry**, Urbana, v. 282, n. 10, p. 7066-7076, 2007.

DENISOV, I. G.; FRANK, D. J.; SLIGAR, S. G. Cooperative properties of cytochromes P450. **Pharmacology & Therapeutics**, Urbana, v. 124, n. 2, p. 151-167, 2009.

de OLIVEIRA, A. R. M.; FONSECA, P.; CURTI, C.; SILVA, R. S.; BONATO, P. S. *In vitro* metabolism study of a new nitrosyl ruthenium complex $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4(\text{terpy})\text{NO}]^{3+}$ nitric oxide donor using rat microsomes. **Nitric Oxide**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 1, p. 14-19, 2009.

DI MARCO, A.; MARCUCCI, I.; VERDIRAME, M.; PEREZ, J.; SANCHEZ, M.; PELAEZ, F.; CHAUDHARY, A.; LAUFER, R. Development and validation of a high-throughput radiometric CYP3A4/5 inhibition assay using tritiated testosterone. **Drug Metabolism and Disposition**, Pomezia, v. 33, n. 3, p. 349-358, 2005.

FACUNDO, V. A.; POLLLI, A. R.; RODRIGUES, J. R. V.; MILITÃO, S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* H. B. K. **Acta Amazonica**, Rondônia, v. 38, n. 4, p. 733-742, 2008.

FELIPE, F. C. B.; FILHO, J. T. S.; SOUZA, L. E. O.; SILVEIRA, J. A.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; VIANA, G. S. B. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, Juazeiro do Norte, v. 14, n. 9, p. 605-612, 2007.

FELIPUCCI NETO, C. A. **Mn(III)profirinas sintéticas como modelos químicos do citocromo P450: a O-desalquilação oxidativa de aril éteres substituídos como modelos de drogas por iodosilbenzeno**. Dissertação (Mestrado em Química)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FERNANDO, H.; HALPERT, J. R.; DAVYDOV, D.R. Resolution of Multiple Substrate Binding Sites in Cytochrome P450 3A4: The Stoichiometry of the Enzyme-Substrate Complexes Probed by FRET and Job's Titration. **Biochemistry**, GalVeston, v. 45, n. 13, p. 4199–4209, 2006.

FIEHN, O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**, California, v. 27, n. 3, p. 261-269, 2008.

GOLICNIK, M. Explicit reformulations of time-dependent solution for a Michaelis–Menten enzyme reaction model. **Analytical Biochemistry**, Ljubljana, v. 406, n. 1, p. 94–96, 2010.

GOLICNIK, M. Explicit analytic approximations for time-dependent solutions of the generalized integrated Michaelis–Menten equation. **Analytical Biochemistry**, Ljubljana, v. 411, n. 2, p. 303–305, 2011a.

GOLICNIK, M. Evaluation of enzyme kinetic parameters using explicit analytic approximations to the solution of Michaelis-Menten equation. **Biochemical Engineering Journal**, Ljubljana, v. 53, n. 2, p. 234-238, 2011b.

GROOT, M. J.; WAKENHUT, F.; WHITLOCK, G.; HYLAND, R. Understanding CYP2D6 interactions. **Drug Discovery Today**, United Kingdom, v. 14, n. 19/20, p. 964-972, 2009.

HARIPARSAD, N.; SANE, R. S.; STROM, S. C.; DESAI, P. B. *In vitro* methods in human drug biotransformation research: Implications for cancer chemotherapy. **Toxicology in vitro**, Cincinnati, v. 20, n. 2, p.135-153, 2006.

HILL, A. V. The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. **Biochemistry Journal**, Cambridge, v. 7, n. 5, p. 471–480, 1913.

HILL, T. L., EISENBERG, E.; CHALOVICH, J. M. Theoretical models for cooperative steady-state ATPase activity of myosin subfragment-1 on regulated actin. **Biophysical Journal**, Maryland, v. 35, n. 1, p. 99–112, 1981.

HLAVICA, P. Evaluation of structural features in fungal cytochromes P450 predicted to rule catalytic diversification. **Biochimica et Biophysica Acta**, Munchen, v. 1834, n. 1, p. 205-220, 2013.

HOUSTON, J. B.; GALETIN, A. Progress towards prediction of human pharmacokinetic parameters from *in vitro* technologies. **Drug Metabolism Reviews**, Manchester, v.35, n. 4, p. 393–415, 2003.

HOUSTON, J. B.; GALETIN, A. Modelling atypical CYP3A4 kinetics: principles and pragmatism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Manchester, v. 433, n. 2, p. 351–360, 2005.

HOUSTON, J. B.; KENWORTHY, K. E. *In vitro*–*in vivo* scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis–Menten model. **Drug Metabolism and Disposition**, Manchester, v. 28, n. 3, p. 246–254, 2000.

HRYCAY, E. G.; BANDIERA, S. M. Review: The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Vancouver, v.522, n. 2, p.71–89, 2012.

HUANG, W.; LIN, Y. S.; MCCONN, D. J.; CALAMIA, J. C.; TOTAH, R. A.; ISOHERRANEN, N.; GLODOWSKI, M.; THUMMEL, K. E. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, North Carolina, v. 32, n. 12, p. 1434-1445, 2004.

HURKO, O. Target-based drug Discovery, genetic diseases, and biologics. **Neurochemistry International**, Devon, v. 61, n. 6, p. 892-898, 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Q2 (R1): validation of Analytical Procedures: text and methodologies**. USA, FDA Federal Register, 2005.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARAES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed da Unicamp, 2006, p. 273-397, 1ª Ed.

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

JOHNSON, K. A.; GOODY, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. **Biochemistry**, Austin, v. 50, n. 39, p. 8264–8269, 2011.

De JONG, W. H. A.; DE VRIES, E. G. E.; KEMA, I. P. Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines. **Clinical Biochemistry**, Groningen, v. 44, n. 1, p. 95–103, 2011.

JUKIC, D.; SABO, K.; SCITOVSKI, R. Total least squares fitting Michaelis–Menten enzyme kinetic model function. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, Amsterdam, v. 201, n. 1, p. 230–246, 2007.

JUNG, C. The mystery of cytochrome P450 Compound I A mini-review dedicated to Klaus Ruckpaul. **Biochimica et Biophysica Acta**, Berlin, v.1814, n. 1, p. 46–57, 2011.

JYOTHI, D.; VANATHI, P.; GOWRI, P. M.; RAO, V. R. S.; RAO, M.; SREEDHAR, A. S. Diferuloylmethane augments the cytotoxic effects of pipartine isolated from *Piper chaba*. **Toxicology in Vitro**, Hyderabad, v. 23, n. 6, p. 1085–1091, 2009.

KEERTHI, K.; RAJAPAKSE, A.; SUN, D.; GATES, K. S. Synthesis and characterization of a small analogue of the anticancer natural product leinamycin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Columbia, v. 21, n. 1, p. 235-241, 2013.

KOPKA, J. Current challenges and developments in GC–MS based metabolite profiling technology. **Journal of Biotechnology**, Golm, v. 124, n. 1, p. 312–322, 2006.

KORFMACHER, W. A. Foundation review: Principles and applications of LC–MS in new drug Discovery. **Drug Discovery Today**, Kenilworth, v. 10, n. 20, p. 1357-1367, 2005.

KORZEKWA, K. R.; KRISHNAMACHARY, N.; SHOU, M.; OGAI, A.; PARISE, R. A.; RETTIE, A. E.; GONZALEZ, F. J.; TRACY, T. S. Evaluation of Atypical Cytochrome P450 Kinetics with Two-Substrate Models: Evidence That Multiple Substrates Can Simultaneously Bind to Cytochrome P450 Active Sites. **Biochemistry**, Pennsylvania, v. 37, n. 12, p. 4137-4147, 1998.

KOSTIAINEN, R.; KOTIAHO, T.; KUURANNE, T.; AURIOLA, S. Liquid chromatography/ atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. **Journal of Mass Spectrometry**, Helsinki, v. 38, n. 4, p. 357–372, 2003.

LEE, S. Y.; LEE, J. Y.; KANG, W.; KWON, K.; OH, S. J.; MA, J. Y.; KIM, S. K. *In vitro* and *in vivo* assessment of cytochrome P450-mediated herb-drug interactions of Ssang-hwa-tang. **Food Chemistry**, Daejeon, v. 136, n. 2, p. 450-457, 2013.

LEVSEN, K.; SCHIEBEL, H. M.; TERLOUW, J. K.; JOBST, K. J.; ELEND, M.; PREISS, A.; THIELE, H.; INGENDOH, A. Even-electron ions: A systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions. **Journal of Mass Spectrometry**, Hannover, v. 42, n. 8, p. 1024-1044, 2007.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. **Science**, Washington, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LIN, L.; HUANG, H.; ZHANG, P.; QI, X.; ZHONG, D. Microbial transformation of dextromethorphan by *Cunninghamella blakesleeana* AS 3.153. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Shenyang, v. 55, n. 4, p. 658–661, 2007.

LIMA, D. K. S.; BALLICO, L. J.; LAPA, F. R.; GONCALVES, H. P.; SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; PEREIRA, I. T.; SILVA, L. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, Rondônia, v. 142, n. 1, p. 274–282, 2012.

LOURENÇO, R. V. **A utilização da química computacional em processos químicos relacionados à ionização por electrospray**. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, Paris, v.10, n. 4/5, p. 392-413, 2007.

MASUDA, Y.; KUGIMIYA, S.; MURAI, K.; HAYASHI, A.; KATO, K. Enhancement of activity and stability of the formaldehyde dehydrogenase by immobilizing onto phenyl-functionalized mesoporous silica. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Toyota, v. 101, p.26–33, 2013.

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

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v. 49, p.333–369, 1913.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O. M. V.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**, São Paulo, v. 127, n. 2, p. 357–364, 2011.

MOREIRA, F. L.; de SOUZA, G. H. B.; RODRIGUES, I. V.; LOPES, N. P.; de OLIVEIRA, A. R. M. 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**, Ribeirão Preto, v. 84, p. 14-19, 2013.

MOHUTSKY, M. A.; CHIEN, J. Y.; RING, B. J.; WRIGHTON, S. A. Predictions of the *in vivo* clearance of drugs from rate of loss using human liver microsomes for phase I and phase II biotransformations. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 23, n. 4, p. 654–662, 2006.

NATH, A.; ATKINS, W. M. Short Communication: A Theoretical Validation of the Substrate Depletion Approach to Determining Kinetic Parameters. **Drug Metabolism and Disposition**, Seattle, v. 34, n. 9, p. 1433–1435, 2006.

NAVICKIENE, H. M.; BOLZANI, V. S.; KATO, M. J.; PEREIRA, A. M.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, Araraquara, v. 14, n. 5, p. 281-284, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1304p. 5^a ed.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, Maryland, v. 70, n. 3, p. 461–77, 2007.

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**, Maryland, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NIWA, T.; OKADA, K.; HIROI, T.; IMAOKA, S.; NARIMATSU, S.; FUNAE, Y. Effect of Psychotropic Drugs on the 21-Hydroxylation of Neurosteroids, Progesterone and Allopregnanolone, Catalyzed by Rat CYP2D4 and Human CYP2D6 in the Brain. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Osaka, v.31, n. 3, p. 348-351, 2008.

NOVÁKOVÁ, L.; VLCKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytical Chimica Acta**, Hradec Králové, v. 656, n. 1/2, p. 8-35, 2009.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. **The Journal of Biological Chemistry**, Osaka, v. 239, n. 7, p. 2370-2378, 1964.

PAKHUNG, L. A. Overview: evaluation of metabolism-based drug toxicity in drug development. **Chemico-Biological Interactions**, Ireland, v. 179, n. 1, p.1-3, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introdução a espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716p. 4th ed.

PEREZ, J. M. C. Current and future trends in the application of HPLC-MS to metabolite-identification studies. **Drug Discovery Today**, Milford, v. 12, n. 5/6, p. 249-256, 2007.

PHAM, N. T.; JEWELL, W. T.; MORIN, D.; BUCKPITT, A. R. Analysis of naphthalene adduct binding sites in model proteins by tandem mass spectrometry. **Chemico-Biological Interactions**, Davis, v. 199, n. 2, p. 120–128, 2012.

PLANT, N. Strategies for using *in vitro* screens in drug metabolism. **Drug Discovery Today**, Surrey Guildford, v. 9, n. 7, p. 328-336, 2004.

RAJ, L.; IDE, T.; GURKAR, A. U.; FOLEY, M.; SCHENONE, M.; LI, X.; TOLLIDAY, N. J.; GOLUB, T. R.; CARR, S. A.; SHAMJI, A. F.; STERN, A. M.; MANDINOVA, A.; SCHREIBER, S. L.; LEE, S. W. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, Massachusetts, v. 475, n. 7355, p. 231-233, 2011.

RODRIGUES, R. V.; LANZMASTER, D.; LONGHI BALBINOT, D. T.; GADOTTI, V. M.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive effect of crude extract, fractions and three alkaloids obtained from fruits of *Piper tuberculatum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Porto Velho, v. 32, n. 10, p. 1809-1812, 2009.

SCHAAB, E. H.; CROTTI, A. E.; IAMAMOTO, Y.; KATO, M. J.; LOTUFO, L. V.; LOPES, N. P. Biomimetic oxidation of piperine and pipartine catalyzed by iron (III) and manganese (III) porphyrins. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 5, p. 912-916, 2010.

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

SEVIOR, D. K.; PELKONEN, O.; AHOKAS, J. T. Hepatocytes: The powerhouse of biotransformation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Melbourne, v.44, n. 2, p.257–261, 2012.

SILVA JUNIOR, E. A. **Estudos de metabolismo *in vitro* de produtos naturais: biotransformação microbiana da pipartina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SIMÕES, R. A. **Avaliação de técnicas miniaturizadas de preparação de amostras na análise enantiosseletiva de fármacos quirais com diferentes características ácido-base em meio microsomal e aplicação em estudos de metabolismo *in vitro***, 2012. Tese (Doutorado em Toxicologia)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

SHAIK, S.; COHEN, S.; WANG, Y.; CHEN, H.; KUMAR, D.; THIEL, W. P450 Enzymes: their structure, reactivity, and selectivities modeled by QM/MM calculations. **Chemical Reviews**, Jerusalem, v.110, n. 3, p. 949–1017, 2010.

SHI, X.; LIU, M.; ZHANG, M.; ZHANG, K.; LIU, S.; QIAO, S.; SHI, R.; JIANG, X.; WANG, Q. Identification of *in vitro* and *in vivo* metabolites of isoimperatorin using liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, Shijiazhuang, v. 141, n. 1, p. 357-365, 2013.

SMITH, M. B.; JERRY, M. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and structures**. USA: John Wiley & Sons, 2007. 2357p. 6th ed.

SOARES, F. A. **Ensaaios bioquímicos e celulares para identificação de novos inibidores de TcGAPDH seletivos à HsGAPDH**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

STONE, A. N.; MACKENZIE, P. I.; GALETIN, A.; HOUSTON, J. B.; MINERS, J. O. Isoform-selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. **Drug Metabolism and Disposition**, Adelaide, v. 31, n. 9, p. 1086–1089, 2003.

SYKES, P. **A guidebook to mechanism in organic chemistry**. United Kingdom: Logman, 1981. 460 p. 5th ed.

THEODORIDIS, G. A.; GIKA, H. G.; WANT, E. J.; WILSON, I. D. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. **Analytica Chimica Acta**, Thessaloniki, v. 711, p. 7– 16, 2012.

TINGLE, M. D.; HELSBY, N. A. Can *in vitro* drug metabolism studies with human tissue replace *in vivo* animal studies?. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Auckland, v. 21, n. 2, p.184-190, 2006.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. **Analytica Chimica Acta**, Brussels, v. 690, p. 148–161, 2011.

TOLONEN, A.; TURPEINEN, M.; PELKONEN, O. Liquid chromatography–mass spectrometry in *in vitro* drug metabolite screening. **Drug Discovery Today**, Oulu, v. 14, n. 3/4, p.120-133, 2009.

TORRES, E.; ABURTO, J. Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 4,6-dimethyldibenzothiophene as dimer complexes: Evidence for kinetic cooperativity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Mexico City, v.437, n. 2, p. 224–232, 2005.

VANDENBERGHE, A.; MARKÓ, I. E.; LUCACCIONI, F.; LUTTS, S. Enantioselective hydrolysis of racemic 1-phenylethyl acetate by an enzymatic system from fresh vegetables. **Industrial Crops and Products**, Louvain-la-Neuve, v. 42, p. 380–385, 2013.

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CROTTI, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 4, p. 840-853, 2008.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 10, p. 1875-1887, 2011.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

XIAO, J. F.; ZHOU, B.; RESSOM, H. W. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, Washington, v. 32, p. 1-14, 2012.

XU, Y. J.; FOUBER, K.; DHOOGHE, L.; LEMIÈRE, F.; MAREGESI, S.; COLEMAN, C. M.; ZOU, Y.; FERREIRA, D.; APERS, S.; PIETERS, L. Rapid isolation and identification of minor natural products by LC–MS, LC–SPE–NMR and ECD: Isoflavanones, biflavanones and bisdihydrocoumarins from *Ormocarpum kirkii*. **Phytochemistry**, Antwerp, v. 79, p. 121–128, 2012.

WANG, M.; CAI, Z.; XU, L. Coupling of acetonitrile deproteinization and salting-out extraction with acetonitrile stacking in chiral capillary electrophoresis for the determination of warfarin enantiomers. **Journal of Chromatography A**, Guangzhou, v. 1218, n. 26, p. 4045–4051, 2011.

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

WU, H.; LI, L.; SHEN, J.; WANG, Y.; LIU, K.; ZHANG, S. *In vitro* metabolism of cyadox in rat, chicken and swine using ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Beijing, v. 67/68, p. 175–185, 2012.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology & Therapeutics**, Stuttgart, v. 138, n. 1, p. 103–141, 2013.

ZAVERI, M.; KHANDHAR, A.; PATEL, S.; PATE, A. Chemistry and pharmacology of *Piper longum* L. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Gandhinagar, v. 5, n. 1, p. 67-76, 2010.

ZHANG, D.; LUO, G.; DING, X.; LU, C. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, Cambridge, v. 2, n. 6, p. 549-561, 2012.

ZHANG, Z. Y.; KAMINSKY, L. S. Determination of metabolic rates and enzyme kinetics. In: _____. **Metabolism in drug design and development**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008. Cap 13, p. 411-446.

ZHOU, W.; DI, L. G.; SHAN, J. J.; BI, X. L.; CHEN, L. T.; WANG, L. C.; CAI, B. C. *In vitro* metabolism in Sprague–Dawley rat liver microsomes of forsythoside A in different compositions of Shuang–Huang–Lian. **Fitoterapia**, Nanjing, v.82, n. 8, p. 1222–1230, 2011.

ZIAREK, J. J.; VOLKMAN, B. F. NMR in the analysis of functional chemokine interactions and drug Discovery. **Drug Discovery Today: Technologies**, Wisconsin, v. 9, n. 4, p. 293-299, 2012.

ZIENTEK, M.; MILLER, H.; SMITH, D.; DUNKLEE, M. B.; HEINLE, L.; THURSTON, A.; LEE, C.; HYLAND, R.; FAHMI, O.; BURDETTE, D. Development of an *in vitro* drug-drug interaction assay to simultaneously monitor Five cytochrome P450 isoforms and performance assesment using drug library compounds. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, La Jolla, v. 58, n. 3, p.206-214, 2008.

APENDICES

APENDICE 1 – Certificado do comitê de ética.

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.1047.53.4), intitulado "Estudo de Metabolismo in vitro do Alcalóide Piplartina Empregando Microsomas Hepáticos de Ratos", de autoria de **Lucas Maciel Mauriz Marques**, e de **Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do **Campus de Ribeirão Preto – USP** foi aprovado em reunião da CEUA de 06/10/2011.

Colaborador: Norberto Peporine Lopes

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1047.53.4), entitled: "Estudo de Metabolismo in vitro do Alcalóide Piplartina Empregando Microsomas Hepáticos de Ratos", by **Lucas Maciel Mauriz Marques** and **Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the **Campus of Ribeirão Preto – USP**, and was approved in the meeting, October 06, 2011.

Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2011.

 Presidente da CEUA

Prof.ª Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

 Secretária da CEUA
 Maria Angélica Depiro

APENDICE 2 – Espectro de absorção do pico registrado, por CLAE-DAD para a piplartina obtido no intervalo entre 190-370 nm. Coluna C8(2) (250 mm x 4.6 mm x 5 μ m), vazão da fase móvel 1 mL min⁻¹. Volume injetado: 20 μ L.

APENDICE 3 – Cromatograma do meio microssomal fortificado com NADP^+ 0,25 mM (A), tampão fosfato 0,25 mol L^{-1} (B), tampão Tris-HCl 0,05 mol L^{-1} (C) e Glicose-6-fosfato desidrogenase (0,5 unidades mL^{-1}) (D). Condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS Shimadzu® (250 mm x 4,6 mm, 4,6 μm), vazão da fase móvel 1 mL min^{-1} . O comprimento de onda foi fixado em 325 nm. Volume injetado: 20 μL . Fase móvel acetonitrila:água 40:60, (v/v).

APENDICE 4 - Cromatograma do meio microssomal fortificado com 25 μL de carbamazepina 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (t_R = 8,57 min) e com 25 μL de piplartina 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (t_R = 15,4 min). Condição cromatográfica: coluna Shim-pack VP-ODS Shimadzu® (250 mm x 4,6 mm, 4,6 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).

APÊNDICE 5 - Espectro de alta resolução da piplartina no modo positivo.

APÊNDICE 6 - Espectro de alta resolução no modo positivo para os produtos da biotransformação microsomal.

APENDICE 7 - Sobreposição (com ampliação $\times 10000000$) dos cromatogramas: meio microssomal (—), controle (—) e branco (—) obtidos para o *pool* de 10 replicatas. A seta indica o outro produto de oxidação formado em $t_R=41,5$ minutos.

APENDICE 8 - Ampliação do cromatograma do meio microssomal, aparecimento de P2. Condições cromatográficas descritas na Figura 18.