UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de metabolismo *in vitro* do triterpeno pentacíclico
amirina empregando microssomas hepático de ratos**

Fernanda de Lima Moreira

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudo de metabolismo *in vitro* do triterpeno pentacíclico
amirina empregando microssomas 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

Orientada: Fernanda de Lima Moreira

Orientador: 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.

Moreira, Fernanda de Lima

Estudo de metabolismo *in vitro* do triterpeno pentacíclico amirina empregando microssomas hepático de ratos. Ribeirão Preto, 2013.

89 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. Amirina. 2. Cinética Enzimática. 3. CG-EM.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda de Lima Moreira

Estudo de metabolismo *in vitro* do triterpeno pentacíclico amirina empregando microssomas 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: Anderson Rodrigo Moraes
de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha Vó Meiga (*in memorian*) e ao meu Vô Alaor (*in memorian*) pela dedicação e pelo amor, vocês estarão sempre em meu coração.

À minha mãe Luciana, à minha irmã Marcela e ao Marcelo por estarem ao meu lado sempre em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira, pela oportunidade em desenvolver este trabalho, mesmo não me conhecendo, confiou e acreditou em mim. Agradeço por todos os ensinamentos, pela dedicação, pela paciência... Enfim, por tudo! Com você tive a oportunidade de crescer tanto profissional como pessoalmente, obrigada!

Agradeço a todos meus familiares pelo apoio. Minha mãe Luciana, por sempre estar disposta a ouvir meus problemas e me ajudar a qualquer momento. A minha querida irmã, da qual tenho muito orgulho e mesmo longe nós estamos sempre unidas. Ao meu namorado, Marcelo, pela paciência, por sempre estar presente nas horas boas e ruins, sempre me ajudando a seguir em frente. Ao meu pai Jairo, pela presença constante em minha vida, sempre orgulhoso de mim. A tia Lucineire, hoje não estaria concluindo este trabalho sem sua ajuda e incentivo a vir para Ribeirão. Aos meus queridos afilhados, Daniel e Rafael, pela alegria que trazem para a minha vida. Aos meus avós queridos (*in memoriam*), Vó Meiga, Vô Alaor e Vó Anita, que não consigo esquecer em nenhum momento, e a todos familiares que não citei aqui, mas que são muito importantes na minha vida.

A todo pessoal do LABMETS pela amizade, pelas conversas e experiência trocada.

Aos professores Luiz F. L. Guimarães, Carlos Miranda e Roberto Santana (supervisores do PAE), exemplares professores que me incentivaram ainda mais a seguir a carreira acadêmica.

A professora Dra. Pierina, por ter disponibilizado seu laboratório para realização de parte deste projeto.

Ao professor Norberto, por ter aberto as portas do seu laboratório pra mim e estar sempre disposto a colaborar com meu projeto.

A Izabel Cristina Casanova Turatti pela imensa ajuda nas análises no CG-EM.

Ao professor Gustavo Henrique Bianco de Souza por ter concedido a amostra para realização deste trabalho.

A aluna de doutorado Ivanildes pelo isolamento da amostra e ajuda durante o projeto.

Aos funcionários da pós-graduação e aos técnicos dos laboratórios pelo auxílio prestado.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela oportunidade de desenvolver este projeto.

As agências de fomento: Capes, pela bolsa concedida e Fapesp, pelo auxílio financeiro.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

MOREIRA, F. L. **Estudo de metabolismo *in vitro* do triterpeno pentacíclico amirina empregando microssomas hepático de ratos.** 2013. 89 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Os isômeros de posição do triterpeno pentacíclico amirina (alfa e beta), estão presentes em várias espécies de plantas, como a *Protium spruceanum*. Estas moléculas vêm mostrando várias propriedades farmacológicas importantes, como efeitos anti-inflamatórios, efeito gastroprotetor, efeito antipruriginoso, efeito antitumoral, entre outros, sendo, dessa forma, uma candidata a um novo fármaco. No entanto, o comportamento destas substâncias frente as enzimas do citocromo P450 (CYP 450) ainda não foram estudadas. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo de metabolismo *in vitro* com esses triterpenos, caracterizar os parâmetros cinéticos enzimáticos assim como possíveis metabólitos que possam surgir empregando microssomas hepático de ratos. Para isto, foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para análise desses triterpenos em microssomas de ratos e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Como técnica de preparação das amostras foi empregado a extração líquido-líquido utilizando hexano como solvente extrator. A metodologia para quantificação dos triterpenos em microssomas hepático foi validada de acordo com a legislação vigente para análise de fármacos em fluidos biológicos, avaliando os seguintes parâmetros: linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão, exatidão, estabilidade e recuperação. Todos os parâmetros avaliados corroboraram com as exigências da legislação. Após validação, iniciou-se os estudos para determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos avaliando a variação do tempo de incubação e da concentração de proteínas microssomais no consumo dos substratos. Utilizando a faixa linear destes experimentos foi determinada a concentração de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ e o tempo de incubação de 20 min, respeitando as condições de Velocidade Inicial. Em seguida, ao avaliar a variação da concentração do substrato observou-se que a cinética obtida é do tipo sigmoidal. Dessa forma, para os cálculos dos parâmetros cinéticos foi utilizado a equação de Hill, obtendo $V_{\max} = 0,698 \pm 0,022 \text{ } \mu\text{mol/mg proteína/min}$, $S_{50} = 55,1 \pm 10,5 \text{ } \mu\text{M}$ e o coeficiente de Hill $2,7 \pm 0,17$, já os parâmetros da beta amirina foram: $V_{\max} = 0,775 \pm 0,034 \text{ } \mu\text{mol/mg proteína/min}$, $S_{50} = 130,4 \pm 42,8 \text{ } \mu\text{M}$ e coeficiente de Hill $2,5 \pm 0,21$. A partir destes dados obteve-se o clearance intrínseco para a beta e a alfa amirina de $3,05 \text{ mL/min/kg}$ e $6,55 \text{ mL/min/kg}$, respectivamente. Apesar das amirinas serem metabolizadas pelas enzimas da CYP 450, nenhum metabólito foi encontrado. Nesse trabalho, foi demonstrando pela primeira vez, o comportamento das enzimas da CYP 450 de ratos frente aos produtos naturais alfa e beta amirina, no qual foi verificado um comportamento atípico, que não segue a cinética michaeliana.

Palavras-chave: Cinética enzimática, Comportamento Sigmoidal, Produto Natural, Cinética não-michaeliana, Cooperativismo positivo.

ABSTRACT

MOREIRA, F. L. ***In vitro* metabolism study of the pentacyclic triterpene amyryns employing rat liver microsomes.** 2013. 89 f. Master's thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The isomers of pentacyclic triterpene amyryns (α and β) occurring in a variety of plants, as *Protium spruceanum*. These molecules have showed significant pharmacological effects, as anti-inflammatory, gastroprotective and antitumor effects. Based on that, these substances have demonstrated great potential to become new drugs. However, the metabolic behavior by employing CYP enzymes (CYP450) has not been studied yet. The aim of this work was to perform an *in vitro* metabolism study by using these triterpenes and to determine the enzymatic kinetic parameters and possible metabolites by employing rat liver microsomes. To perform that, a bioanalytical method was developed and validated to analysis amyryns in rat microsomes. Gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC-MS) was applied in the analysis. Liquid-liquid extraction was used to clean the sample and hexane was used as extraction solvent. Before metabolism studies, the method was validated according to current legislation to analysis of drugs in biological fluids. The following parameters were evaluated: linearity, sensitivity, selectivity, precision, accuracy, stability and recovery. All parameters evaluated were in agreement to legislation guidelines. After validation, enzymatic kinetic parameters were determined through variation of incubation time and concentration of microsomal proteins. By using linear range, the incubation time of 20 min and microsomal protein concentration of 0.25 mg mL^{-1} were determined to respect V_0 conditions. The enzymatic kinetic results showed a sigmoidal profile. Thus, to calculate the kinetic parameters it was used the Hill equation. It was observed a $V_{\max} = 0.698 \pm 0.022 \text{ } \mu\text{mol/mg protein/min}$, $S_{50} = 55.18 \pm 10.5 \text{ } \mu\text{M}$ and Hill coefficient of 2.7 ± 0.17 to α amyryn and a $V_{\max} = 0.775 \pm 0.034 \text{ } \mu\text{mol/mg protein/min}$, $S_{50} = 130.4 \pm 42.8 \text{ } \mu\text{M}$ and Hill coefficient of 2.5 ± 0.21 to β amyryn. The intrinsic clearance to β and α amyryn was 3.05 mL/min/kg e 6.55 mL/min/kg , respectively. In spite of amyryns were metabolized by the CYP 450 enzymes, none metabolite was found. In this work, it was demonstrated, for the first time, the behavior of rat liver microsomes front to α and β amyryn, in which it was observed an atypical behavior, that it does not follow the Michaelis-Menten kinetics.

Keywords: Kinetic enzymatic, Sigmoidal behavior, Natural products, Non-michaelian kinetic, Positive cooperative

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplar de *Protium spruceanum* (Gentilmente concedido por Ivanildes Vasconcelos Rodrigues).....3
- Figura 2:** Unidade de isopreno.....4
- Figura 3:** Triterpenos pentacíclicos alfa (1) e beta (2) amirina.....5
- Figura 4:** Mudança da velocidade com o tempo. Adaptado de Gilbert, 2000...11
- Figura 5:** Sigmoide obtida com o gráfico V_0 versus Concentração do substrato. Adaptado de Gesztelyi et al. (2012).....12
- Figura 6:** Gráfico Eadie-Hofstee obtido em uma cinética michaeliana. Adaptado de ATKINS, 2005.....12
- Figura 7:** Gráfico Eadie-Hofstee obtido em uma cinética de cooperatividade positiva. Adaptado de ATKINS, 2005.....12
- Figura 8:** Diagrama esquemático do Cromatógrafo à Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas. 1- Injetor, 2- Sistema Carreador de Gás, 3- Coluna de separação, 4- Interface, 5- Fonte de Ionização, 6- Analisador, 7- Multiplicador de Elétrons. Adaptado de GROB; BARRY, 2004.....17
- Figura 9:** A) Imagem ressaltando o fígado que é retirado para a produção dos microssomas. B) homogenizador tipo “Potter” contendo os fragmentos de fígado após a homogeneização.....25
- Figura 10:** A) Sobrenadante que é coletado após a centrifugação por 15 minutos a 4°C a 12.000 g. B) “Pellets”, contendo os microssomas hepáticos, obtidos após a centrifugação em ultracentrífuga a 4°C por 60 minutos a uma velocidade de 105.000 g.....25
- Figura 11:** Cromatograma referente a análise da α - e β -amirina separados pela coluna RP-18, fase móvel metanol, vazão 1,0 mL min⁻¹, temperatura de análise 23 $\pm$ 2°C, detecção em 203 nm. Volume injetado 20 μ L, concentração da solução dos isômeros de 0,75 mM.....33
- Figura 12:** Cromatograma relativo a análise da α - e β -amirina separados pela coluna RP-8, fase móvel metanol, vazão 1,0 mL min⁻¹, temperatura de análise 23 $\pm$ 2°C, detecção em 203 nm. Volume injetado 20 μ L, concentração da solução dos isômeros de 0,75 mM.....33
- Figura 13:** Cromatograma relativo a análise da α - e β -amirina separados pela coluna RP-18, fase móvel metanol: água (80:20 v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹, temperatura de análise 23 $\pm$ 2°C, detecção em 203 nm. Volume injetado 20 μ L, concentração da solução dos isômeros de 0,75 mM.....34
- Figura 14:** Cromatograma relativo a análise da α - e β -amirina separados pela coluna RP-18, fase móvel metanol: água (95:5 v/v), vazão 1,0 mL min⁻¹,

temperatura de análise $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado 20 μL , concentração da solução dos isômeros de 0,75 mM.....34

Figura 15: Extração dos analitos de microsomas hepático de ratos empregando hexano como solvente extrator. Amirina isômero 1 (t_R 14,7 min) e amirina isômero 2 (t_R 15,9 min). Fase móvel metanol, vazão 1,0 mL min^{-1} , temperatura de análise $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado 20 μL , concentração dos isômeros no meio de incubação de 58,6 μM36

Figura 16 Extração dos analitos de microsomas hepático de ratos empregando hexano: isopropanol (8:2, v/v) como solvente extrator. Amirina isômero 1 (t_R 14,7 min) e amirina isômero 2 (t_R 15,9 min). Fase móvel metanol, vazão 1,0 mL min^{-1} , temperatura de análise $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado 20 μL , concentração dos isômeros no meio de incubação de 58,6 μM36

Figura 17: Efeito do volume de solvente orgânico na extração da alfa e beta amirina do meio microsomal. Fase móvel metanol, vazão 1,0 mL min^{-1} , temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), detecção em 203 nm. Concentração dos isômeros no meio de incubação de 58,6 μM , todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os números 1 e 2 correspondem aos isômeros das amirinas.....37

Figura 18: Efeito da adição de sal na extração da alfa e beta amirina do meio microsomal. Fase móvel metanol, vazão 1,0 mL min^{-1} , temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), detecção em 203 nm. Concentração dos isômeros no meio de incubação de 58,6 μM , todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os números 1 e 2 correspondem aos isômeros das amirinas.....38

Figura 19: Efeito do tempo de agitação na extração da alfa e beta amirina do meio microsomal. Fase móvel metanol, vazão 1,0 mL min^{-1} , temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), detecção em 203 nm. Concentração dos isômeros no meio de incubação de 58,6 μM , todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os números 1 e 2 correspondem aos isômeros das amirinas.....38

Figura 20: Efeito da velocidade de agitação na extração da alfa e beta amirina do meio microsomal. Fase móvel metanol, vazão 1,0 mL min^{-1} , temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), detecção em 203 nm. Concentração dos isômeros no meio de incubação de 58,6 μM , todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os números 1 e 2 correspondem aos isômeros das amirinas.....39

Figura 21: Principais fragmentos monitorados nas análises quantitativas das amirinas.....41

Figura 22: Estrutura química do 5- α -colestano.....41

Figura 23: Espectro de massas no modo "Full Scan" do padrão interno α -coletano. Os fragmentos 217, 357 e 372 m/z foram selecionados para as análises quantitativas.....42

Figura 24: Cromatograma obtido por CG-EM para análise das amirinas. Condições cromatográficas: coluna a ZB-5MS com espessura de 0,25 μm , comprimento de 30 m e diâmetro interno de 0,25 mm. Temperatura inicial de 180°C e taxa de 30°C/min até 290°C. Gás de arraste: hélio na vazão de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da interface e da fonte de ionização foram, respectivamente, 290°C e 250°C. 1) α -colestano, 2) beta amirina, 3) alfa amirina. Em azul, a rampa térmica do forno.....42

Figura 25: Gráficos de análise residual da beta amirina obtidos através do programa MINITAB.....44

Figura 26: Gráficos de análise residual da alfa amirina obtidos através do programa MINITAB.....44

Figura 27: Cromatograma demonstrando a seletividade do método. A) Branco contendo apenas o meio microssomal; B) Amostra contendo o meio microssomal fortificado com as amirinas: 1- β -amirina e 2- α -amirina.....46

Figura 28: Efeito da variação da quantidade de proteínas no consumo do substrato. Concentração das amirinas 0,12 mM. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Tempo de incubação 90 min. Todos experimentos foram realizados em triplicata.....48

Figura 29: Efeito da variação da quantidade de proteínas no consumo do substrato, faixa linear. Concentração das amirinas 0,12 mM. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Tempo de incubação 90 min. Todos experimentos foram realizados em triplicata.....48

Figura 30: Efeito da variação do tempo de incubação no consumo do substrato. Concentração da solução das amirinas 0,12 mM. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Concentração da proteína microssomal 1,5 mg mL⁻¹. Todos experimentos foram realizados em triplicata.....49

Figura 31: Efeito da variação do tempo de incubação no consumo do substrato, faixa linear. Concentração da solução das amirinas 0,12 mM. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Concentração da proteína microssomal 1,5 mg mL⁻¹. Todos experimentos foram realizados em triplicata.....49

Figura 32: Sigmoide obtida para a β -amirina. Concentração de proteínas microssomais: 0,25 mg mL⁻¹, tempo de incubação 20 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.....51

Figura 33: Sigmoide obtida para a α -amirina. Concentração de proteínas microssomais: 0,25 mg mL⁻¹, tempo de incubação 20 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.....51

Figura 34: Gráfico Eadie-Hofstee para β -amirina.....52

Figura 35: Gráfico Eadie-Hofstee para α -amirina.....52

Figura 36: Pesquisa do possível metabólito utilizando acetato de etila como solvente extrator. A) Amostra branco microssomal, B) Amostra após metabolismo pelos microssomas hepáticos de ratos, C) Amostra controle, sem adição de NADPH. 1) β -amirina, 2) α -amirina.....55

Figura 37: Cromatograma correspondente aos isômeros das amirinas. Linha preta: Decaimento do pico da amostra metabolizada. Linha rosa: Controle sem adição de NADPH. 1) β -amirina, 2) α -amirina.....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns medicamentos derivados de produtos naturais inseridos no mercado entre 1981 e 2010.....	2
Tabela 2: Principais isoformas da CYP presente em humanos.....	9
Tabela 3: Procedimento para a dosagem das proteínas.....	26
Tabela 4: Dados da linearidade do método.....	43
Tabela 5: Limite de quantificação ($n = 5$).....	44
Tabela 6: Teste de estabilidade para análise das amirinas ($n = 6$).....	45
Tabela 7: Precisão e Exatidão intraensaio ($n = 5$).....	45
Tabela 8: Precisão e Exatidão interensaio ($n = 5$).....	46
Tabela 9: Valores de recuperação do método proposto.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
A549	Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão
CALU-6	Linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Conc	Concentração
CG	Cromatógrafo à Gás
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL _{max}	Clearance intrínseco máximo
CO ₂	Dióxido de Carbono
CYP 450	Citocromo P 450
DPR	Desvio Padrão Relativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EI	Impacto de elétrons
EM	Espectrômetro de massas
ESI	Eletronebulização
FAB	Bombardeamento rápido de elétrons
GABA-A	Ácido gama-aminobutírico
GC-MS	Gas chromatography coupled with mass spectrometer
H	Coeficiente de Hill
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HL60	Linhagem celular de leucemia
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
LC-MS	Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
Log P	Coeficiente de Partição
LQ	Limite de Quantificação
K _m	Constante de Michaelis-Menten
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MS/MS	Espectrômetro de Massas Sequencial (em <i>Tandem</i>)

m/z	Razão massa/carga
n	Coeficiente de Hill
NAC	N-acetil-L-cisteína
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo
NTUB1	Linhagem celular de tumor de bexiga em humano
pK_a	Constante de dissociação
pO_2	Pressão parcial do oxigênio
Ptn	Proteína
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S	Concentração do substrato
S	Desvio Padrão
S_{50}	Concentração de substrato na qual a enzima está hemisaturada e a velocidade corresponde a metade da Velocidade Máxima
SIM	Monitoramento Seletivo de Íons
TOF	Tempo de voo
t_R	Tempo de retenção
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
V_{max}	Velocidade Máxima da reação enzimática
V_0	Velocidade Inicial
$\bar{X}$	Média

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
 1 INTRODUÇÃO	 2
1.1 Produtos naturais	2
1.1.1 Importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos.....	2
1.1.2 Triterpenos pentacíclicos α - e β -amirina	3
1.2 Metabolismo <i>in vitro</i>	7
1.2.1 Citocromo P450.....	8
1.2.2 Cinética Enzimática	9
1.2.2.1 Clearance Intrínseco	13
1.2.3 Microsomas hepáticos	13
1.3 Técnicas analíticas empregadas em estudos de metabolismo <i>in vitro</i>	14
1.3.1 Espectrometria de Massas	14
1.3.1.1 Espectrômetro de Massas em Tandem (MS/MS).....	15
1.3.1.2 Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	16
 2 OBJETIVOS	 19
2.1 Objetivos Gerais	19
2.2 Objetivos Específicos	19
 3 MATERIAIS E MÉTODOS	 21
3.1 Materiais	21
3.1.1 Solventes e Reagentes	21
3.1.2 Equipamentos para a separação cromatográfica	21
3.1.3 Colunas Cromatográficas	22
3.1.4 Equipamentos em geral.....	22
3.1.5 Amostra de alfa e beta amirina.....	22
3.1.6 Preparo das soluções das amirinas e do padrão interno.....	23

3.1.7 Animais.....	23
3.1.8 Programas utilizados no processamento de dados.....	23
3.2 Métodos.....	24
3.2.1 Isolamento e purificação de alfa e beta amirina	24
3.2.2 Preparação dos microssomas hepático de ratos.....	24
3.2.2.1 Dosagem de Proteínas.....	25
3.2.3 Procedimento de incubação para o estudo de metabolismo <i>in vitro</i>	26
3.2.4 Procedimento de preparação da amostra (extração líquido-líquido)	27
3.2.5 Análise das amirinas utilizando o cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).....	27
3.2.6 Validação da metodologia analítica	28
3.2.6.1 Linearidade.....	28
3.2.6.2 Limite de quantificação (LQ).....	29
3.2.6.3 Precisão e Exatidão.....	29
3.2.6.4 Recuperação	30
3.2.6.5 Estabilidade	30
3.2.6.6 Seletividade.....	31
3.2.7 Pesquisa dos metabólitos.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Otimização do método analítico empregando CLAE	33
4.2 Otimização da preparação da amostra empregando a extração líquido-líquido	35
4.3 Mudança de técnica analítica para análise das amirinas.....	39
4.4 Análise das amirinas por CG-EM	40
4.5 Validação da metodologia analítica	42
4.5.1 Linearidade.....	43
4.5.2 Limite de quantificação (LQ).....	44
4.5.3 Estabilidade	45
4.5.4 Precisão e exatidão intraensaio e interensaio	45
4.5.5 Seletividade	46
4.5.6 Recuperação	46
4.6 Estudo de metabolismo <i>in vitro</i>	47
4.7 Pesquisa do Metabólito	54
5 CONCLUSÃO	58

6 REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO	69

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais

1.1.1 Importância dos produtos naturais como fonte de novos fármacos

Historicamente, uma parcela dos fármacos comercializados teve sua origem de produtos naturais e seus derivados. Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas. Exemplos importantes de fármacos obtidos de plantas são a digoxina, proveniente da *Digitalis spp.* e a morfina e a codeína, obtidas da *Papaver somniferum* (RATES, 2001). A utilização dos produtos naturais pode seguir duas vertentes principais: (i) a comercialização de partes da planta processada que contém o ativo ou (ii) a produção sintética de ativos a partir dos produtos naturais (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Um estudo recente realizado por Newman e Cragg (2012) apresenta um levantamento sobre a utilização de produtos naturais no desenvolvimento de moléculas ativas. A Tabela 1 contém alguns produtos naturais inseridos no mercado e sua principal ação (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Tabela 1: Alguns medicamentos derivados de produtos naturais inseridos no mercado entre 1981 e 2010.

Derivado de Produto Natural	Nome comercial	Efeito farmacológico
Daptomicina	Cubicin®	Antibacteriano
Teicoplanina	Targocid®	Antibacteriano
Acetato de Caspofungina	Cancidas®	Antifúngico
Anidulafungina	Eraxis®	Antifúngico
Zanamivir	Relenza®	Antiviral
Peramivir	PeramiFlu®	Antiviral
Artemisinina	Artemisin®	Antiparasitário
Ivermectina	Mectizan®	Antiparasitário
Pentostatina	Nipent®	Anticancerígeno
Peplomicina	Pepleo®	Anticancerígeno

Nesse estudo foi possível observar que 48,6% das substâncias estudadas atualmente para o tratamento do câncer são provenientes de produtos naturais ou derivados. Nesse estudo, vários produtos naturais demonstraram efeitos contra o câncer, tais como: masoprocol, paclitaxel, romidepsina e solamargina;

todos estes fármacos estão disponíveis atualmente no mercado (NEWMAN; CRAGG, 2012).

O Brasil, com uma das maiores biodiversidades do mundo, possui plantas com um enorme potencial como fonte de novos fármacos, o que desperta um grande interesse do mundo inteiro. Dentre toda essa diversidade existem as plantas da família Burseraceae, como a *Protium spruceanum* e a *Protium heptaphyllum* que contem os compostos ativos α - e β -amirina, objetos deste estudo.

1.1.2 Triterpenos pentacíclicos α - e β -amirina

A família Burseraceae compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies tropicais e subtropicais. Esta família ocorre em todo Brasil, sendo largamente encontrada na região amazônica, onde sua seiva é conhecida como breu branco, goma limão e almécega do Brasil (BANDEIRA et al., 2002). Alguns de seus exemplares são: *Protium heptaphyllum*, *Brassica oleracea*, *Protium unifoliolatum* e *Protium spruceanum*. Estas plantas contem triterpenos pentacíclicos, como a α - e β -amirina (TAYLOR et al., 2006). A Figura 1 mostra um exemplar de *Protium spruceanum*.

Figura 1: Exemplar de *Protium spruceanum* (Gentilmente concedido por Ivanildes Vasconcelos Rodrigues).

Os terpenos são constituídos por unidades de isopreno. Com isso, os monoterpenos são aqueles que possuem duas unidades de isopreno (Figura 2). Já os triterpenos possuem 6 destas unidades. O precursor dos terpenos é um composto de 6 carbonos, um ácido diol, chamado ácido mevalônico. Na formação dos terpenos este ácido é transformado em um pirofosfato e perde CO_2 e H_2O formando o pirofosfato de isopentenilo, que também pode se isomerizar a pirofosfato de 3,3-dimetilalilo. São esses pirofosfatos que dão origem aos terpenos (CONSTANTINO, 2008).

Figura 2: Unidade de isopreno.

As propriedades físico-químicas das amirinas indicam a característica apolar dessas substâncias. A alfa amirina possui um log P de 10,6, um pKa de 15,1 e o ponto de ebulição de 243°C , já a beta amirina possui um log P de 11,0, um pKa de 15,1 e o ponto de ebulição de 260°C . Além disso, são insolúveis em água e solúveis em solventes como o éter, hexano, benzeno e clorofórmio (SCIFINDER WEB).

Os triterpenos pentacíclicos, em geral, apresentam uma ampla variedade de efeitos farmacológicos, que incluem efeitos anti-inflamatório, antitumoral, gastroprotetor e hepatoprotetor (HU, 1998; LIU et al., 1995; JAMES; MAYEUX; HINSON, 2003). Dentre os triterpenos destacam-se a alfa e a beta amirina (Figura 3), isômeros de posição. Entre as diversas atividades atribuídas às amirinas, destaca-se a atividade antitumoral. Taylor et al. (2006) demonstraram que o extrato da casca da *P. heptaphyllum* e *P. unifoliolatum* mostraram citotoxicidade significativa contra células tumorais de pulmão das linhagens A549 e CALU-6, além da inibição da leucina aminopeptidase, enzima relacionada com certos tipos de câncer como, por exemplo, aqueles que atingem o fígado. Já a beta amirina, isolada da *Garcinia subelliptica*, mostrou efeitos contra células tumorais de bexiga em humano (NTUB1) (LIN et al., 2011). Em um estudo recente, foi demonstrado que o mecanismo de ação das

amirinas sobre a HL60, célula tumoral encontrada em leucemias, é através da indução da morte celular por apoptose (BARROS et al., 2011).

Figura 3: Triterpenos pentacíclicos alfa (1) e beta (2) amirina.

Recentemente foi demonstrado que o palmitato de beta amirina e o acetato de beta amirina possuem capacidade de diminuir a concentração da lipoproteína LDL e aumentar a concentração da lipoproteína HDL, além de inibir significativamente a enzima HMG-CoA redutase (MAURYA et al., 2012). Aragão et al. (2006) avaliaram efeitos da alfa e beta amirina sobre o sistema nervoso central e foi encontrado que esses compostos interagem com o receptor GABA-A, provavelmente nos mesmos subtipos de receptores que atuam os benzodiazepínicos, produzindo efeitos sedativos e hipnóticos. Este mesmo estudo demonstrou a capacidade antidepressiva das amirinas ao aumentar a atividade noradrenérgica, o que está diretamente relacionada com o quadro de depressão (ARAGÃO et al., 2006). Além disso, Aragão e colaboradores (2007) demonstraram efeito antiplaquetário significativo da alfa e beta amirina isoladas da resina de *Protium heptaphyllum*. O efeito foi dependente da concentração e a agregação plaquetária foi induzida por três substâncias diferentes: adenosina 5'-difosfato (ADP), colágeno e ácido araquidônico.

Vários trabalhos também comprovaram a ação das amirinas contra micro-organismos e fungos (JOHANN et al., 2007; MALLAVADHANI et al., 2004; ZHENG et al., 2011). Johann et al. (2007) demonstraram a ação de derivados esterificados da α - e β -amirina contra espécies de *Candida*, na qual os derivados formiato e acetato mostraram potencial atividade antifúngica contra *Candida* spp., além disso, o formiato de amirina inibiu a habilidade de adesão da *C. albicans* nas células epiteliais da boca.

Além dessas ações, também foram confirmados os efeitos atribuídos pela medicina popular, tais como: anti-inflamatório e antipruriginoso (CARRETERO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2004a; OLIVEIRA et al., 2004b; WU et al., 2011). Oliveira et al., (2004a) avaliaram a capacidade gastroprotetora e anti-inflamatória da resina natural coletada do tronco de *Protium heptaphyllum* em camundongos e ratos. Neste estudo os autores avaliaram seus efeitos em modelos experimentais de úlceras gástricas e inflamação. Em camundongos, a resina (200 e 400 mg kg⁻¹) atenuou significativamente as lesões gástricas induzidas por etanol ou etanol acidificado, de uma forma semelhante a N-acetil-L-cisteína (NAC). Em ratos, em doses similares, a resina não alterou o edema de pata-traseira induzido pela carragenina, mas efetivamente reduziu a formação de granuloma induzido pelo método “cotton pellet”, sugerindo seu efeito inibitório na formação de colágeno, mas não em edema agudo. A resina não demonstrou nenhuma toxicidade em camundongos até a dose oral de 5 g kg⁻¹. A análise fitoquímica revelou a presença dos triterpenos alfa e beta amirina como principais constituintes da resina. Estes resultados indicam que o potencial gastroprotetor e anti-inflamatório da resina pode ser atribuído principalmente a esses triterpenos pentacíclicos.

Outro estudo realizado por Oliveira et al. (2004b) avaliou a capacidade da alfa e beta amirina na supressão do prurido empregando camundongos como modelos animais. Nesse estudo a alfa e beta amirina foram isoladas da resina de *Protium heptaphyllum* e posteriormente injetadas em camundongos. Nesse trabalho os animais foram pré-tratados oralmente com alfa e beta amirina (50, 100 e 200 mg kg⁻¹) ou ciproheptadina (10 mg kg⁻¹), um antagonista dos receptores de histamina. Duas horas depois, eles receberam injeções subcutâneas de dextran T40 (75 mg kg⁻¹) ou do composto 48/80 (3 mg kg⁻¹) na parte das costas e os “arranhões” foram quantificados por 20 min. O prurido induzido por dextran T40 e pelo composto 48/80 foram significativamente inibidos nos animais pré-tratados com alfa e beta amirina (100 e 200 mg kg⁻¹) ou ciproheptadina (10 mg kg⁻¹). Estes estudos indicaram que o efeito antipruriginoso da alfa e beta amirina pode estar relacionado a uma estabilização na membrana dos mastócitos.

Devido a este grande potencial de efeitos farmacológicos apresentados é de suma importância conhecer o comportamento destas moléculas ao serem

metabolizadas por enzimas hepáticas, já que esta é uma etapa inicial no desenvolvimento de um novo fármaco.

1.2 Metabolismo *in vitro*

Devido o grande potencial farmacológico de novas moléculas pesquisadas, uma etapa importante e inicial no desenvolvimento de um novo fármaco é a avaliação do seu comportamento frente as enzimas do citocromo P450. Estas enzimas normalmente inserem um átomo de oxigênio molecular no substrato. Em mamíferos, este processo catalítico requer a transferência de elétrons do NADPH para as enzimas do citocromo P450 (LYUBIMOV, 2012; URLACHER; GIRHARD, 2012). As enzimas do citocromo P450 catalisam uma imensa variedade de reações químicas em procariotos, plantas e animais. Elas também participam na biossíntese de hormônios, segundos mensageiros, e também atuam no metabolismo de xenobióticos no corpo humano (ATKINS, 2005).

O metabolismo de um novo fármaco pelo organismo é um dos determinantes mais importantes em sua disposição cinética, sendo a etapa inicial para a eliminação da molécula pelo organismo (KUMAR; SURAPANENI, 2001). Geralmente o metabolismo de fármacos envolve as reações de fase I e fase II e posterior eliminação do fármaco. Nas reações de fase I as moléculas apolares são convertidas em compostos mais polares principalmente por reações de oxidação, redução e hidrólise. As reações de fase II envolvem a conjugação dos substratos com moléculas como o ácido glicurônico ou grupos acetil (ASHA; VIDYAVATHI, 2011). Frequentemente os analitos sofrem reações de fase I e posteriormente de fase II; contudo essa não é uma regra sendo que os substratos podem diretamente sofrer reações de fase II, sem necessariamente passar pelas de fase I. Nas reações de fase I, a oxidação de fármacos pela citocromo P450 tem várias consequências importantes, tanto na farmacologia quanto na toxicologia, como a influência sobre a biodisponibilidade dos fármacos no organismo. Além disso, o polimorfismo genético das enzimas do citocromo P450 pode levar a diferentes perfis de biotransformação de um determinado fármaco (MANSUY, 2011). A biotransformação se processa principalmente no fígado. Neste órgão, estes compostos migram para o hepatócito, e nesta célula, são atraídas para as

paredes do retículo endoplasmático liso, já que esta região possui características lipofílicas, assim como as substâncias a serem biotransformadas. Esse processo geralmente inativa o fármaco, pois, além de modificar pontos fundamentais de sua estrutura, diminui a possibilidade de que o mesmo alcance tecidos suscetíveis. A biotransformação é, para esses fármacos, sinônimo de eliminação. Algumas vezes, entretanto, originam-se metabólitos ativos ou até mais ativos que o fármaco administrado. Para avaliar o comportamento metabólico dos fármacos vários modelos experimentais *in vitro* podem ser usados, tais como os microsossomas hepáticos, hepatócitos, frações S9 de fígados e superssomas (isoformas isoladas do CYP) (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

O estudo de metabolismo *in vitro* fornece valiosas informações sobre a natureza dos produtos metabólicos, além de possibilitar o isolamento de enzimas de fase I e II e permitir a comparação do metabolismo entre diferentes espécies. O emprego de sistemas *in vitro* resulta em menores despesas com a pesquisa, rápido tempo para alcançar resultados e a capacidade de determinar e comparar as constantes em tecidos obtidos a partir de várias espécies (LIPSCOMB; POET, 2008).

1.2.1 Citocromo P450

As enzimas da citocromo foram descobertas em 1958 em fígado de rato e porco, sendo caracterizadas por uma intensa absorção em 450 nm (MANSUY, 2011). As enzimas da citocromo P450 (CYP450) são hemoproteínas caracterizadas por possuírem um ferro em seu interior. Sua classificação é baseada na sequência de aminoácidos destas proteínas. Duas enzimas da citocromo contendo 40% da sequência de aminoácidos em comum são consideradas da mesma família sendo representada através de números, por exemplo, CYP1 e CYP2. Já as subfamílias possuem 55% de semelhança e são representadas por letras, por exemplo, CYP1A (COLEMAN, 2005). Atualmente, 57 famílias foram encontradas em humanos, mas apenas 16 estão relacionadas com o metabolismo de fármacos (LYUBIMOV, 2012). As principais enzimas responsáveis pela biotransformação estão representadas na Tabela 2, na qual estão demonstrados os substratos modelos que são

metabolizados por cada isoforma e exemplos de indutores e inibidores destas enzimas (COLEMAN, 2005; LYUBIMOV, 2012).

Tabela 2: Principais isoformas da CYP presente em humanos.

Isoforma	Substrato modelo	Inibidor	Indutor
1A1	Cafeína	Alfa-naftoflavona	Organoclorados
1A2	Cafeína	Cimetidina	Nicotina
2A6	Cumarina	Tranilcipromina	Rifampicina
2B6	Ciclofosfamida	Tranilcipromina	Rifampicina
2C8	Amodiaquina	Genfibrozila	Rifampicina
2C9	Amitriptilina	Isoniazida	Rifampicina
2C19	Citalopram	Cimetidina	Prednisona
2D6	Venlafaxina	Amiodarona	Nenhum
2E1	Benzeno	Dissulfiram	Etanol
3A4/5	Aflatoxina B1	Cimetidina	Carbamazepina

1.2.2 Cinética Enzimática

A cinética enzimática é uma área da bioquímica que estuda a ação das enzimas sobre o substrato, ou seja, a sua atividade catalítica. Essa área também pode ser considerada como um ramo da cinética química que estuda as propriedades catalíticas das enzimas (ENGEL, 1981). O estudo *in vitro* é necessário para prever o tipo de reação que a enzima pode catalisar *in vivo*. Dessa forma, a caracterização *in vitro* da biotransformação de fármacos inicia-se com uma análise de seus parâmetros cinéticos que está relacionado com a velocidade de formação do(s) metabólito(s) ou consumo do substrato por um sistema enzimático, por exemplo, o hepático (GILBERT, 2000).

Michaelis e Menten (1913) estudaram a ação da invertase sobre a sacarose e propuseram um mecanismo com várias etapas para descrever a influência da concentração do substrato sobre a atividade da enzima. O modelo proposto está demonstrado na Reação 1.

Na qual E representa a enzima, S o substrato e P o produto. A velocidade da reação está vinculada a etapa lenta, no caso, a transformação

de E•S em produto, sendo uma reação de 1ª ordem. O modelo matemático de cinética enzimática de Michaelis-Menten é o mais empregado e está apresentado na Equação 1, abaixo (GILBERT, 2000).

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

A equação de Michaelis-Menten é a equação da velocidade para uma reação catalisada através de enzimas e com um único substrato. É uma expressão da relação quantitativa entre a velocidade inicial V_0 , a velocidade máxima V_{max} , e a concentração do substrato (S), todas relacionadas através da constante de Michaelis-Menten ou K_m . O K_m é equivalente à concentração de substrato na qual V_0 é igual à metade de V_{max} , e indica a afinidade de uma enzima pelo seu substrato (VENKATAKRISHNAN; VON MOLTKE; GREENBLATT, 2001). O gráfico de Michaelis-Menten mostra que a extensão da formação do produto é determinada em função do tempo para uma concentração crescente de substrato. A velocidade da reação depende da quantidade de enzima que está presente no complexo enzima-substrato (ES). Em concentrações baixas de substrato, pouca enzima está presente no complexo ES. Dessa forma, há uma grande quantia de enzima livre que não apresenta substrato ligado. Em altas concentrações do substrato, toda enzima está virtualmente no complexo ES. Assim, a quantia de enzima que está presente no complexo ES é determinada pela proporção V_0/V_{max} , que é $ES/(ES + E) = V_0/V_{max} = [S] / (K_m + [S])$ (GILBERT, 2000). Enzimas que seguem a cinética proposta por Michaelis e Menten produzem um perfil hiperbólico no gráfico da velocidade *versus* concentração do substrato (LYUBIMOV, 2012).

Na determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos é essencial manter condições de velocidade inicial (V_0), que corresponde a uma porcentagem máxima de 10% de depleção do substrato. Esta condição deve ser garantida, pois ao longo da reação a velocidade torna-se menor devido a fatores como: depleção do substrato, inibição do metabolismo pelo produto e instabilidade da enzima (GILBERT, 2000). Dessa forma, a velocidade inicial deve ser determinada antes destas mudanças (Figura 4).

Figura 4: Mudança da velocidade com o tempo. Adaptado de Gilbert, 2000.

Existem outros comportamentos que podem ser observados em estudos de cinética enzimática. Dessa forma, Hill (1910) descreveu a relação do equilíbrio quantitativo entre a pressão parcial do oxigênio (pO_2) e a porcentagem de saturação da hemoglobina com oxigênio através de uma sigmoide (GOUTELLE et al., 2008). Este comportamento é chamado de cooperativismo positivo; ele é gerado pela ligação de um primeiro substrato a enzima que facilita a ligação dos demais substratos resultando em uma curva sigmoide, portanto diferente da curva hiperbólica proposta por Michaelis-Menten (GILBERT, 2000). Este tipo de comportamento pode ser demonstrado pela Equação 2.

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]^h}{(S_{50})^h + [S]^h} \quad (2)$$

S corresponde à concentração do substrato, S_{50} é a concentração do substrato na qual a enzima está hemissaturada e sua velocidade é a metade da velocidade máxima (V_{max}). h ou n corresponde ao coeficiente de Hill e indica o grau de cooperatividade (ou sigmoicidade). Quando h é igual a 1 a Equação 2 simplifica-se e torna-se a equação de Michaelis-Menten (Equação 1). Quando o valor de h for maior que 1, tem-se uma cooperatividade positiva (Figura 5) (LYUBIMOV, 2012).

Figura 5: Sigmoide obtida com o gráfico V_0 versus Concentração do substrato. Adaptado de Gesztelyi et al. (2012).

Muitas vezes, o comportamento sigmoideal é difícil de ser distinguido da hipérbole produzida pela cinética típica, então, o gráfico de Eadie-Hofstee é utilizado já que produz dois comportamentos bem diferentes ao correlacionar V_0 com V_0/S (Figuras 6 e 7).

Figura 6: Gráfico Eadie-Hofstee obtido em uma cinética michaeliana. Adaptado de ATKINS, 2005.

Figura 7: Gráfico Eadie-Hofstee obtido em uma cinética de cooperatividade positiva. Adaptado de ATKINS, 2005.

1.2.2.1 Clearance Intrínseco

Após a entrada da substância no organismo, o mecanismo de clearance é responsável pela sua eliminação. O clearance ou depuração intrínseca é uma medida da relação dos parâmetros cinéticos enzimáticos para o processo de eliminação e, desta forma, refletem a capacidade máxima da depuração. Ele fornece uma estimativa da capacidade intrínseca do organismo em eliminar o fármaco na ausência de limitações, como as impostas pelo fluxo sanguíneo (GOODMAN; GILMAN, 2007).

Este parâmetro tem sido mensurado durante a descoberta de fármacos e tal dado é usado na predição das características ideais de disposição de um fármaco no organismo. Além disso, o clearance intrínseco é utilizado na predição do clearance hepático *in vivo* (CHIBA; ISHII; SUGIYAMA, 2009; LIPSCOMB; POET, 2008).

1.2.3 Microsomas hepáticos

Microsoma hepático é o modelo *in vitro* mais empregado em estudos de metabolismo. Consiste de uma fração subcelular do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos e são obtidos por meio de homogeneização do fígado, seguido de centrifugações diferenciais (FASINU; BOUIC; ROSENKRANZ, 2012).

Os estudos com microsomas são aplicados na descoberta e desenvolvimento de fármacos que incluem a identificação dos metabólitos, comparação de metabolismo por diferentes espécies, predição do clearance *in vivo* e reações de fenotipagem. Entre as vantagens desta técnica estão: baixo custo, simplicidade no uso, é um dos modelos *in vitro* melhor caracterizados na pesquisa de metabolismo de fármacos e podem ser armazenados por longos períodos sem perder a atividade enzimática (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

1.3 Técnicas analíticas empregadas em estudos de metabolismo *in vitro*

1.3.1 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas iniciou-se com os experimentos de Thomsom analisando “raios catódicos” e a condutividade elétrica de gases. O princípio físico envolvido neste sistema é que partículas carregadas eletricamente, quando em movimento, podem ter suas trajetórias alteradas por campos elétricos e por campos magnéticos: a grandeza do desvio está relacionada a muitas variáveis que incluem a massa da partícula carregada em questão (CONSTANTINO, 2008). O espectrômetro de massas é um instrumento altamente sofisticado que consiste basicamente de cinco partes: sistema para injeção e ionização da amostra, analisador de massas, detector de íons e processador de dados (NIESSEN, 2006).

A elucidação estrutural de pequenas moléculas utilizando o espectrômetro de massas é uma ferramenta importante em estudos bioanalíticos, como os estudos de metabolismo *in vitro* utilizando microssomas hepáticos. A confirmação da estrutura pode ser obtida utilizando metodologias complementares como a ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional, além do infravermelho e da cristalografia por raio-X (KIND; FIHEN, 2010). Para a aquisição de dados dois modos são geralmente utilizados: o modo Full-scan e o modo SIM (Monitoramento Seletivo de Íons). Na análise no modo Full-scan uma série de espectros de massas com uma ampla faixa de massas são continuamente adquiridos. Já no modo SIM, alguns íons característicos dos analito são selecionados, permitindo o alcance de um menor limite de detecção, já que a produção de íons é muito maior (NIESSEN, 2001).

A estratégia para a análise dos metabólitos depende das informações disponíveis e da fase em que se encontra o estudo. Nos estágios iniciais da descoberta e estudos de cinética enzimática são baseados em análises quantitativas do metabólito e/ou de seu precursor (KOSTIAINEN et al., 2003). No estudo de elucidação estrutural do(s) metabólito(s) formado(s), as características necessárias para análise são a especificidade e sensibilidade do método desenvolvido (KOSTIAINEN et al., 2003). Kind e Fihen (2010) mostram

em sua revisão alguns fragmentos típicos produzidos pelo metabolismo de fase I e fase II, que podem facilitar a interpretação de um espectro de massas. Nesse trabalho, os autores mostram as técnicas mais empregadas de ionização na elucidação de metabólitos, ressaltando as vantagens e desvantagens de cada uma e levando em consideração as características da molécula estudada, em ordem crescente de polaridade. Nesse trabalho, os ionizadores indicados pelos autores são o impacto de elétrons (EI), a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a eletronebulização (ESI) (KIND; FIHEN, 2010).

1.3.1.1 Espectrômetro de Massas em Tandem (MS/MS)

A utilização de espectrômetros de massas acoplados (MS/MS) permite a análise de misturas complexas. Entre as técnicas de ionização, apenas o impacto eletrônico permite uma alta fragmentação da substância em questão. Então, para a obtenção de informações adicionais sobre a estrutura utilizando outros métodos é empregada a espectrometria de massas sequencial ou em tandem (NIESSEN, 2006). A forma mais simples deste equipamento acopla dois espectrômetros o primeiro é utilizado para selecionar o íon precursor ou íon “pai”, em seguida, este íon entra na câmara de colisão, onde é fragmentado com o auxílio de um gás inerte e, por último, os fragmentos formados são selecionados pelo segundo espectrômetro de massas, são chamados íons “filhos” (DASS, 2007; TAFT; SILVA, 2008). Os espectros obtidos a partir de equipamentos de espectrometria de massas sequencial não tem a mesma reprodutibilidade do que o obtido com o impacto de elétrons, mas é possível compor bibliotecas de espectros (KIND; FIHEN, 2010). Levsen et al. (2005) discutem a utilização da espectrometria de massas em tandem na investigação de metabólitos produzidos na fase II do metabolismo. Esse trabalho apresenta técnicas alternativas ao CG-EM (cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas) na elucidação de metabólitos, uma vez que os metabólitos produzidos na fase II são altamente polares, necessitando derivatizar a amostra antes da análise no CG-EM. Com isso, várias técnicas de ionização branda são mencionadas, como o bombardeamento rápido de elétrons (FAB), a eletronebulização (ESI) e a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Liu e Hop (2005) mostram a utilidade dos vários

modos de aquisição disponíveis com a espectrometria de massas em tandem na caracterização de metabólitos, além de várias estratégias para derivatização química da amostra, a fim de facilitar a elucidação estrutural. Um exemplo é a troca “*online*” do hidrogênio pelo deutério, que pode ser feita usando um solvente deuterado como fase móvel, o que implica em um tempo de preparo de amostra menor. Outra revisão (MA; ZHU, 2009) apresenta diferentes mecanismos para aumentar a seletividade utilizando um triplo quadrupolo na detecção e caracterização estrutural de metabólitos, como a marcação do isótopo estável utilizando a glutatona como agente de captura, que é colocado na solução de incubação. Outra alternativa é a utilização de analisadores com uma alta resolução, o tempo de voo (TOF); e utilizando das vantagens deste tipo de analisador, foi desenvolvido um programa para processamento de dados chamado “*mass defect filter*” (MDF) com o objetivo de detectar metabólitos rapidamente em matrizes complexas (MA; ZHU; 2009).

1.3.1.2 Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A cromatografia à gás acoplada ao espectrômetro de massas é uma poderosa ferramenta para a análise qualitativa e quantitativa de uma ampla variedade de compostos relativamente voláteis (NIESSEN, 2001).

O interfaceamento é simples, uma vez que a conexão entre o cromatógrafo a gás (CG) e o espectrômetro de massas (EM) pode ser feita diretamente, já que o sistema de bombeamento do espectrômetro de massas é capaz de captar todo eluente da coluna. Esta interface é aquecida para impedir a condensação do analito. A fonte de ionização usada no espectrômetro necessita ionizar compostos volatilizados, as fontes mais utilizadas são o impacto de elétrons e a ionização química. Para separação dos íons, os analisadores do tipo quadrupolo podem ser empregados neste tipo de equipamento. Nesse analisador os íons são separados de acordo com a sua relação massa/carga (m/z). Este analisador consiste em quatro cilindros metálicos paralelos nos quais se aplicam uma corrente elétrica do tipo DC e um potencial de RF (radiofrequência) alternadamente. No entanto, outros modelos podem ser usados como o tempo de voo e *ion-trap*. Um fator importante no acoplamento CG-EM é o vácuo que deve ser mantido na interface, fonte de

ionização e no analisador, a fim de evitar a colisão entre as moléculas e os íons. A Figura 8 mostra um diagrama esquemático de um equipamento de cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; GROB; BARRY, 2004; Mc NAIR; MILLER, 2009; NIESSEN, 2001).

Figura 8: Diagrama esquemático do Cromatógrafo à Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas. 1- Injetor, 2- Sistema Carreador de Gás, 3- Coluna de separação, 4- Interface, 5- Fonte de Ionização, 6- Analisador, 7- Multiplicador de Elétrons. Adaptado de GROB; BARRY, 2004.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente projeto tem como objetivo caracterizar os parâmetros cinéticos *in vitro* da alfa e beta amirina utilizando microsomas hepático de ratos, assim como a determinação de possíveis metabólitos formados desses substratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de uma técnica analítica para separação e quantificação da alfa e beta amirina;
- Desenvolvimento de uma técnica de extração das amirinas de microsomas hepático de ratos;
- Validação da metodologia analítica empregando microsomas hepático de ratos como matriz;
- Caracterização dos parâmetros cinéticos da alfa e beta amirina empregando microsomas hepático de ratos;
- Pesquisa de metabólitos formados a partir do metabolismo *in vitro*.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Solventes e Reagentes

Os solventes utilizados (grau cromatografia) nos experimentos foram: metanol, acetonitrila e isopropanol da J.T. Baker[®] (Phillipsburg, EUA), hexano da Panreac[®] (Barcelona, Espanha), diclorometano e acetato de etila da Mallinckrodt Chemicals[®] (Phillipsburg, EUA), clorofórmio, éter e metil terc-butil éter da Vetec[®] (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Os reagentes empregados na preparação das soluções tampão foram fosfato monossódico monoidratado (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) fosfato dissódico diidratado (Merck[®], Darmstadt, Alemanha), Hepes (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) cloreto de potássio Nuclear (Diadema, SP, Brasil), ácido clorídrico da Chemco[®] (Campinas, SP, Brasil), glicerina e tris (base) (hidroximetil)aminometano da J.T. Baker[®] (Phillipsburg, NJ, EUA) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) da Carlo Erba[®] (Milão, Itália). Os reagentes utilizados para a preparação dos cofatores empregados nos estudos de metabolismo *in vitro* foram nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, glicose-6-fosfato e a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, todos obtidos da Sigma-Aldrich[®] (St Louis, MO, EUA). Como padrão interno foi usado o α -colestano também da Sigma-Aldrich[®] (St Louis, MO, EUA).

Para a dosagem do conteúdo das proteínas foi utilizado o kit para dosagem de proteínas totais da Labtest (Labtest[®], MG, Brasil).

3.1.2 Equipamentos para a separação cromatográfica

As análises iniciais foram realizadas em um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu[®] (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-10AT-VP de duplo pistão, um injetor Rheodyne (Cotati, CA, EUA) modelo 7125 com amostrador de 50 μ L e detector na região Ultravioleta-Visível (modelo SPD-10A VP).

No desenvolvimento do método foi empregado também um sistema para cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM)

da marca Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) (modelo: GCMS-QP 2010) com um auto amostrador da Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) (modelo: AOC-5000).

3.1.3 Colunas Cromatográficas

- 1) Coluna RP-18 da Phenomenex[®] (Torrance, CA, EUA) com dimensões de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e partícula de 5 micron,
- 2) Coluna RP-8 da Lichrospher[®] (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) com dimensões de 124 mm de comprimento, 4,0 mm de diâmetro e partícula de 5 micron,
- 3) Coluna ZB-5MS da Phenomenex[®] (Torrance, CA, EUA) com espessura de 0,25 µm, comprimento de 30 m e diâmetro interno de 0,25 mm.

3.1.4 Equipamentos em geral

Para a pesagem das substâncias foi utilizada a balança Sartorius AG Germany modelo CP225D (Sartorius[®], Santo André, SP, Brasil). Na preparação dos microssomas foi utilizado um homogenizador tipo “Potter” modelo MA 181 (Marconi[®], Piracicaba, SP, Brasil). Nas etapas de centrifugação foram utilizadas a centrífuga Hitachi (CF16RXII, Himac[®], Tóquio, Japão) e a ultra centrífuga Beckman XL-70 (Beckman[®], Carlsbad, CA, EUA). A água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q Plus (Millipore[®], Bedford, EUA). Para a dosagem das proteínas foi utilizado um espectrofotômetro da Agilent[®] modelo 8453 (Waldbrook, Alemanha). Para a incubação das amostras foi utilizado um banho metabólico, modelo SL 157, Solab[®] (Piracicaba, SP, Brasil). O peagômetro utilizado nas aferições de pH das soluções aquosas foi o Quimis[®] modelo A88AS (Diadema, SP, Brasil). Na etapa de preparação das amostras foi utilizado um agitador Vibrax VXR (IKA[®], Staufen, Alemanha), um agitador Phoenix[®] modelo AP56 (Araraquara, SP, Brasil) e a centrífuga Hitachi descrita acima.

3.1.5 Amostra de alfa e beta amirina

Os substratos foram isolados do extrato etanólico de folhas de *Protium spruceanum*, coletada na cidade de Lavras-MG e fornecidos gentilmente pelo

professor Gustavo Henrique Bianco de Souza da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Para o cálculo da concentração dos isômeros levou-se em consideração a proporção de (6:4 *p/p*) para a beta e alfa amirina, respectivamente. Essa proporção foi adotada, pois as análises de pureza realizadas pelo grupo do professor Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza mostraram essa relação após a purificação das amostras.

3.1.6 Preparo das soluções das amirinas e do padrão interno

Para o preparo das soluções das amirinas foi preparado uma solução-estoque de 116,67 μM , que corresponde a maior massa de amirinas solubilizada que pode ser solubilizada por metanol. A partir desta solução foram preparadas as seguintes soluções-trabalho: 0,28; 0,53; 1,06; 1,76; 2,80; 3,52; 4,69; 5,86; 11,72; 17,58; 23,44; 35,15; 46,87 e 70,31 μM . O padrão interno 5- α -colestano foi devidamente pesado e solubilizado em hexano, resultando em uma concentração de 67 μM .

3.1.7 Animais

Seis ratos machos da raça Wistar com 40 dias de idade, pesando entre 180-220 g foram fornecidos pelo biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto foram utilizados para obtenção dos microsomas hepáticos. Os animais foram ambientados a 25°C com ciclos de luz de 12 horas. Antes da retirada do fígado, os animais foram submetidos a jejum por uma noite e na manhã seguinte foram sacrificados pelo método de decaptação (Protocolo CEUA nº 11.1.323.53.8).

3.1.8 Programas utilizados no processamento de dados

MINITAB Release, version 14.1 (State College, PA, EUA) foi utilizado para análise da regressão linear. GraphPad Prism Version 3.03 (San Diego, CA, EUA) foi empregado para a determinação dos parâmetros cinético enzimáticos.

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento e purificação de alfa e beta amirina

Uma vez que não faz dos objetivos desse trabalho, o isolamento e purificação das amirinas foram realizados. Contudo, o protocolo de isolamento e purificação das amirinas das folhas de *Protium spruceanum* pode ser encontrado em Rodrigues (2010).

3.2.2 Preparação dos microsomas hepático de ratos

Os microsomas hepáticos foram obtidos pelo método descrito por Omura e Sato (1964). O fígado foi retirado (Figura 9A) (após decaptação do animal), seccionado em pequenos pedaços e lavado três vezes com solução tampão $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7,4), contendo $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. Ressaltando que todo procedimento foi realizado em baixa temperatura. Em seguida, utilizou-se um homogeneizador tipo “Potter” (Figura 9B), realizando uma homogeneização com 3 ciclos, sendo que cada ciclo compreende 3 triturações de um minuto com velocidade de 1000 rpm. Após, o fígado homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 4°C a 12.000 g . O sobrenadante foi coletado (Figura 10A) e centrifugado em ultracentrífuga a 4°C por 60 minutos a uma velocidade de 105.000 g . O “pellet” (Figura 10B) contendo os microsomas foi ressuscitado em solução tampão $0,05 \text{ M}$ Hepes-HCl (pH 7,4) contendo 20% de glicerina e $0,001 \text{ M}$ EDTA pH 7,4 e congelado a -170°C até o momento do uso.

Figura 9: A) Imagem ressaltando o fígado que é retirado para a produção dos microssomas. B) homogenizador tipo “Potter” contendo os fragmentos de fígado após a homogeneização.

Figura 10: A) Sobrenadante que é coletado após a centrifugação por 15 minutos a 4°C a 12.000 g. B) “Pellets”, contendo os microssomas hepáticos, obtidos após a centrifugação em ultracentrífuga a 4°C por 60 minutos a uma velocidade de 105.000 g.

3.2.2.1 Dosagem de Proteínas

O conteúdo de proteínas presente nos microssomas foi medido pelo método do biureto, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Procedimento para a dosagem das proteínas.

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-	0,02 mL	-
Padrão ^a	-	-	0,02 mL
Água destilada	0,02 mL	-	-
Reagente Biureto ^b	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

^aSoro-albumina bovina

^bSulfato de cobre pentaidratado 0,15% e tartarato de sódio e potássio 0,6% em hidróxido de sódio 0,75 mol L⁻¹.

Os tubos contendo as amostras foram deixados em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, em seguida as absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro empregando um comprimento de onda de 545 nm. A concentração de proteínas totais foi calculada segundo a Equação 3.

$$Ptn\ totais = \frac{Abs_{teste}}{Abs_{padrão}} \times 40\ (mg\ mL^{-1}) \quad (3)$$

Onde Ptn totais é o valor das proteínas totais, Abs teste é a absorbância obtida com a amostra, Abs Padrão é a absorbância do padrão.

3.2.3 Procedimento de incubação para o estudo de metabolismo *in vitro*

Para a incubação foram utilizados tubos de vidro de 8 mL com tampa rosqueável. Inicialmente, 25 µL da solução dos triterpenos dissolvidos em metanol foi adicionada ao tubo, destacando que esta concentração de metanol não interfere na ação das enzimas da CYP 450 (BUSBY; ACKERMANN; CRESPI, 1999). Posteriormente, foi adicionado 250 µL da solução de incubação contendo NADP⁺, glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase, resultando em concentrações no meio de incubação de 0,25 mmol, 5 mmol e 0,50 unidades, respectivamente. Sendo o cofator um reagente importante nos estudos de metabolismo *in vitro*, procurou-se trabalhar com excesso do mesmo para que não houvesse depleção de cofator durante os experimentos. O meio microsomal foi pré-incubado na presença do substrato e do sistema de incubação NADPH a 37 °C durante 5 min. Após, adicionou-se solução tampão fosfato 0,25 mol L⁻¹ pH 7,4 para obter um volume final de 1000 µL. Finalmente, a fração microsomal do fígado de rato foi acrescentada e o

procedimento de metabolismo *in vitro* foi iniciado. A incubação foi realizada sob agitação a 37 °C. Depois de decorrido o tempo de incubação, a reação foi encerrada ao adicionar-se o solvente da extração e posteriormente o padrão interno (α -colestano) empregado nas análises. Controles foram realizados sem a adição do sistema de regeneração de NADPH e sem a presença de microsomas. A diferença entre os valores obtidos com e sem NADPH foi considerada a taxa da amirina que sofreu metabolismo pelo CYP 450. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.4 Procedimento de preparação da amostra (extração líquido-líquido)

Em um tubo de vidro com tampa rosqueável contendo a amostra submetida ao processo de incubação, adiciona-se o solvente orgânico extrator, agita-se utilizando o agitador de tubos do tipo “*mixer*” durante 20 segundos e, em seguida, no sistema Vibrax durante tempo e velocidade determinada. Após esta etapa, centrifuga-se os tubos a 3000 rpm (2860 x g) durante 7 minutos. Retira-se o solvente orgânico e transfere-o para um tubo com fundo cônico. Por fim, seca-se o solvente com ar comprimido e ressuspende-se na fase móvel utilizada ou no solvente de injeção. Vários parâmetros foram otimizados durante a extração, tais como: tipo de solvente orgânico, adição de sal, tempo de extração e velocidade de agitação.

3.2.5 Análise das amirinas utilizando o cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM)

Os estudos iniciais de preparação de amostras foram realizados empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como técnica analítica. No entanto, devido a problemas na detecção das amirinas optou-se por mudar de técnica analítica, empregando dessa forma, a CG-EM em todo desenvolvimento do projeto. Na mudança da técnica analítica, a primeira etapa foi determinar os principais fragmentos a serem monitorados no espectrômetro de massas. Dessa forma foi empregado o modo “*Full Scan*”, monitorando uma ampla faixa de razão massa/carga (50-430 u.m.a). Após selecionar os íons característicos para cada substância foi aplicado o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM). A separação cromatográfica foi realizada empregando

uma temperatura inicial de 180°C que foi aumentada com uma taxa de 30°C/min até 290°C. A análise durou 28,6 minutos. Como gás de arraste foi empregado hélio na vazão de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da interface e da fonte de ionização foram, respectivamente, de 290°C e 250°C. Os seguintes íons foram monitorados: 203, 218 e 426 *m/z* para alfa e beta amirina e 217, 357 e 372 *m/z* para o α -colestano.

3.2.6 Validação da metodologia analítica

Toda validação analítica foi realizada empregando microssomas hepático de ratos “branco” como matriz e a extração líquido-líquido previamente otimizada. Além disso, foi empregada a padronização interna, visando corrigir erros provenientes do preparo e injeção da amostra no instrumento cromatográfico. Para isto, foi adicionado 40 μ L de uma solução de 5- α -colestano (67 μ M) e a fração obtida com a divisão da área das amirinas pelo 5- α -colestano foi definida como a resposta analítica. Na validação analítica optou-se por seguir os parâmetros recomendados pela ANVISA (2003) para análise de fármacos em fluidos biológicos, sendo esses: linearidade, limite de quantificação, seletividade, estabilidade, precisão, exatidão e recuperação.

3.2.6.1 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método em gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, contidos em uma faixa analítica especificada (ANVISA, 2012). Os padrões de calibração serão aprovados se apresentarem um desvio padrão relativo menor que 20% para o limite de quantificação (LQ) e 15% para as demais concentrações (ANVISA, 2012). O teste de falta de ajuste foi realizado empregando o programa MINITAB Release, version 14.1, considerando como estatisticamente significativo um valor de *p* maior que 0,05.

A curva analítica foi preparada adicionando no meio microssomal (volume final de 1000 μ L) 25 μ L da solução de amirinas (*n* = 3, para cada concentração), obtendo-se assim uma faixa de concentração entre 0,16-42,18 μ M para a beta amirina e 0,11- 28,12 μ M para a alfa amirina.

3.2.6.2 Limite de quantificação (LQ)

O LQ pode ser considerado como a menor concentração empregada capaz de ser quantificada de uma forma precisa e exata. O erro relativo e o coeficiente de variação não devem ultrapassar 20% (ANVISA, 2003). O LQ foi determinado avaliando concentrações de 0,16 µM para a beta e 0,11 µM para a alfa amirina, todos em quintuplicata. Estas amostras foram analisadas com base em uma curva analítica preparada na faixa de 0,16- 42,18 µM para a beta e 0,11-28,12 µM para a alfa amirina.

3.2.6.3 Precisão e Exatidão

A precisão normalmente é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) de acordo com a Equação 4.

$$DPR (\%) = \frac{S}{X} \times 100 \quad (4)$$

Onde S e X representam, respectivamente, a estimativa do desvio padrão e a média dos valores de concentração obtidos das amostras analisadas. Já a exatidão é expressa em porcentagem do erro relativo, através da Equação 5.

$$Erro\ Relativo\ (\%) = \frac{Conc\ obtida - Conc\ nominal}{Conc\ nominal} \times 100 \quad (5)$$

Conc. obtida refere-se à concentração obtida na análise e Conc. nominal é a concentração considerada verdadeira. Para a determinação da exatidão e precisão foram analisadas amostras em concentração baixa, média e alta: 0,64; 14,06; e 28,12 µM para a beta amirina e 0,42; 9,38 e 18,75 µM para a alfa amirina. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata para cada concentração.

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

3.2.6.4 Recuperação

A recuperação é dada pela Equação 6 abaixo.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração obtida}}{\text{Concentração nominal}} \times 100 \quad (6)$$

A concentração obtida é a concentração do analito após o processo de extração da matriz e a concentração nominal é a concentração teórica das soluções do analito. As análises foram realizadas em triplicata, na qual se avaliaram a recuperação em três concentrações distintas para cada analito: 0,63; 14,06 e 28,12 µM para beta amirina e 0,42; 9,37 e 18,74 µM para alfa amirina.

3.2.6.5 Estabilidade

Os ensaios de estabilidade foram realizados adicionando ao meio microssomal (sem cofatores) quantidades conhecidas dos triterpenos. Os testes foram realizados mantendo as amostras a 37°C durante 60 minutos e em repouso sobre a bancada durante 12 horas. Após esse período estas amostras foram submetidas a extração e posterior análise. Na avaliação foram comparadas as áreas das amostras recém-preparadas (frescas) com as áreas das amostras que foram submetidas aos ensaios de estabilidade. Além disso, avaliou-se a estabilidade das amostras quando permanecidas no autoinjeter do sistema cromatográfico. Neste experimento a amostra foi colocada no meio de incubação e posteriormente extraída, então, injetou-se imediatamente as seis primeiras amostras e as outras seis foram injetadas após 24 horas, a fim de verificar se há algum tipo de degradação no momento em que as amostras extraídas ficam em repouso no autoinjeter. Foram analisadas concentrações baixa e alta, como recomenda a ANVISA. Nos testes foram analisadas as concentrações 1,05 e 28,12 µM para a beta amirina e 0,70 e 18,74 µM para a alfa amirina. Os ensaios foram realizados em sextuplicata e a análise estatística foi realizada empregando o *Student's t-test* e nível de significância estabelecido como $p \geq 0,05$. Foram consideradas estáveis as amostras que apresentaram $p \geq 0,05$ e desvio padrão relativo inferior a 15%.

3.2.6.6 Seletividade

Na seletividade foi avaliada a capacidade do procedimento de preparação da amostra em eliminar interferentes provenientes da matriz microssomal. Esse estudo foi realizado extraindo amostras “brancos” de microssomas sem adição do analito. Posteriormente foi avaliado a presença de interferentes no tempo de retenção dos analitos e do padrão interno.

3.2.7 Pesquisa dos metabólitos

A pesquisa dos metabólitos provenientes do metabolismo das amirinas foi realizada no modo “*Full Scan*” fazendo uma varredura entre 50-600 u.m.a. Nessa etapa, foi utilizado o acetato de etila como solvente extrator. O procedimento de incubação foi realizado da mesma forma como descrito na seção 3.2.3, empregando uma concentração de 28,12 μM para a alfa e 18,75 μM para a beta amirina, sem adição do padrão interno e utilizando um tempo de incubação de 60 minutos e uma concentração de 1,5 mg mL^{-1} de proteínas microssomais. Esses estudos foram realizados em escala ampliada, incubando 10 amostras independentes e posteriormente concentrando todas em um único tubo. Procedeu-se da mesma maneira para os controles.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização do método analítico empregando CLAE

Inicialmente a determinação das amirinas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. Devido à ausência de cromóforos no analito o comprimento de onda empregado foi de 203 nm. A temperatura de análise foi de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Nessa técnica, as colunas RP-18 (Figura 11) e RP-8 (Figura 12) foram avaliadas, utilizando como fase móvel metanol.

Figura 11: Cromatograma referente a análise da α - e β -amirina separados pela coluna RP-18, fase móvel metanol, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de análise $23 \pm 2^\circ\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado $20 \mu\text{L}$, concentração da solução dos isômeros de $0,75 \text{ mM}$.

Figura 12: Cromatograma relativo a análise da α - e β -amirina separados pela coluna RP-8, fase móvel metanol, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de análise $23 \pm 2^\circ\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado $20 \mu\text{L}$, concentração da solução dos isômeros de $0,75 \text{ mM}$.

Como pode ser observado na Figura 11, houve a separação dos isômeros da amirina, o que pode ser corroborado com trabalhos relatados na literatura que fazem a análise das amirinas em condições semelhantes (HÉRNANDEZ-VÁZQUEZ et al., 2010; MATHE et al., 2004).

Contudo, empregando a coluna RP-8 verificou-se que os picos da alfa e beta amirina coeluíram, além de apresentarem um tempo de retenção curto, o que posteriormente poderia causar perda na seletividade do método, pois na análise de matrizes biológicas, diversos interferentes eluem rapidamente da coluna. Esse baixo tempo de retenção das amirinas pode ser explicado pela cadeia carbônica menor apresentada pela coluna RP-8, diminuindo assim o tempo de retenção do analito (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Dessa forma, a coluna RP-18 foi selecionada para as análises posteriores.

Outro parâmetro avaliado foi a composição da fase móvel, utilizando a coluna RP-18. Foram avaliadas as seguintes fases móveis: metanol:água (80:20 v/v) (Figura 13), metanol:água (95:5, v/v) (Figura 14).

Figura 13: Cromatograma relativo a análise da α - e β -amirina separados pela coluna RP-18, fase móvel metanol: água (80:20 v/v), vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de análise $23 \pm 2^\circ\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado $20 \mu\text{L}$, concentração da solução dos isômeros de 0,75 mM.

Figura 14: Cromatograma relativo a análise da α - e β -amirina separados pela coluna RP-18, fase móvel metanol: água (95:5 v/v), vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de análise $23 \pm 2^\circ\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado $20 \mu\text{L}$, concentração da solução dos isômeros de 0,75 mM.

Verificou-se que adicionando água à fase móvel as bandas alargaram, resultado de uma baixa resolução, além de diminuir o tempo de retenção dos analitos. O comportamento apresentado não corrobora com análises realizadas

no modo fase reversa, pois a diminuição da força cromatográfica leva a um aumento no tempo de retenção dos analitos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Um comportamento semelhante é descrito por Snyder, Kirkland e Dolan (2009) que nomeia como “comportamento irregular” o aumento da adição de água na fase móvel e uma retenção não usual. Provavelmente, esse fenômeno observado deve-se a baixa solubilidade das amirinas nessas fases móveis aquosas levando a uma ineficiente interação com a coluna cromatográfica e eluição rápida das mesmas. Dessa forma, verificou-se que a melhor condição cromatográfica de separação foi obtida com a coluna RP-18 e fase móvel composta por metanol (Figura 11).

4.2 Otimização da preparação da amostra empregando a extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido foi o método eleito para extrair os analitos das amostras de microssomas hepático de ratos, já que é uma técnica simples e promove uma limpeza aceitável da amostra. Primeiramente, vários solventes orgânicos puros ou mistura foram avaliados, tais como: hexano, hexano:isopropanol (8:2, v/v), éter dietílico, diclorometano, clorofórmio e metil terc-butil éter. Entre os solventes avaliados, o qual mostrou uma melhor limpeza da amostra (clean up) e melhor valor de recuperação foi o hexano (Figura 15). Esse fenômeno pode ser explicado devido a baixa polaridade e o elevado coeficiente de partição das amirinas (Log P de aproximadamente 10) (SCIFINDER WEB). A análise de outros solventes ficou dificultada devido a extração de diversos interferentes provenientes da matriz microssomal, como pode ser observado na Figura 16 que mostra a extração empregando a mistura hexano: isopropanol (8:2, v/v).

Figura 15: Extração dos analitos de microsomas hepático de ratos empregando hexano como solvente extrator. Amirina isômero 1 (t_R 14,7 min) e amirina isômero 2 (t_R 15,9 min). Fase móvel metanol, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de análise $23 \pm 2^\circ\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado $20 \mu\text{L}$, concentração dos isômeros no meio de incubação de $58,6 \mu\text{M}$.

Figura 16: Extração dos analitos de microsomas hepático de ratos empregando hexano:isopropanol (8:2, v/v) como solvente extrator. Amirina isômero 1 (t_R 14,7 min) e amirina isômero 2 (t_R 15,9 min). Fase móvel metanol, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura de análise $23 \pm 2^\circ\text{C}$, detecção em 203 nm. Volume injetado $20 \mu\text{L}$, concentração dos isômeros no meio de incubação de $58,6 \mu\text{M}$.

Dessa forma, empregando o solvente hexano partiu-se para uma otimização mais detalhada da preparação da amostra avaliando os seguintes parâmetros: volume de solvente orgânico, adição de cloreto de sódio, tempo de extração e velocidade de agitação. Toda otimização foi realizada em triplicata, na ausência de padrão interno. Para tanto, foi construído um gráfico que representa a quantidade extraída (área do pico) frente as modificações empregadas. Na otimização do volume de solvente orgânico (Figura 17), utilizou-se 4 mL e 6 mL de solvente orgânico. Verificou-se que não houve

diferenças significativas na porcentagem de extração das amirinas frente os volumes avaliados. Dessa forma optou-se por empregar 4 mL como volume de solvente extrator para que a geração de resíduo químico fosse menor.

Figura 17: Efeito do volume de solvente orgânico na extração da alfa e beta amirina do meio microssomal. Fase móvel metanol, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), detecção em 203 nm. Concentração dos isômeros no meio de incubação de $58,6 \mu\text{M}$, todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os números 1 e 2 correspondem aos isômeros das amirinas.

Em seguida foi avaliada a influência da adição de diferentes concentrações de cloreto de sódio à amostra. O cloreto de sódio promove o efeito salting-out podendo resultar em aumento da quantidade extraída do analito (PAWLISZYN, 1997). Para tanto foram avaliadas as seguintes concentrações de cloreto de sódio: 0%, 5%, 10% e 20% (p/v). Como pode ser observado na Figura 18 houve uma diminuição na eficiência de extração com a adição de sal. Dessa forma, NaCl não foi adicionado nas amostras.

Figura 18: Efeito da adição de sal na extração da alfa e beta amirina do meio microssomal. Fase móvel metanol, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), detecção em 203 nm. Concentração dos isômeros no meio de incubação de $58,6 \mu\text{M}$, todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os números 1 e 2 correspondem aos isômeros das amirinas.

A Figura 19 apresenta a influência do tempo de agitação na eficiência de extração das amirinas. Foram avaliados os seguintes tempos de extração: 15 min, 20 min, 30 min e 40 min. Como pode ser observado, não houve uma variação significativa na quantidade extraída, sendo dessa forma, adotado como tempo de extração 15 minutos.

Figura 19: Efeito do tempo de agitação na extração da alfa e beta amirina do meio microssomal. Fase móvel metanol, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), detecção em 203 nm. Concentração dos isômeros no meio de incubação de $58,6 \mu\text{M}$, todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os números 1 e 2 correspondem aos isômeros das amirinas.

Por fim, foi avaliado a intensidade da agitação (Figura 20), variando a velocidade de agitação de 1000 rpm e 1500 rpm, na qual 1500 rpm proporcionou uma maior quantidade extraída das amirinas. Assim, para futuros estudos foi empregado 1500 rpm como velocidade de agitação.

Figura 20: Efeito da velocidade de agitação na extração da alfa e beta amirina do meio microssomal. Fase móvel metanol, vazão $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), detecção em 203 nm. Concentração dos isômeros no meio de incubação de $58,6 \mu\text{M}$, todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os números 1 e 2 correspondem aos isômeros das amirinas.

Dessa forma as condições finais para a extração das amirinas dos microssomas hepático de ratos foram: hexano como solvente extrator (4 mL), extração durante 15 minutos a uma velocidade de agitação de 1500 rpm. Deve ser ressaltado que a extração líquido-líquido está sujeita a influência de diversos fatores que podem levar a perda na precisão durante sua otimização, tais como: evaporação do solvente durante as etapas de preparação das amostras, perdas durante a ressuspensão do resíduo na fase móvel e outros. Dessa forma, na validação da metodologia, foi empregado a padronização interna, com o objetivo de minimizar esses erros inerentes da técnica.

4.3 Mudança de técnica analítica para análise das amirinas

Após toda a otimização da separação analítica por CLAE e otimização da técnica de preparação de amostras, deu-se início a alguns estudos preliminares de metabolismo *in vitro*. Contudo devido a ausência de cromóforos nos analitos, a quantidade a ser adicionada no meio microssomal deveria ser muito alta para que o sinal do detector fosse detectável de uma forma reprodutível. Contudo, em altas concentrações as amirinas são insolúveis no meio necessitando assim de um co-solvente para solubilização das mesmas. Normalmente, esses solventes apresentam uma alta absorção em comprimentos de onda curtos (203 nm), inviabilizando dessa forma os estudos. Além disso, como não há qualquer informação na literatura sobre o valor da

concentração de amirinas a ser empregada nesse estudo, optou-se por utilizar um maior intervalo possível, desde a detectabilidade mínima que o sistema fosse capaz de gerar um sinal reprodutível até a solubilidade máxima do substrato no meio microssomal. Devido a essas limitações analíticas da CLAE com detecção por UV-Vis, selecionou-se outro método para análise das amirinas utilizando, agora, a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas. Essa técnica apresenta um grande potencial para a quantificação das amirinas, devido a possibilidade de análise de moléculas altamente lipofílicas, além de apresentar uma grande sensibilidade e seletividade. Esta técnica de separação vem sendo utilizada na quantificação de alfa e beta amirina em alguns estudos (CHING et al., 2010; CHING et al., 2011; LYTOVCHENKO et al., 2009). Dessa forma, os estudos subsequentes foram realizados por CG-EM.

4.4 Análise das amirinas por CG-EM

Na mudança da técnica analítica, a primeira etapa foi determinar os principais fragmentos a serem monitorados no espectrômetro de massas. Dessa forma foi empregado o modo "*Full Scan*", monitorando as massas compreendidas entre 50 e 430 u.m.a para as amirinas. Após análise do espectro de massas no modo "*Full Scan*", o método de monitoramento seletivo de íons foi aplicado, e, para a alfa e a beta amirina foram monitorados os fragmentos 203, 218 e 426 m/z (Figura 21).

Figura 21: Principais fragmentos monitorados nas análises quantitativas das amirinas.

O monitoramento desses íons já vem sendo empregados na análise de triterpenos, como demonstrado no trabalho de Pollier e Goossens (2012). Anterior a etapa da validação analítica, foi necessária a determinação de um padrão interno, pois todo procedimento de validação será realizado empregando a padronização interna. Dessa forma, foi empregado o 5- α -colestano (Figura 22) como padrão interno. O 5- α -colestano apresenta propriedades físico-químicas semelhantes as amirinas o que corrobora com a escolha como padrão interno ideal.

Figura 22: Estrutura química do 5- α -colestano.

A Figura 23 apresenta o espectro de massas feito no modo “*Full Scan*” monitorando as massas compreendidas entre 50 e 375 u.m.a. Dessa forma, foi monitorado seletivamente os íons 217, 357 e 372 m/z para análise do α -colestano.

Figura 23: Espectro de massas no modo “Full Scan” do padrão interno α -coletano. Os fragmentos 217, 357 e 372 m/z foram selecionados para as análises quantitativas.

A Figura 24 apresenta um cromatograma das amirinas e do padrão interno por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Figura 24: Cromatograma obtido por CG-EM para análise das amirinas. Condições cromatográficas: coluna a ZB-5MS com espessura de 0,25 μm , comprimento de 30 m e diâmetro interno de 0,25 mm. Temperatura inicial de 180°C e taxa de 30°C/min até 290°C. Gás de arraste: hélio na vazão de 1,0 mL min^{-1} . A temperatura da interface e da fonte de ionização foram, respectivamente, 290°C e 250°C. 1) α -coletano, 2) beta amirina, 3) alfa amirina. Em azul, a rampa térmica do forno do sistema cromatográfico.

4.5 Validação da metodologia analítica

Após otimização da metodologia analítica para separação e quantificação das amirinas por CG-EM, foi dado início a validação da metodologia empregando a padronização interna. Na validação optou-se por seguir o guia para métodos bioanalíticos da ANVISA (2003), pois os

microssomas hepáticos constituem uma matriz complexa. Foram monitorados os íons 203, 218 e 426 m/z para análise das amirinas e os íons 217, 357 e 372 m/z para análise do padrão interno α -colestano. Toda validação foi realizada empregando microssomas hepático de ratos isentos de amirinas ou α -colestano como matriz e a extração líquido-líquido previamente otimizada por CLAE. Optou-se em continuar a utilizar a extração líquido-líquido, pois a mesma foi capaz de fornecer extratos isentos de interferentes, o que significa que a técnica de extração apresenta uma boa capacidade de limpeza da amostra, o que é crucial em cromatografia gasosa. Para o cálculo da concentração dos isômeros levou-se em consideração a proporção de (6:4 p/p) para a beta e alfa amirina, respectivamente.

4.5.1 Linearidade

Na avaliação da linearidade a ANVISA (2003) estabelece que os desvios dos valores nominais não podem ser superiores a 15% assim como o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,98. A Tabela 4 apresenta os dados da linearidade do método. Como pode ser observado, todos os valores apresentados estão de acordo com as exigências da legislação vigente.

Tabela 4: Dados da linearidade do método.

Analito	Linearidade			Lack of Fit	
	Faixa (μM)	Equação Linear ^a	r^b	F	p^c
Beta Amirina	0,16 – 42,18	$y = 0,0810 x + 0,0970$	0,996	3,20	0,053
Alfa Amirina	0,11 – 28,12	$y = 0,0577 x + 0,0282$	0,993	0,06	0,992

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

^b: Coeficiente de Correlação

^c: nível de significância $p \leq 0,05$

As Figuras 25 e 26 apresentam os gráficos da análise de resíduos das curvas analíticas. Como pode ser observado, existe uma distribuição aleatória dos valores no gráfico, indicando assim uma regressão linear satisfatória (RIBEIRO et al., 2008).

Figura 25: Gráficos de análise residual da beta amirina obtidos através do programa MINITAB.

Figura 26: Gráficos de análise residual da alfa amirina obtidos através do programa MINITAB.

4.5.2 Limite de quantificação (LQ)

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para o limite de quantificação. Como pode ser observado, os valores de erro relativo e desvio padrão relativo estão inferiores ao recomendável pela legislação, comprovando assim o poder de quantificação mínima do método.

Tabela 5: Limite de quantificação ($n = 5$).

Analito	Limite de Quantificação			
	Conc Nominal (μM)	Conc Obtida (μM)	Erro Relativo (%) ^a	DPR (%) ^b
Beta Amirina	0,16	0,16	0	2,4
Alfa Amirina	0,11	0,11	0	5,1

^a: Erro Relativo expresso em porcentagem.

^b: Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem

4.5.3 Estabilidade

O teste de estabilidade mostrou que as amostras mantêm-se estáveis a 37°C durante 60 minutos em banho-maria, ao permanecer sobre a bancada durante 12 horas e ao permanecer em repouso no autoinjeter até o momento da injeção. A Tabela 6 mostra os resultados do teste de estabilidade para as concentrações baixa e alta, como recomenda a ANVISA (2003).

Tabela 6: Teste de estabilidade para análise das amirinas ($n = 6$).

	Tabela 01: Teste de estabilidade para análise das amirinas (1 e 3%)							
	Estabilidade		Beta amirina		Alfa amirina			
	Concentração (µM)							
	1,05		28,12		0,70		18,74	
	valor-p	D.P.R.	valor-p	D.P.R.	valor-p	D.P.R.	valor-p	D.P.R.
Bancada	0,883	10,8	0,798	8,5	0,448	9,3	0,289	9,3
37°C	0,689	9,7	0,289	9,3	0,815	8,4	0,966	8,7
Autoinjeter	0,493	13,2	0,668	10,3	0,352	12,2	0,496	11,5

^a: nível de significância $p \leq 0,05$

^b: Desvio Padrão Relativo (DPR) expresso em porcentagem

4.5.4 Precisão e exatidão intraensaio e interensaio

Os ensaios de exatidão e precisão intraensaio foram realizados em um mesmo dia; já os ensaios de precisão e exatidão interensaio, os experimentos foram realizados em três dias consecutivos. Deve ser destacado que a cada dia de ensaio era realizada uma nova curva analítica para a quantificação das amostras. Como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8, todos os valores para precisão e exatidão ficaram inferiores ao recomendado pela legislação (15%).

Tabela 7: Precisão e Exatidão intraensaio ($n = 5$).

Analito	Concentração Nominal (μM)	Concentração Obtida (μM)	Exatidão ^a	Precisão ^b
Beta Amirina	0,64 / 14,06 / 28,12	0,58 / 14,24 / 26,51	-7,9 / +1,3 / -5,7	3,9 / 7,5 / 13,1
Alfa Amirina	0,42 / 9,38 / 18,75	0,43 / 9,79 / 14,51	+1,9 / -5,5 / -7,3	6,3 / 9,8 / 14,5

^a: Erro Relativo expresso em porcentagem

^b: Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem

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

Analito	Concentração Nominal (μM)	Concentração Obtida (μM)	Exatidão (E%)	Precisão (DPR%)
Beta Amirina	0,63 / 14,06 / 28,12	0,58 / 13,95 / 27,32	-7,3 / -0,8 / -2,8	4,4 / 10,2 / 12,4
Alfa Amirina	0,42 / 9,38 / 18,75	0,41 / 9,22 / 18,12	-2,1 / -1,61 / -3,3	7,7 / 10,7 / 11,2

^a: Erro Relativo expresso em porcentagem

^b: Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem

4.5.5 Seletividade

A seletividade de um método bioanalítico é um importante parâmetro a ser avaliado. Esse parâmetro garante que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de metabólitos, produtos de degradação ou compostos presentes na amostra (PASCHOAL et al., 2008; CASSIANO et al., 2009). Verificou-se que nenhum pico interferente elui no mesmo tempo de retenção dos analitos ou padrão interno (Figura 27A). Essa alta seletividade deve-se ao sistema de detecção empregado e também ao elevado poder de limpeza da técnica de preparo de amostra.

Figura 27: Cromatograma demonstrando a seletividade do método. A) Branco contendo apenas o meio microssomal; B) Amostra contendo o meio microssomal fortificado com as amirinas: 1- β -amirina e 2- α -amirina.

4.5.6 Recuperação

A recuperação foi avaliada analisando o desvio padrão relativo das amostras extraídas, sendo considerado aceitável um DPR inferior a 15%

(ANVISA, 2003). Como pode ser observado na Tabela 9, em todas as concentrações avaliadas, o DPR foi inferior ao recomendável pela legislação.

Tabela 9: Valores de recuperação do método proposto.

	Beta Amirina			Alfa Amirina		
	Concentração (µM)					
	0,63	14,06	28,12	0,42	9,37	18,74
Recuperação(%)	58,1	56,7	58,7	59,2	54,3	58,1
DPR (%) ^a	7,3	4,5	8,7	6,5	6,8	6,5

^a: Desvio Padrão Relativo expresso em porcentagem

4.6 Estudo de metabolismo *in vitro*

Após a validação da metodologia analítica, iniciou-se o estudo para a determinação dos parâmetros enzimáticos das amirinas. O primeiro parâmetro avaliado foi a influência da variação da concentração das proteínas na degradação das amirinas. Na avaliação desse parâmetro, deve-se observar o desaparecimento do substrato ou a produção do metabólito em uma região linear de concentração de proteínas. No presente estudo optou-se por utilizar a avaliação da depleção do substrato. Este método é o mais indicado já que o substrato geralmente está em maior quantidade do que o metabólito, sendo possível o alcance de menores limites de detecção (TINGLE; HELSBY, 2006). Para a obtenção de altas concentrações do metabólito é necessário utilizar condições extremas de incubação, como um tempo de incubação longo e alta concentração de proteína microsomal, o que acarreta em vários problemas como a instabilidade da enzima, inibição do metabolismo pelo produto, entre outros (JONES; HOUSTON, 2004; TINGLE; HELSBY, 2006). Inicialmente o estudo foi realizado variando a quantidade de proteínas microsomais no seguinte intervalo: 0,1, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 e 5,0 mg de proteínas por mL de meio microsomal. Como pode ser observado na Figura 28, no intervalo avaliado o consumo da beta e alfa amirina não foi linear com o aumento de proteínas. Para alcançar uma região linear foi realizado outro estudo variando a concentração de proteínas no seguinte intervalo: 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 mg de proteínas por mL de meio microsomal (Figura 29). O coeficiente de correlação alcançado com esta curva foi de 0,962 e 0,937 para beta e alfa amirina, respectivamente. Dentre os valores compreendidos dentro da faixa linear

elegeu-se a concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para analisar o próximo parâmetro, o tempo de incubação.

Figura 28: Efeito da variação da quantidade de proteínas no consumo do substrato. Concentração das amirinas $0,12 \text{ mM}$. Temperatura de incubação 37°C , pH do meio 7,4. Tempo de incubação 90 min. Todos experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 29: Efeito da variação da quantidade de proteínas no consumo do substrato, faixa linear. Concentração das amirinas $0,12 \text{ mM}$. Temperatura de incubação 37°C , pH do meio 7,4. Tempo de incubação 90 min. Todos experimentos foram realizados em triplicata.

O segundo parâmetro avaliado foi a influência da variação do tempo no consumo do substrato. A variação do tempo de incubação permite determinar em qual período o consumo do analito ou a produção do metabólito é linear. Os tempos avaliados foram: 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Como pode ser observado na Figura 30, no intervalo avaliado, o consumo da beta e alfa amirina não foi linear com o aumento do tempo de incubação. Para alcançar uma região linear foi realizado outro estudo variando tempo de incubação no

seguinte intervalo: 0, 10, 30 e 60 minutos (Figura 31). O coeficiente de correlação alcançado foi de 0,979 e 0,981 para beta e alfa amirina, respectivamente.

Figura 30: Efeito da variação do tempo de incubação no consumo do substrato. Concentração da solução das amirinas 0,12 mM. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Concentração da proteína microssomal 1,5 mg mL⁻¹. Todos experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 31: Efeito da variação do tempo de incubação no consumo do substrato, faixa linear. Concentração da solução das amirinas 0,12 mM. Temperatura de incubação 37°C, pH do meio 7,4. Concentração da proteína microssomal 1,5 mg mL⁻¹. Todos experimentos foram realizados em triplicata.

Após otimização desses dois parâmetros, foram selecionadas condições dentro da faixa linear, que obedecem as condições de velocidade inicial (V_0) que correspondem a uma depleção máxima de 10% do substrato. É importante manter estas condições, pois ao longo da reação outros fatores, além da concentração do substrato, podem influenciar, como: inibição pelo produto formado, degradação da enzima e depleção do substrato (GILBERT, 2000).

Dessa forma, foi utilizado a concentração de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas microsomais e tempo de incubação de 20 minutos no estudo dos parâmetros cinéticos enzimáticos.

A Figura 32 mostra o gráfico de V_0 versus a concentração do substrato, o comportamento obtido é atípico, não correspondendo a cinética Michaeliana usualmente encontrada neste tipo de estudo. Este comportamento demonstrado não pode ser explicado pela equação descrita por Michaelis-Menten (1913) e sim pela equação de Hill (1910) que descreve um comportamento sigmoide resultante de um cooperativismo positivo. Este comportamento ocorre devido a ligação dos substratos aos múltiplos sítios de ligação contidos em uma enzima. A primeira molécula que se liga a um sítio da enzima aumenta a afinidade da enzima pelo substrato, resultando em um comportamento sigmoidal. Ambas as moléculas beta (figura 32) e alfa amirina (figura 33) apresentaram este comportamento.

Este comportamento “atípico” é encontrado geralmente na subfamília CYP3A4, no qual já foi comprovada a atuação desta isoforma na cinética sigmoidal de várias substâncias (KENWORTHY et al., 2001; SHOU et al., 1999). Apesar de existirem muitos estudos a respeito da estrutura tridimensional da CYP3A4 e os possíveis sítios de ligação, o mecanismo pelo qual o cooperativismo ocorre ainda é muito discutido. Atualmente, há estudos que suportam tanto a cooperatividade induzida pelo ligante (substrato), quanto aos mecanismos de mudança na conformação da enzima (SEVRIUKOVA; POULOS, 2012). No entanto, apesar das evidências, estudos complementares devem ser feitos para confirmar a subfamília responsável pelo metabolismo das amirinas.

Figura 32: Sigmoide obtida para a β -amirina. Concentração de proteínas microsossomais: $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, tempo de incubação 20 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 33: Sigmoide obtida para a α -amirina. Concentração de proteínas microsossomais: $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, tempo de incubação 20 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

O gráfico de Eadie-Hofstee corresponde a outra forma de expressar os resultados obtidos com a variação da concentração dos substratos. Esses gráficos são mostrados, nas Figuras 34 e 35. Como pode ser observado pelo gráfico há claramente o cooperativismo positivo no metabolismo desse substrato. Este tipo de gráfico distingue o comportamento Michaeliano (o qual corresponde a uma reta) da cinética de Hill (caracterizada por um gráfico em forma de “gancho”) (WU, 2011).

Figura 34: Gráfico Eadie-Hofstee para β -amirina.

Figura 35: Gráfico Eadie-Hofstee para α -amirina.

Os parâmetros cinéticos enzimáticos obtidos para a alfa amirina a partir do comportamento sigmoide foram: $V_{\max} = 0,698 \pm 0,022 \text{ } \mu\text{mol/mg proteína/min}$, $S_{50} = 55,18 \pm 10,5 \text{ } \mu\text{M}$ e o coeficiente de Hill $2,7 \pm 0,17$, já os parâmetros da beta amirina foram: $V_{\max} = 0,775 \pm 0,034 \text{ } \mu\text{mol/mg proteína/min}$, $S_{50} = 130,4 \pm 42,8 \text{ } \mu\text{M}$ e coeficiente de Hill $2,5 \pm 0,21$.

Nos estudos de metabolismo *in vitro* utilizando microsomas existe um parâmetro importante que pode ser calculado: o clearance intrínseco. Esse parâmetro é a medida da relação dos parâmetros cinéticos enzimáticos para o processo de eliminação e, desta forma, reflete a capacidade máxima do metabolismo (GOODMAN; GILMAN, 2007). A estratégia para predição do clearance *in vivo* baseada nos dados obtidos do clearance intrínseco foi introduzida por Houston (1994), desde então, vários artigos demonstram a capacidade de predição do clearance através de testes *in vitro*. Estes

experimentos, geralmente utilizam microssomas ou hepatócitos de ratos; atualmente os microssomas humanos também tem sido empregados (CHIBA, ISHII, SUGIYAMA, 2009). Para o cálculo do clearance intrínseco de substâncias que seguem o modelo sigmoidal, utiliza-se a Equação 7 (LYUBIMOV, 2012; SEGEL, 1975).

$$CL_{m\acute{a}x} = \frac{\frac{V_{m\acute{a}x}}{S_{50}}(h-1)^{1-1/h}}{h} \quad (7)$$

$CL_{m\acute{a}x}$ corresponde ao clearance intrínseco máximo, $V_{m\acute{a}x}$ corresponde a velocidade máxima, S_{50} indica a concentração de substrato para a qual $V_{m\acute{a}x}$ corresponde a metade de V_0 . A expressão “constante de Michaelis” (K_m) deve ser reservada para as cinéticas hiperbólicas. n ou h é o coeficiente de Hill o qual indica uma medida do grau de cooperatividade (ou sigmoidicidade). Então a partir desta equação calculou-se o clearance intrínseco, obtendo-se os resultados para a beta e alfa amirina de 3,05 ml/min/kg e 6,55 ml/min/kg, respectivamente.

Ching et al (2011) estudaram a farmacocinética das amirinas, obtendo um valor de clearance baixo, assim como o obtido neste trabalho. O clearance hepático obtido para a beta amirina foi de $2,04 \pm 0,24$ ml/min/kg. Este valor correlaciona-se com a alta meia-vida encontrada ($10,2 \pm 3,0$ h), já que esta é inversamente proporcional ao clearance (GOODMAN; GILMAN, 2007). Este estudo também demonstrou que a beta amirina possui uma baixa biodisponibilidade ($0,86 \pm 0,23\%$) e um volume de distribuição aparente moderado (1317 ± 253 ml kg^{-1}). Além disso, verificou-se que a alfa e a beta amirina possuem um perfil farmacocinético similar, o que pode ser comparado com os resultados obtidos com a cinética enzimática no presente trabalho, na qual ambas amirinas apresentaram um perfil parecido durante todas as etapas do estudo (CHING et al., 2011). Jeong et al. (2007) demonstraram a farmacocinética de um composto com estrutura similar as amirinas, o ácido oleanólico, que apresentou uma baixa biodisponibilidade oral também (0,7%), no entanto, obteve-se tempo de meia-vida menor e uma maior depuração.

O estudo de cinética enzimática na área de produtos naturais ainda é muito escasso, existindo poucos dados na literatura. Um artigo recente determinou a cinética enzimática do produto natural grandisina, uma lignana

com propriedades antitumorais, empregando microssomas hepático de ratos. Nesse trabalho obteve-se um comportamento hiperbólico e um baixo clearance intrínseco (MESSIANO et al, 2012).

A escolha da utilização de microssomas provenientes de ratos neste estudo deriva das vantagens que este modelo proporciona, uma vez que estudos com microssomas humanos são geralmente de alto custo, além da possibilidade de serem considerados não éticos. Os sistemas *in vitro* são um modo de comparar as taxas metabólicas entre espécies e prever o comportamento *in vivo*, não necessitando a utilização de humanos (LIPSCOMB; POET, 2008). Existem algumas diferenças entre a atividade catalítica das isoformas da CYP de humano e a de rato. As principais isoformas presente em ratos são CYP3A2, CYP2C11, CYP1A1/1A2, CYP2E1, CYP2D1 e CYP2B1/2. Entre estes, a CYP3A2 (correspondente a CYP3A4 em humanos), a CYP2C11 (correspondente a CYP2C9 em humanos) e a CYP1A1/1A2 (correspondente a CYP1A2 em humanos) representa mais que 60% do total de enzimas da CYP 450 (DE OLIVEIRA et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2002). Bogaards et al. (2000) realizaram um estudo detalhado comparando as isoformas entre sete espécies diferentes, incluindo ratos e humanos. Os autores compararam as espécies utilizando testes de atividade enzimática e inibição enzimática utilizando padrões já bem caracterizados na literatura, e concluíram que as isoformas da CYP 450 de ratos e humanos são muito parecidas.

4.7 Pesquisa do Metabólito

Na pesquisa do metabólito foi empregado um solvente mais polar no processo de extração, em substituição ao hexano. Dessa forma, foi utilizado o acetato de etila (Figura 36), uma vez que este solvente é mais polar, podendo extrair os possíveis metabólitos que geralmente possuem uma característica mais hidrofílica. Além disso, utilizando os experimentos de otimização do tempo de incubação e concentração de proteínas microssomais foi possível utilizar as condições que permitem a maior porcentagem de metabolismo, sendo, então, utilizado como tempo de incubação 60 minutos e a concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de proteínas microssomais. Apesar desses experimentos serem realizados em escala ampliada, visando uma melhora na detecção de possíveis

metabólitos (item 3.2.7) não foi possível observar a presença de metabólitos. A Figura 37 mostra uma ampliação do cromatograma, demonstrando o decaimento do pico das amirinas que foram submetidas a incubação com os microsossomas em relação ao controle, no entanto, nenhum metabólito foi observado. Esse fato pode estar atribuído a baixa taxa de metabolismo das amirinas impossibilitando a observação de possíveis metabólitos formados.

Figura 36: Pesquisa do possível metabólito utilizando acetato de etila como solvente extrator. A) Amostra branco microsomal, B) Amostra após metabolismo pelos microsossomas hepáticos de ratos, C) Amostra controle, sem adição de NADPH. 1) β -amirina, 2) α -amirina.

Figura 37: Cromatograma correspondente aos isômeros das amirinas. Linha preta: Decaimento do pico da amostra metabolizada. Linha rosa: Controle sem adição de NADPH. 1) β -amirina, 2) α -amirina.

A dificuldade em encontrar os metabólitos produzidos através da incubação microssomal também ocorreu no trabalho de Jeong et al. (2007), no qual os autores citam que foi possível encontrar metabólitos a partir da incubação do ácido oleanólico com microssomas de rato, no entanto, utilizando o LC-MS não foi possível verificar a estrutura de tais substâncias, provavelmente devido ao limite de detecção do equipamento não permitir avaliar tais metabólitos. Este problema pode ter ocorrido no presente trabalho, já que o CG-EM utilizado na identificação pode não ter sido capaz de detectar os possíveis metabólitos devido a baixa formação dos mesmos.

5. CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Utilizando o potencial dos produtos naturais em se tornar um novo fármaco, avaliou-se pela primeira vez, a cinética enzimática das enzimas da CYP 450 frente aos triterpenos pentacíclico alfa e beta amirinas, compostos com atividades farmacológicas promissoras. Neste estudo, foi empregado microsomas hepático de ratos, por ser considerado um modelo *in vitro* simples e com possibilidade de predição e comparação de vias metabólicas em mamíferos. Na avaliação dos parâmetros cinéticos enzimáticos, através da variação da concentração de substratos, foram mantidas as condições de velocidade inicial, obtendo um comportamento sigmoidal. Esta cinética atípica não é muito citada na literatura, na qual se encontra vários relatos sobre a cinética de Michaelis-Menten, caracterizada por uma hipérbole em um gráfico que correlaciona a velocidade inicial e a concentração do substrato. Apesar das amirinas serem metabolizadas pelas enzimas da CYP 450, nenhum metabólito foi encontrado nas condições analíticas do presente trabalho. Estudos mais detalhados empregando isoformas isoladas da CYP450 podem ajudar na caracterização das isoformas responsáveis pelo metabolismo das amirinas.

6. REFERÊNCIAS

6 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Genéricos-Legislação-Resolução-RE. nº. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 15 mai. 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: 16 ago. 2012.

ARAGÃO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 85, p. 827- 834, 2006.

ARAGÃO, G. F. et al. Antiplatelet activity of α - and β - amyrin, isomeric mixture from *Protium heptaphyllum*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 45, n. 5, p. 343-349, 2007.

ASHA, S.; VIDAYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in *in vitro* metabolismo of drugs- a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, p. 1699-1722, 2010.

ATKINS, W. M. Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome p450-catalyzed reactions. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 291–310, 2005.

BANDEIRA, P. N. et al. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* march. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1078-1080, 2002.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROS, F. W. A. et al. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 1268–1276, 2011.

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

BUSBY, W. F.; ACKERMANN, J. M.; CRESPI, C. L. Effect of methanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on *in vitro* activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. **Drug Metabolism and Disposition**, Switzerland, v. 27, n. 2, p. 246-249, 1999.

CARRETERO, M. E. et al. Fraction from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (*Bursereaceae*) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 116, p. 11-15, 2008.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 1021- 1030, 2009.

CHIBA, M.; ISHII, Y.; SUGIYAMA, Y. Prediction of Hepatic Clearance in human from *in vitro* data for successful drug development. **Journal of American Pharmaceutical Association**, Easton, v. 11, p. 262-276, 2011.

CHING, J. et al. β -amyryn from *Ardisia elliptica* Thunb. is more potent than aspirin in inhibiting collagen-induced platelet aggregation. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 48, p. 275-279, 2010.

CHING, J. et al. Quantification of α -and β -amyryn in rat plasma by gas chromatography – mass spectrometry: application to preclinical pharmacokinetic study. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 46, p. 457-464, 2011.

COLEMAN, M. D. **Human Drug Metabolism**. 1ª ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. 286 p.

COLLINS, C. H; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª ed. Campinas: Editora Unicamp, 2006. 456 p.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. v. 3. 574 p.

DASS, C. **Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry**. 1ª ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. 610 p.

DE OLIVEIRA, A. R. M. et al. *In vitro* metabolism study of a new nitrosyl ruthenium complex $[\text{Ru}(\text{NHNHq})(\text{terpy})\text{NO}]^{3+}$ nitric oxide donor using rat microsomes. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 21, p. 14–19, 2009.

ENGEL P. C. **Enzyme Kinetics. A Steady-state Approach**. 2^a ed. Londres: Chapman and Hall, 1981. 96 p.

FASINU, P.; BOUIC, P. J.; ROSENKRANZ, B. Liver-Based *In Vitro* Technologies for Drug Biotransformation Studies – A Review. **Current Drug Metabolism**, Sharjah, v. 13, p. 1 -10, 2012.

GESZTELYI, R. et al. The Hill equation and the origin of quantitative pharmacology. **Archive for History of Exact Sciences**, New York, v. 66, p. 427–438, 2012.

GILBERT, H. F. **Basics concepts in Biochemistry**. 2^aed. New York: Mcgraw-hill education, 2000. 331 p.

GOODMAN, J.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12^a ed. New York: Mcgraw-hill education, 2012. 2112 p.

GOUTELLE, S. et al. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modeling. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Paris, v. 22, p. 633–648, 2008.

GROB, R. L.; BARRY, E. F. **Modern Practice of Gas Chromatography**. 4^a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. 1064 p.

HÉRNANDEZ-VÁZQUEZ, L. et al. Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 31, p. 476- 480, 2010.

HILL, A.V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. **The Journal of Physiology**, Leningrad, v. 40, p. iv–vii, 1910.

HOUSTON, J. B. Utility of *in vitro* drug metabolism data in predicting *in vivo* metabolic clearance. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 47, p.1469–79, 1994.

HU, Z.H. Application of glycyrrhizin as drugs. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 23, p. 553- 560, 1988.

JAMES, L. P.; MAYEUX, P. R.; HINSON, J. A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metabolism Disposition**, Switzerland, v. 31, p. 499-506, 2003.

JEONG, D. W. et al. Dose-Linear Pharmacokinetics of Oleanoic Acid after Intravenous and Oral Administration in rats. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, Chichester, v. 28, p. 51- 57, 2007.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of the amyrin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, p. 148–153, 2007.

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

KENWORTHY, K. E. et al. Multisite kinetic models for CYP3A4: simultaneous activation and inhibition of diazepam and testosterone metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, Switzerland, v. 29, n. 12, p. 1644–1651, 2001.

KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical review**, New York, v. 2, p. 23–60, 2010.

KOBAYASHI, K. et al. Substrate specificity rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems on the rat, **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 63, p. 889–896, 2002.

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

KOSTIAINEN, R. et al. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 38, p. 357–372, 2003.

KUMAR, G.N.; SURAPANENI, S. Role of drug metabolism in drug Discovery and development. **Medicinal Research Review**, New Jersey, v. 20, n. 5, p. 397-411, 2001.

LEVSEN, K. et al. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1067, n. 1 – 2, p. 55 –72, 2005.

LIN, K. et al. Xanthine Oxidase Inhibitory Triterpenoid and Phloroglucinol from Guttiferaceous Plants Inhibit Growth and Induced Apoptosis in Human NTUB1 Cells through a ROS-Dependent Mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, p. 407–414, 2011.

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

LIU, D. Q.; HOP, C. E. C. A. Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography–tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 1–18, 2005.

LIU, J. et al. Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 275, p. 768-774, 1995.

LYTOVCHENKO, A. et al. Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues. **Plant Methods**, London, v. 5, n. 4, p. 1-11, 2009.

LYUBIMOV, A .V. **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**, 1^a ed, New Jersey: John Wiley and Sons, 2012, 4784 p.

MA, S.; ZHU, M. Recent advances in applications of liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 179, p. 25–37, 2009.

MALLAVADHANI, U. V. et al. Antimicrobial Activity of Some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. **Biological and pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 10, p. 1576- 1579, 2004.

MANSUY, D. Brief historical overview and recent progress on cytochromes P450: Adaptation of aerobic organisms to their chemical environment and new mechanisms of prodrug bioactivation. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 69, p. 62-69, 2011.

MATHE, C. et al. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of triterpenoids in commercial frankincense. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 60, p. 493-499, 2004.

MAURYA, R. et al. β -amyrin acetate and β -amyrin palmitate as antidyslipidemic agents from *Wrightia tomentosa* leaves. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 19, p. 682-685, 2012.

Mc NAIR, H. M.; MILLER, J. M. **Basic Gas Chromatography**. 2^a ed. New York: Wiley-Interscience, 2009. 256 p.

MESSIANO, G. B. et al. *In vitro* metabolism study of the promising anticancer agent the lignan (-)-grandisin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 72, p. 240–244, 2013.

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

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, p. 311 – 335, 2012.

NIESSEN, W. M. A. **Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry**. 1^a ed. New York: CRC Press, 2001. 528 p.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography–Mass Spectrometry**. 3^a ed. New York: CRC Press, 2006. 602 p.

OLIVEIRA, F. A. et al. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, London, v. 49, p.105-111, 2004a.

OLIVEIRA, F. A. et al. Pentacyclic triterpenoids, alpha, beta amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacological, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 78, p. 719–725, 2004b.

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

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

PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction: Theory and Practice**. 1^a ed. Cambridge: Willey-VCH, 1997. 247 p.

POLLIER, J.; GOOSSENS, A. Oleanoic acid. **Phytochemistry**, New York, v. 77, p. 10-15, 2012.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs, **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 603–613, 2001.

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

RODRIGUES, I. V. **Estudo Biomonitorado para Avaliação da Atividade Antiinflamatória e Analgésica das Folhas da Espécie *Protium spruceanum* (Benth) Engler. (Burseraceae)**. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto Ouro Preto, 2010.

SCIFINDER WEB. Disponível em: <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>. Acesso em: 12 nov. 2012.

SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**. New York: John Wiley and Sons, 1975. 984 p.

SEVRIOUKOVA, I. F.; POULOS, T. L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. **Dalton Transactions**, London, DOI: 10.1039/c2dt31833d.

SHOU, M. et al. Sigmoidal kinetic model for two co-operative substrate-binding sites in a cytochrome P450 3A4 active site: an example of the metabolism of

diazepam and its derivatives. **Biochemical journal**, London, v. 340, p. 845-853, 1999.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3^a ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. 960 p.

TAFT, C. A.; SILVA, C. H. T. P. **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics**. 1^a ed. Kerala: Research Signpost, 2008. 247 p.

TAYLOR, P. G. et al. Evaluation of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for antitumor and antiprotease activities. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 44, p. 349-362, 2006.

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

URLACHER, V. B.; GIRHARD, M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspective for synthetic application. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 26-36, 2012.

VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Human drug metabolism and cytochromes P450: Application and relevance of *in vitro* models. **Journal of Clinical Pharmacology**, Thousand Oaks, v. 41, p. 1149-1179, 2001.

WU, B. Substrate inhibition kinetics in drug metabolism reactions. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 43, p. 440–456, 2011.

WU, C. et al. Triterpenoid contents and anti-Inflammatory properties of the methanol extracts of Ligustrum species leaves, **Molecules**, Berlin, v. 16, p. 1-15, 2011.

ZHENG, Y. et al. Antibacterial compounds from *Siraitia grasvenorii* leaves. **Natural Products Research**, New York, v. 25, n. 9, p. 890- 897, 2011.

ANEXO

ANEXO

ANEXO 1: Protocolo CEUA nº 11.1.323.53.8. Aprovação da Comissão de Ética no uso de animais (CEUA).

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.323.53.8), intitulado "Estudo de Metabolismo *in vitro* do Triterpeno Pentacíclico Amirina Empregando Microsomas Hepático de Ratos", de autoria de **Fernanda de Lima Moreira**, 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 04/05/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.323.53.8), entitled: "Estudo de Metabolismo *in vitro* do Triterpeno Pentacíclico Amirina Empregando Microsomas Hepático de Ratos", by **Fernanda de Lima Moreira** 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, May 04, 2011.

Ribeirão Preto, 9 de maio de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro