UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

LUCAS MACIEL MAURIZ MARQUES

Disposição cinética, metabolismo e permeabilidade intestinal *in vitro* do alcaloide Govaniadina

Ribeirão Preto
2017

LUCAS MACIEL MAURIZ MARQUES

Disposição cinética, metabolismo e permeabilidade intestinal *in vitro* do alcaloide Govaniadina

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Lucas Maciel Mauriz Marques

Orientador: Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 20/02/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Marques, Lucas

Disposição cinética, metabolismo e permeabilidade intestinal
in vitro do alcaloide govaniadina/ Lucas Marques; orientador,
Norberto Peporine Lopes. - 2017
170f.; 30cm.

Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017
Versão original

1. Govaniadina. 2. Metabolismo *in vitro*. 3. Farmacocinética.

Nome: MARQUES, Lucas Maciel Mauriz

Título: Disposição cinética, metabolismo e permeabilidade intestinal *in vitro* do alcaloide govaniadina

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A **Deus**, Senhor da minha vida, condutor dos meus passos, autor da minha Fé, força da minha oração e conselheiro de todos os momentos.

À **Rivian**, minha esposa, companheira zelosa e paciente. Em especial ao fruto do nosso amor, meu filho **Bento**, que do ventre é motivo de orgulho e alegria.

A minha Família, especialmente minha **mãe Maria do Carmo**, que lá do Piauí sempre lutou pelo meu futuro e não deixou de acompanhar as minhas conquistas diárias....

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes**, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório, pelos ensinamentos de vida e aconselhamentos oportunos, por cada momento ao longo destes anos de convivência. Por ajudar, com seu zelo e atenção, na minha formação profissional.

A todos que compõe o **Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos**, amigos, colegas, funcionários, técnicos e aos que também já passaram por esta casa. Obrigado pelos momentos de discussão científica e de descontração.

A todos que compõe o **Laboratório de Metabolismo in vitro e Técnicas de Separação**, que direta ou indiretamente auxiliaram-me: **Profª Drª Marilda Assis**, **Bruno Rocha**, **Nayara Albuquerque**, **Daniel Blascke** e a todos os que um dia por lá passaram. Agradeço, também, ao **Prof. Dr. Anderson de Oliveira**, pela orientação e apoio.

Aos colaboradores para concretização deste trabalho: **Prof. Dr. Ricardo Vessecchi**, **Profª Drª. Rosângela Peccinini**, **Dr. Daniel Callejon**, **Drª. Larissa Garcia**, **Dr. Michel de Campos**, **Dr. João Paulo de Sousa**.

Ao **Prof Dr. Achyut Adhikari** e todo o seu grupo de pesquisa pelo fornecimento do material objeto de estudo deste trabalho.

A todos que compõe o **Institut für Lebensmittelchemie**, destaco o **Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf** pela oportunidade, orientação e recepção no laboratório. Aos colaboradores **Dr. Benedikt Cramer**, **Matthias Behrens**, **Svetlana Kalinina**, **Ulrike Rottkord**, **Yannick Hövelmann**. Agradeço, também, ao amigo **Florian Hübner**, pela atenção e cuidado.

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

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

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

A **FAPESP**, pelo apoio financeiro da bolsa de doutorado no Brasil (#2013/16496-5) e bolsa BEPE na Alemanha (#2015/02592-8). O mesmo agradecimento às demais agências de fomento: **CAPES** e **CNPq**.

*Make no little plans,
they have no magic to stir men's blood...
Make big plans; aim high in hope and work.*

Daniel Burnham

RESUMO

MARQUES, Lucas Maciel Mauriz. **Disposição cinética, metabolismo e permeabilidade intestinal *in vitro* do alcaloide govaniadina**. 2017. 170f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Ao longo da história da humanidade, os produtos naturais oriundos de plantas, vêm sendo investigados e utilizados no tratamento de inúmeras doenças. Os alcaloides do gênero *Corydalis*, do tipo tetrahidroprotoberberina e, em especial a govaniadina, foram identificados como uma nova categoria de ligantes dopaminérgicos e responsáveis por atividades analgésica, antimalárica, leishmanicida e antiurease. A partir destes dados, objetivou-se investigar o perfil farmacocinético, o metabolismo e a permeabilidade intestinal *in vitro* do alcaloide govaniadina. Como resultado geral para o metabolismo *in vitro*, empregando fração microssomal animal e humana, foram obtidos cinco metabólitos: um O-desmetilado (**M1**); um di-hidroxilado (**M2**); um mono-hidroxilado (**M3**) e dois glicuronidados (**M4 e M5**). Um método por CLUE-EM/EM foi desenvolvido e validado para investigação do perfil farmacocinético da govaniadina em plasma de ratos, após a administração intravenosa. A análise das curvas de decaimento plasmático *versus* tempo de coleta indicam que os dados se ajustam ao modelo bicompartimental, com meia-vida de distribuição = $9,2 \pm 8,9$ min, *clearance* = $41,7 \pm 30,4$ mL min⁻¹ kg⁻¹ e meia-vida de eliminação = $55,1 \pm 37,9$ min. Com relação aos estudos de viabilidade celular, a govaniadina apresentou efeitos citotóxicos moderados frente às linhagens celulares Hep G2, HeK-T-293 e CCF-STTG1 em concentrações até 100 µmol L⁻¹. Estudo de permeabilidade intestinal *in vitro* em modelo Caco-2, sugere transporte por difusão passiva, com coeficiente de permeabilidade aparente de $20,6 \pm 3,9 \times 10^{-6}$ cm/s e taxa de efluxo de 0,55. Estes resultados serão importantes para direcionar os experimentos futuros no que tange ao desenvolvimento farmacêutico da govaniadina.

Palavras-chave: Govaniadina. Metabolismo *in vitro*. Farmacocinética.

ABSTRACT

MARQUES, Lucas Maciel Mauriz. **Kinetic disposition, *in vitro* metabolism and intestinal permeability of the govaniadine alkaloid.** 2017. 170f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Throughout humankind history, natural products from plants have been investigated and have been used in the treatment of countless diseases. Tetrahydroprotoberberine alkaloids from the *Corydalis*, in particular govaniadine, has been identified as a new category of dopaminergic ligands and responsible for analgesic, antimalarial, leishmanicidal and antiurease properties. Taking these data into account, the aim of this work was to investigate the pharmacokinetic profile, the *in vitro* metabolism and the intestinal permeability of the alkaloid govaniadine. As a general result for the *in vitro* metabolism, employing animal and human microsomal fraction, five metabolites were obtained: one O-demethylated (**M1**); one dihydroxylated (**M2**); one monohydroxylated (**M3**) and two glucuronidated (**M4** and **M5**). A LC-MS/MS method was developed and validated for the investigation of the govaniadine pharmacokinetic profile in rat plasma following intravenous administration. The mean plasma concentration versus time profile was best fitted to a two-compartmental model, with a distribution half-life = 9.2 ± 8.9 min, clearance = $41.7 \pm 30,4 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ and an elimination half-life = 55.1 ± 37.9 min. Regarding cell viability studies, govaniadine showed moderate cytotoxic effects against Hep G2, HeK-T-293 and CCF-STTG1 cell lines at concentrations up to $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. *In vitro* intestinal permeability study in Caco-2 model, suggests passive diffusion transport, with an apparent permeability value of $20.6 \pm 3.9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ and an efflux rate of 0.55. These results will be important to guide future experiments concerning govaniadine pharmaceutical development.

Keywords: Govaniadine. *In vitro* metabolism. Pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.0 -	Estrutura molecular da govaniadina: (14aS)-2-metoxi-5,8,14,14a-tetraidro-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquino[2,1-b]isoquinolin-1-ol	04
Figura 1.1 -	Procedimento geral de incubação para metabolismo <i>in vitro</i> empregando fração microssomal hepática (murina e humana)	22
Figura 1.2 -	Perfil cromatográfico da fração enriquecida de <i>Corydalis govaniana</i> Wall. Coluna gemini 5 μ m (250 $\times$ 4,6 mm). Fase móvel composta por H ₂ O (A) e MeCN (B) ambos com 0,1 % de ácido fórmico (v/v); gradiente: 0-20 min 10% (B), 20-30 min 30% (B), 30-35 min 100% (B), 35-37 min 100% (B), 37-46 min 10% (B), vazão de 0,8 mL min ⁻¹ em CLAE 1-DAD. In-box: espectro na região do UV	24
Figura 1.3 -	Espectros em alta resolução obtidos por CLAE 1-EM, da fração enriquecida de <i>Corydalis govaniana</i> Wall. Equipamento <i>micrOTOF II-ESI-ToF Bruker Daltonics</i> ®	25
Figura 1.4 -	(a) Mapa do potencial eletrostático molecular e (b) estruturas de equilíbrio da govaniadina (kcal mol ⁻¹)	26
Figura 1.5 -	Proposta para o mecanismo de fragmentação (EM/EM) dos principais íons da govaniadina (A) e da caseadina (B)	27
Figura 1.6 -	Correlações entre hidrogênios e carbonos observadas no mapa de contornos HMBC da govaniadina	28
Figura 1.7 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> da govaniadina após extração com CHCl ₃ a partir de microssomas hepático de rato. A) amostra branco; B) amostra teste e C) amostra controle. Metabólitos: M1, M2 e M3. CLAE 2-DAD. Composição da fase móvel (A) H ₂ O e (B) MeCN contendo 0,1% ácido fórmico (v/v), vazão 0,3 mL min ⁻¹ , gradiente de eluição : 0-5 min, 10-30% (B); 5-6 min, 30-100% (B); 6-7 min, 100% (B); 7-11 min, 10% (B). Coluna kinetex™ C18	

	(100 × 2,1 mm d.i.; 2,6 µm)	31
Figura 1.8 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> da govaniadina após extração com n-Hex a partir de microssomas hepático de rato. A) amostra branco; B) amostra teste e C) amostra controle. Metabólitos: M2 e M3. CLAE 2–DAD. Método: vide figura 1.7	31
Figura 1.9 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> da govaniadina após extração com AcOEt a partir de microssoma hepático de rato. A) amostra branco; B) amostra teste e C) amostra controle. Metabólitos: M2 e M3. CLAE 2–DAD. Método: vide figura 1.7	32
Figura 1.10 -	Espectro de EM ² dos metabólitos M1 (<i>m/z</i> 314), M2 (<i>m/z</i> 340) e M3 (<i>m/z</i> 342). CLAE 2–EM ² (<i>amaZon-SL, ion trap</i>)	33
Figura 1.11 -	Proposta para o mecanismo de fragmentação de A) metabólito 1 (M1); B) metabólito 2 (M2) e C) metabólito 3 (M3)	35
Figura 1.12 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> da govaniadina após extração com CHCl ₃ a partir de microssoma hepático humano. A) amostra branco; B) amostra teste e C) amostra controle. Metabólitos: M1 e M2. Método: vide figura 1.7	36
Figura 1.13 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> , de Fase I , da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de porco. Metabólito: M1. CLAE 3–DAD. Composição da fase móvel (A) H ₂ O e (B) MeCN ambos com 0,1% de ácido fórmico (v/v) em eluição por gradiente a uma vazão de 0,350 mL min ⁻¹ (0-15 min: 10% (B), 15-18 min: 30% (B), 18-21 min: 100% (B), 21-24 min: 100% (B), 24-26 min: 10% (B)). Coluna Nucleodur® C18 ISIS, 5 µm,	

	150 × 2 mm (<i>Macherey-Nagel</i>). Inserção: análise no modo negativo	38
Figura 1.14 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> , de Fase II , da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de porco. Metabólito: govaniadina glicuronidada (M4). Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo	39
Figura 1.15 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> , de Fase I e II , da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de porco. Metabólitos: M1, M4 e M5 (glicuronidação de M1). Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo	39
Figura 1.16 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> , de Fase I , da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de rato. Metabólito: M1. Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo	40
Figura 1.17 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> , de Fase II , da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de rato. Metabólito: M4. Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo	40
Figura 1.18 -	Cromatograma representativo para as análises do metabolismo <i>in vitro</i> , de Fase I e II , da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de rato. Metabólitos: M1, M4 e M5. Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo	41
Figura 1.19 -	Proposta para o mecanismo de fragmentação de A) metabólito 4 (M4) e B) metabólito 5 (M5)	42
Figura 1.20 -	Espectro em alta resolução, no modo positivo. Govaniadina, <i>m/z</i> 327 (A); M4, <i>m/z</i> 506 (B); M1, <i>m/z</i> 317	

	(C) e M5, m/z 497 (D)	43
Figura 1.21 -	Resumo dos metabólitos formados após incubação da govaniadina com fração microssomal hepática humana (H), de porco (P) e de rato (R), na presença do sistema de regeneração de NADPH e UDPGA	45
Figura 2.1 -	Procedimento de extração líquido-líquido da govaniadina em plasma de rato	57
Figura 2.2 -	Perfil cromatográfico para A) govaniadina, $T_R = 5,63$ min e B) mianserina, $T_R = 6,31$ min. Descrição da metodologia de análise, seção 3.1.1., página 54. Gráfico Intensidade (%) <i>versus</i> tempo (min)	67
Figura 2.3 -	Espectros de massas da solução padrão de govaniadina (m/z 326) aplicando-se diferentes potenciais no capilar (1,5 a 3,5 kV)	68
Figura 2.4 -	Espectros de massas da solução padrão de mianserina (m/z 265) aplicando-se diferentes potenciais no capilar (1,5 a 3,5 kV)	69
Figura 2.5 -	Espectros de massas da solução-padrão de govaniadina (m/z 326) aplicando-se diferentes potenciais no cone (5 a 35 V)	70
Figura 2.6 -	Espectros de massas da solução-padrão de mianserina (m/z 265) aplicando-se diferentes potenciais no cone (10 a 30 V)	70
Figura 2.7 -	Espectros de massas da solução-padrão de govaniadina (m/z 326) aplicando-se diferentes energias de colisão (0 a 20 eV), gás de colisão: argônio	71
Figura 2.8 -	Espectros de massas da solução-padrão de mianserina (m/z 265) aplicando-se diferentes energias de colisão (0 a 25 eV), gás de colisão: argônio	72
Figura 2.9 -	Avaliação dos solventes para extração da govaniadina e mianserina de plasma de ratos	73
Figura 2.10 -	Teste de seletividade em plasma de ratos	74
Figura 2.11 -	Efeito de matriz em plasma de ratos	75

Figura 2.12 -	Teste de efeito residual em plasma de ratos	78
Figura 2.13 -	Curva de decaimento plasmático para a govaniadina <i>versus</i> tempo de coleta após administração i.v. de uma dose 1 mg kg ⁻¹ para os animais 1, 2, 3 e 4	80
Figura 2.14 -	Curva de decaimento plasmático para a govaniadina <i>versus</i> tempo de coleta após administração i.v. de uma dose 1 mg kg ⁻¹ para os animais 5, 6, 7 e 8	81
Figura 2.15 -	Diagrama do modelo bicompartimental	84
Figura 2.16 -	Farmacocinética da govaniadina correlacionando com a formação do metabólito mono-hidroxilado (M3). Tempos de coleta 5, 60 e 180 min. <i>MRM</i> do metabólito (342 > 194), <i>MRM</i> da govaniadina (326 > 178). Análise por CLUE-DAD-EM/EM	84
Figura 3.1 -	Visão transversal de um poço do suporte permeável para desenvolvimento e crescimento da monocamada de células Caco-2. Legenda: AP-compartimento apical (lúmen intestinal); BL-compartimento basolateral (sangue); (•) Monocamada de células Caco-2	104
Figura 3.2 -	Viabilidade celular da linhagem Hep G2 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h empregando diferentes densidades celulares (5 × 10 ³ ; 1 × 10 ⁴ e 5 × 10 ⁴), n = 6. Legenda: (***)-Significância estatística alta (p <0,001); (**)-Significância estatística média (p <0,01) e (*)-Significância estatística baixa (p <0,05)	109
Figura 3.3 -	Viabilidade celular da linhagem Hep G2 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h, comparativamente ao controle negativo (MeOH 1%), n = 18. Micotoxina tricoteceno (T2, 10 µmol L ⁻¹) foi utilizada como controle positivo. (***)-Significância estatística alta (p <0,001) e (*)-Significância estatística baixa (p <0,05). Densidade celular: 1 x 10 ⁴ célula/ poço ..	110
Figura 3.4 -	Viabilidade celular da linhagem HeK-T-293 após	

	incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h empregando diferentes densidades celulares (3×10^3 e 6×10^3), $n = 6$. (***)- Significância estatística alta ($p < 0,001$); (**)-Significância estatística média ($p < 0,01$) e (*)-Significância estatística baixa ($p < 0,05$)	111
Figura 3.5 -	Viabilidade celular da linhagem HeK-T-293 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h, comparativamente ao controle negativo (MeOH 1%), $n = 9$. Camptotecina (CPT, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi utilizada como controle positivo. (***)- Significância estatística alta ($p < 0,001$) e (**)-Significância estatística média ($p < 0,01$). Densidade celular: 3×10^3 célula/ poço	112
Figura 3.6 -	Viabilidade celular da linhagem CCF-STTG1 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h, comparativamente ao controle negativo (MeOH 1%), $n = 18$. Camptotecina (CPT, $30 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi utilizada como controle positivo. (***)- Significância estatística alta ($p < 0,001$) e (*)-Significância estatística baixa ($p < 0,05$). Densidade celular: 1×10^4 célula/ poço	113
Figura 3.7 -	Cromatograma <i>MRM</i> da govaniadina no meio HBSS nas concentrações: $6,3 \text{ nmol L}^{-1}$, LIQ (A); 200 nmol L^{-1} , LSQ (B); amostra branco injetada após o LSQ de 200 nmol L^{-1} (C); $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, LIQ (D); $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, LSQ (E); amostra branco injetada após o LSQ de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (F). Gráfico intensidade (cps) <i>versus</i> tempo (min)	115
Figura 3.8 -	Perfil de permeabilidade da govaniadina ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) após ensaio na direção absorviva (AP-BL) em monocamadas de células Caco-2 durante 24h, $n = 9$	119
Figura 3.9 -	Perfil de permeabilidade da govaniadina (200 nmol L^{-1}) após ensaio de transporte ativo (AP-BL e BL-AP) em	

monocamadas de células Caco-2 durante 24h, n = 9. (**)

Significância estatística 120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Íons observados nos espectros em alta resolução da fração enriquecida de <i>Corydalis goviana</i> Wall. Equipamento <i>micrOTOF II-ESI-ToF Bruker Daltonics</i> ®	25
Tabela 1.2 -	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a govaniadina isolada neste trabalho e respectiva comparação com dados publicados na literatura	29
Tabela 1.3 -	Íons observados nos espectros de IES-EM em alta resolução da amostra do metabolismo <i>in vitro</i> da govaniadina com fração microsomal hepática de rato (<i>micrOTOF II</i>)	34
Tabela 2.1 -	Parâmetros do método <i>MRM</i> (<i>multiple reaction monitoring</i>) para detecção da govaniadina e do padrão interno mianserina	55
Tabela 2.2.	Parâmetros do <i>tune</i> do espectrômetro de massas ajustados para análise da govaniadina e do padrão interno mianserina	55
Tabela 2.3 -	Fator de matriz normalizado de PI (FMN) para a govaniadina	75
Tabela 2.4 -	Linearidade do método	76
Tabela 2.5 -	Precisão e Exatidão ($n = 5$)	77
Tabela 2.6 -	Recuperação da govaniadina em plasma de rato ($n = 5$)	78
Tabela 2.7 -	Parâmetros Farmacocinéticos (média $\pm$ desvio padrão) extraídos da curva de concentração plasmática <i>versus</i> tempo, após administração i.v. de uma dose 1 mg kg^{-1} ($n = 8$)	82
Tabela 3.1 -	Parâmetros do método <i>MRM</i> para detecção da govaniadina	98
Tabela 3.2 -	Parâmetros de validação para o método de quantificação da govaniadina no meio HBSS, por CLAE-EM/EM	116
Tabela 3.3 -	Valores da RET ($\Omega \text{ cm}^2$) para a monocamada de células Caco-2 para o tempo 0 (t_0) e após a última coleta, tempo 24h (t_{24}), $n = 9$	118

Tabela 3.4 -	Taxa de rejeição à permeabilidade do corante Amarelo de LúCIFer (%) através da monocamada de células Caco-2, n = 9	121
---------------------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

$[\alpha]^{25}_D$	Rotação óptica a 25°C e 589,3 nm (linha D da luz de sódio)
®	Marca registrada
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AcOEt	Acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Apical
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva de concentração plasmática do tempo zero extrapolada ao infinito
ASC_{0-t}	Área sob a curva de concentração plasmática do tempo zero ao último tempo de coleta
$ASMC_{0-\infty}$	Área sob a curva do primeiro momento do tempo zero extrapolada ao infinito
$ASMC_{0-t}$	Área sob a curva do primeiro momento do tempo zero ao último tempo de coleta
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BEH	<i>Ethylene Bridged Hybrid</i>
BL	Basolateral
Caco-2	Células de adenocarcinoma de cólon humano
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCF-STTG1	Linhagem celular de astrocitoma humano
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH_2Cl_2	Diclorometano
$CHCl_3$	Clorofórmio
CID	Dissociação induzida por colisão
CL	<i>Clearance</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
$Cp_{média}$	Concentração plasmática média
CPT	Camptotecina

CQA	Controle de qualidade de concentração alta
CQB	Controle de qualidade de concentração baixa
CQM-1	Controle de qualidade de concentração média-1
CQM-2	Controle de qualidade de concentração média-2
CV	Coeficiente de variação
CYP450	Citocromo P450
<i>d</i>	Dupleto
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector espectrofotométrico de arranjo de diodo
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMEM	Meio <i>Eagle</i> modificado de <i>Dulbecco</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>dt</i>	Duplo tripleto
E	Erro relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E_{lab}	Energia de colisão
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EM ⁿ	Espectrometria de massas por múltiplo estágio
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
eV	Eletronvolt
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
FM	Fator de matriz
FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
Fração S9	Sobrenadante obtido pela homogeneização e centrifugação a 9000g

FT-ICR MS	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer</i>
Fu	Fração livre
GOV	Govaniadina
H ₂ O	Água
HBSS	Solução salina balanceada de <i>Hank</i>
HCD	<i>Higher-energy collisional dissociation</i>
HEK-T-293	Linhagem de células renais embrionárias humanas
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
IC ₅₀	Concentração de inibição média
i.v.	Administração intravenosa
IT	<i>Ion trap</i>
J	Constante de acoplamento
LIQ	Limite inferior de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIAN	Mianserina
<i>MRM</i>	<i>Multiple reaction monitoring</i>
n-Hex	Hexano
N ₂	Nitrogênio
Na-TFA	Ácido trifluoroacético sodiado
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
PI	Padrão interno
P _{app}	Coeficiente de permeabilidade aparente
PAPS	Adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato
PNs	Produtos naturais
ppm	Partes por milhão
PSG	Penicilina, estreptomicina e L-glutamina
PTFE	Politetrafluoretileno

RDA	Retro-Diels-Alder
RET	Resistência elétrica transepitelial
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Singleto
SFB	Soro fetal bovino
SRN	Sistema de regeneração NADPH comercial
$t_{1/2}$	Meia-vida
$t_{1/2\alpha}$	Meia-vida de distribuição
$t_{1/2\beta}$	Meia-vida de eliminação
T2	Micotoxina tricoteceno
TE	Taxa de efluxo
THPB	Tetrahidroprotoberberina
TM	<i>Trade-mark</i>
T_{max}	Tempo para atingir pico tecidual livre
TMR	Tempo de residência médio
TQ	Tripo quadrupolo
T_R	Tempo de retenção
u	Unidade de massa atômica
UDPGA	Uridina difosfoácido glucurônico
UGT	Uridina difosfato glicosiltransferase
UV	Espectro no ultravioleta
V	Volt
v/v	Volume/volume
Vd	Volume de distribuição
α	Constante de velocidade de distribuição
β	Constante de velocidade de eliminação
β -NADPH	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
INTRODUÇÃO GERAL	01
1. INTRODUÇÃO	02
1.1. Considerações gerais	02
1.2. Gênero <i>Corydalis</i>	03
1.3. Prospecto do trabalho	04
REFERÊNCIAS	05
OBJETIVO GERAL	08
CAPÍTULO 1: Caracterização estrutural e metabolismo <i>in vitro</i> da govaniadina	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Metabolismo <i>in vitro</i>	11
2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO 1.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Materiais	14
3.1.1. Coleta e identificação do material vegetal	14
3.1.2. Reagentes e solventes	14
3.1.3. Equipamentos	15
3.2. Métodos	18
3.2.1. Purificação da fração enriquecida de <i>Corydalis govaniiana</i> Wall. por meio da técnica <i>short column</i>	18
3.2.2. Determinação da atividade ótica (rotação específica)	18
3.2.3. Modelos de química computacional em estudos empregando espectrometria de massas	19

3.2.4. Preparo das frações subcelulares hepática de rato e porco	19
3.2.4.1. Procedimento de incubação para metabolismo <i>in vitro</i> empregando fração microsomal hepática murina e humana	20
3.2.4.2. Procedimento de incubação para metabolismo <i>in vitro</i> empregando fração microsomal, citosólica e S9 suína	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Obtenção e caracterização da govaniadina	24
4.2. Estudos de metabolismo <i>in vitro</i> empregando microsomas hepático murino e humano	30
4.3. Estudos de metabolismo <i>in vitro</i> empregando fração microsomal hepática de rato e de porco, fração citosólica e fração S9 de porco	37
5. COMENTÁRIOS FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 2: Disposição cinética da govaniadina e ligação às proteínas plasmáticas	51
1. INTRODUÇÃO	52
2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO 2	53
3. MATERIAIS E METODOS	54
3.1. Materiais e reagentes	54
3.1.1. Equipamentos	54
3.2. Métodos	56
3.2.1. Validação da Metodologia Bioanalítica	56
3.2.1.1. Soluções-padrão utilizadas na validação bioanalítica	56
3.2.1.2. Procedimento de preparo e extração das amostras	56
3.2.1.3. Parâmetros avaliados na validação do método	57
3.2.1.3.1. Linearidade	58
3.2.1.3.2. Limite inferior de quantificação	59
3.2.1.3.3. Seletividade	59
3.2.1.3.4. Efeito residual	59
3.2.1.3.5. Efeito de matriz	59
3.2.1.3.6. Precisão e exatidão	60
3.2.1.3.7. Recuperação	61

3.2.1.3.8. Estabilidade	62
3.2.2. Avaliação do perfil farmacocinético da govaniadina em plasma de ratos	62
3.2.2.1. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos	63
3.2.3. Ligação às proteínas plasmáticas	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1. Otimização das condições de análise da govaniadina e do padrão interno mianserina por CLUE-EM/EM	67
4.2. Otimização de um método de preparo de amostras para extração da govaniadina de plasma de ratos	72
4.3 Validação da metodologia bioanalítica	73
4.4. Avaliação do perfil farmacocinético da govaniadina em ratos	78
4.5. Ligação às proteínas plasmáticas	85
5. COMENTÁRIOS FINAIS	87
REFERÊNCIAS	88

CAPÍTULO 3: Avaliação da atividade citotóxica e permeabilidade celular da govaniadina

celular da govaniadina	93
1. INTRODUÇÃO	94
1.1. Viabilidade celular	94
1.2. Permeabilidade celular	94
2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO 3	96
3. MATERIAIS E MÉTODOS	97
3.1. Materiais e reagentes	97
3.1.1. Equipamentos	98
3.2. Métodos	99
3.2.1. Avaliação da viabilidade celular	99
3.2.1.1. Análise Estatística	100
3.2.2. Quantificação da govaniadina no meio HBSS, para estudo de permeabilidade celular em monocamada de células Caco-2	100
3.2.2.1. Linearidade	101
3.2.2.2. Precisão e exatidão	101
3.2.2.3. Efeito residual	102

3.2.2.4. Efeito de matriz	102
3.2.2.5. Estabilidade	102
3.2.3. Permeabilidade celular	103
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4.1. Avaliação da citotoxicidade	107
4.2. Validação de um método para quantificação de govaniadina em meio HBSS	114
4.2.1. Permeabilidade celular em monocamada de células Caco-2	117
5. COMENTÁRIOS FINAIS	122
CONCLUSÃO DA OBRA	123
REFERÊNCIAS	124
Apêndice	128
Anexo	141

INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Ao longo da história da humanidade, os produtos naturais (PNs), oriundos de plantas, vêm sendo investigados e utilizados no tratamento de inúmeras doenças (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; WU et al., 2013). Como afirmado por Newman e Cragg (2012, 2016): *os PNs e/ou compostos baseados no seu arranjo estrutural, desempenham papel significativo na descoberta de fármacos e representam fonte mais bem sucedida neste sentido.*

A biodiversidade é fonte de novas estruturas químicas. Os metabólitos secundários, que não estão relacionados com o metabolismo primário, são vitais para a sobrevivência das plantas e são produzidos por meio do metabolismo especializado como forma de defesa contra herbívoros e patógenos (ou de outras fontes de estresse biótico e abiótico) ou como atração para o agente polinizador. Como exemplos de PNs, citam-se: flavonoides, terpenos, polifenóis e alcaloides (ATANASOV et al., 2015; BRUSOTTI et al., 2014; DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015; KINGSTON, 2011; MOREIRA et al., 2016; WOLFENDER et al., 2015; ZHAO; DAVIS; VERPOORTE, 2005).

Atanasov et al. (2015) relataram que a partir da análise de 122 compostos utilizados como medicamentos, 80% foram provenientes de plantas cuja utilização etnofarmacêutica está relacionada com as indicações para as quais os respectivos compostos são prescritos. Atmaca et al. (2016) destacaram que das atuais medicações no mercado, 25-48% foram provenientes de plantas, fato também confirmado por Patridge et al. (2016) que publicaram que para o *Food and Drug Administration* (FDA), os PNs e seus derivados representam mais de um terço dentre todas as fontes de novos agentes terapêuticos por eles aprovados.

O processo de descoberta e desenvolvimento de um fármaco é prolongado e arriscado. O investimento anual global, em termos de pesquisa e desenvolvimento, está em torno de US\$ 50 bilhões (HARVEY 2014; MOREIRA et al., 2016; NILSSON et al., 2015). Não apenas os valores envolvidos estão cada vez mais elevados, a taxa de insucesso também, em torno de 85-75%, para novos fármacos (DENG; LENTO; WILSON, 2016). À vista disto, o interesse científico pela descoberta de

medicamentos a partir de fontes naturais renova-se, apesar dos conhecidos desafios (ATANASOV et al., 2015; ATMACA et al., 2016).

1.2. Gênero *Corydalis*

O gênero *Corydalis*, pertencente à família Fumariaceae, engloba cerca de 470 espécies, é nativo da China, das cordilheiras do Himalaia no Nepal, Paquistão e Índia, também sendo encontrado em regiões montanhosas do leste africano (DAR et al., 2011). Extratos de plantas, de diferentes espécies deste gênero, têm sido utilizados como analgésicos na Ásia Oriental (KIM; CHOI; LEE, 2012) e apresentaram atividade contra hepatite, amebíase e câncer de fígado (SUN et al., 2006). Os alcaloides são considerados os constituintes responsáveis pelas atividades biológicas (YANG et al., 2014), alguns deles apresentando potencial terapêutico para o tratamento da doença de *Alzheimer* (KHODOROVA et al., 2013).

Os alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberina (THPB) estão distribuídos nas famílias: Papaveraceae, Berberidaceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Annonaceae, Magnoliaceae e Convolvulaceae (GRYCOVA; DOSTAL; MAREK, 2007). Aqueles constituem uma importante classe devido às suas ações antitumoral e citotóxica (CHEN et al., 2005; MANZZINI et al., 2003), antimicrobiana, antifúngica (GADHIYA; PONNALA; HARDING, 2015), atividade biológica no sistema nervoso central e cardiovascular (GE et al., 2014) e ao seu papel central na biossíntese de vários outros tipos de alcaloides incluindo protopinas e espirobenzilisquinolinas (SUAU; SILVA; VALPUESTA, 1991).

Os alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberina (THPB) deste gênero, e em especial a govaniadina (Figura 1.0), foram identificados como uma nova categoria de ligantes dopaminérgicos (GADHIYA et al., 2016; SHRESTHA et al., 2013) e também responsáveis pelas atividades analgésica, antimalárica, leishmanicida e antiurease (CALLEJON et al., 2014; BODNAR 2017; GRYCOVA; DOSTAL; MAREK, 2007; MODOLO et al., 2015; MUHAMMAD et al., 2015; SHRESTHA et al., 2013, 2016; WANGCHUK et al., 2012).

REFERÊNCIAS¹

- ATMACA, H.; BOZKURT, E.; CITTAN, M.; TEPE, H. D. Effects of *Galium aparine* extract on the cell viability, cell cycle and cell death in breast cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 305–310, 2016.
- ATANASOV, A. G.; WALTEBERGER, B.; WENZIG, E. M. P.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582–1614, 2015.
- BODNAR, R. J. Endogenous Opiates and Behavior: 2015. **Peptides**, v. 88, p. 126–188, 2017.
- BRUSOTTI, G.; CESARIA, I.; DENTAMARO, A.; CACCIALANZA, G.; MASSOLINI, G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218–228, 2014.
- CALLEJON, D. R.; RIUL, T. B.; FEITOSA, L. G.; GUARATINI, T.; SILVA, D. B.; ADHIKARI, A.; SHRESTHA, R. L.; MARQUES, L. M.; BARUFFI, M. D.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P. Leishmanicidal evaluation of tetrahydroprotoberberine and spirocyclic erythrina-alkaloids. **Molecules**, v. 19, p. 5693–5703, 2014.
- CHEN, W. H.; QIN, Y.; CAI, Z.; CHAN, C. L.; LUO, G. A.; JIANG, Z. H. Spectrometric studies of cytotoxic protoberberine alkaloids binding to double-stranded DNA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1859–1866, 2005.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 703–723, 2014.
- DAR, G. H.; KOUL, S. T.; NAQSHI, A. R.; KHUROO, A. A.; MALIK, A. H. A new species of *Corydalis* DC. (Fumariaceae) from Kashmir, North-west Himalaya, India. **Taiwania**, v. 56, p. 305–308, 2011.
- DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 299–315, 2015.
- DENG, B.; LENTO, C.; WILSON, D. J. Hydrogen deuterium exchange mass spectrometry in biopharmaceutical discovery and development - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 940, p. 8–20, 2016.

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

GADHIYA, S.; MADAPA, S.; KURTZMAN, T.; ALBERTS, I. L.; RAMSEY, S.; PILLARSETTY, N. K.; KALIDINDI, T.; HARDING, W. W. Tetrahydroprotoberberine alkaloids with dopamine and σ receptor affinity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 2060–2071, 2016.

GADHIYA, S.; PONNALA, S.; HARDING, W. W. A divergent route to 9,10-oxygenated tetrahydroprotoberberine and 8-oxoprotoberberine alkaloids: synthesis of ($\pm$)-isocorypalmine and oxypalmatine. **Tetrahedron**, v. 71, p. 1227–1231, 2015.

GE, H. X.; ZHANG, J.; LU, L. L.; BO, Y. Y. Biotransformation of tetrahydroprotoberberines by *Panax ginseng* hairy root culture. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 133–139, 2014.

GRYCOVA, L.; DOSTAL, J.; MAREK, R. Quaternary protoberberine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 68, p. 150–175, 2007.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193–200, 2014.

KHODOROVA, N. V.; SHAVARDA, A. L.; PILLON, M. L.; LABERCHE, J. C.; VOITSEKHOVSKAJA, O. V.; CONTI, M. B. Biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloids in *Corydalis bracteata*: Compartmentation and seasonal dynamics. **Phytochemistry**, v. 92, p. 60–70, 2013.

KIM, K. H.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. Turtschamide, a cytotoxic putrescine bisamide from *Corydalis turtschaninovii*. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 1490–1492, 2012.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496–511, 2011.

MANZZINI, S.; BELLUCI, M.C.; MONDELLI, R. Mode of binding of the cytotoxic alkaloid berberine with the Double Helix oligonucleotide D(AAGAATTCTT)₂. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 505–514, 2003.

MODOLO, L. V.; de SOUZA, A. X.; HORTA, L. P.; ARAUJO, D. P.; de FÁTIMA, A. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 35–44, 2015.

MOREIRA, F. L.; MARQUES, L. M. M.; LOPES, N. P.; DE OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism studies of natural products are crucial in the early development of medicines. **Phytochemistry Reviews**, 2016. DOI 10.1007/s11101-016-9482-0.

MUHAMMAD, N.; SHRESTHA, R. L.; ADHIKARI, A.; WADOOD, A.; KHAN, H.; KHAN, A. Z.; MAIONE, F.; MASCOLO, N.; de FEO, V. First evidence of the analgesic activity of govaniadine, an alkaloid isolated from *Corydalis govaniiana* Wall. **Natural Product Research**, v. 29, p. 430–437, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.

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**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NILSSON, A.; GOODWIN, R. J.; SHARIATGORJI, M.; VALLIANATOU, T.; WEBBORN, P. J.; ANDREN, P. E. Mass spectrometry imaging in drug development. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 1437–1455, 2015.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, p. 204–207, 2016.

SHRESTHA, R. L.; ADHIKARI, A.; MARASINI, B. P.; JHA, R. N.; CHOUDHARY, M. I. Novel inhibitors of urease from *Corydalis govaniana* Wall. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 228–231, 2013.

SHRESTHA, N.; SHRESTHA, S.; KOJU, L.; SHRESTHA, K. K.; WANG, Z. Medicinal plant diversity and traditional healing practices in eastern Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 292–301, 2016.

SUAU, R.; SILVA, M. V.; VALPUESTA, M. A novel oxidation stage in the chemistry of protoberberine alkaloids. Synthesis of 7,8-dehydroberbines. **Tetrahedron**, v. 47, p. 5841–5846, 1991.

SUN, N.; LU, G.; YUAN, B.; YUAN, B. Research advances in *Corydalis thalictrifolia* Franch. **Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 78–80, 2006.

WANGCHUK, P.; KELLER, P. A.; PYNE, S. G.; WILLIS, A. C.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Antimalarial alkaloids from a Bhutanese traditional medicinal plant *Corydalis dubia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 310–313, 2012.

WOLFENDER, J. L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 135–164, 2015.

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

YANG, Z. Y.; JIANG, B. H.; TENG, F. K.; HAN, N.; LIU, Z. H.; ZHOU, J. J.; WANG, Y.; GUO, D. A.; YIN, J. Ambiguanine A–G, hexahydrobenzophenanthridine alkaloids from *Corydalis ambigua* var. *amurensis*. **Phytochemistry**, v. 105, p. 158–163, 2014.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 283–333, 2005.

OBJETIVO GERAL

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi contribuir para o conhecimento do perfil metabólico e farmacocinético do alcaloide govaniadina.

Para se alcançar este objetivo foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- Avaliação e comparação do metabolismo *in vitro* empregando as frações microssomal hepática animal (suína e murina) e humana, frações citosólica e S9 (suína);
- Investigação do perfil farmacocinético em ratos Wistar após a administração intravenosa (i.v.) em *bolus* e determinação da fração de ligação às proteínas plasmáticas;
- Avaliação da atividade citotóxica em linhagem de células hepáticas (Hep G2), renais (Hek-T-293) e de astrocitoma do cérebro humano (CCF-STTG1). Bem como, caracterização da absorção intestinal *in vitro* empregando o modelo de monocamadas de células Caco-2.

CAPÍTULO 1:

Caracterização estrutural e metabolismo *in vitro* da govaniadina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabolismo *in vitro*

O fígado é o maior órgão envolvido no metabolismo de compostos endógenos e exógenos. O termo metabolismo refere-se ao processo de transformação enzimática de grupo(s) químico(s), de uma molécula, em outro(s). Como exemplo, o processo de conversão do caráter lipofílico, de um composto, em hidrofílico, a fim de facilitar o seu processo de eliminação do organismo. A superfamília do citocromo P450 (CYP450) é um grupo diverso de enzimas incluindo principalmente oxidases, redutases e hidrolases, as quais catalisam várias reações, incluindo oxidação, sulfoxidação, hidroxilação aromática e alifática, N- e O-desalquilação e desaminação (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN 2017; BRANDON et al., 2003; GOLIZEH et al., 2015; YUAN et al., 2014).

As enzimas do CYP450 estão distribuídas em vários tecidos e órgãos, incluindo: células sanguíneas periféricas, plaquetas, glândulas adrenais, tecido adiposo, nasal e vaginal, vesículas seminais, cérebro, pulmão, rins, intestino e fígado. Dentre os citados, o fígado e o intestino delgado contribuem em maior extensão com os processos de metabolismo e eliminação (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN 2017).

As reações metabólicas podem ser de Fase I e Fase II. As de Fase I estão envolvidas no primeiro estágio, compreendendo reações redox mediadas principalmente pelo CYP450, e em menor extensão pelas flavinas monooxigenases (FMO's), incluindo hidroxilações, dealquilações, epoxidações e isomerizações. As de Fase II compreendem reações de conjugação do tipo: glicuronidação, sulfonação, acetilação, metilação, conjugação com glutatona e com aminoácidos, resultando no aumento da hidrofiliabilidade do composto, tornando-o mais facilmente excretável (CUSACK et al., 2013; NOWAK; WOZNIAKIEWICZ; KOSCIELNIAK, 2014). Há ainda os transportadores expressos no fígado, intestino, rins e cérebro e que formam uma barreira seletiva para o transporte de compostos grandes e/ou ionizados para fora e para dentro das células, desempenhando papel fundamental nos processos de absorção, distribuição e excreção. Exemplificando-se, tem-se a glicoproteína-P (P-gp) e a proteína associada de multirresistência (ALMAZROO; MIAH;

VENKATARAMANAN 2017; MOREIRA et al., 2016; XU; LI; KONG, 2005).

O metabolismo é um dos mais importantes fatores que afetam o perfil farmacocinético dos xenobióticos. A caracterização dos principais metabólitos formados é crucial para gerar informações à respeito da biodisponibilidade, propriedades farmacológicas e toxicológicas (FRAGA et al., 2011; LUBIN et al., 2015; MA et al., 2016) e chave para continuidade do processo de desenvolvimento de um medicamento (CUSAK et al., 2013). As metodologias *in vitro* constituem-se em ferramentas simples e rápidas que têm sido extensivamente empregadas. Isto porque, os ensaios *in vitro* são usualmente menos prolongados e dispendiosos que os ensaios *in vivo* e podem fornecer previsão quanto aos resultados clínicos em humanos, sobre a identidade dos metabólitos formados e as enzimas envolvidas (MOREIRA et al., 2016; ZHANG et al., 2012). Como exemplos, podem ser citadas as frações subcelulares hepáticas: microssomas, hepatócitos, fração S9 e citosólica (ABASS, 2016).

O modelo microssomal vem sendo amplamente empregado para este fim devido suas vantagens, seja no procedimento de obtenção ou mesmo na estabilidade do conteúdo proteico quando comparado a outras frações subcelulares (YUAN et al., 2014), gerando informações adequadas acerca dos eventos *in vivo* (NOWAK; WOZNIAKIEWICZ; KOSCIELNIAK, 2014). Uma parcela significativa das enzimas envolvidas no metabolismo encontra-se enriquecida na fração microssomal, devido à sua própria metodologia de preparo (BRANDON et al., 2003; GOLIZEH et al., 2015). Frente ao já exposto e também pelo fato de que no caso dos PNs, a sua segurança não é intrínseca simplesmente pelo fato de serem de origem natural, o investimento inicial em estudos de metabolismo faz-se necessário e é crítico (MOREIRA et al., 2016).

2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO 1

Avaliar e comparar o metabolismo *in vitro* do alcaloide govaniadina empregando a fração microssomal hepática animal (suína e murina), fração microssomal hepática (humana) e frações citosólica e S9 (suína) a fim de se predizer o que será formado *in vivo*.

Para atingir este objetivo foram definidos os seguintes pontos:

- Isolamento do alcaloide govaniadina a partir da fração enriquecida de *Corydalis gowaniana* Wall.;
- Desenvolvimento de processos de metabolismo *in vitro* empregando as frações subcelulares hepáticas (animal e humana).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Coleta e identificação do material vegetal

A planta *Corydalis govaniana* Wall. foi coletada em *Langtang* (*Rashuwa*, Nepal) e a identificação botânica foi realizada por *Sanjiv Kumar Rai*, taxonomista (*Department of Plant Resources, Thapathali, Kathmandu, Nepal*). A exsicata referente ao material vegetal, CG-207 está depositada no *Central Department of Botany, Tribhuvan University, Kirtipur, Kathmandu, Nepal*.

A fração enriquecida de *Corydalis govaniana* Wall., contendo o alcaloide govaniadina, foi fornecida pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. *Achyut Adhikari* (*Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical and Biological Sciences, University of Karachi, Paquistão*).

3.1.2. Reagentes e solventes

- Os solventes utilizados foram: acetato de etila, acetona, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, dimetilsulfóxido, metanol, *n*-hexano grau HPLC ou PA (*Carlo Erba, Chaussie du Vexin, França*; *J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey, EUA*; *Mallinckodt, Phillipsburg, New Jersey, EUA*; *Vetec, Duque de Caxias, Brasil*).

- A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema *Milli-Q* (*Millipore, Bedford, EUA*).

- O reagente fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (NaH_2PO_4) foi obtido da *Synth* (*Diadema, São Paulo, Brasil*). Hepes ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$) e Tris base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) foram obtidos da *J. T. Baker* (*Phillipsburg, New Jersey, EUA*).

- Os cofatores D-Glicose-6-fosfato monossódico, glicose-6-fosfato desidrogenase tipo VII, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (*Darmstadt, Hessen, Alemanha*). Alameticina (solução feita a partir de *Tricoderma viride*), sal de sódio de uridina difosfoácido glucurônico e adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (*Saint Louis, Missouri, EUA*).

- A fração microssomal de fígado humano foi adquirida da *BD GentestTM* (Woburn, Massachusetts, EUA). A fração é composta por um *pool* de 50 doadores de ambos os sexos, na concentração proteica de 20 mg mL⁻¹ (0,5 mL). O sistema de regeneração NADPH comercial (SRN), soluções A (26 mmol L⁻¹ de NADP, 66 mmol L⁻¹ de glicose-6-fosfato e 66 mmol L⁻¹ de MgCl₂ em água) e B (40 unidades mL⁻¹ de glicose-6-fosfato desidrogenase em 5 mmol L⁻¹ de citrato de sódio) também foram adquiridas do mesmo fornecedor, bem como o tampão fosfato de potássio (0,5 mol L⁻¹, pH 7,4).

3.1.3. Equipamentos

- Agitador de tubos *Phoenix AP56* (Araraquara, São Paulo, Brasil);
- Agitador do tipo VXR da IKA[®] (*Staufen, Baden-Württemberg, Alemanha*);
- Balanças analíticas (*Marte*, modelo As1000, São Paulo, Brasil; *Mettler Toledo*, modelo AG 245, Suíça);
- Banho ultrassônico (*Unique*, modelo Ultracleaner 4050, Piracicaba, São Paulo, Brasil);
- Centrífuga (*Hitachi CF16RXII, Himac compact, Tokyo, Japão*);
- Medidor de pH (*Gehaka*, modelo PG1800, Diadema, São Paulo);
- Espectrômetro *Bruker Avance[®] DRX-500*, operando a 500 MHz, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP). Para obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear, as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃, pureza isotópica = 99,8%, *Sigma-Aldrich[®]*) e transferidas para tubos de RMN de 175 × 5 mm (*Sigma-Aldrich[®]*). Foram obtidos espectros em 1D (unidimensionais) e 2D (bidimensionais). O processamento dos espectros foi feito com auxílio do *software MestReNova 6.0.2*. (União Europeia).
- As análises para identificação dos metabólitos formados a partir das frações microssomais (humana e murina) foram efetuadas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**CLAE 1**) da marca *Shimadzu[®]* (Kyoto, Japão) composto de: bombas de alta pressão (modelo LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃), injetor com amostrador de 100 µL (SIL-20A HT), detector

espectrofotométrico de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A, 200 a 600 nm), módulo de comunicação (CBM-20A) e forno para coluna (CTO-20A) aquecido a 40°C. As injeções foram efetuadas automaticamente (5 µL). Empregou-se coluna cromatográfica *Kinetex™ XB-C18 Phenomenex®* (100 mm × 2,1mm, d.i.), tamanho de partícula 2,6 µm e coluna de guarda *Phenomenex®* (2,1mm, d.i.). Como fase móvel foi utilizada H₂O (A) e MeCN (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico (v/v) em eluição por gradiente a uma vazão de 0,3 mL min⁻¹: 0-5 min 10% (B), 5-6 min 30% (B), 6-7 min 100% (B), 7-7,5 min 100% (B), 7,5-11 min 10% (B), tempo total de análise de 11 minutos. O equipamento de **CLAE 1** foi acoplado a um espectrômetro de massas *micrOTOF II - ESI-ToF Bruker Daltonics®* (Billerica, Massachusetts, EUA). O aparelho é de alta resolução necessitando calibração interna. Para tanto, utilizou-se solução de ácido trifluoroacético sodiado (Na-TFA, 10 mg mL⁻¹). Os espectros foram adquiridos em modo positivo, empregando ionização por *electrospray* (IES), nas condições: capilar: 3500 V; *end plate offset*: 500 V; temperatura do gás de secagem: 200°C; vazão de 9 L min⁻¹ e pressão de 4 Bar, varredura 100-500 *m/z*. Foi utilizado gás nitrogênio (N₂), tanto para nebulização como para secagem. O programa empregado na aquisição dos dados foi o *software Bruker Compass DataAnalysis 4.1* (Bremen, Alemanha).

- Para os experimentos de espectrometria de massas por múltiplo estágio (EMⁿ) utilizou-se equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**CLAE 2**) da marca *Shimadzu®* (Kyoto, Japão), composto de bombas de alta pressão (modelo LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃), injetor com amostrador de 100 µL (SIL-20A HT), detector espectrofotométrico de arranjo de diodo (SPD-M20A, 200 a 600 nm), módulo de comunicação (CBM-20A) e forno para coluna (CTO-20A) aquecido a 40°C. As injeções foram efetuadas automaticamente (5 µL). Foram utilizadas as mesmas coluna e fase móvel descritas anteriormente. O equipamento de **CLAE 2** foi acoplado a um espectrômetro de massas *amaZon-SL ion trap(IT) Bruker Daltonics®* (Billerica, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos em modo positivo, empregando IES, nas condições: capilar: 3500 V; *end plate offset*: 500 V; temperatura do gás de secagem: 280°C, vazão de 7 L min⁻¹ e pressão de 2 Bar. Foi utilizado nitrogênio (N₂) tanto para nebulização como para secagem. O programa empregado na aquisição dos dados foi o *software Bruker Compass DataAnalysis 4.1* (Bremen, Alemanha).

- Para os experimentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) em alta resolução utilizou-se espectrômetro de massas *micrOTOF II-ESI-ToF Bruker Daltonics*[®] (Billerica, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos em modo positivo, empregando IES, via bomba de infusão (300 $\mu\text{L h}^{-1}$, *Kd Scientific*, EUA), nas condições: capilar 3500 V; *end plate*: 500 V; temperatura do gás de secagem 180°C, a uma vazão de 4 L min^{-1} e pressão de 0,4 Bar. Foi utilizado nitrogênio (N_2) tanto para nebulização como para secagem. As amostras foram previamente diluídas em MeOH:H₂O na proporção de 1:1. Para calibração interna utilizou-se solução de Na-TFA (10 mg mL^{-1}). O programa empregado na aquisição dos dados foi o *software Bruker Compass DataAnalysis 4.1* (Bremen, Alemanha).

- As análises para identificação dos metabólitos formados a partir das frações microssomal, citosólica e S9 de porco foram feitas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**CLAE 3**) da marca *Thermo Scientific Accela*TM (*Dreieich, Hessen, Alemanha*) composto de bombas de alta pressão (modelo 60057-60010), auto-amostrador (60057-60020), detector espectrofotométrico de arranjo de diodo (DAD) (SPD-M30A, *Shimadzu, Canby, Oregon, EUA*), módulo de comunicação CBM-20A (*Shimadzu, Kyoto, Japão*). As injeções foram efetuadas automaticamente (5 μL). Empregou-se a coluna cromatográfica *Nucleodur*[®] C18 ISIS, 5 μm , 150 $\times$ 2 mm (*Macherey-Nagel, Alemanha*). Como fase móvel foi utilizada H₂O (A) e MeCN (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico (v/v) em eluição por gradiente a uma vazão de 0,350 mL min^{-1} : 0-15 min 10% (B), 15-18 min 30% (B), 18-21 min 100% (B), 21-24 min 100% (B), 24-26 min 10% (B), tempo total da corrida de 35 minutos. O equipamento de **CLAE 3** foi acoplado a um espectrômetro de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*, FT-ICR MS) com fonte de IES (*LTQ Orbitrap XL, Thermo Scientific, Dreieich, Hessen, Alemanha*). O modo “aquisição dependente de dados” foi empregado para se obter os espectros de (EM)ⁿ a partir das seguintes configurações: (1) varredura inicial para coleta do espectro completo dos íons da amostra; (2) varredura posterior para coleta dos espectros de EM/EM dos íons mais intensos a partir dos obtidos da varredura inicial. A faixa de massas contemplou o intervalo de 50 a 1000 m/z . Paralelamente, elaborou-se uma lista com massas para os possíveis metabólitos. Por meio de dissociação colisional de alta energia (*higher-energy collisional dissociation*, HCD), fragmentou-se o primeiro e o segundo íons

mais intensos da lista. Os espectros foram adquiridos em modo positivo, empregando IES, nas seguintes condições: capilar: 3500 V; temperatura do capilar: 275°C. Foi utilizado gás hélio (He) durante as análises HCD e rampa de energia de colisão de 0 a 35 eV. O programa empregado na aquisição dos dados foi o *software Xcalibur 2.07 SP 1* (Thermo Scientific, Dreieich, Hessen, Alemanha).

3.2. Métodos

3.2.1. Purificação da fração enriquecida de *Corydalis govani* Wall. por meio da técnica *short column*

A fração enriquecida de *Corydalis govani* Wall., contendo o alcaloide govaniadina (≈ 400 mg), foi submetida a cromatografia clássica modelo *short column* em sílica gel (70-230 mesh, 60°A, Aldrich). O solvente empregado para eluição foi diclorometano. Após coleta dos 50 mL iniciais, foram recolhidas 35 frações (500 mL cada) as quais foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico, por CLAE 1-EM. Para coleta da última fração empregou-se AcOEt como solvente de eluição (100%). As frações 3-7 foram reunidas e secas a temperatura ambiente cristalizando 72,5 mg de govaniadina (pureza maior que 98%) e as frações 8-25 foram reunidas e secas a temperatura ambiente cristalizando 94,2 mg de govaniadina (pureza > 95%), as demais frações apresentaram pureza < 90%. A confirmação estrutural deu-se por meio de análises de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135°, HMQC, HMBC e EM.

3.2.2. Determinação da atividade ótica (rotação específica)

A govaniadina (50 mg) foi solubilizada em 1 mL de clorofórmio. Essa solução foi transferida para cela do polarímetro com capacidade de 1 mL e caminho óptico de 10 mm. A análise de rotação específica, $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$, foi realizada em polarímetro digital (Jasco P-2000, Maryland, EUA) o qual efetuou o cálculo automaticamente para as amostras analisadas ($n = 3$).

3.2.3. Modelos de química computacional em estudos empregando espectrometria de massas

Modelos de química computacional foram utilizados para avaliação dos sítios de protonação e das propostas de fragmentação. Este estudo foi conduzido em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Vessecchi (FFCLRP-USP). As geometrias para as moléculas neutras e seus subsistemas protonados foram obtidas por meio do modelo B3LYP/6-311++G(d,p) implementado no programa Gaussian 03 (de OLIVEIRA et al., 2015; VESSECCHI et al., 2011). Este programa foi posteriormente empregado na obtenção das grandezas termoquímicas e sítios de reatividade das moléculas.

3.2.4. Preparo das frações subcelulares hepática de rato e porco

O estudo envolvendo a preparação da fração microsomal hepática de ratos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto-USP, de acordo com o processo nº 14.1.721.53.6 (Anexo A, página 142). A fração microsomal hepática de rato foi obtida pelo método descrito por Marques et al. (2014). Seis ratos machos da raça Wistar com 40 dias de idade, fornecidos pelo Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) foram utilizados. Os animais foram ambientados a 25°C com ciclos de 12 horas de luz, na manhã seguinte foram sacrificados por decaptação. O fígado fresco foi removido e colocado em béquer com solução tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4), contendo 0,15 mol L⁻¹ KCl.

Os fígados foram triturados e lavados três vezes em tampão Tris-HCl. Após isto, foram homogeneizados em homogeneizador tipo *Potter* (modelo MA 181, *Marconi*, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e centrifugados por 15 min, a 4°C, a 10000g (modelo *Himac CF16RXII*, *Hitachi*, *Tokyo*, Japão). O sobrenadante foi coletado e centrifugado em ultracentrífuga a 4°C, por 60 min, a uma velocidade de 100000g (modelo XL-70, *Beckman*, *Carlsbad*, EUA). O *pellet* contendo os microsomas foi ressuspenso em solução tampão Hepes-HCl 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,4), contendo 20% de glicerol e EDTA 1 mmol L⁻¹ e mantido a -80°C até o momento da utilização. O conteúdo proteico foi dosado pelo método do biureto empregando um kit para dosagem de proteínas totais (*Labtest*, Belo Horizonte, Brasil).

O estudo envolvendo a utilização das frações microssomal hepática, citosólica e S9 de porco foi desenvolvido durante estágio de doutorado sanduíche no *Institut für Lebensmittelchemie, Universität Münster*, Alemanha, sob a supervisão do Prof. Dr. *Hans-Ulrich Humpf*. O procedimento de preparo para as referidas frações encontra-se descrito por Welsch e Humpf (2012) e Winston et al. (1992).

3.2.4.1. Procedimento de incubação para metabolismo *in vitro* empregando fração microssomal hepática murina e humana

Para a fração microssomal hepática de rato, a mistura de incubação (1000 μL) consistiu de: govaniadina ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$), tampão fosfato de sódio (100 mmol L^{-1} , pH 7,4), solução de incubação contendo β -NADPH ($0,25 \text{ mmol L}^{-1}$), glicose-6-fosfato (5 mmol L^{-1}) e glicose-6-fosfato desidrogenase ($0,5 \text{ unidades mL}^{-1}$) em tampão Tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) com $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ KCl (MARQUES et al., 2016), utilizou-se excesso de co-fator, a fim de que não houvesse depleção durante os experimentos.

Para a fração microssomal hepática humana, a mistura de incubação (200 μL) consistiu de: govaniadina ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) e sistema de regeneração NADPH (NADPH $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$; glicose-6-fosfato $3,3 \text{ mmol L}^{-1}$; glicose-6-fosfato desidrogenase $0,4 \text{ unidades mL}^{-1}$ e MgCl_2 $3,3 \text{ mmol L}^{-1}$) em tampão fosfato de potássio (100 mmol L^{-1} , pH 7,4) (MARQUES et al., 2016).

Estes conjuntos, descritos nos dois primeiros parágrafos, foram pré-incubados a 37°C durante 5 min em banho-maria (modelo SL 157, Solab, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Transcorrido este tempo, foram adicionadas aos respectivos conjuntos de incubação: fração microssomal hepática murina (1 mg mL^{-1}) e humana (1 mg mL^{-1}) e o procedimento de metabolismo *in vitro* iniciado. A incubação foi realizada sob agitação a 37°C por 90 min, e foi encerrada ao adicionar-se o solvente extrator (4000 μL para o sistema contendo microssoma de rato e 1000 μL para o sistema contendo microssoma humano).

As amostras foram agitadas em agitador de soluções (modelo AP56, *Phoenix*®, Piracicaba, São Paulo, Brasil), por 20 segundos e, em seguida, no sistema de agitação orbital Vibrax (modelo VRX, IKA®, *Staufen*, Alemanha) durante 15 min a 1000 rpm. Centrifugaram-se os tubos a $2860g$, durante 8 min, a 4°C (centrífuga *Himac CF16RXII*, *Hitachi*, *Tokyo*, Japão). Retiraram-se, respectivamente, 3000 μL e 750 μL de solvente extrator, do sistema contendo microssoma de rato e

de humano. Por fim, as amostras foram evaporadas até seca sob ar comprimido. Os resíduos secos foram ressuspensos em 200 µl de fase móvel MeCN:H₂O (10:90), filtrados em membranas PTFE de 13 mm de diâmetro, poro 0,22 µm (*Millex*, *Millipore*) e uma alíquota de 5 µL foi injetada.

O procedimento geral de metabolismo *in vitro* está esquematizado na página a seguir. Amostras do tipo controle foram preparadas sem a adição do sistema de regeneração de NADPH; amostras do tipo branco foram preparadas aliquotando-se metanol ao invés de govaniadina. Todos os experimentos foram preparados em triplicata (n = 3).

Figura 1.1 - Procedimento geral de incubação para metabolismo *in vitro* empregando fração microssomal hepática murina e humana

3.2.4.2. Procedimento de incubação para metabolismo *in vitro* empregando fração microssomal, citosólica e S9 (suína)

Todos os procedimentos de metabolismo *in vitro* foram conduzidos de acordo com os trabalhos de Marques et al. (2014) e Ruan e Yan (2014). Para o desenvolvimento das reações de **Fase I**, a govaniadina ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi incubada com tampão Tris-HCl ($31,2 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,4), sistema de regeneração de NADPH (NADPH 1 mmol L^{-1} , glicose-6-fosfato 1 mmol L^{-1} , glicose-6-fosfato desidrogenase $0,5 \text{ unidades mL}^{-1}$ e MgCl_2 4 mmol L^{-1}) e fração microssomal hepática de porco ($1 \text{ mg proteína mL}^{-1}$) em um volume final de $200 \mu\text{L}$.

Para o desenvolvimento das reações de **Fase II**, a govaniadina ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi incubada com tampão Tris-HCl ($64,2 \text{ mmol L}^{-1}$, pH 7,4), MgCl_2 (4 mmol L^{-1}), diferentes cofatores (UDPGA 2 mmol L^{-1} ou PAPS $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; separadamente, e

não em combinação) e diferentes frações subcelulares na concentração de 1 mg proteína mL⁻¹ (fração microssomal, citosólica e S9; separadamente, e não em combinação) em um volume final de 200 µL. Alameticona (1,25 µg mL⁻¹, concentração final) foi adicionada apenas nas reações contendo o cofator UDPGA para promover abertura de poros na barreira lipofílica do sítio ativo da UGT, facilitando, assim, a ocorrência das reações de glicuronidação (GÓMEZ et al., 2015).

Para o desenvolvimento das reações de **Fase I e II**, um conjunto de condições de incubação foi empregado para cada fração subcelular (fração microssomal, citosólica e S9). As reações foram preparadas reunindo-se todos os cofatores nas quantidades anteriormente descritas.

Todas as reações foram incubadas em incubadora Binder a 37°C, sob agitação de 100 rpm, durante 90 min (*Heidolph® Rotamax 120 Orbital Shaker*, Alemanha). Após este tempo, as reações foram finalizadas pela adição de 400 µL de acetonitrila gelada. Todo o conteúdo foi centrifugado a 10000g, 4°C, durante 15 minutos (centrífuga Mikro 200R, *Hettich zentrifugen*, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para tubos do tipo *ependorf* e deixado evaporar até a secura em concentradora de rotação a vácuo a 35°C (Concentrador de S-BA-VC-300H, H. *Saur Laborbedarf*, Reutlingen, Baden-Württemberg, Alemanha). Após isto, o resíduo foi reconstituído em 200 µL de fase móvel de MeCN:H₂O (10:90 v/v), filtrado através de membrana de PTFE (politetrafluoretileno) de 13 mm de diâmetro, poro 0,45 µm (Phenomenex) e 5 µL foram injetados no sistema cromatográfico. Todos os experimentos foram preparados em triplicata (n = 3). Amostras do tipo controle sem cofatores ou sem substrato ou sem frações subcelulares foram também avaliadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção e caracterização da govaniadina

A análise por CLAE 1-EM, da fração enriquecida de *Corydalis govaniana* Wall., resultou no cromatograma apresentado na figura 1.2, o qual apresenta dois compostos: um majoritário, T_R (tempo de retenção) = 20,1 min (m/z 326) e um minoritário T_R = 21,0 min (m/z 342). Os espectros na região do UV, para ambos, revelaram duas bandas: uma com absorção máxima próxima de 208 nm e outra próxima de 288 nm, as quais são compatíveis com o núcleo THPB (DEEVANHXAY et al., 2009; RINGDAHL; CHAN; CRAIG, 1981). Relativamente a cada um dos sinais cromatográficos, para o majoritário, tem-se: $[M+H]^+ = m/z$ 326,1393 e fragmento m/z 178,0868; Para o minoritário, tem-se: $[M+H]^+ = m/z$ 342,1699 e o mesmo fragmento (Figura 1.3 e Tabela 1.1).

Figura 1.2 - Perfil cromatográfico da fração enriquecida de *Corydalis govaniana* Wall. Coluna gemini 5 μ m (250 $\times$ 4,6 mm). Fase móvel composta por H₂O (A) e MeCN (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico (v/v); gradiente: 0-20 min 10% (B), 20-30 min 30% (B), 30-35 min 100% (B), 35-37 min 100% (B), 37-46 min 10% (B), vazão de 0,8 mL min⁻¹ em CLAE 1-DAD. In-box: espectro na região do UV

Figura 1.3 - Espectros em alta resolução obtidos por CLAE 1-EM, da fração enriquecida de *Corydalis goviana* Wall. Equipamento *micrOTOF II-ESI-ToF Bruker Daltonics*[®]

Tabela 1.1 - Íons observados nos espectros em alta resolução da fração enriquecida de *Corydalis goviana* Wall. Equipamento *micrOTOF II-ESI-ToF Bruker Daltonics*[®]

	T_R (min)	Fórmula química	m/z acurado	m/z exato	Erro (ppm)
[M+H] ⁺	20,1	$C_{19}H_{20}NO_4^+$	326,1393	326,1387	1,8
Govaniadina					
[M+H] ⁺	21,0	$C_{20}H_{24}NO_4^+$	342,1699	342,1700	0,3
Interferente					

A análise do mapa de potencial eletrostático molecular da govaniadina (Figura 1.4a) sugere que o átomo de nitrogênio é sítio de protonação mais favorável, pois é onde se localiza a região mais nucleofílica (em vermelho), a qual acomoda o próton satisfatoriamente (VESSECCHI et al., 2012). A análise da afinidade protônica (Figura 1.4b), fornece a estabilidade das espécies protonadas (VESSECCHI et al., 2008) e confirma o que foi descrito anteriormente, como o átomo de nitrogênio sendo o mais estável após protonação (238,74 kcal mol⁻¹).

Figura 1.4 - (a) Mapa do potencial eletrostático molecular e (b) estruturas de equilíbrio da govaniadina (kcal mol^{-1})

A identificação do sítio de protonação foi determinante para se estabelecer o efeito da ativação colisional sobre a migração do próton em experimentos de ESI-CID-EM/EM, possibilitando a identificação da estrutura do íon precursor a partir do qual foram formados os íons fragmentos (VESSECCHI et al., 2008).

Nos apêndices F e H (páginas 134 e 136, respectivamente), encontram-se os espectros de massas para a govaniadina e o interferente, respectivamente, obtidos a partir de experimentos de EM/EM aplicando-se energias de colisão (E_{lab}) crescentes. E nos apêndices G e I (páginas 135 e 137, respectivamente), encontram-se os espectros de massas para a govaniadina e o interferente, respectivamente, obtidos a partir de experimentos de EM^n aplicando-se amplitudes crescentes.

Em se tratando de um alcaloide do tipo THPB, a fragmentação explica-se a partir de uma reação do tipo Retro-Diels-Alder (RDA, Figura 1.5) (DEMARQUE et al., 2016). Há a formação do íon imínio em m/z 178 e do fragmento em m/z 163 resultante da perda de 15 u ($-\text{CH}_3$), ligado ao grupo metoxila no anel A. Isto porque, os alcaloides do tipo THPB ocorrem na natureza usualmente oxigenados nas posições 2, 3, 9, 10- ou 2, 3, 10, 11-, embora um grupo hidroxila ou metoxila possam estar presentes em C-1 (RINGDAHL; CHAN; CRAIG, 1981).

Com relação ao chamado “interferente”, trata-se da caseadina, outro alcaloide também presente na fração, conforme descrito por Shrestha et al. (2013).

Figura 1.5 - Proposta para o mecanismo de fragmentação (EM/EM) dos principais íons da govaniadina (A) e da caseadina (B)

Mediante esta resposta, iniciou-se isolamento da govaniadina a partir da fração enriquecida de *Corydalis govaniiana* Wall., por meio da cromatografia do tipo *short column*, a qual consiste em empacotar uma pequena quantidade de sílica (10 g para cada 1 g de amostra) e o eluente é constituído por solvente de baixa polaridade, capaz de eluir lentamente os compostos ao longo da coluna (SOUSA et al., 2012). Anteriormente, foram desenvolvidas algumas corridas por cromatografia em camada delgada (CCD) e a partir dos perfis obtidos (dados não apresentados), percebeu-se que nas placas onde se havia empregado 100% de CH_2Cl_2 praticamente não houve migração da mancha (govaniadina + caseadina) e com 100% de AcOEt, a mancha migrou rapidamente. Portanto, estes dois solventes foram utilizados para início e fim da eluição, respectivamente (seção 3.2.1, página 18).

Ao final da coleta de todas as frações e monitoramento por CLAE 1-EM, percebeu-se que nas frações de 3 a 7 havia um único sinal no cromatograma, referente à govaniadina. Nas frações de 8 a 25 apareceram dois sinais, um referente à govaniadina e o outro à caseadina. Portanto, cada conjunto de frações foi reunido e, após análise por CLAE 1, apresentaram pureza > 98 e 95%, respectivamente. Uma vez reunidas, procedeu-se com a confirmação da estrutura por meio da análise

de RMN.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e DEPT 135° (Tabela 1.2 e Apêndices A, B e C) exibem sinais característicos para quatro metilenos [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 2,82 *ddd*, 3,05 – 3,01 *m*/29,5 (CH_2 -5); 2,72 – 2,66 *m*, 3,09 *ddd*/48,6 (CH_2 -6); 3,88 *d*, 3,98 *d*/57,9 (CH_2 -8); 2,72 – 2,66 *m*, 3,63 *dd*/32,5 (CH_2 -13)], uma metina alifática [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4,02 *dd*/56,2 (CH_2 -14)]; quatro metinas aromáticas [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6,73 *d*/109,1 (CH-3); 6,64 *d*/119,6 (CH-4); 6,55 *s*/106,2 (CH-9); 6,54 *s*/108,8 (CH-12)], uma metoxila [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 3,85 *s*/56,1 (2- OCH_3)] e um metileno dioxigenado [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 5,88 *s*/100,6 (10- OCH_2O -11)]. Estes sinais estão de acordo com a estrutura descrita por Shrestha et al. (2013).

A presença de dois prótons com acoplamento *orto* em δ 6,73 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-3) e δ 6,64 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-4), confirmam a presença de grupos substituintes em C-1 e C-2. A presença dos singletos em δ 6,55 *s* (H-9) e 6,54 *s* (H-12) confirmam a substituição em C-10 e C-11, como também está demonstrado nos espectros de HMQC e HMBC (Figura 1.6 e Apêndices D e E). O valor da rotação óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -47.45$ está em acordo com compostos já reportados, os quais também possuem configuração 14-*S* (RINGDAHL; CHAN; CRAIG, 1981; SHRESTHA et al., 2013).

Figura 1.6 - Correlações entre hidrogênios e carbonos observadas no mapa de contornos HMBC da govaniadina

Tabela 1.2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a govaniadina isolada neste trabalho e respectiva comparação com dados publicados na literatura

H/C	δ_{H} ppm ^a		δ_{C} ppm ^b	
	GOV	GOV ^c	GOV	GOV ^c
1	-	-	144,6	146,8
2	-	-	142,6	144,4
3	6,73 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	6,76 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	109,1	111,1
4	6,64 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	6,58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	119,6	120,4
4a	-	-	126,6	128,5
5	2,82 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 4,0, 5,0 e 15,5 Hz)	2,80 (<i>m</i>)	29,5	29,8
	3,05 – 3,01 (<i>m</i>)	2,95 (<i>m</i>)		
6	2,72 – 2,66 (<i>m</i>)	2,62 (<i>m</i>)	48,6	49,0
	3,09 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 4,0, 5,0 e 15,5 Hz)	3,06 (<i>m</i>)		
8	3,88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,0 Hz)	3,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,5 Hz)	57,9	58,6
	3,98 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,0 Hz)	3,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,5 Hz)		
8a	-	-	128,2	127,3
9	6,55 (<i>s</i>)	6,55 (<i>s</i>)	106,2	107,1
10	-	-	145,8	146,8
11	-	-	146,1	147,4
12	6,54 (<i>s</i>)	6,53 (<i>s</i>)	108,8	109,4
12a	-	-	128,3	128,9
13	2,72 – 2,66 <i>m</i>	2,60 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11,0 e 15,5 Hz)	32,5	32,8
	3,63 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5 e 16,5 Hz)	3,64 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0 e 15,5 Hz)		
14	4,02 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3,5 e 11,0 Hz)	4,00 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,0 e 11,0 Hz)	56,2	57,2
14a	-	-	124,5	125,9
2-OCH ₃	3,85 (<i>s</i>) 3H	3,82 (<i>s</i>)	56,1	56,8
OCH ₂ O	5,88 (<i>s</i>) 2H	5,85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,5 Hz)	100,6	102,0
		5,86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,5 Hz)		

^a(500 MHz, CDCl₃); ^b(125 MHz, CDCl₃); ^c(SHRESTHA et al., 2013).

Tendo-se finalizado a caracterização estrutural e visando reduzir o tempo de análise que estava em 46 min (Figura 1.2, página 24), adotou-se nova coluna: *Kinetex*TM XB-C18 *Phenomenex*[®] (100 mm × 2,1 mm, d.i.), tamanho de partícula 2,6 µm e coluna de guarda *Phenomenex*[®] (2,1 mm, d.i.). A nova composição e vazão da fase móvel, após ajustes, estão descritas na seção 3.1.3 (página 15). Desta forma, o novo tempo para a corrida cromatográfica passou a ser de 11 min e a govaniadina apresentou $T_R = 5,70$ min.

4.2. Estudos de metabolismo *in vitro* empregando microsomas hepático murinos e humanos

A parte inicial dos estudos de metabolismo *in vitro* envolveu o emprego de microsomas de rato, conforme descrito na seção 3.2.4.1 (página 20). Tendo-se obtido a melhor condição cromatográfica para análise da govaniadina, foi necessário estabelecer uma técnica para sua extração. Para tanto, foi avaliada a extração líquido-líquido (ELL), julgando-se a quantidade recuperada do analito do meio microsomal e a presença de interferentes no cromatograma após a extração.

Desta forma, foram avaliados os solventes: *n*-hex, CHCl_3 e AcOEt . Obteve-se o melhor resultado empregando CHCl_3 , pois foi possível extrair a govaniadina e todos os metabólitos (Figura 1.7) ao contrário dos solventes *n*-hex e AcOEt , conforme as figuras 1.8 e 1.9. Para todas as amostras analisadas, os cromatogramas apresentaram-se livres de interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

Figura 1.7 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro* da govaniadina após extração com CHCl₃ a partir de microssomas hepático de rato. A) amostra branco; B) amostra teste e C) amostra controle. Metabólitos: M1, M2 e M3. CLAE 2-DAD. Composição da fase móvel (A) H₂O e (B) MeCN contendo 0,1% ácido fórmico (v/v), vazão 0,3 mL min⁻¹, gradiente de eluição : 0–5 min, 10–30% (B); 5–6 min, 30–100% (B); 6–7 min, 100% (B); 7–11 min, 10% (B). Coluna *kinetex*TM C18 (100 × 2,1 mm d.i.; 2,6 μm)

Figura 1.8 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro* da govaniadina após extração com *n*-Hex a partir de microssomas hepático de rato. A) amostra branco; B) amostra teste e C) amostra controle. Metabólitos: M2 e M3. CLAE 2-DAD. Método: vide figura 1.7

Figura 1.9 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro* da govaniadina após extração com AcOEt a partir de microsoma hepático de rato. A) amostra branco; B) amostra teste e C) amostra controle. Metabólitos: M2 e M3. CLAE 2–DAD. Método: vide figura 1.7

Conforme pode ser visto na sobreposição dos cromatogramas (Figura 1.7, página 31) há três sinais: $T_R = 3,40$ min, $4,50$ min e $4,90$ min na amostra teste ($n = 3$), que não aparecem nas amostras controle e branco, aos quais se nomeou M1, M2 e M3 em referência aos metabólitos 1, 2 e 3, respectivamente. A fragmentação por IES-EM/EM (Figura 1.10) apresenta para M1 : $[M+H]^+ = m/z$ 314 e pico base m/z 178 (íon imínio); M2 : $[M+H]^+ = m/z$ 340 e pico base m/z 192 (íon imínio); M3 : $[M+H]^+ = m/z$ 342 e pico base m/z 324.

Figura 1.10 - Espectro de EM² dos metabólitos M1 (m/z 314), M2 (m/z 340) e M3 (m/z 342). CLAE 2–EM² (*amaZon-SL*, *ion trap*)

Estas mesmas amostras foram submetidas a análise em alta resolução, em equipamento CLAE 1-EM (Apêndice J, página 138). A Tabela 1.3, apresenta os dados de massa teórica e cálculo de erro (em ppm), para confirmação das fórmulas moleculares.

Tabela 1.3 - Íons observados nos espectros de IES-EM em alta resolução da amostra do metabolismo *in vitro* da govaniadina com fração microsomal hepática de rato (*micrOTOF II*)

	<i>m/z</i> acurado	<i>m/z</i> exato	Erro (ppm)	Fórmula química
M1	314,1373	314,1387	4,5	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄ ⁺
M2	340,1172	340,1179	2,1	C ₁₉ H ₁₈ NO ₅ ⁺
M3	342,1330	342,1336	1,8	C ₁₉ H ₂₀ NO ₅ ⁺

O Metabólito 1 (M1): elui em $T_R = 3,40$ min (Figura 1.7, página 31), $[M+H]^+ = 314$ (Figura 1.10, página 33 e Apêndice J). O fragmento de m/z 178 foi semelhante ao observado para a govaniadina, que corresponde à fragmentação do tipo RDA, indicando que não houve alteração na porção isoquinolina (Figura 1.11A, página 35). Há também o íon m/z 163 formado a partir da perda de 15 u ($-CH_3$) da metoxila ligada ao anel A.

O M1 foi identificado como um derivado catecólico, formado via O-desmetilação. Em acordo, Fraga et al. (2011) demonstraram que o metabolismo do composto LASSBio-294, o qual também contém uma ponte metileno dióxi, envolveu clivagem do anel e O-desmetilação para produzir o respectivo metabólito 3,4-dihidroxifenil.

Figura 1.11 - Proposta para o mecanismo de fragmentação de A) metabólito 1 (M1); B) metabólito 2 (M2) e C) metabólito 3 (M3)

O Metabólito 2 (M2): elui em $T_R = 4,50$ min (Figura 1.7, página 31), $[M+H]^+ = 340$ (Figura 1.10, página 33 e apêndice J). Para M2, a proposta é de que o $[M+H]^+$ seja m/z 358 (di-hidroxilado), porém devido à desidratação na fonte de ionização, apresenta-se como m/z 340, o qual sofre fragmentação do tipo RDA, formando m/z 192. A presença do íon m/z 149 é chave para confirmar que não houve alteração nos anéis C e D, bem como na ponte metileno dióxi, conforme apresentado na Figura 1.11B.

O Metabólito 3 (M3): elui em $T_R = 4,90$ min (Figura 1.7, página 31), $[M+H]^+ = 342$ (Figura 1.10, página 33 e apêndice J). Este valor para $[M+H]^+$, com diferença de 16 u, comparativamente à govaniadina, é indicativo da presença de uma hidroxila. O fragmento m/z 324 origina-se de uma perda de H_2O e o fragmento m/z 194 foi formado por meio de uma fragmentação do tipo RDA. Sugere-se que a hidroxilação para este metabólito tenha ocorrido em C(14), tendo-se em vista o favorecimento da formação de m/z 324 em detrimento de m/z 194 (em termos de intensidade de íons).

Contrariamente, considerando-se que a hidroxilação tivesse ocorrido em C(5) ou C(6), ambas as fragmentações (perda de H₂O e RDA) não iriam afetar a ocorrência uma da outra e caso a hidroxilação tivesse ocorrido nas posições C(8) ou C(13), apenas uma das duas fragmentações seria possível. Com base nestes dados, M3 está sendo proposto como um metabólito mono-hidroxilado (Figura 1.11C).

Em vista destes resultados, avançou-se para o estudo de metabolismo *in vitro* empregando a fração microssomal hepática humana, baseando-se nas metodologias descritas por Clements e Li (2011) e Barth et al. (2015). Como pode ser visto na figura 1.12, há dois sinais: T_R = 3,40 min e 4,50 min (*n* = 3), os quais não aparecem nas amostras controle e branco, e que são também coincidentes quanto ao padrão de fragmentação de M1 (O-desmetilado) e M2 (di-hidroxilado), discutidos anteriormente.

Os resultados apresentados nesta seção encontram-se publicados na revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 131, p. 464-472, 2016.

Figura 1.12 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro* da govaniadina após extração com CHCl₃ a partir de microssoma hepático humano. A) amostra branco; B) amostra teste e C) amostra controle. Metabólitos: M1 e M2. Método: vide figura 1.7

4.3. Estudos de metabolismo *in vitro* empregando fração microsomal hepática de rato e de porco, fração citosólica e fração S9 de porco

Esta parte do trabalho foi desenvolvida durante doutorado sanduíche no *Institut für Lebensmittelchemie, Universität Münster*, Alemanha, em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. *Hans Ulrich-Humpf*.

No presente trabalho, com o propósito de se obter uma visão geral a respeito do metabolismo *in vitro* da govaniadina, diferentes frações hepáticas subcelulares de rato e de porco foram empregadas em três experimentos independentes: metabolismo de **Fase I**, de **Fase II** e de **Fase I e II**, conforme descrição na seção 3.2.4.2. (página 22).

A fração citosólica contém enzimas de Fase II solúveis (N-acetiltransferase, glutathione S-transferase e sulfotransferase) e a fração S9 contém uma mistura das frações microsomal e citosólica. Ambas foram escolhidas para comparação do potencial metabólico com o dos microsomas (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017; BRANDON et al., 2003; GOLIZEH et al., 2015; ZVEREVA et al., 2016).

É sabido, também, que podem existir diferenças nas vias metabólicas, entre espécies, levando-se à particularidades na formação dos metabólitos (WANG et al., 2016). Em porcos, o sistema microsomal tem provado ser um bom modelo quanto à reprodução do metabolismo humano seja ao nível celular, subcelular ou molecular. Além disso, há extensa homologia na sequência, atividade metabólica, bem como na distribuição para as várias famílias das enzimas do CYP450 entre o fígado humano e o suíno (LI et al., 2016).

Este conhecimento serviu de suporte para investigação do metabolismo *in vitro* da govaniadina em diferentes frações subcelulares hepáticas animais (de rato e de porco).

O perfil metabólico, quando do emprego da fração microsomal hepática de porco, é apresentado nas figuras 1.13, 1.14 e 1.15. O perfil metabólico, quando do emprego da fração hepática microsomal de rato, é apresentado nas figuras 1.16, 1.17 e 1.18.

Figura 1.13 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro*, de **Fase I**, da govaniadina a partir da incubação com fração microsomal hepática de porco. Metabólito: M1. CLAE 3–DAD. Composição da fase móvel (A) H₂O e (B) MeCN ambos com 0,1% de ácido fórmico (v/v) em eluição por gradiente a uma vazão de 0,350 mL min⁻¹ (0-15 min: 10% (B), 15-18 min: 30% (B), 18-21 min: 100% (B), 21-24 min: 100% (B), 24-26 min: 10% (B)). Coluna Nucleodur® C18 ISIS, 5 µm, 150 × 2 mm (Macherey-Nagel). Inserção: análise no modo negativo

Figura 1.14 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro*, de **Fase II**, da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de porco. Metabólito: govaniadina glicuronidada (M4). Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo

Figure 1.15 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro*, de **Fase I e II**, da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de porco. Metabólitos: M1, M4 e M5 (glicuronidação de M1). Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo

Figure 1.16 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro*, de **Fase I**, da govaniadina a partir da incubação com fração microsomal hepática de rato. Metabólito: M1. Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo

Figure 1.17 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro*, de **Fase II**, da govaniadina a partir da incubação com fração microsomal hepática de rato. Metabólito: M4. Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo

Figura 1.18 - Cromatograma representativo para as análises do metabolismo *in vitro*, de **Fase I e II**, da govaniadina a partir da incubação com fração microssomal hepática de rato. Metabólitos: M1, M4 e M5. Método: vide figura 1.13. Inserção: análise no modo negativo

Após incubação da govaniadina no sistema de **Fase I** houve a formação de M1 em ambas as frações microssomais: de porco (Figura 1.13) e de rato (Figura 1.16), em acordo com o que foi descrito anteriormente tanto para o tempo de retenção (T_R) como para o perfil de fragmentação.

Após incubação da govaniadina no sistema de **Fase II** houve a formação do metabólito glicuronidado (M4) em ambas as frações microssomais: de porco (Figura 1.14) e de rato (Figura 1.17). O M4 eluiu em $T_R = 6,5$ min, $[M+H]^+ = m/z$ 502,1706 ($C_{25}H_{28}NO_{10}^+$; 0,4 ppm), apêndice K (página 139). O fragmento m/z 326 origina-se da perda de ácido glicurônico (Figura 1.19a).

Após incubação da govaniadina no sistema de **Fase I e II** houve a formação dos metabólitos M1, M4 e de um novo: M5, que corresponde à glicuronidação de M1. Todos eles foram comuns para ambas as frações microssomais: de porco (Figura 1.15) e de rato (Figura 1.18). O M5 eluiu em $T_R = 1.8$ min, $[M+H]^+ = m/z$ 490,1722 ($C_{24}H_{28}NO_{10}^+$; 2,9 ppm), apêndice K. O fragmento m/z 314 origina-se da perda de ácido glicurônico (Figura 1.19b).

Figura 1.19 - Proposta para o mecanismo de fragmentação de A) metabólito 4 (M4) e B) metabólito 5 (M5)

A conjugação com ácido glicurônico é a principal reação no metabolismo de Fase II. Aproximadamente 40-70% dos compostos endógenos e/ou exógenos são glicuronidados (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017). Entretanto, para M5 (m/z 490), a posição exata da modificação metabólica não foi possível resolver, se na porção isoquinolina ou catecólica. Segundo Liang et al. (2016), estruturalmente a porção catecólica seria a mais suscetível à glicuronidação.

A espectrometria de massas (EM) acoplada a técnicas cromatográficas é rotineiramente utilizada na identificação de metabólitos. Entretanto, mesmo os instrumentos de EM mais avançados, nem sempre podem proporcionar uma identificação estrutural completa. Para tanto, diferentes abordagens são empregadas, incluindo: a espectrometria de mobilidade iônica, experimentos de troca isotópica hidrogênio/deutério (H/D), derivatização química e a RMN (LUBIN et al., 2015).

Experimentos de troca isotópica hidrogênio/deutério (H/D) (FOTI et al., 2013), foram efetuados. Contudo, pela análise da fragmentação (Figura 1.20A-D),

não houve aparecimento de quaisquer fragmentos informativos quanto ao local da glicuronidação.

Figura 1.20 – Espectro em alta resolução, no modo positivo. Govaniadina, m/z 327 (A); M4, m/z 506 (B); M1, m/z 317 (C) e M5, m/z 497 (D)

Nenhum dos metabólitos previamente descritos apareceu nas amostras do tipo branco e controle, confirmando as reações serem NADPH e UDPGA-dependentes. Além disso, não houve a formação de quaisquer outros compostos (sulfatados ou glicuronidados, por exemplo) quando do emprego das frações citosólica e S9, mesmo variando-se alguns parâmetros como tempo de incubação, concentração das frações subcelulares e solvente extrator (dados não apresentados). Teve-se certeza quanto à funcionalidade das mencionadas frações, porque outros substratos foram testados e houve formação de metabólitos (dados não apresentados). O metabolismo de **Fase II** e de **Fase I e II** não chegou a ser efetuado em sistema microsomal humano.

À vista do que foi apresentado neste capítulo, a figura 1.21 resume as vias do metabolismo *in vitro* da govaniadina envolvendo todos os sistemas empregados.

Figura 1.21 – Resumo dos metabólitos formados após incubação da govaniadina com fração microssomal hepática humana (H), de porco (P) e de rato (R), na presença do sistema de regeneração de NADPH e UDPGA

5. COMENTÁRIOS FINAIS

Neste capítulo foi apresentado o primeiro relato à respeito do metabolismo *in vitro* da govaniadina empregando diferentes frações hepáticas subcelulares (microsomas, fração citosólica e fração S9) de fontes diversas (murina, suína e humana). Como resultado geral, foram obtidos cinco metabólitos: um O-desmetilado (M1), um di-hidroxilado (M2), um mono-hidroxilado (M3) e dois glicuronidados (M4 e M5), sendo que o metabólito M4 é formado a partir da glicuronidação direta da govaniadina e M5 é formado a partir da glicuronidação de M1. Este estudo permitiu ganho de conhecimento à respeito do metabolismo do referido alcaloide e servirá de suporte para decisões quanto ao seu desenvolvimento farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- ABASS, K. M. An investigation into the formation of tebufenozide's toxic aromatic amine metabolites in human *in vitro* hepatic microsomes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 73–78, 2016.
- ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug metabolism in the liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, p. 1-20, 2017.
- BARTH, T.; MOREIRA, F. L.; HABENSCHUS, M. D.; FERREIRA, L. S.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism of the lignan (–)-grandisin, an anticancer drug candidate, by human liver microsomes. **Drug Testing and Analysis**, v. 7, p. 780-786, 2015.
- BRANDON, E. F.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 189, p. 233–246, 2003.
- CAREY, B.; SÁEZ, M. J. F.; HAMILTON, B.; O'HALLORAN, J.; PELT, F. N. A. M.; JAMES, K. J. Elucidation of the mass fragmentation pathways of the polyether marine toxins, dinophysistoxins, and identification of isomer discrimination processes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p.1793-1802, 2012.
- CLEMENTS, M.; LI, L. Strategy of using microsome-based metabolite production to facilitate the identification of endogenous metabolites by liquid chromatography mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, p. 36–44, 2011.
- CUSACK, K. P.; KOOLMAN, H. F.; LANGE, U. E. W.; PELTIER, H. M. ;PIEL, I.; VASUDEVAN, A. Emerging technologies for metabolite generation and structural diversification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 5471-5483, 2013.
- DEEVANHXAY, P.; SUZUKI, M.; MAESHIBU, N.; LI, H.; TANAKA, K.; HIROSE, S. Simultaneous characterization of quaternary alkaloids, 8-oxoprotoberberine alkaloids, and a steroid compound in *Coscinium fenestratum* by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, p. 413-425, 2009.
- DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Products Report**, v. 33, p. 432-455, 2016.
- FOTI, C.; ALSANTE, K.; CHENG, G.; ZELESKY, T.; ZELL, M. Tools and workflow for structure elucidation of drug degradation products. **Trends in Analytical chemistry**, v. 49, p. 89–99, 2013.

FRAGA, A. G. M.; SILVA, L. L.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. CYP1A2-mediated biotransformation of cardioactive 2-thienylidene-3,4-methylenedioxybenzoylhydrazine (LASSBio-294) by rat liver microsomes and human recombinant CYP enzymes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 349-355, 2011.

GOLIZEH, M.; SCHNEIDER, C.; OHLUND, L. B.; SLENO, L. Multidimensional LC-MS/MS analysis of liver proteins in rat, mouse and human microsomal and S9 fractions. **Eupa Open Proteomics**, v. 6, p. 16-27, 2015.

GÓMEZ, A. B.; ERRATICO, C. A.; EEDE, N. V. D.; IONAS, A. C.; LEONARDS, P. E.G.; COVACI, A. *In vitro* metabolism of 2-ethylhexyldiphenyl phosphate (EHDPPH) by human liver microsomes. **Toxicology Letters**, v. 232, p. 203-212, 2015.

LI, J.; ZHANG, Y.; DU, Z.; PENG, J.; MAO, L.; GAO, S. Biotransformation of OH-PBDEs by pig liver microsomes: Investigating kinetics, identifying metabolites, and examining the role of different CYP isoforms. **Chemosphere**, v. 148, p. 354-360, 2016.

LIANG, S. C.; XIA, Y. L.; HOU, J.; GE, G. B.; ZHANG, J. W.; HE, Y. Q.; WANG, J. Y.; QI, X. Y.; YANG, L. Methylation, Glucuronidation, and Sulfonation of Daphnetin in Human Hepatic Preparations *In Vitro*: Metabolic Profiling, Pathway Comparison, and Bioactivity Analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 808-816, 2016.

LUBIN, A.; CABOOTER, D.; AUGUSTIJNS, P.; CUYCKENS, F. One drop chemical derivatization – DESI-MS analysis for metabolite structure identification. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 50, p. 871-878, 2015.

MA, Y.; XIE, W.; TIAN, T.; JIN, Y.; XU, H.; ZHANG, K.; DU, Y. Identification and comparative oridonin metabolism in different species liver microsomes by using UPLC-Triple-TOF-MS/MS and PCA. **Analytical Biochemistry**, v. 511, p. 61-73, 2016.

MARQUES, L. M. M.; CALLEJON, D. R.; PINTO, L. G.; DE CAMPOS, M. L.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; VESSECCHI, R.; ADHIKARI, A.; SHRESTHA, R. L. S.; PECCININI, R. G.; LOPES, N. P. Pharmacokinetic properties, *in vitro* metabolism and plasma protein binding of govaniadine an alkaloid isolated from *Corydalis govaniana* Wall. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 464-472, 2016.

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

MOREIRA, F. L.; MARQUES, L. M. M.; LOPES, N. P.; DE OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism studies of natural products are crucial in the early development of medicines. **Phytochemistry Reviews**, 2016. DOI 10.1007/s11101-016-9482-0.

NOWAK, P.; WOZNIKIEWICZ, M.; KOSCIELNIAK, P. Simulation of drug metabolism. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 42-49, 2014.

de OLIVEIRA, A. L. L.; VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; DEBONSI, H. M. Collision-Induced Dissociation Analysis of Brevianamide A and C in Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 822-827, 2015.

RINGDAHL, B.; CHAN, R. P. K.; CRAIG, J. C. Protoberberine alkaloids: chiroptical properties and absolute configuration. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 75-79, 1981.

RUAN, J. Q.; YAN, R. Regioselective glucuronidation of the isoflavone calycosin by human liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 220, p. 231-240, 2014.

SHRESTHA, R. L. S.; ADHIKARI, A.; MARASINI, B. P.; JHA, R. N.; CHOUDHARY, M. I. Novel inhibitors of urease from *Corydalis govaniana* Wall. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 228-231, 2013.

SOUSA, J. P. B.; TOMAZ, J. C.; da SILVA, C. C. P.; ELLENA, J.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Novel sesquiterpene lactones from *Eremanthus seidelii*. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 6339-6342, 2012.

VESSECCHI, R.; LOPES, J. N. C.; LOPES, N. P.; GALEMBECK, S. E. Application of the Atoms in Molecules Theory and Computational Chemistry in Mass Spectrometry Analysis of 1,4-Naphthoquinones Derivatives. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, p. 12780-12788, 2011.

VESSECCHI, R.; TOMAZ, J. C.; SANTOS, G. P.; de OLIVEIRA, A. R. M.; LOPES, N. P.; CLOSOSKI, G. C. Gas-phase reactivity of protonated 2-oxazoline derivatives: mass spectrometry and computational studies. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 1061-1069, 2012.

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

WANG, P.; ZHAO, Y.; ZHU, Y.; SUN, J.; YERKE, A.; SANG, S.; YU, Z. Metabolism of dictamnine in liver microsomes from mouse, rat, dog, monkey, and human. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 119, p. 166-174, 2016.

WELSCH, T.; HUMPF, H. U. HT-2 toxin 4-Glucuronide as New T-2 toxin metabolite: enzymatic synthesis, analysis, and species specific formation of T-2 and HT-2 toxin glucuronides by rat, mouse, pig, and human liver microsomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 10170-10178, 2012.

WINSTON, G. W.; TRAYNOR, C. A.; SHANE, B. S., HAJOS, A. K. D. Modulation of the mutagenicity of three dinitropyrene isomers *in vitro* by rat-liver S9, cytosolic, and microsomal fractions following chronic ethanol ingestion. **Mutation Research**, v. 279, p. 289-298, 1992.

XU, C.; LI, C. Y. T.; KONG, A. N. T. Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 249-268, 2005.

YUAN, L.; JIA, P.; SUN, Y.; ZHAO, C.; ZHI, X.; SHENG, N.; ZHANG, L. Study of *in vitro* metabolism of m-nisoldipine in human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 97, p. 65-71, 2014.

ZVEREVA, I.; SEMENISTAYA, E.; KROTOV, G.; RODCHENKOV, G. Comparison of various *in vitro* model systems of the metabolism of synthetic doping peptides: Proteolytic enzymes, human blood serum, liver and kidney microsomes and liver S9 fraction. **Journal of Proteomics**, v. 149, p. 85-97, 2016.

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

CAPÍTULO 2:

Disposição cinética da govaniadina e ligação às proteínas plasmáticas

1. INTRODUÇÃO

Baseado no que foi apresentado e discutido no capítulo anterior, a govaniadina apresenta potencial para ser pesquisada e desenvolvida como novo agente terapêutico. Entretanto, dados sobre sua disposição cinética não foram reportados.

A abordagem farmacocinética para produtos naturais é um desafio devido à própria complexidade destes compostos e indisponibilidade ou inadequação de padrões de referência (HAN; CHIN; CHOI, 2013). Além do que, a bioatividade está estritamente relacionada com a farmacocinética (ZHANG et al., 2017).

A farmacocinética visa descrever a relação entre dose administrada de um composto e exposição do organismo a ele (DONNET; SAMSON, 2013). É também descrita como o estudo do tempo de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de um composto após administração (FAN; de LANNOY, 2014; LOFTSSON et al., 2015).

O entendimento das propriedades de ADME de um candidato a fármaco, o conhecimento de suas características farmacológicas, a compreensão das suas propriedades físico-químicas e a avaliação cuidadosa do seu perfil farmacocinético, no estágio inicial de estudo, são importantes, sendo benéficos, por exemplo, para definição da via de administração e dose. Para mais, são responsáveis por reduzir problemas que só seriam detectados nas etapas finais do desenvolvimento clínico. Isto porque, independente da atividade ou especificidade do composto, busca-se um perfil de absorção favorável, com distribuição para os sítios específicos e eliminação satisfatória (FAN; de LANNOY, 2014; HODGSON, 2001; WILLIAMSON et al., 2017).

Desta forma, a farmacocinética desempenha papel cada vez mais importante nos processos de descoberta e desenvolvimento, seja a partir da seleção dos candidatos, na justificativa do seu valor terapêutico, no suporte aos ensaios clínicos e no fornecimento de uma base racional para sua formulação (HE et al., 2015; MEHTA et al., 2015, ZHANG et al., 2017). E com isto, eliminam-se candidatos com propriedades de ADME deficitárias (BASAVARAJ; BETAGERIN, 2014).

2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO 2

Investigar o perfil farmacocinético da govaniadina em ratos Wistar após administração intravenosa (i.v.) em *bolus* e determinar a taxa de ligação às proteínas plasmáticas.

Para se atingir este objetivo foram definidas as seguintes etapas:

- Desenvolvimento de uma técnica de preparo de amostra para extração da govaniadina de plasma de ratos;
- Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica para quantificação da govaniadina em plasma de ratos.
- Aplicação do método bioanalítico desenvolvido em estudo do perfil farmacocinético da govaniadina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e reagentes

- O padrão interno Mianserina foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira (FFCLRP-USP).
- Solventes utilizados: acetato de etila, acetonitrila, etanol, metanol, *n*-hexano grau HPLC ou PA (*Carlo Erba, Chaussie du Vexin*, França; *J.T. Baker, Phillipsburg*, EUA; *Mallinckodt, Phillipsburg*, EUA; Vetec, Duque de Caxias, Brasil).
- A água utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema *Milli-Q* (*Millipore, Bedford*, EUA).
- Os filtros de centrífuga do tipo Amicon Ultra-0,5 mL (*Millipore, Billerica, Massachusetts*, EUA) com peso molecular de corte de 30.000 Da, foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Cristiane Masetto de Gaitani (FCFRP-USP).

3.1.1. Equipamentos

- Agitador de tubos Phoenix AP56 (Araraquara, Brasil);
- Balanças analíticas (*Marte As1000*, São Paulo, Brasil; *MettlerToledo AG 245*, Suíça; *Shimadzu AY220*, São Paulo, Brasil);
- Medidor de pH (*Gehaka PG1800*, Diadema, São Paulo);
- Para quantificação da govaniadina em plasma de ratos utilizou-se Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (CLUE, Waters[®], *ACQUITY UPLC-MS*), composto por bomba binária, injetor automático, degaseificador e forno para coluna (35°C). Coluna C18 *ACQUITY* 1,7 µm BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) de 2,1 × 50 mm, equipada com pré-coluna de material equivalente (*Vanguard* 2,1 × 5 mm). Como fase móvel, foi utilizada H₂O (A) e MeCN (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico (v/v) em eluição por gradiente a uma vazão de 0,3 mL min⁻¹: 0-5 min 10% (B), 5-7 min 20% (B), 7-8 min 100% (B), 8-8,5 min 100% (B), 8,5-11 min 10% (B). As amostras foram acondicionadas a 10°C no injetor automático, o volume de injeção foi de 5 µL. Para limpeza do sistema de injeção automática foi utilizada mistura contendo H₂O: MeOH: MeCN (4:1:1 v/v/v, como solvente fraco) e H₂O: MeOH: MeCN (1:2:2 v/v/v, como solvente forte). As análises por espectrometria de massas

(EM) foram realizadas no modo positivo, empregando IES e um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (*TQ Detector, Waters*). Para a quantificação foram otimizados o modo *MRM* (*multiple reaction monitoring*) e os parâmetros do *MS tune* do detector de massas, conforme as tabelas 2.1 e 2.2, respectivamente.

Tabela 2.1 - Parâmetros do método *MRM* (*multiple reaction monitoring*) para detecção da govaniadina e do padrão interno mianserina

Composto	Capilar (kV)	Transição (<i>m/z</i>)	Cone (V)	E _{lab} * (eV)
Govaniadina	2,5	326>178	20	15
Mianserina	2,5	265>208	25	20

*Energia de colisão

Tabela 2.2 - Parâmetros do *tune* do espectrômetro de massas ajustados para análise da govaniadina e do padrão interno mianserina

Parâmetros ajustados no <i>MS Tune</i>			<i>MRM</i>	<i>Scan</i>
Lentes Rf	0,1	^a LM resolução 1	2,7	14,8
Temperatura da fonte	150°C	^b HM resolução 1	15,0	8,7
Temperatura de dessolvatação	350°C	Energia do ion 1	0,5	0,7
Vazão, gás de dessolvatação (N ₂)	650 L h ⁻¹	Entrada	50	
Vazão, gás no cone (N ₂)	75 L h ⁻¹	Colisão	3	
Vazão, gás de colisão (Argônio)	0,15 L h ⁻¹	Saída	50	
Pressão na cela de colisão	3,02 x 10 ⁻³ mBar	LM resolução 2	9,3	14,3
		HM resolução 2	14,9	8,3
		Energia do ion 2	0,6	0,9

^a Low mass; ^b High Mass

3.2. Métodos

3.2.1. Validação da Metodologia Bioanalítica

3.2.1.1. Soluções-padrão utilizadas na validação bioanalítica

A solução estoque de govaniadina foi preparada em metanol na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e as soluções de trabalho foram preparadas a partir de diluição seriada da solução estoque para as concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 1,1; 10,5; 21,0; 26,3 e $31,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução estoque de mianserina (padrão interno) foi preparada em metanol na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a solução de trabalho foi preparada na concentração de $5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C .

3.2.1.2. Procedimento de preparo e extração das amostras

O preparo das amostras foi baseado nos trabalhos de Gao et al. (2014) e Yang et al. (2014), figura 2.1. Alíquotas de $100 \mu\text{L}$ da amostra de plasma foram transferidas para tubos tipo *ependorf*. Estas alíquotas foram enriquecidas com $10 \mu\text{L}$ da solução do padrão interno (mianserina; $5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e foram adicionados $750 \mu\text{L}$ de AcOEt, o solvente extrator. Após agitação orbital por 2 min (Agitador *Gehaka* AV-2, São Paulo, Brasil) e centrifugação por 10 min, a 4°C , a $10280g$ (Centrífuga *Boeco Germany* M-240R, Alemanha), uma alíquota da fase orgânica ($600 \mu\text{L}$) foi transferida para outro tubo tipo *ependorf* e evaporada até a secura em concentradora rotativa a vácuo por 30 min, a 35°C (*Analítica*, Christ RVC2-18, São Paulo). Os resíduos foram ressuspensos em $200 \mu\text{L}$ de fase móvel MeCN:H₂O (10:90), filtrados em membranas PTFE (politetrafluoretileno) de 13 mm de diâmetro, poro $0,22 \mu\text{m}$ (*Millex*, *Millipore*) e uma alíquota de $5 \mu\text{L}$ foi injetada no sistema CLUE-EM/EM. A aquisição dos dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o *software* *Waters Quanlynx*, presente no pacote *MassLynx*, versão 4.1.

Figura 2.1 - Procedimento de extração líquido-líquido da govaniadina em plasma de rato

3.2.1.3. Parâmetros avaliados na validação do método

Neste estudo, um método por CLUE-EM/EM sensível e seletivo foi desenvolvido e validado de acordo com o que é preconizado pelas agências nacionais e internacionais (Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, 2012; *European Medicines Agency-EMA*, 2011; *Food and Drug Administration-FDA*, 2001) para investigação do perfil farmacocinético da govaniadina em ratos após a administração intravenosa (i.v.) em *bolus*. O método foi validado pela avaliação dos parâmetros: linearidade, limite de quantificação, seletividade, efeito residual e de matriz, precisão e exatidão, recuperação e estabilidade.

3.2.1.3.1. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da fortificação de 100 μL de plasma branco normal com 10 μL da solução-padrão de mianserina na concentração de 5,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração final no meio de 550 ng mL^{-1}) e 10 μL das soluções-padrão de govaniadina nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 1,1; 10,5; 21,0; 26,3 e 31,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo-se assim concentrações finais no meio de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 110,0; 1050,0; 2100,00; 2630,0 e 3150,0 ng mL^{-1} respectivamente. Após fortificação, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração (seção 3.2.1.2., página 56) e analisadas por CLUE-EM/EM. Foram também avaliadas amostras do tipo branco (processadas sem os analitos) e amostras do tipo zero (processadas apenas com o padrão interno). O quociente área do pico da govaniadina pela área do pico da mianserina foi determinado e colocado no eixo das ordenadas e as concentrações da govaniadina foram colocadas no eixo das abcissas. Desta forma, três curvas analíticas foram construídas a partir desta resposta, em três diferentes dias de análise. A análise de regressão utilizada foi a dos mínimos quadrados, onde a variável independente refere-se à concentração teórica da govaniadina na matriz. A regressão foi representada pela equação da reta e pelo coeficiente de correlação (r). Além disso, a equação de regressão linear foi verificada quanto a falta de ajuste (*Lack of Fit*) através do “teste F”. Os cálculos estatísticos foram feitos empregando o *software MINITAB Release* versão 14.1 (*State College, Pennsylvania, EUA*).

3.2.1.3.2. Limite inferior de quantificação (LIQ)

O limite inferior de quantificação (LIQ) foi definido como a menor concentração quantificada de govaniadina, em plasma, com precisão (coeficiente de variação, $CV \leq 20\%$) e exatidão (erro relativo, $-20\% < E < 20\%$). O LIQ ($n = 5$) foi avaliado a partir da fortificação de 100 μL de plasma com 10 μL de solução padrão de PI ($5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 10 μL de solução-padrão de govaniadina em concentrações decrescentes e analisado com base em uma curva analítica preparada paralelamente.

3.2.1.3.3. Seletividade

Para avaliação da seletividade, foram analisados plasmas brancos do tipo normal ($n = 4$), lipêmico ($n = 1$) e hemolisado ($n = 1$), sem a adição do analito e do padrão interno. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do LIQ ($2,5 \text{ ng mL}^{-1}$), considerando-se as respostas de sinais interferentes próximo ao tempo de retenção da govaniadina e da mianserina inferiores a 20% e 5%, respectivamente.

3.2.1.3.4. Efeito residual

Quanto a avaliação do efeito residual, foram feitas injeções de amostras do tipo branco, sendo duas anteriores e três posteriores às amostras do limite superior de quantificação (LSQ, $3150,0 \text{ ng mL}^{-1}$). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ ($2,5 \text{ ng mL}^{-1}$), considerando-se as respostas de sinais interferentes próximo ao tempo de retenção da govaniadina e da mianserina inferiores a 20% e 5%, respectivamente.

3.2.1.3.5. Efeito de matriz

Relativamente ao efeito de matriz, este foi conduzido através da infusão pós-coluna, via bomba de infusão, de soluções-padrão de govaniadina e mianserina, ambas na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparadas na fase móvel $\text{MeCN:H}_2\text{O}$ (40:60), em vazão combinada com eluição de amostras processadas de plasma dos tipos

branco ($n = 4$), lipêmico ($n = 2$) e hemolisado ($n = 2$) na condição cromatográfica desenvolvida (página 54). As análises foram executadas nos modos *MRM* (*multiple reaction monitoring*) e varredura (*full scan*). Desta forma, foi possível avaliar a supressão ou aumento da ionização dos analitos de interesse quando da coeluição de componentes endógenos da matriz (KRUIVE et al., 2015).

Adicionalmente, o efeito de matriz foi quantificado pela análise de amostras de plasma branco dos tipos normal ($n = 6$), lipêmico ($n = 3$) e hemolisado ($n = 3$) processadas e posteriormente adicionadas dos analitos. Para a govaniadina e o PI, o fator de matriz (FM) foi calculado pela razão área do analito na presença da matriz pela área do analito na ausência da matriz. O fator de matriz normalizado por PI (FMN) foi calculado dividindo-se o FM da govaniadina pelo FM do padrão interno. O coeficiente de variação (CV, %) dos FMNs calculados não deve ser superior a 15%. A determinação foi feita para dois níveis de concentração: 5,0 e 2630,0 ng mL⁻¹.

3.2.1.3.6. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas para uma mesma corrida (intracorrída) e para corridas diferentes (intercorrída). Para cada corrida foram preparadas replicatas ($n = 5$) para as amostras do LIQ (2,5 ng mL⁻¹) e para mais cinco concentrações controle de qualidade (CQ): baixa (CQB, 5,0 ng mL⁻¹), média-1 (CQM-1, 40,0 ng mL⁻¹), média-2 (CQM-2, 1050,0 ng mL⁻¹), alta (CQA, 2630,0 ng mL⁻¹) e para o limite superior de quantificação (LSQ, 3150,0 ng mL⁻¹). O cálculo da precisão foi expresso como coeficiente de variação (CV, %) conforme a equação 2.1, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. O cálculo da exatidão foi expresso como erro relativo (E, %), conforme a equação 2.2, não se admitindo valores fora da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal. Os cálculos foram baseados em curvas analíticas processadas diariamente.

$$CV(\%) = (s/M) \times 100 \quad (2.1)$$

Em que:

s: desvio padrão absoluto de replicatas para cada concentração;

M: média aritmética dos valores obtidos das replicatas para cada concentração.

$$E(\%) = \frac{(\text{valor obtido} - \text{valor real})}{\text{valor real}} \times 100 \quad (2.2)$$

3.2.1.3.7. Recuperação

A eficiência da recuperação da govaniadina extraída do plasma nas concentrações do LIQ (2,5 ng mL⁻¹), CQM-1 (40,0 ng mL⁻¹), CQA (2630,0 ng mL⁻¹) e LSQ (3150,0 ng mL⁻¹) foi determinada comparando-se as áreas obtidas para estas amostras com as áreas dos analitos não submetidos a extração, nestas mesmas concentrações. O resultado foi expresso em porcentagem de extração do analito, conforme a equação 2.3. Os resultados foram também avaliados pelo coeficiente de variação (CV, %), sendo considerados aceitáveis os valores inferiores a 15%. A eficiência da recuperação representa a habilidade do solvente em extrair os compostos alvos de uma referida matriz (TANG et al., 2015).

$$\text{Recuperação (\%)} = (M_1 \times 100/M_2)/0,8 \quad (2.3)$$

Em que:

M₁: Média aritmética da área do analito submetido a extração;

M₂: Média aritmética da área do analito não submetido a extração;

0,8: Valor de correção, uma vez que foram aliqüotados 750 µL de solvente extrator e extraídos apenas 600 µL, após centrifugação.

3.2.1.3.8. Estabilidade

Os testes foram conduzidos para se avaliar a estabilidade das amostras de plasma enriquecidas com solução de govaniadina nas concentrações baixa ($5,0 \text{ ng ml}^{-1}$) e alta ($2630,0 \text{ ng ml}^{-1}$) por período de curto (6 e 12h) e de longo prazo (10 dias), após ciclos de congelamento/descongelamento e pós processamento (auto-injetor).

Para estabilidade de curta duração, foram preparadas amostras de plasma enriquecidas e então mantidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 6 e 12 h. Após estes períodos foram extraídas e analisadas. Para estabilidade de longa duração, foram preparadas amostras de plasma enriquecidas e então mantidas a temperatura de -60°C durante 10 dias. Após este período foram extraídas e analisadas.

Para estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, amostras de plasma foram preparadas e então mantidas a temperatura de -60°C por 24h e descongeladas, após este período, a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Após descongelamento completo, as amostras foram novamente congeladas nas mesmas condições, por mais 12h. Este ciclo foi repetido por mais duas vezes e ao final do terceiro ciclo foram extraídas e analisadas.

Para estabilidade de auto-injetor, após o processo de extração, as amostras foram mantidas dentro do auto-injetor (10°C), sendo injetadas 24h após a análise da última amostra do dia. Os resultados obtidos, para todas as estabilidades, foram comparados com aqueles obtidos pela análise de amostras recém preparadas. As amostras foram consideradas estáveis quando o erro relativo (E, %) em relação às amostras frescas foi inferior a 15%.

3.2.2. Avaliação do perfil farmacocinético da govaniadina em plasma de ratos

O estudo do perfil farmacocinético da govaniadina foi desenvolvido em colaboração com os Pós-doutorandos Daniel Roberto Callejon e Larissa Garcia Pinto, ambos trabalhando na época na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

A avaliação foi conduzida em ratos machos Wistar, com aproximadamente 5 semanas de idade, pesando $250 \pm 10 \text{ g}$, fornecidos pelo Biotério Central da

Prefeitura do *Campus* USP de Ribeirão Preto (número CEUA: 14.1.721.53.6, Anexo A). Os animais foram ambientados a 25°C com ciclos de luz de 12h, água e comida foram fornecidas à vontade. Para os experimentos, os animais passaram por jejum de no máximo 12h antes do tratamento.

A dose administrada foi preparada em tampão fosfato (137 mmol L⁻¹ NaCl; 2,7 mmol L⁻¹ KCl; 4,3 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 1,4 mmol L⁻¹ KH₂PO₄) e solubilizada com auxílio de etanol (EtOH), respeitando-se a concentração final máxima de 20% (NEERVANNAN, 2006; FAN; de LANNOY, 2014). A dose administrada foi de 1 mg kg⁻¹. Cada animal, quando do seu tratamento, era colocado em caixa de madeira (19,5 × 35 × 30 cm) contendo uma lâmpada incandescente (100 W) e com isto facilitava-se o processo de dilatação e visualização das veias. A venipunctura foi realizada com o auxílio de um cateter intravenoso (*Safelet Nipro*, amarelo, modelo 24G × 3/4") em uma das veias caudais laterais do animal. As amostras de sangue (≈ 200 µL) foram coletadas nos tempos: 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120 e 180 minutos em tubos heparinizados. Após a coleta, os tubos foram centrifugados durante 20 min, a 4°C, a 410g (Centrífuga *Boeco Germany* M-240R, Alemanha) e o plasma foi separado e armazenado em freezer a -60°C até o momento do preparo da amostra (seção 3.2.1.2, página 56) e análise.

Amostras de plasma branco foram coletadas para os ensaios de desenvolvimento e validação da metodologia bioanalítica. Para isto, foi empregado o método de eutanásia com sobredose anestésica, associação de quetamina (100 mg kg⁻¹) com xilasina (10 mg kg⁻¹), por via intraperitoneal. O sangue foi coletado em tubos heparinizados, os quais foram centrifugados (4000g, 20 minutos, a 4°C, centrífuga *Boeco*, modelo M-240R) e o plasma foi separado e armazenado em freezer a -60°C até o momento da utilização.

3.2.2.1. Cálculo dos parâmetros farmacocinéticos

O cálculo dos parâmetros farmacocinéticos foi conduzido em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Rosângela Gonçalves Peccinini e com o pós-doutorando Michel Leandro de Campos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Os parâmetros foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo de coleta. Foi empregado o *software* validado *WinNonlin*

versão 6.4 (EUA, licença: 0127ADEA801A4C40B9B46878AEA120 9AE3). A disposição cinética foi melhor descrita pelo modelo bicompartimental com fator de ponderação de $1/(Y_{\text{hat}} \times Y_{\text{hat}})$ (MARQUES et al, 2016). A área sob a curva de concentração plasmática *versus* tempo (ASC_{0-t} , equação 2.4) foi calculada pelo método dos trapezóides e a área sob a curva do tempo zero extrapolada ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi calculada pelo mesmo método, conforme a equação 2.5. As equações 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 e 2.10 referem-se aos cálculos, respectivamente: da área sob a curva do primeiro momento do tempo zero ao último tempo de coleta ($ASMC_{0-t}$), da área sob a curva do primeiro momento do tempo zero ao infinito ($ASMC_{0-\infty}$), do tempo de residência médio (TMR), da concentração plasmática média ($Cp_{\text{média}}$) e do tempo para se atingir o pico tecidual livre (T_{max}) (BOROUJERDI, 2002; FAN; de LANNOY, 2014; GAI et al., 2011; MARQUES et al, 2016; SHAO et al., 2017, STORPIRTIS et al, 2011a).

$$ASC_{0-t} = [(Cp_0 + Cp_1)/2] \times \Delta t + [(Cp_1 + Cp_2)/2] \times \Delta t + [(Cp_x + Cp_n)/2] \times \Delta t \quad (2.4)$$

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + C_n/\beta \quad (2.5)$$

$$ASMC_{0-t} = \{[(Cp_0 \times t_0) + (Cp_1 \times t_1)]/2\} \times \Delta t + \{[(Cp_1 \times t_1) + (Cp_2 \times t_2)]/2\} \times \Delta t + \{[(Cp_x \times t_x + Cp_n \times t_n)]/2\} \times \Delta t \quad (2.6)$$

$$ASMC_{0-\infty} = ASMC_{0-t} + (Cp_n \times t_n/\beta) + Cp_n/\beta^2 \quad (2.7)$$

$$TMR = ASMC_{0-\infty} / ASC_{0-\infty} \quad (2.8)$$

$$Cp_{\text{média}} = ASC_{0-t} / \text{tempo de coleta} \quad (2.9)$$

$$T_{\text{max}} = (\ln \alpha - \ln \beta) / (\alpha - \beta) \quad (2.10)$$

Em que:

Cp_0 , Cp_1 , Cp_2 : concentrações plasmáticas no tempo zero (t_0) e nos tempos das coletas subsequentes;

Cp_x : a concentração no penúltimo tempo de coleta;

Cp_n : a concentração no último tempo de coleta;

Δt : a variação do intervalo de tempo de coleta das amostras;

α : constante de distribuição;

β : constante de eliminação;

$\ln$: logaritmo neperiano.

As constantes de velocidade (α e β) e as microconstantes de velocidade (K_{12} , K_{21} e K_{10}) foram estimadas pelo ajuste ao modelo bicompartimental das curvas de concentração plasmática versus tempo (BOROUJERDI, 2002). A meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$) foi calculada por meio da equação $0,693/\alpha$ e a meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) foi calculada por meio da equação $0,693/\beta$. Para o cálculo de *clearance* foi utilizada a equação modelo independente $Cl = \text{Dose}/ASC_{0-\infty}$ (FAN; de LANNOY, 2014; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a) e para o cálculo de volume aparente de distribuição a equação $Vd = Cl/\beta$ (FAN; de LANNOY, 2014; TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b). Todos os parâmetros estão descritos como média aritmética $\pm$ desvio padrão (DP).

3.2.3. Ligação às proteínas plasmáticas (LPP)

O estudo *in vitro* de ligação às proteínas plasmáticas (LPP) foi efetuado pelo método de ultrafiltração (UF) (CHEN et al., 2015). A solução de govaniadina (EtOH, 20% v/v) foi adicionada a 300 μL de plasma branco, em tubos tipo *ependorf*, para se obter concentrações de 5,0 ng mL^{-1} (baixa concentração) e 2630,0 ng mL^{-1} (alta concentração). As amostras foram incubadas em banho-maria, sob agitação a 37°C por 2h (incubadora modelo SL 157, *Solab*, Brasil). Ao término deste tempo, as amostras foram transferidas para filtros de centrifuga do tipo Amicon Ultra-0,5 mL. A centrifugação ocorreu a 10280g, durante 30 min a 37°C (Centrífuga *Boeco Germany* M-240R, Alemanha) e uma alíquota de 100 μL foi recolhida como ultrafiltrado. O procedimento de preparo da amostra foi realizado conforme descrito na Seção

3.2.1.2. (página 56). Todos os experimentos foram preparados em triplicata ($n = 3$). A ligação não específica (LNE) da govaniadina à membrana do filtro de UF foi avaliada utilizando-se solução aquosa em vez de plasma, mantendo-se as concentrações descritas anteriormente. A LNE foi estimada de acordo com a equação 2.11 (LEE et al., 2003):

$$LNE = (C_{AB} - C_{AA})/C_{AB} \quad (2.11)$$

Onde,

C_{AB} : é a concentração nominal da govaniadina na solução aquosa;

C_{AA} : é a concentração da govaniadina obtida para a solução aquosa após o processo de centrifugação (ultrafiltrado).

A correção da LNE para estimar o valor da ligação às proteínas plasmáticas (LPP) foi feito por meio das equações 2.12 e 2.13 (LEE et al., 2003):

$$F_u = C_{UF}/[(1-LNE)C_{NP}] \quad (2.12)$$

$$LPP = 100(1 - F_u) \quad (2.13)$$

Onde,

F_u : corresponde a fração livre;

C_{UF} : é a concentração da govaniadina no plasma ultrafiltrado;

C_{NP} : é a concentração nominal plasmática da govaniadina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização das condições de análise da govaniadina e do padrão interno mianserina por CLUE-EM/EM

As condições cromatográficas foram otimizadas a fim de se resolver os componentes da amostra com rapidez, eficiência e sensibilidade (ZHAO et al., 2015). Diferentes composições de fase móvel (acetonitrila:água; metanol:água; com e sem adição de ácido fórmico 0,1%), em eluição por gradiente, foram testadas. Isto porque, considerando que a IES ocorre em solução, os aditivos na fase móvel influenciam na ionização dos analitos e, portanto na sensibilidade do método (ZHAO et al., 2015). O sistema acetonitrila-água com 0,1% de ácido fórmico (seção 3.1.1., página 54) resultou em menor pressão no sistema, melhores separação cromatográfica e ionização dos analitos, figura 2.2.

Figura 2.2 - Perfil cromatográfico para A) govaniadina, $T_R = 5,63$ min e B) mianserina, $T_R = 6,31$ min. Descrição da metodologia de análise, seção 3.1.1., página 54. Gráfico Intensidade (%) versus tempo (min)

As condições relativas ao espectrômetro de massas (EM): energia de colisão, potenciais do cone e do capilar foram ajustadas a fim de se obter maior intensidade dos íons precursores e produtos (HU et al., 2015). Estas condições foram obtidas por infusão direta das soluções-padrão dos analitos, ambas na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparadas na fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (60:40) e introduzidas via bomba de infusão, na vazão de $5 \mu\text{L min}^{-1}$, concomitantemente com infusão da fase móvel (modo combinado). Os canais de transição *MRM* foram então definidos a partir da análise do espectro de EM/EM. O resultado final está descrito nas tabelas 2.1 e 2.2 (página 55).

Para a variação do potencial do capilar, o que se percebe tanto para a govaniadina, $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$ 326 (Figura 2.3), quanto para a mianserina, $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$ 265 (Figura 2.4) é que, partindo-se do valor de 1,5 kV a intensidade do sinal do íon precursor é crescente até 2,5 kV, após a qual ocorre descréscimo desta intensidade e aumento de outros íons. Selecionando-se, então, o valor de 2,5 kV para ambos os analitos.

Figura 2.3 - Espectros de massas da solução padrão de govaniadina (m/z 326) aplicando-se diferentes potenciais no capilar (1,5 a 3,5 kV)

Figura 2.4 - Espectros de massas da solução padrão de mianserina (m/z 265) aplicando-se diferentes potenciais no capilar (1,5 a 3,5 kV)

Para o potencial do cone, procurou-se valor adequado a fim de se minimizar a ocorrência de dissociação na fonte de ionização e com isto não comprometer a quantificação (SONG, 2011). Desta forma, a valor foi intencionalmente elevado para ambos os analitos e o que se percebeu é que para a govaniadina (Figura 2.5) ocorreu dissociação na fonte de ionização ($326 > 178$) a partir de 25 V, por esta razão selecionou-se o valor imediatamente inferior (20 V) e para a mianserina (Figura 2.6) ocorreu dissociação na fonte de ionização ($265 > 208$) a partir de 30 V, selecionando-se o de 25 V.

Figura 2.5 - Espectros de massas da solução-padrão de govaniadina (m/z 326) aplicando-se diferentes potenciais no cone (5 a 35 V)

Figura 2.6 - Espectros de massas da solução-padrão de mianserina (m/z 265) aplicando-se diferentes potenciais no cone (10 a 30 V)

Por fim, para ambos os analitos, a energia de colisão foi otimizada para um valor suficiente para promover a fragmentação, mantendo-se relativa intensidade do íon precursor em relação ao íon fragmento. Para a govaniadina, o valor selecionado foi de 15 eV (Figura 2.7) e para a mianserina, o de 20 eV (Figura 2.8).

Figura 2.7 - Espectros de massas da solução-padrão de govaniadina (m/z 326) aplicando-se diferentes energias de colisão (0 a 20 eV), gás de colisão: argônio.

Figura 2.8 - Espectros de massas da solução-padrão de mianserina (m/z 265) aplicando-se diferentes energias de colisão (0 a 25 eV), gás de colisão: argônio.

4.2. Otimização de um método de preparo de amostras para extração da govaniadina de plasma de ratos

Fixada a melhor condição de análise, foi necessário estabelecer uma técnica para extração da govaniadina de plasma de ratos. Para tanto, foi avaliada a extração líquido-líquido (ELL), considerando-se a quantidade recuperada do analito da matriz e a presença de interferentes após a extração com cada solvente. O desenvolvimento do método baseou-se nos estudos de Gao et al. (2014) e Yang et al. (2014) os quais trabalharam com alcaloides do gênero *Corydalis*.

Foram avaliados os solventes: *n*-hexano, acetato de etila e a mistura (1:1) de ambos, com e sem adição de agente alcalinizante (NaOH, 1 mol L⁻¹). A utilização de mianserina como padrão interno, justificou-se devido semelhanças entre as propriedades físico-químicas. GOV: LogP 1,59 ± 0,56 e pKa: 9,87 ± 0,20; MIAN: Log P 1,14 ± 0,75 e pKa 8,26 ± 0,20 (SCIFINDER, 2015a, b).

Idealmente, um padrão interno deve ter estrutura semelhante ao analito de interesse, sendo o mais apropriado o análogo marcado isotopicamente. Na

indisponibilidade deste último, compostos com tempo de retenção próximo ao do analito de interesse são frequentemente utilizados (HU et al., 2016).

A condição de extração em meio básico (adição de NaOH 1 mol L⁻¹) foi testada devido o caráter básico da govaniadina e a sua extração na forma não ionizada (ZHAO et al., 2015). Entretanto, com esta condição, a resposta não foi satisfatória. Conforme a figura 2.9, a melhor recuperação ocorreu empregando o acetato de etila como solvente extrator.

Figura 2.9 - Avaliação dos solventes para extração da govaniadina e mianserina de plasma de ratos

4.3 Validação da metodologia bioanalítica

Estabelecida uma condição de extração, teve início a validação do método pela avaliação da seletividade. Considerando que as amostras podem conter interferentes com propriedades similares às do analito de interesse (KRUIVE et al., 2015), foi necessário avaliar a capacidade do procedimento de preparo de amostra em eliminá-los.

Comparando-se os cromatogramas obtidos no modo *MRM* (Figura 2.10), pode-se verificar que não há interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção dos analitos, demonstrando que a técnica de preparo possibilitou uma limpeza adequada da amostra.

Figura 2.10 - Teste de seletividade em plasma de ratos

O efeito de matriz foi avaliado devido a possibilidade da presença de substâncias não monitoradas, que coeluissem da matriz e que comprometessem a eficiência de ionização, prejudicando a precisão e exatidão do método (TANG et al., 2015; WANG; LI, 2015). Em concordância com a figura 2.11, não houve aumento ou supressão da ionização dos analitos nos seus respectivos tempos de retenção, para ambos os modos de aquisição (*Full scan* e *MRM*). Complementarmente, foi avaliado o FMN para dois níveis de concentração (5,0 e 2630,0 ng mL⁻¹). Os CVs dos FMNs relativos a todas as amostras foram inferiores a 15% (Tabela 2.3). O efeito de matriz interfere com a resposta do analito em proporção à sua concentração. Sua ocorrência dá-se através de reação entre o(s) analito(s) e algum constituinte da matriz resultando numa espécie que pode suprimir ou aumentar a resposta de sinal no EM (FUREY et al., 2013).

Figura 2.11 - Efeito de matriz em plasma de ratos

Tabela 2.3 - Fator de matriz normalizado de PI (FMN) para a govaniadina

Plasma	Concentração (ng mL ⁻¹)	FMN	CV (%)
Normal	5	4,2 ± 0,4	8
(n = 6)	2630	1,2 ± 0,1	4
Hemolisado	5	2,5 ± 0,2	6
(n = 3)	2630	1,7 ± 0,1	6
Lipêmico	5	2,1 ± 0,0	0
(n = 3)	2630	1,6 ± 0,1	8

A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas analíticas. O método atendeu as especificações, tendo sido linear na faixa de concentrações 2,50 - 3150,0 ng mL⁻¹. Tratando-se de um intervalo amplo, desvios maiores foram encontrados nas concentrações mais altas. A fim de que estes pontos não influenciassem na regressão linear, mais intensamente, que os desvios menores, nas concentrações mais baixas (fenômeno da heteroscedasticidade) (ROZET et al., 2011), houve necessidade de ponderação da curva e assim, a equação da reta

obtida pelo método dos mínimos quadrados, após ponderação ($1/x^2$), foi $y = 0,0068x + 0,0032$ ($r^2 > 0,99$), onde y representa a razão entre a área do pico da govaniadina e da mianserina, e x representa a concentração de govaniadina. A análise dos padrões de calibração ($n = 5$) apresentou desvio menor que 20% em relação à concentração nominal do LIQ ($2,5 \text{ ng mL}^{-1}$) e desvio menor que 15% em relação à concentração nominal para as demais concentrações, conforme preconizado pelas resoluções vigentes (ANVISA, 2012; EMEA, 2011; FDA, 2001). Além disso, a avaliação da linearidade por meio do “teste F” para a falta do ajuste (*Lack of Fit*) demonstrou-se satisfatória, conforme a tabela 2.4:

Tabela 2.4 - Linearidade do método

Faixa (ng mL^{-1})	Equação Linear	<i>Lack of Fit</i>	
		F	p
2,50 – 3150,0	$y = 0,0068x + 0,0032$	0,34 ^a	0,937 ^b

^a $F_{\text{valor}} < F_{\text{tabelado}}$. ^b $p \geq 0,1$.

Relativamente à precisão e exatidão, tomando-se como base os valores reportados na tabela 2.5, para o erro e o coeficiente de variação, eles encontram-se dentro dos limites preconizados (ANVISA, 2012; EMEA, 2011; FDA, 2001). Com relação ao valor do LIQ, os resultados das corridas analíticas, fortificadas com $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de govaniadina, apresentam resposta identificável e reprodutível, com coeficiente de variação e erro relativo inferior a 20% (Tabela 2.5). E a menor concentração detectável para a govaniadina (limite de detecção) ficou em $0,025 \text{ ng mL}^{-1}$.

Tabela 2.5 - Precisão e Exatidão ($n = 5$)

Controles (ng mL ⁻¹)	Intraensaio			Interensaio		
	[Obtida] ^a (ng mL ⁻¹)	E ^b , (%)	CV ^c , (%)	[Obtida] (ng mL ⁻¹)	E, (%)	CV, (%)
2,5 (LIQ)	2,6 ± 0,2	6	6	2,6 ± 0,2	3	9
5,0 (CQB)	4,8 ± 0,3	-3	7	5,0 ± 0,5	0	10
40,0 (CQM-1)	40,3 ± 5,8	1	14	40,1 ± 4,5	0	11
1050,0 (CQM-2)	1021,8 ± 74,1	-3	7	1051,0 ± 108,1	0	10
2630,0 (CQA)	2909,0 ± 47,9	11	2	2837,4 ± 145,6	8	5
3150,0 (LSQ)	3446,5 ± 439,8	9	13	3214,8 ± 361,5	2	11

^a Média, ^b Erro Relativo e ^c Coeficiente de variação.

Foi também avaliado o efeito residual, pelo aparecimento ou aumento dos sinais dos analitos devido à contaminação no sistema de injeção da amostra (HU, F. et al., 2015; HU, G. et al., 2015). A análise das amostras do tipo branco, injetadas antes e após as amostras do LSQ, demonstrou que as respostas de sinais interferentes próximo ao tempo de retenção da govaniadina e da mianserina foram inferiores a, respectivamente, 20% e 5% (Figura 2.12).

Figura 2.12 - Teste de efeito residual em plasma de ratos

A eficiência da extração dos analitos do plasma de rato foi consistente, precisa e reprodutível, para diferentes níveis de concentração, conforme apresentado na tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Recuperação da govaniadina em plasma de rato ($n = 5$)

Govaniadina (ng mL ⁻¹)	Recuperação ^a	Precisão
	(%)	CV, % ^b
2,5 (LIQ)	89,1	19
40,0 (CQM-1)	98,1	4
2630,0 (CQA)	89,6	1
3150,0 (LSQ)	95,7	1

^a Média. ^b Coeficiente de variação.

4.4. Avaliação do perfil farmacocinético da govaniadina em ratos

O método validado foi aplicado na investigação da farmacocinética da govaniadina em plasma de ratos.

Primeiramente foram preparados estudos piloto onde foram examinados diferentes veículos de solubilização e concentrações (para a dose) e tempos de coleta. A composição da dose deve ser levada em consideração, visto muitos compostos terem solubilidade limitada em solução aquosa e, portanto, necessitarem

de um co-solvente. Em geral, o(s) co-solvente(s) não deve(m) exceder 20% do volume total de injeção, uma vez que há possibilidade de hemólise e inibição de enzimas metabolizadoras, afetando o perfil farmacocinético (FAN; de LANNOY, 2014; NEERVANNAN, 2006). O veículo selecionado foi o etanol (seção 3.2.2., página 62), porque para os animais que receberam doses veiculadas em DMSO houve ocorrência de hemólise e este solvente é responsável pela inibição de algumas isoformas do CYP450, incluindo CYP1A2, 2C8/9, 2C19, 2D6, 2E1 and 3A4 (BUGGINS; DICKINSON; TAYLOR, 2007), as quais podem estar envolvidas no metabolismo da govaniadina. A dose final selecionada foi de 1 mg kg⁻¹ (seção 3.2.2., página 62).

Levando-se em consideração que, para administração i.v., a maioria dos compostos apresenta uma fase de distribuição inicial anterior a uma fase de eliminação terminal, pelo menos dois pontos na fase inicial ($\approx$ 15min após administração) são recomendados para uma estimativa confiável da concentração plasmática e pelo menos três pontos durante a fase terminal para estimativa segura da meia-vida terminal (FAN; de LANNOY, 2014). Desta forma, nove pontos de coleta foram selecionados (seção 3.2.2, página 62).

Após administração da dose, coleta e análise das amostras de plasma, obtiveram-se curvas de concentração plasmática *versus* tempo, as quais foram transformadas em gráficos ortogonais lineares-logarítmicos (Figuras 2.13 e 2.14) para obtenção das respectivas equações exponenciais e com isto foi possível o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos (Tabela 2.7 e Apêndice L).

Figura 2.13 - Curva de decaimento plasmático para a govaniadina *versus* tempo de coleta após administração i.v. de uma dose 1 mg kg⁻¹ para os animais 1, 2, 3 e 4

Figura 2.14 - Curva de decaimento plasmático para a govaniadina *versus* tempo de coleta após administração i.v. de uma dose 1 mg kg⁻¹ para os animais 5, 6, 7 e 8

Tabela 2.7 - Parâmetros Farmacocinéticos (média $\pm$ desvio padrão) extraídos da curva de concentração plasmática *versus* tempo, após administração i.v. de uma dose 1 mg kg⁻¹ (n = 8)

Parâmetros	Unidade	Média $\pm$ DP
ASC _{0-t}	(min $\times$ ng mL ⁻¹)	42592,1 $\pm$ 37684,3
ASC _{t-∞}	(min $\times$ ng mL ⁻¹)	44981,4 $\pm$ 41450,2
R áreas	(%)	96,7 $\pm$ 2,9
α	(min ⁻¹)	0,139 $\pm$ 0,086
β	(min ⁻¹)	0,017 $\pm$ 0,008
K_{12}	(min ⁻¹)	0,034 $\pm$ 0,029
K_{21}	(min ⁻¹)	0,024 $\pm$ 0,013
K_{10}	(min ⁻¹)	0,098 $\pm$ 0,054
t _{1/2} α	(min)	9,2 $\pm$ 8,9
t _{1/2} β	(min)	55,1 $\pm$ 37,9
TMR	(min)	27,4 $\pm$ 16,4
V _d	(mL kg ⁻¹)	2724,3 $\pm$ 1811,4
Cl	(mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	41,7 $\pm$ 30,4
T _{max}	(min)	27,7 $\pm$ 23,9
Cp _{média}	(ng mL ⁻¹)	271,9 $\pm$ 216,5

ASC_{0-t} - área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta; ASC_{0- ∞} - área sob a curva do tempo zero extrapolada ao infinito; r áreas - relação entre ASC_{0-t} e ASC_{0- ∞} ; α - constante de distribuição; t_{1/2} α - meia-vida de distribuição; β - constante de eliminação; t_{1/2} β - meia-vida de eliminação; K_{12} e K_{21} - microconstantes de distribuição; K_{10} - microconstante de eliminação; TMR - tempo de residência médio; V_d - volume de distribuição; Cl - clearance; T_{max} - tempo para pico tecidual livre; Cp_{média} - concentração plasmática média.

Uma vez que o resultado terapêutico depende da avaliação dos efeitos de um composto sobre o organismo, o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos é fundamental (HAN; CHIN; CHOI, 2013). Conforme apresentado na tabela 2.7 é possível observar que a relação entre áreas (r áreas, ASC_{0-t}/ASC_{0- ∞}) foi > 90%, demonstrando que o tempo de coleta foi suficiente para contemplar o mínimo de 80% de exposição do animal à govaniadina na dose administrada (FAN; de LANNOY, 2014) e com isto o desenho experimental foi adequado para o cálculo confiável dos parâmetros farmacocinéticos.

Os dados mostraram-se melhor ajustados ao modelo bicompartimental, para o qual observam-se duas inclinações da reta, cada uma referente a uma fase distinta

(Figuras 2.13 e 2.14). A primeira fase (distribuição) está relacionada a um rápido declínio da concentração plasmática de govaniadina a partir do compartimento central, com uma constante de distribuição alta (α) $0,139 \pm 0,086 \text{ min}^{-1}$, a qual reflete uma meia-vida de disposição rápida ($t_{1/2\alpha}$) $9,2 \pm 8,9 \text{ min}$. Após atingir o $T_{\max} = 27,7 \pm 23,9 \text{ min}$, a concentração de govaniadina diminui. Este declínio gradual aparece como a fase posterior (eliminação), com uma meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) de $55,1 \pm 37,9 \text{ min}$.

Com relação ao Vd (volume de distribuição), o valor de $2724,3 \pm 1811,4 \text{ mL kg}^{-1}$ é alto, considerando que o volume corporal para um rato Wistar é de aproximadamente $17,5 \text{ mL}$ (7% do seu peso corporal) (DIEHL et al., 2001), sendo indicativo de ligação tecidual (LOFTSSOM, 2015).

As constantes de velocidade (α e β) são denominadas híbridas, representam uma mistura dos processos de distribuição e eliminação que ocorrem nos compartimentos central e periférico, e que são dependentes das microconstantes: K_{12} , K_{21} e K_{10} , figura 2.15 e tabela 2.7 (BOROUJERDI, 2002). A velocidade de transferência da govaniadina a partir do compartimento central para o periférico (K_{12}) sendo superior à de sentido inverso (K_{21}), explica a já descrita meia-vida de distribuição rápida ($t_{1/2\alpha}$). Ao mesmo tempo, a permanência prolongada da govaniadina no compartimento periférico ($K_{21} < K_{12}$), explica o porquê de $t_{1/2\beta} > \text{TMR}$.

Uma meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) prolongada pode estar associada ou a um valor de Vd alto ou a um *clearance* baixo. A influência do Vd deve-se ao fato de que somente o composto presente no sistema vascular pode ser transportado aos órgãos eliminadores. Quanto maior o Vd, menor a fração de composto que pode ser eliminada ao longo do tempo e maior a meia-vida (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004b).

Com relação ao *clearance*, considerando o valor do débito cardíaco (DC) para um rato Wistar como sendo $234 \text{ mL kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ($\text{DC} = 180 \times \text{massa}^{-0,19}$) e que 50% deste valor ($117 \text{ mL kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) será recebido pelo fígado e pelos rins e que, portanto, não é possível obter valor maior, o *clearance* de $41,7 \pm 30,4 \text{ mL kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, é considerado mediano (TOUTAIN; BOUSQUET-MÉLOU, 2004a).

Figura 2.15 - Diagrama do modelo bicompartimental

E, avaliando-se estas amostras, para além dos parâmetros de farmacocinética, detectou-se um dos metabólitos já descritos no capítulo anterior, o M3 (Figura 2.16). Não foi possível a sua quantificação devido a inexistência de um padrão isolado e os demais metabólitos já apresentados e discutidos não foram detectados.

Figura 2.16 - Farmacocinética da GOV correlacionando com a formação do metabólito mono-hidroxilado (M3). Tempos de coleta 5, 60 e 180 min. *MRM* do metabólito (342 > 194), *MRM* da GOV (326 > 178). Análise por CLUE-DAD-EM/EM

4.5. Ligação às proteínas plasmáticas

A taxa de ligação às proteínas plasmáticas (LPP) representa o percentual da concentração total que não está ligado às proteínas no sangue (plasma), a qual é farmacodinamicamente ativa, pois é sabido que, apenas a fração livre pode atingir o sítio ativo por meio de difusão através das membranas e exercer o efeito farmacológico. O conhecimento da LPP é importante no processo de desenvolvimento de fármacos e deve estar integrado aos dados farmacocinéticos (LI et al., 2015; MARQUES et al., 2016). Isto porque, esta avaliação é crucial para determinar a extensão e duração da ação terapêutica de um composto, sendo identicamente útil na concepção do regime de doses e na estimativa da margem de segurança (WANG et al., 2016).

Há vários métodos *in vitro* para avaliação da LPP, o padrão-ouro é o equilíbrio de diálise, que geralmente serve de referência para outros métodos como a ultrafiltração (UF) e a ultracentrifugação (UC). A ultrafiltração é semelhante ao equilíbrio de diálise: aplica-se pressão externa (força centrífuga) para separar o fármaco livre daquele ligado às proteínas plasmáticas através de uma membrana de exclusão de tamanho. É um método simples e apresenta vantagens em relação a outros, tais como a diálise de equilíbrio, a ultracentrifugação ou a microextração em fase sólida. Entretanto, cuidados devem ser tomados com relação a ligação não específica à membrana de filtração, a qual pode ser fonte de artefato experimental (KRATZER; KEES; DORN, 2016; LAMBRINIDIS; VALLIANATOU; KAKOULIDOU, 2015; WANG; WILLIAMS, 2013) e também à influência da temperatura durante o procedimento experimental, que pode ser fonte de variação para a LPP (STOVE et al., 2015).

No presente estudo, foi empregada ultrafiltração, a temperatura de 37°C. A LPP, já com correção da ligação não específica à membrana de filtração (LNE), foi de $92,9 \pm 1,3$ (concentração baixa, 5 ng mL⁻¹) e de $99,4 \pm 0,1\%$ (concentração alta, 2630 ng mL⁻¹). Conforme afirmação de Chandasana e col (2015) e Lambrinidis, Vallianatou e Kakoulidou (2015) a extensão da LPP pode influenciar o *clearance* de um composto. Assim, para a govaniadina, a alta taxa de LPP está provavelmente relacionada com o valor do *clearance* observado (Tabela 2.7, página 82) e com a lenta distribuição entre os espaços intra e extracelular (MARQUES et al., 2016).

Ainda, associadamente aos dados de farmacocinética, é sabido que no organismo, um fármaco permanece retido nos tecidos por ligar-se às proteínas teciduais. Assim, o volume de distribuição parece ser elevado porque sua concentração plasmática está reduzida. Por outro lado, quando um fármaco se liga muito às proteínas plasmáticas, gerando altas concentrações no plasma, o Vd será muito reduzido, o que sugere baixa difusibilidade do fármaco para os tecidos. Entretanto, não é possível afirmar que um fármaco que se liga muito às proteínas plasmáticas não se liga, também, às estruturas teciduais. Deve-se lembrar que esta ligação é reversível e está em equilíbrio dinâmico (STORPIRTIS et al., 2011b).

Todos os resultados apresentados neste capítulo encontram-se publicados na revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 131, p. 464-472, 2016.

5. COMENTÁRIOS FINAIS

O acetato de etila foi o solvente de escolha para a extração da govaniadina de plasma de ratos. Um método por CLUE-EM/EM simples, sensível, seletivo, preciso e exato foi desenvolvido e validado, o qual foi satisfatoriamente aplicado a um estudo de farmacocinética. A análise das curvas de decaimento plasmático *versus* tempo de coleta indicam que os dados se ajustam ao modelo bicompartimental, com uma constante de distribuição (α) $0,139 \pm 0,086 \text{ min}^{-1}$, uma meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$) $9,2 \pm 8,9 \text{ min}$, com $T_{\text{max}} = 27,7 \pm 23,9 \text{ min}$, meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$) de $55,1 \pm 37,9 \text{ min}$ e Vd alto de $2724,3 \pm 1811,4 \text{ mL kg}^{-1}$. A taxa de ligação à proteína plasmática mostrou-se alta ($\approx 95\%$) para dois níveis de concentrações avaliados. Estes dados servirão de subsídio para estudos de farmacocinética adicionais da própria govaniadina ou para alcaloides relacionados.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012. Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 de maio de 2012. Seção 1, p. 93.
- BASAVARAJ, S.; BETAGERIN, G. V. Can formulation and drug delivery reduce attrition during drug discovery and development—review of feasibility, benefits and challenges. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4(1), p. 3-17, 2014.
- BOROUJERDI, M. Multicompartment models: linear two-compartment model with instantaneous input and first-order disposition. In: _____: **Pharmacokinetics: Principles and Applications**. Estados Unidos da América: McGraw-Hill, 2002, cap. 11, p. 233-253.
- BUGGINS, T. R.; DICKINSON, P. A.; TAYLOR, G. The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1482–1503, 2007.
- CHEN, J.; WU, H.; XU, G. B.; DAI, M. M.; HU, S. L.; SUN, L. L.; WANG, W.; WANG, R.; LI, S. P.; LI, G. Q. Determination of geniposide in adjuvant arthritis rat plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application to oral bioavailability and plasma protein binding. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 108, p. 122–128, 2015.
- CHANDASANA, H.; CHHONKER, Y. S.; BALA, V.; PRASAD, Y. D.; CHAITANYA, T. K.; SHARMA, V. L.; Bhatta, R. Pharmacokinetic bioavailability, metabolism and plasma protein binding evaluation of NADPH-oxidase inhibitor apocynin using LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 985, p. 180–188, 2015.
- DONNET, S.; SAMSON, A. A review on estimation of stochastic differential equations for pharmacokinetic/pharmacodynamic models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 929-939, 2013.
- DIEHL, K. H.; HULL, R.; MORTON, D.; PFISTER, R.; RABEMAMPIANINA, Y.; SMITH, D.; VIDAL, J. M.; Van De VORSTENBOSCH, C. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood including routes and volumes. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, p. 15-23, 2001.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use. **Guideline on bioanalytical method validation**. 2011. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 30 dezembro 2016.
- FAN, J.; de LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, p. 93-120, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 30 dezembro 2016.

FUREY, A.; MORIARTY, M. M.; BANE, V.; KINSELLA, B.; LEHANE, M. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. **Talanta**, v. 115, p. 104–122, 2013.

GAI, M. N.; STORPIRTIS, S.; de CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. Administração extravascular de medicamentos em dose única. In: _____. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011b, cap. 5, p. 40-49.

GAO, Y.; HU, S.; ZHANG, M.; LI, L.; LIN, Y. Simultaneous determination of four alkaloids in mice plasma and brain by LC–MS/MS for pharmacokinetic studies after administration of *Corydalis Rhizoma* and *Yuanhu Zhitong* extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 92, p. 6-12, 2014.

HAN, S. Y.; CHIN, Y. W.; CHOI, Y. H. A new approach for pharmacokinetic studies of natural products: measurement of isoliquiritigenin levels in mice plasma, urine and feces using modified automated dosing/blood sampling system. **Biomedical Chromatography**, v. 27, p. 741-749, 2013.

HE, C.; LI, J.; XU, N.; WANG, R.; LI, Z.; YANG, L.; WANG, Z. Pharmacokinetics, bioavailability, and metabolism of Notoginsenoside Fc in rats by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 109, p. 150-157, 2015.

HODGSON J. ADMET—turning chemicals into drugs. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 722–726, 2001.

HU, G.; XU, R. A.; DONG, Y. Y.; WANG, Y. Y.; YAO, W. W.; CHEN, Z. C.; CHEN, D.; BU, T.; GE, R. S. Simultaneous determination of liensinine, isoliensinine and neferine in rat plasma by UPLC–MS/MS and application of the technique to pharmacokinetic studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 94–98, 2015.

HU, Y.L.; CHEN, Z.P.; CHEN, Y.; SHI, C. X.; YU, R. Q. Generalized multiple internal standard method for quantitative liquid chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1445, p. 112–117, 2016.

KRATZER, A.; KEES, F.; DORN, C. Unbound fraction of fluconazole and linezolid in human plasma as determined by ultrafiltration: Impact of membrane type. **Journal of Chromatography B**, v. 1039, p. 74-78, 2016.

KRUBE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M. L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29–44, 2015.

LAMBRINIDIS, G.; VALLIANATOU, T.; KAKOULIDOU, A. T. *In vitro, in silico* and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 86, p. 27–45, 2015.

LEE, K. J.; MOWER, R.; HOLLENBECK, T.; CASTELO, J.; JOHNSON, N.; GORDON, P.; SINKO, P. J.; HOLME, K.; LEE, Y. H. Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 1015–1021, 2003.

LI, J.; SHI, Q.; JIANG, Y.; LIU, Y. Pretreatment of plasma samples by a novel hollow fiber centrifugal ultrafiltration technique for the determination of plasma protein binding of three coumarins using acetone as protein binding releasing agente. **Journal of Chromatography B**, v. 1001, p. 114–123, 2015.

LOFTSSON, T. Excipient pharmacokinetics and profiling. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 480, p. 48–54, 2015.

MARQUES, L. M. M.; CALLEJON, D. R.; PINTO, L. G.; DE CAMPOS, M. L.; DE OLIVEIRA, A. R. M.; VESSECCHI, R.; ADHIKARI, A.; SHRESTHA, R. L. S.; PECCININI, R. G.; LOPES, N. P. Pharmacokinetic properties, *in vitro* metabolism and plasma protein binding of govaniadine an alkaloid isolated from *Corydalis gowaniana* Wall. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 464–472, 2016.

MEHTA, P.; SHAH, R.; LOHIDASAN, S.; MAHADIK, K. R. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants-A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, p. 207–227, 2015.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, p. 715–731, 2006.

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

SCIFINDER. Chemical Abstracts Service. **CAS Registry Number 1572379-55-5**. Govaniadine Chemical Properties. 2015a. Disponível em: < <https://origin-scifinder-cas.ez67.periodicos.capes.gov.br/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> >. Acesso em: 30 dezembro 2016.

SCIFINDER. Chemical Abstracts Service. **CAS Registry Number 24219-97-4**. Mianserin Chemical Properties. 2015b. Disponível em: < <https://origin-scifinder-cas.ez67.periodicos.capes.gov.br/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> >. Acesso em: 30 dezembro 2016.

SHAO, N.; JIANG, H.; WANG, X.; YUAN, B.; JIN, Y.; SONG, M.; ZHAO, Y.; XU, H. Stereoselective pharmacokinetics of 25-methoxyl-dammarane-3 β ,12 β , 20-triol and its active demethyl-metabolite epimers in rats after oral and intravenous administration. **Fitoterapia**, v. 116, p. 139-145, 2017.

SONG, F. "Cross-Talk" in scheduled multiple reaction monitoring caused by in-Source fragmentation in herbicide screening with liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 4361-4364, 2011.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; de CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. Parâmetros farmacocinéticos. In: _____. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011a, cap. 2, p. 17-25.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; de CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. Parâmetros farmacocinéticos. In: _____. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011b, cap. 2, p. 26-33.

STOVE, V.; COENE, L.; CARLIER, M.; DE WAELE, J. J.; FIERIS, T.; VERSTRAETE, A. G. Measuring unbound versus total vancomycin concentrations in serum and plasma: methodological issues and relevance. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 37, p. 180–187, 2015.

TANG, Y. N.; PANG, Y. X.; HE, X. C.; ZHANG, Y. Z.; ZHANG, J. Y.; ZHAO, Z. Z.; YI, T.; CHEN, H. B. UPLC-QTOF-MS identification of metabolites in rat biosamples after oral administration of *Dioscorea saponins*: A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 127–140, 2015.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Plasma clearance. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 415-425, 2004a.

TOUTAIN, P. L.; BOUSQUET-MELOU, A. Volumes of distribution. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 441–453, 2004b.

WANG, C.; WILLIAMS, N. S. A mass balance approach for calculation of recovery and binding enables the use of ultrafiltration as a rapid method for measurement of plasma protein binding for even highly lipophilic compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 75, p. 112-117, 2013.

WANG, X., LI, P. Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC–MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run. **Food Chemistry**, v. 173, p. 897–904, 2015.

WANG, Y.; XIE, G.; LIU, Q.; DUAN, X.; LIU, Z.; LIU, X. Pharmacokinetics, tissue distribution, and plasma protein binding study of chicoric acid by HPLC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1031, p. 139-145, 2016.

WILLIAMSON, B.; WILSON, C.; DAGNELL, G.; RILEY, R. J. Harmonised high throughput microsomal stability assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 84, p. 31-36, 2017.

YANG, C.; XIAO, Y.; WANG, Z.; WANG, S.; CHEN, L.; WU, L.; LIU, G. UHPLC–ESI–MS/MS determination and pharmacokinetic study of two alkaloid components in rat plasma after oral administration of the extract of *Corydalis bungeana* Turcz. **Journal of Chromatography B**, v. 960, p. 59-66, 2014.

ZHANG, X.; LIU, S.; PI, Z.; LIU, Z.; SONG, F. Simultaneous quantification method for comparative pharmacokinetics studies of two major metabolites from geniposide and genipin by online microdialysis-UPLC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1041, p. 11-18, 2017.

ZHAO, L.; SUN, X.; XIONG, Z.; WANG, S. Simultaneous determination of mosapride and its active des-p-fluorobenzyl and 4' -N-oxide metabolites in rat plasma using UPLC–MS/MS: An application for a pharmacokinetic study. **Talanta**, v. 137, p. 130–135, 2015.

CAPÍTULO 3:
Avaliação da atividade
citotóxica e permeabilidade
celular da govaniadina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Viabilidade celular

A condução de uma investigação adequada, quanto a redução de problemas relacionados à segurança de um candidato a fármaco, desde o seu desenvolvimento inicial (pré-clínico) até a fase final, continua sendo um desafio para a indústria farmacêutica. A literatura apresenta e discute estudos de citotoxicidade como ferramenta para identificação de agentes potencialmente tóxicos, ainda no estágio pré-clínico, anterior ao avanço de estudos em animais (CYBULSKI; RADKO e RZESKI, 2015; HROUZEK et al., 2016; RANA et al., 2016; RIVERA; GILMAN, 2012; SEO et al., 2015).

Isto porque, como principal razão para a retirada de um composto do mercado, cita-se a sua toxicidade seja ela cardíaca, hepática e/ou renal. Nos últimos anos, esforços tem sido feitos no intuito de rapidamente se identificar tais eventos (ABASS, 2016; LIN; WILL, 2012). A conveniência da utilização de linhagens celulares inclui a provisão de resultados humano-específicos e, ao mesmo tempo, como desvantagens, incluem-se a instabilidade do genótipo e a limitação em mimetizar a complexidade *in vivo* (ATIENZAR et al., 2014).

A partir de artigos reportando a atividade citotóxica para alcaloides do tipo THPB e também para os estruturalmente relacionados (CORRECHE et al., 2008; GADHIYA et al., 2016; VRBA et al., 2014; VAZQUEZ et al., 2005), considerou-se avaliar os efeitos citotóxicos da govaniadina frente a diferentes linhagens celulares.

1.2. Permeabilidade celular

A função primária do trato intestinal é servir como local para absorção de nutrientes, eletrólitos e xenobióticos. Em geral, qualquer medicamento, após administração por via oral, será absorvido do lúmen do intestino para os enterócitos, seguirá para a circulação porta, fígado e, finalmente, para a circulação sistêmica. O intestino humano expressa boa parte das enzimas de Fase I e II do metabolismo, incluindo as CYPs e UGTs. Para além das enzimas metabolizadoras, o intestino também expressa uma gama de transportadores incluindo os de influxo e efluxo (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017).

Posto isto, a avaliação da absorção intestinal pode ser conduzida por meio do emprego de modelos *in vivo* ou *in vitro*. Este último, devido à facilidade de execução e precisão nos resultados obtidos, é amplamente utilizado, destacando-se o emprego da linhagem de células Caco-2. Estas células são derivadas do adenocarcinoma de cólon humano e se diferenciam espontaneamente após 14-15 dias de cultivo. Uma vez diferenciadas, exibem características morfológicas e funcionais de enterócitos maduros, e podem até mesmo expressar algum transportador presente no intestino delgado humano. Este sistema é amplamente utilizado na indústria farmacêutica nos estágios iniciais do desenvolvimento de um candidato a fármaco, como ferramenta para previsão dos mecanismos de absorção gastrointestinal (BORKAR et al.; 2016; HENRI et al., 2014; HUBATSCH; RAGNARSSON; ARTURSSON, 2007; PICHARDO et al., 2017; SEVIN et al., 2013).

Até o momento, nenhuma avaliação sobre a permeabilidade intestinal *in vitro* da govaniadina foi reportada. Desta forma, este processo será aqui investigado por meio do emprego do modelo de monocamadas de células Caco-2.

Os estudos contemplados neste capítulo foram desenvolvidos em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. *Hans Ulrich-Humpf*, *Institut für Lebensmittelchemie, Universität Münster*, Alemanha.

2. OBJETIVOS DO CAPÍTULO 3

Avaliar os efeitos citotóxicos da govaniadina frente a linhagem de células hepáticas (Hep G2), renais (Hek-T-293) e de astrocitoma do cérebro Humano (CCF-STTG1). E, adicionalmente, caracterizar sua absorção intestinal *in vitro* empregando o modelo de monocamadas de células Caco-2.

Para se atingir estes objetivos, foram definidos os seguintes pontos:

- Estabelecimento de uma faixa de concentrações a ser testada para as diferentes linhagens celulares;
- Desenvolvimento e validação de metodologia bioanalítica para quantificação da govaniadina no meio HBSS.
- Aplicação do método bioanalítico desenvolvido para estudo da absorção intestinal *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e reagentes

- Meio *Eagle* modificado de *Dulbecco* (DMEM, *Pan Biotech*, Alemanha), meio DMEM/*Ham's F12* (DMEM/F12, *Pan Biotech*, Alemanha), solução salina balanceada de *Hank* (HBSS, *Biochrom GmbH*, Alemanha), tampão do ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico (tampão HEPES, *Carl Roth GmbH + Co. KG*, Alemanha), solução PSG (penicilina, estreptomicina e L-glutamina, *Corning*, EUA), soro fetal bovino (SFB, *Pan Biotech*, Alemanha), Meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, *Pan Biotech*, Alemanha) e corante amarelo de *Lúcifer* (*Sigma–Aldrich*, Alemanha). Os demais reagentes foram adquiridos da *Merck* (*Darmstadt*, Alemanha), *Roth* (*Karlsruhe*, Alemanha) ou *Sigma–Aldrich* (*Steinheim*, Alemanha).
- Linhagem celular de hepatoma humano (Hep G2, ACC 180, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*, *Braunschweig*, Alemanha). Células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2, *American Type Culture Collection*, HTB-37™, *LGC Standards GmbH*, *Wesel*, Alemanha).
- Linhagem de células renais embrionárias humanas (HEK-T-293) foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. *S. Hüttelmaier* (*Universität Halle-Wittenberg*, Alemanha). Linhagem celular de astrocitoma humano (CCF-STTG1) foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. *Hans-Joachim Galla* (*Universität Münster*, Alemanha).
- Solventes grau HPLC: acetonitrila (MeCN) e metanol (MeOH) foram obtidos da *Merck* (*Darmstadt*, Alemanha), *Roth* (*Karlsruhe*, Alemanha) ou *Sigma–Aldrich* (*Steinheim*, Alemanha).
- A água (H₂O) utilizada nos experimentos foi purificada pelo sistema Purelab® flex (*Veolia Water Technologies*, *Celle*, Alemanha).

3.1.1. Equipamentos

• A quantificação da govaniadina em células Caco-2 foi conduzida em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (**CLAE 4**) da marca Agilent 1100 (*Waldbronn, Baden-Württemberg, Alemanha*) composto de bombas de alta pressão (modelo G1312A), injetor automático (G1329A) com volume de injeção de 5 μL e forno para coluna (1200 G1316A), aquecido a temperatura de 40°C. Utilizou-se a coluna cromatográfica *Nucleodur*[®] C18 ISIS, 5 μm , 150 $\times$ 2 mm (*Macherey-Nagel*). Como fase móvel foi utilizada H₂O (A) e MeCN (B), ambos com 0,1% de ácido fórmico (v/v) em eluição por gradiente a uma vazão de 0,350 mL min⁻¹: 0-15 min 10% (B), 15-18 min 30% (B), 18-21 min 100% (B), 21-24 min 100% (B), 24-26 min 10% (B), tempo total da análise de 35 minutos. O equipamento de **CLAE 4** foi acoplado a um espectrômetro de massas Qtrap 4000 (*Applied Biosystems, Darmstadt, Hessen, Alemanha*). Os espectros foram adquiridos no modo positivo, empregando IES, operando no modo *MRM*. Configuração: capilar 5500 V; temperatura do gás de nebulização: 350°C e pressão de 35 psi. Foi utilizado nitrogênio (N₂) tanto como gás de dessolvatação, bem como de colisão (20 psi). O tempo de residência (*dwel time*) foi ajustado automaticamente: potencial de orifício (*declustering potential*) 75 V e saída de potencial de colisão, 15 V. As transições de *MRM* e as correspondentes energias estão descritas na tabela 3.1. O programa empregado na aquisição dos dados foi o *software Analyst 1.4.2 software (Applied Biosystems)*.

Tabela 3.1 - Parâmetros do método *MRM* para detecção da govaniadina

Composto	<i>MRM</i>	E _{Lab} * (V)
Govaniadina	326>178	40
	326>163	62

*Energia de colisão

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação da viabilidade celular

A manipulação das linhagens celulares foi conduzida em capela de fluxo laminar vertical. Todas as linhagens foram cultivadas em monocamadas, em frascos de 75 cm² com 10 mL de meio de cultura, a 37°C, em estufa humidificada com atmosfera de 5% de CO₂. Para a linhagem Hep G2, empregou-se meio DMEM suplementado com tampão HEPES (10 mmol L⁻¹), penicilina (100 unidades mL⁻¹), estreptomicina (100 µg mL⁻¹), L-glutamina (2 mmol L⁻¹) e SFB (10% v/v). A linhagem HEK-T-293 foi mantida em meio DMEM com mesma suplementação da linhagem anterior, exceto pela adição de tampão HEPES 20 mmol L⁻¹. Para a linhagem CCF-STTG1, empregou-se meio RPMI 1640 suplementado com penicilina (100 unidades mL⁻¹), estreptomicina (100 µg mL⁻¹), L-glutamina (2 mmol L⁻¹) e SFB (10% v/v).

O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana e quando da confluência microscópica das células entre 80-90%, elas foram tripsinizadas (tripsina 0,05%, v/v), subcultivadas e transferidas para placas de cultura de células de 96 poços (100 µL/ poço), na densidade celular apropriada para cada linhagem. Para a Hep G2 (subcultivos 11-13) empregou-se a densidade de 1×10^4 células/poço. Para a HEK-T-293 (subcultivos 13-15) empregou-se 3×10^3 células/poço e para a CCF-STTG1 (subcultivos 68-70) 1×10^4 células/poço.

Após 24h de estabilização e aderência das células, cada linhagem foi tratada com meio livre de soro e, mais 24h depois, cada linhagem foi tratada com govaniadina na faixa de concentrações de 1 µmol L⁻¹ a 100 µmol L⁻¹ durante 48h. Como controle negativo, cada linhagem foi incubada com metanol (1% v/v) e como controle positivo, cada linhagem foi incubada com a micotoxina tricoteceno (concentração final: 10 µmol L⁻¹) ou com camptotecina (concentração final: 10 µmol L⁻¹ e 30 µmol L⁻¹). Todas as etapas de cultivo e incubação foram conduzidas a 37°C, em estufa humidificada com atmosfera de 5% de CO₂.

Os ensaios foram efetuados para linhagens celulares de três diferentes subcultivos e sob condição livre de soro para se excluir qualquer ligação da govaniadina às proteínas séricas. A viabilidade celular foi avaliada colorimetricamente utilizando o ensaio de CCK-8 (*Cell Counting Kit-8*, Dojindo Laboratories, Tokyo, Japão) (CRAMER et al., 2010). Após 48h de incubação da

govaniadina, em cada linhagem celular, o meio de cultura foi removido das placas de 96 poços, seguido de adição de 100 µL de meio de cultura fresco e 10 µL de solução corante (sal de tetrazólio solúvel em água, WST-8) para cada poço da placa. As placas foram incubadas novamente a 37°C, durante 90min. A redução da solução-corante, pelas desidrogenases das células viáveis, produz o formazan que é solúvel em água e absorve em $\lambda = 450$ nm. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Tecan infinite® M200 PRO, Salzburg, Áustria) e o *software* Tecan *i-control* versão 1.7.1.12, (Crailsheim, Alemanha) foi utilizado para conversão dos dados. A quantidade de formazan gerada é diretamente proporcional ao número de células viáveis (ANGIUS; FLORIS, 2015; CRAMER et al., 2010; MULAC & HUMPF, 2011).

3.2.1.1. Análise Estatística

Todos os dados foram tratados e avaliados pelos *softwares* MINITAB Release (versão 14.1) e GraphPad Prism (versão 5.01). Os dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A significância estatística foi determinada por meio do teste-t de *student* não pareado. Nos gráficos, a legenda está assim apresentada: (***) - Significância estatística alta ($p < 0,001$); (**) - Significância estatística média ($p < 0,01$) e (*) - Significância estatística baixa ($p < 0,05$). Curvas do tipo dose-resposta foram construídas no *software* GraphPad Prism para cálculo do IC₅₀.

3.2.2. Quantificação da govaniadina no meio HBSS, para estudo de permeabilidade celular em monocamada de células Caco-2

Para a quantificação da govaniadina em meio HBSS foi utilizado um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (**CLAE 4**) acoplado a um espectrômetro de massas Qtrap 4000 (seção 3.1.1, página 98). Neste estudo, um método por CLAE-EM/EM sensível e seletivo foi desenvolvido e validado de acordo com o que é preconizado pelas agências internacionais (EMEA, 2011; FDA, 2001).

3.2.2.1. Linearidade

Neste estudo, MeOH foi utilizado para dissolver a govaniadina (concentração final no meio HBSS 0,1% v/v). A avaliação da linearidade contemplou dois intervalos de concentrações, o primeiro de 6,3-200 nmol L⁻¹ e o segundo de 0,2-10 µmol L⁻¹ (em meio HBSS). A análise de regressão utilizada foi a dos mínimos quadrados (fator de ponderação 1/x²). A regressão foi representada pela equação da reta e pelo coeficiente de correlação (*r*). Além disso, a equação de regressão linear foi verificada, através do “teste F”, para a falta de ajuste (*Lack of Fit*). Os cálculos estatísticos foram efetuados no programa MINITAB *Release* versão 14.1 (*State College, Pennsylvania*, EUA).

Para cada uma das três curvas construídas, foram avaliadas replicatas (*n* = 5) para as amostras do LIQ (6,3 nmol L⁻¹ e 0,2 µmol L⁻¹) e para as amostras controle de qualidade (CQ) nas concentrações: baixa (CQB, 12,6 nmol L⁻¹ e 1 µmol L⁻¹), média (CQM, 50 nmol L⁻¹ e 5 µmol L⁻¹), alta (CQA, 100 nmol L⁻¹ e 8 µmol L⁻¹) e para o limite superior de quantificação (LSQ, 200 nmol L⁻¹ e 10 µmol L⁻¹).

3.2.2.2. Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram determinadas para uma mesma corrida (intracorrída) e para corridas diferentes (intercorrídas). Para cada corrida foram preparadas replicatas (*n* = 5) para as amostras do LIQ (6,3 nmol L⁻¹ e 0,2 µmol L⁻¹) e para mais cinco concentrações controle de qualidade (CQ): baixa (CQB, 12,6 nmol L⁻¹ e 1 µmol L⁻¹), média (CQM, 50 nmol L⁻¹ e 5 µmol L⁻¹), alta (CQA, 100 nmol L⁻¹ e 8 µmol L⁻¹) e para o limite superior de quantificação (LSQ, 200 nmol L⁻¹ e 10 µmol L⁻¹). O cálculo da precisão foi expresso como coeficiente de variação (CV, %) conforme a equação 2.1 (página 61, capítulo 2), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. O cálculo da exatidão foi expresso como erro relativo (E, %), conforme a equação 2.2 (página 61, capítulo 2), não se admitindo valores fora da faixa de ± 15% do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de ± 20% do valor nominal.

3.2.2.3. Efeito residual

Para avaliação do efeito residual, foram feitas injeções de amostras do tipo branco (apenas o meio HBSS), sendo duas anteriores e três posteriores às amostras do limite superior de quantificação (LSQ, 200 nmol L⁻¹ e 10 µmol L⁻¹). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras processadas do LIQ (6,3 nmol L⁻¹ e 0,2 µmol L⁻¹), considerando-se as respostas de sinais interferentes próximo ao tempo de retenção da govaniadina inferiores a 20%.

3.2.2.4. Efeito de matriz

O efeito de matriz foi quantificado pela análise de amostras do meio HBSS processadas e posteriormente adicionadas de govaniadina, bem como pela análise de amostras de soluções de govaniadina nas concentrações de CQB (12,6 nmol L⁻¹ e 1 µmol L⁻¹) e CQA (100 nmol L⁻¹ e 8 µmol L⁻¹). O fator de matriz (FM) foi calculado pela razão área do analito na presença da matriz pela área do analito na ausência da matriz (em solução). O coeficiente de variação (CV, %) dos FMs não deve ser superior a 15%.

3.2.2.5. Estabilidade

Os testes foram conduzidos para se avaliar a estabilidade das amostras de meio HBSS enriquecidas com govaniadina nas concentrações baixa (12,6 nmol L⁻¹ e 1 µmol L⁻¹) e alta (100 nmol L⁻¹ e 8 µmol L⁻¹) por período prolongado (30 dias) e após ciclos de congelamento e descongelamento.

Para a estabilidade de longa duração, foram preparadas amostras de meio HBSS enriquecidas com govaniadina e então mantidas a temperatura de -20°C durante 30 dias. Após este período foram extraídas e analisadas.

Para estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, amostras de meio HBSS enriquecidas com govaniadina foram preparadas e então mantidas a temperatura de -20°C por 24h e descongeladas após este período a temperatura ambiente (25 ± 2°C). Posteriormente ao descongelamento completo, as amostras foram novamente congeladas nas mesmas condições por mais 12h. Este ciclo foi repetido e ao final do terceiro, foram extraídas e analisadas. Os resultados

obtidos para todas as estabilidades foram comparados com aqueles obtidos pela análise de amostras recém preparadas. As amostras foram consideradas estáveis quando o erro relativo (E, %) em relação às amostras frescas foi inferior a 15%.

3.2.3. Permeabilidade celular

O delineamento experimental foi baseado em trabalhos anteriores de Hemmersbach et al. (2013) e Himanshu et al. (2013). Cada experimento foi repetido para três diferentes subcultivos (58-60) da linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2. As células foram cultivadas em frascos de 75 cm² contendo meio DMEM/F-12 (sem L-glutamina e com NaHCO₃ 1,2 g L⁻¹) suplementado com SFB (10%, v/v), L-glutamina (2 mmol L⁻¹), penicilina (100 unidades mL⁻¹) e estreptomicina (0,1 mg mL⁻¹) a 37°C e sob atmosfera de 5% CO₂. O subcultivo foi efetuado quando as células atingiram confluência microscópica entre 70–80%, com solução tripsina (0,05%, v/v)/ EDTA (0,02%, v/v).

Para os estudos de permeabilidade, o semeio das células para suporte permeável (Filtros *Transwell* de 12 poços, poro 0,4 µm, membrana de polycarbonato, *Corning, New York*, EUA) foi feito na densidade de 5×10^4 células/poço (área de crescimento de 1,12 cm²) e as células permaneceram em crescimento durante 21 dias, para diferenciação dos enterócitos e desenvolvimento da monocamada. O cultivo destas células foi em meio DMEM/F-12, sendo 760 µL no compartimento apical (AP), com células e 1650 µL no basolateral (BL), sem células. A troca de meio foi efetuada em dias alternados, durante os 21 dias do experimento (Figura 3.1).

Figura 3.1 - Visão transversal de um poço do suporte permeável para desenvolvimento e crescimento da monocamada de células Caco-2. Legenda: AP-compartimento apical (lúmen intestinal); BL-compartimento basolateral (sangue); (•) Monocamada de células Caco-2

Após cerca de 16h, no vigésimo primeiro dia após o semeio, o meio DMEM/F-12 foi substituído pelo meio de transporte HBSS, pH 7,4. Cada poço do suporte permeável (Filtros *Transwell*) foi transferido para o módulo *CellZscope* (*NanoAnalytics GmbH, Münster, Alemanha*). As condições de cultivo foram modificadas para atmosfera humidificada a 37°C, sem fornecimento de CO₂, para obtenção de valores estáveis de pH. A integridade das monocamadas e das junções paracelulares foi examinada pela aferição da resistência elétrica transepitelial (RET). Apenas as monocamadas com valores da RET superiores a 1000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ foram utilizadas.

Para avaliação da permeabilidade na direção absorptiva (sentido apical para basolateral, AP-BL), 76 μL de meio foram removidos do compartimento apical e substituídos por igual volume de solução teste (govaniadina 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em meio HBSS), substituição 1/10.

Para avaliação dos transporte ativo (ambas as direções: AP-BL e BL-AP), 76 μL e 165 μL de meio foram removidos dos compartimentos apical e basolateral, respectivamente. As mesmas alíquotas, mas de solução teste (govaniadina 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em meio HBSS), foram adicionadas aos compartimentos correspondentes.

Tomando-se em consideração a relação para ambos os compartimentos de 76 μL / 1650 μL (1/ 2,17), as amostras foram retiradas na mesma proporção: 46 μL

da porção apical e 100 µL da basolateral durante oito tempos de coleta 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 20 e 24 horas. O valor final para a RET também foi aferido após o último tempo de coleta (24h) para assegurar que não houve nenhum dano à monocamada. Previamente a esta medida, os volumes de cada compartimento foram ajustados para os valores iniciais (760 µL no apical e 1650 µL no basolateral).

O transporte da govaniadina, por unidade de área da monocamada, foi estimado a partir do cálculo do coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}) de acordo com a equação 3.1 (AFRAPOLI et al., 2016):

$$P_{app}(\text{cm s}^{-1}) = [V/(AC_0)] \times (\Delta C/\Delta t) \quad (3.1)$$

Onde,

V: é o volume no compartimento acceptor (cm^3);

A: é a área superficial da membrana do filtro (cm^2);

C_0 : é a concentração inicial no compartimento doador;

$\Delta C/\Delta t$: é a mudança de concentração ao longo do tempo de coleta no compartimento receptor ou o *slope* da quantidade acumulada no compartimento receptor em função do tempo.

A taxa de efluxo (TE) foi calculada pela equação:

$$TE = P_{app}^{BL-AP} / P_{app}^{AP-BL} \quad (3.2)$$

Adicionalmente à aferição da RET, a permeabilidade paracelular da monocamada de células Caco-2 foi avaliada com o marcador fluorescente amarelo de LúCIFer. Ao final da aferição da RET, no último ponto de coleta (24h), como descrito anteriormente, uma alíquota de 76 µL de meio foi removida do compartimento apical e substituída por igual volume do marcador fluorescente (500 µmol L⁻¹, em meio HBSS). Após 1h de incubação, alíquotas de 100 µL de cada um dos compartimentos (AP e BL) foram transferidas para placas de cultura de células de 96 poços escuras (o corante é fotossensível). Uma curva analítica (0,05-500 µmol L⁻¹, solução amarelo de LúCIFer em meio HBSS) foi preparada e transferida para a mesma placa. A fluorescência do corante foi lida em leitor de microplacas ($\lambda_{excitação}$ =

485nm, $\lambda_{\text{emissão}} = 535\text{nm}$; Tecan infinite[®] M200 PRO, *Salzburg*, Áustria; Tecan *i-control software* versão 1.7.1.12, *Crailsheim*, Alemanha). A permeabilidade para o corante amarelo de Lúcyfer foi expressa como percentual de rejeição (%) e foi calculada utilizando a equação 3.3 (HIMANSHU et al., 2013):

$$\% = 100 \times [1 - F_{\text{basolateral}} / F_{\text{apical}}] \quad (3.3)$$

Onde,

$F_{\text{basolateral}}$: é o valor para fluorescência no compartimento basolateral;

F_{apical} : é o valor para fluorescência no compartimento apical;

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da citotoxicidade

A escolha pela avaliação da citotoxicidade da govaniadina em linhagem de células hepáticas (Hep G2) e renais (Hek-T-293), deveu-se principalmente aos resultados já apresentados e discutidos nos capítulos anteriores a respeito do metabolismo *in vitro*, da farmacocinética e também porque o fígado e o rim são os órgãos mais envolvidos nos processos de metabolismo e excreção de xenobióticos (FAN; DE LANNOY, 2014). Considerando-se, outrossim, que alguns alcaloides do gênero *Corydalis* são ligantes de receptores de dopaminérgicos (SHRESTHA et al., 2013), a avaliação contemplou a linhagem de células de astrocitoma do cérebro humano (CCF-STTG1).

As linhagens de hepatoma humano, derivadas de tecidos tumorais ou de células primárias artificialmente transformadas, tais como a Hep G2, é uma das mais utilizadas na investigação da citotoxicidade de xenobióticos, porque são altamente diferenciadas e apresentam muitas das características genotípicas e morfológicas das células parenquimatosas do fígado (ATIENZAR et al., 2014; GAYATHRI et al., 2015; LI; MA; WANG, 2015). A linhagem celular derivada de rim embrionário humano (Hek 293) é de fácil cultivo e reproduz-se rapidamente, a linhagem Hek-T-293 é sua variante clonal (DUMONT et al., 2016). Os astrócitos são responsáveis pelo desenvolvimento, manutenção e proteção das células neurais e, a linhagem de astrocitoma CCF-STTG1 assemelha-se aos astrócitos humanos normais (WOEHLING; ZILZ; COLEMAN, 2006).

A parte inicial do trabalho consistiu na determinação da faixa de concentrações a ser utilizada. Trabalhos anteriores para alcaloides estruturalmente relacionados, como: palmatina, coritencina e isocoreximina (VAZQUEZ et al., 2005; VRBA et al., 2014) utilizaram, no geral, uma faixa entre 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Ainda neste início, foi avaliado o efeito da resposta celular quando do emprego de diferentes densidades celulares para cada linhagem (GASQUE et al., 2014).

Para a Hep G2, nas densidades de 5×10^3 células/poço e 5×10^4 células/poço, a resposta da viabilidade foi elevada em praticamente todas as concentrações, diferentemente do que ocorreu para a de 1×10^4 células/poço (Figura 3.2). A fim de se evitar uma interpretação equivocada à respeito do real

efeito, adotou-se esta última densidade para um novo experimento. Após 48h de tratamento, a viabilidade celular permaneceu elevada (entre 100% e 80%) nas concentrações entre $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Um pequeno decréscimo foi observado apenas para a concentração mais alta ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), viabilidade = $65,88 \pm 13,74\%$. Para a micotoxina tricoteceno (T2, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$), controle positivo, observou-se redução na viabilidade para $30,37 \pm 4,52\%$ (Figura 3.3).

Para a HeK-T-293, após 48h de tratamento, a viabilidade celular permaneceu elevada ($> 100\%$) em todas as concentrações avaliadas, independente da densidade (Figura 3.4). Comparativamente à camptotecina (CPT, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$), controle positivo, observou-se redução na viabilidade para $10,53 \pm 2,46\%$ (Figura 3.5).

Para a CCF-STTG1, um decréscimo na viabilidade celular foi observado apenas na concentração mais alta avaliada ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) para $23,33 \pm 2,73\%$. Relativamente à camptotecina (CPT, $30 \mu\text{mol L}^{-1}$), controle positivo, observou-se redução na viabilidade para $43,76 \pm 3,92\%$ (Figura 3.6). Com base, ainda, na mesma figura, foi possível determinar o IC50, ou seja, a concentração que provoca a redução de 50% na viabilidade celular. Obteve-se, assim, $\text{IC}_{50} = 120,26 \mu\text{M}$ em 48 horas de incubação, para esta linhagem.

Em linhas gerais, pelos resultados apresentados, foi possível observar que a viabilidade celular permaneceu elevada para quase todas concentrações e em todas as linhagens testadas, exceto apenas para a concentração mais alta avaliada ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) para a linhagem CCF-STTG1 (astrocitoma do cérebro humano) onde verificou-se um efeito citotóxico moderado. Esta mesma segurança, com relação a viabilidade celular, já havia sido demonstrada em trabalho de Callejon et al. (2014), onde a govaniadina apresentou baixa atividade citotóxica para linhagem de macrófagos J774 de camundongo, com seletividade do efeito citotóxico maior para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* do que para as células de mamíferos (hospedeiro).

Figura 3.2 - Viabilidade celular da linhagem Hep G2 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h empregando diferentes densidades celulares (5×10^3 ; 1×10^4 e 5×10^4), $n = 6$. Legenda: (***) - Significância estatística alta ($p < 0,001$); (**) - Significância estatística média ($p < 0,01$) e (*) - Significância estatística baixa ($p < 0,05$)

Figura 3.3 - Viabilidade celular da linhagem Hep G2 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h, comparativamente ao controle negativo (MeOH 1%), n = 18. Micotoxina tricoteceno (T2, 10 µmol L⁻¹) foi utilizada como controle positivo. Legenda: (***) - Significância estatística alta (p <0,001) e (*) - Significância estatística baixa (p <0,05). Densidade celular: 1 x 10⁴ célula/ poço.

Figura 3.4 - Viabilidade celular da linhagem HeK-T-293 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h empregando diferentes densidades celulares (3×10^3 e 6×10^3), $n = 6$. Legenda: (***) - Significância estatística alta ($p < 0,001$); (**) - Significância estatística média ($p < 0,01$) e (*) - Significância estatística baixa ($p < 0,05$)

Figura 3.5 - Viabilidade celular da linhagem HeK-T-293 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h, comparativamente ao controle negativo (MeOH 1%), n = 9. Camptotecina (CPT, 10 µmol L⁻¹) foi utilizada como controle positivo. Legenda: (***) - Siginificância estatística alta (p <0,001) e (**) - Siginificância estatística média (p <0,01). Densidade celular: 3 x 10³ célula/ poço.

Figura 3.6 - Viabilidade celular da linhagem CCF-STTG1 após incubação concentração-dependente com govaniadina por período de 48h, comparativamente ao controle negativo (MeOH 1%), $n = 18$. Camptotecina (CPT, $30 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi utilizada como controle positivo. Legenda: (***) - Significância estatística alta ($p < 0,001$) e (*) - Significância estatística baixa ($p < 0,05$). Densidade celular: 1×10^4 célula/ poço.

4.2. Validação de um método para quantificação de govaniadina em meio HBSS.

Preliminarmente ao início dos estudos de permeabilidade celular em monocamada de células Caco-2, um método para quantificação de govaniadina no meio HBSS foi desenvolvido e validado. Os cromatogramas estão apresentados na figura 3.7. Os resultados indicaram que quando as amostras do tipo branco foram injetadas após as respectivas amostras do LSQ (200 nmol L^{-1} e $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), a resposta dos sinais interferentes, no tempo de retenção da govaniadina, foi inferior a 20% da resposta para as amostras processadas do LIQ ($6,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e $0,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), demonstrando que o efeito residual é aceitável.

Em se trabalhando com intervalos amplos de concentração ($6,3 \text{ nmol L}^{-1}$ a $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), optou-se por dividir a faixa de concentrações, construindo-se duas curvas analíticas para cada. As equações de regressão foram $y = 24713,4x - 150476,8$ (intervalo $6,3\text{-}200 \text{ nmol L}^{-1}$) e $y = 753153,4x + 320685,37$ (intervalo $0,2\text{-}10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). No que concerne à precisão e exatidão (intraensaio e interensaio), os valores obtidos estão todos dentro dos limites aceitáveis (EMEA 2011; FDA 2001) demonstrando a confiabilidade do método. Os resultados estão descritos na tabela 3.2.

Com relação ao efeito de matriz, os CVs calculados para os FMs nas concentrações baixa ($12,6 \text{ nmol L}^{-1}$ e $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e alta (100 nmol L^{-1} e $8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) foram menores que 15%, indicando que este efeito é negligenciável para o método (Tabela 3.2). Os resultados para o estudo de estabilidade também encontram-se reportados na mesma tabela e observa-se que a govaniadina apresentou-se estável no meio HBSS nas condições examinadas.

Figura 3.7 - Cromatograma *MRM* da govaniadina no meio HBSS nas concentrações: 6,3 nmol L⁻¹, LIQ (A); 200 nmol L⁻¹, LSQ (B); amostra branco injetada após o LSQ de 200 nmol L⁻¹ (C); 0,2 μmol L⁻¹, LIQ (D); 10 μmol L⁻¹, LSQ (E); amostra branco injetada após o LSQ de 10 μmol L⁻¹ (F). Gráfico intensidade (cps) *versus* tempo (min)

Tabela 3.2 - Parâmetros de validação para o método de quantificação da govaniadina no meio HBSS, por CLAE-EM/EM

	Faixa de concentrações									
	6,3-200 (nmol L ⁻¹)					200-10 (µmol L ⁻¹)				
	6,3	12,6	50	100	200	0,2	1	5	8	10
Precisão (CV, %)										
	6	10	3	6	11	11	7	7	6	2
	5	10	4	8	11	10	7	8	6	4
Exatidão (RE, %)										
	-9	-5	3	7	-3	-1	2	-4	3	-2
	-3	0	3	-1	1	-3	3	3	2	-5
Estabilidade (CV, %)										
	-20°C/ 30 dias	4	3	3		12			10	
	Congelamento-	10	6			12			5	
	descongelamento									
EM ^a (CV, %)	9	3	3			11			3	
	equação	y = 24713,4x – 150476,8								
		y = 753153,4x + 320685,37								
Curva analítica	Falta de ajuste	F ^c	1,2			0,88				
	p ^d	0,329				0,497				

^aefeito matriz; ^b coeficiente de correlação; ^cF_{observado} < F_{tabelado}; ^dp ≥ 0,1.

4.2.1. Permeabilidade celular em monocamada de células Caco-2

Para ser administrado oralmente, um composto ativo deve ter adequada absorção no epitélio intestinal de forma a atingir a circulação sistêmica, bem como os seus alvos no organismo. Neste processo, diversas barreiras biológicas precisam ser atravessadas (AFRAPOLI et al., 2016).

Para previsão da biodisponibilidade de um composto, o modelo de monocamada de células Caco-2 tem sido aplicado. Este modelo também é aceito pela FDA para classificação de compostos no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (HIMANSHU et al., 2013). Assim sendo, como forma de se estimar a absorção *in vivo* da govaniadina, um método de quantificação por CLAE-EM/EM foi desenvolvido, validado e satisfatoriamente empregado em ensaio de permeabilidade *in vitro*.

O passo inicial, para o desenvolvimento do ensaio, foi a seleção da concentração adequada de govaniadina. Levando-se em conta os resultados anteriormente descritos para viabilidade em três diferentes linhagens celulares (seção 4.1, página 107), foram selecionadas as concentrações de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 200 nmol L^{-1} , uma vez que não foi observado qualquer efeito citotóxico. Tal cuidado justifica-se porque de acordo com Hubatsch, Ragnarsson e Artursson (2007), especialmente para estudos de transporte ativo, uma concentração baixa, tipicamente na faixa micromolar ($\mu\text{mol L}^{-1}$), é utilizada para evitar a saturação das proteínas de transporte.

O passo seguinte foi verificar a integridade das monocamadas de células Caco-2, por meio da aferição da RET, anteriormente ao início do ensaio (HIMANSHU et al., 2013). A resposta, valores superiores a 1000 $\Omega \text{ cm}^2$, confirmou que as monocamadas apresentavam-se íntegras. E, o MeOH utilizado para dissolver a govaniadina (concentração final no meio HBSS 0,1% v/v), não alterou a RET. Posteriormente, ao final do último tempo de coleta (24h) a resposta da RET foi novamente verificada, confirmando que não houve dano às monocamadas durante o ensaio (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Valores da RET ($\Omega \text{ cm}^2$) para a monocamada de células Caco-2 para o tempo 0 (t_0) e após a última coleta, tempo 24h (t_{24}), n = 9

Controle (0,1% MeOH) (AP-BL)		Transporte absorptivo (AP-BL)		Transporte ativo (AP-BL e BL-AP)	
0h	24h	0h	24h	0h	24h
1328,33 ±	1513,33 ±	1285,00 ±	1321,25 ±	1280,00 ±	1626,67 ±
187,98	223,31	218,89	131,31	165,73	223,31

Quando da aplicação da govaniadina apenas no compartimento apical (concentração final $10 \mu\text{mol L}^{-1}$), houve decaimento lento e gradual até o tempo 8h, anteriormente à estabilização entre os tempos 8 e 24h. Este decaimento foi concomitante ao aumento gradativo da concentração da govaniadina no compartimento basolateral nos referidos tempos t_{8-24} (Figura 3.8). O valor da permeabilidade aparente (P_{app}) para o transporte absorptivo (AP-BL) foi de $20,6 \pm 3,9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. De acordo com Yee (1997) e Pichardo et al. (2017), compostos com $P_{\text{app}} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ podem ser classificados como bem absorvidos (70-100%). Esta permeabilidade, na direção absorptiva, é frequentemente utilizada em conjunto com os valores de solubilidade do composto como previsão da sua absorção (SEVIN et al., 2013).

Figura 3.8 - Perfil de permeabilidade da govaniadina ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) após ensaio na direção absorptiva (AP-BL) em monocamadas de células Caco-2 durante 24h, $n = 9$.

O transporte através do epitélio intestinal pode ocorrer por duas vias: paracelular (através de junções intercelulares) e transcelular. O transporte paracelular envolve o mecanismo de difusão passiva, enquanto que para o transporte transcelular pode haver mediação de processos passivos, facilitados e ativos, por meio de transportadores de membrana (PICHARDO et al., 2017).

Para se avaliar a susceptibilidade da govaniadina aos transportadores de efluxo (de membrana), uma solução (concentração final 200 nmol L^{-1}) foi aplicada em ambos os compartimentos. Os resultados estão apresentados na figura 3.9. Após 24 h, foram quantificadas as concentração de $190,1 \pm 13,4 \text{ nmol L}^{-1}$ (compartimento apical) e de $166,4 \pm 29,7 \text{ nmol L}^{-1}$ (compartimento basolateral). Apenas para os tempos 0,5h e 1h, as diferenças de valores quantificados entre os compartimentos apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

O valor para o P_{app} (BL-AP) foi de $1,76 \pm 0,34 \times 10^{-6}$ cm/s, e para o P_{app} (AP-BL) foi de $3,17 \pm 0,8 \times 10^{-6}$ cm/s. A razão de efluxo (RE) calculada foi de 0,55, o que sugere que não há envolvimento de transportadores de efluxo (GOUVEA et al., 2014). Desta forma, os dados indicam que a govaniadina é transportada através da monocamada celular por difusão passiva, não sofrendo efluxo ativo. De acordo com Afrapoli et al. (2016) e Sun & Pang (2008) o valor de RE < 1,2 ou 1,5 indica que somente a difusão passiva está envolvida no transporte.

Figura 3.9 - Perfil de permeabilidade da govaniadina (200 nmol L^{-1}) após ensaio de transporte ativo (AP-BL e BL-AP) em monocamadas de células Caco-2 durante 24h, n = 9. (**) Significância estatística.

Além disso, a integridade das junções oclusivas entre células adjacentes foi avaliada por meio do marcador fluorescente, o corante amarelo de Lúcer (AFRAPOLI et al., 2016). O corante apresenta baixa permeabilidade e, como resultado, não permeia a monocamada de células quando as junções oclusivas estão íntegras (HIMANSHU et al., 2013). Os dados apresentados na tabela 3.4 demonstram que menos de 1% do corante adicionado ao compartimento apical foi transportado através da monocamada ao longo de 1h de incubação, evidenciando a integridade da barreira celular.

Tabela 3.4 - Taxa de rejeição à permeabilidade do corante Amarelo de Lúifer (%) através da monocamada de células Caco-2, n = 9

Controle (0,1% MeOH) (AP-BL)	Transporte absorvivo (AP-BL)	Transporte ativo (AP-BL e BL-AP)
99,94 ± 0,04	99,88 ± 0,28	99,62 ± 1,05

As células Caco-2 expressam múltiplas enzimas do metabolismo tais como sulfotransferases, UDP-glicuronosiltransferases e as glutationas S-transferases. A presença de metabólitos poderia alterar a resposta quanto a taxa de efluxo e aos coeficientes P_{app} (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017; HUA et al., 2015; SUN; PANG, 2008). Por conseguinte, durante os experimentos de permeabilidade, as amostras foram analisadas quanto a presença de metabólitos. No entanto, pelos resultados obtidos, a govaniadina atravessou a monocamada sem sofrer ação das enzimas do metabolismo. μ

Ao final do experimento, a membrana de cada filtro (Filtros *Transwell*), contendo a monocamada de células, foi retirada com auxílio de um bisturi e extraída com 1 mL de MeCN (100%) em banho de ultrassom durante 1 h. O sobrenadante foi transferido para tubos *eppendorfs* e deixado evaporar até a secura em concentradora de rotação a vácuo a 35°C (Concentrador de S-BA-VC-300H, H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Baden-Württemberg, Alemanha) e reconstituído em H₂O/MeCN (9:1, v/v). A concentração final de govaniadina, quantificada em relação à inicialmente aplicada, para cada experimento, foi inferior a 1%. Portanto, a quantidade intracelular foi desprezível.

5. COMENTÁRIOS FINAIS

A govaniadina não apresentou efeitos citotóxicos em ensaios de viabilidade celular em linhagens celulares de fígado (Hep G2), de rim (Hek-T-293) e de cérebro (CCF-STTG1). Um método por CLAE-EM/EM para quantificação da govaniadina no meio HBSS foi desenvolvido, validado e aplicado em ensaio de permeabilidade celular *in vitro* em monocamada de Caco-2. A difusão passiva é predominante na direção apical-basolateral ($P_{app} = 20,6 \pm 3,9 \times 10^{-6}$ cm/s).

CONCLUSÃO DO TRABALHO DE PESQUISA

Ao término dos três capítulos pode-se concluir que:

- A govaniadina é passível de sofrer reações de metabolismo *in vitro*, sejam elas de Fase I ou II, mediante o emprego de diferentes frações subcelulares de fontes diversas (animal ou humana).
- Os metabólitos encontrados provavelmente serão também formados *in vivo*. Um O-desmetilado (**M1**); um di-hidroxilado (**M2**); um mono-hidroxilado (**M3**) e dois glicuronidados (**M4 e M5**).
- A análise das curvas de decaimento plasmático *versus* tempo de coleta indicam que os dados se ajustam ao modelo bicompartimental, com meia-vida de distribuição = $9,2 \pm 8,9$ min, *clearance* = $41,7 \pm 30,4$ mL min⁻¹ kg⁻¹ e meia-vida de eliminação = $55,1 \pm 37,9$ min.
- Com relação aos estudos de viabilidade celular, a govaniadina apresentou efeitos citotóxicos moderados frente às linhagens celulares Hep G2, HeK-T-293 e CCF-STTG1 em concentrações até 100 µmol L⁻¹.
- A análise do perfil de permeabilidade intestinal *in vitro* em modelo Caco-2, revela que a govaniadina distribui-se pelo organismo, com expectativa de ser bem absorvida. Isto certifica a continuidade de estudos visando o desenvolvimento deste alcaloide como um futuro fármaco.

REFERÊNCIAS

- ABASS, K. M. An investigation into the formation of tebufenozide's toxic aromatic amine metabolites in human *in vitro* hepatic microsomes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 73–78, 2016.
- AFRAPOLI, F. M.; OUFIR, M.; WALTER, F. R.; DELI, M. A.; SMIESKO, M.; ZABELA, V.; BUTTERWECK, V.; HAMBURGER, M. Validation of UHPLC–MS/MS methods for the determination of kaempferol and its metabolite 4-hydroxyphenyl acetic acid, and application to *in vitro* blood-brain barrier and intestinal drug permeability studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 264–274, 2016.
- ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug metabolism in the liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, p. 1-20, 2017.
- ANGIUS, F.; FLORIS, A. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 314-319, 2015.
- ATIENZAR, F. A.; NOVIK, E. I.; GERETS, H. H.; PAREKH, A.; DELATOUR, C.; CARDENAS, A.; MACDONALD, J.; YARMUSH, M. L.; DHALLUIN, S. Predictivity of dog co-culture model, primary human hepatocytes and HepG2 cells for the detection of hepatotoxic drugs in humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 275, p. 44–61, 2014.
- BORKAR, N.; CHEN, Z.; SAABY, L.; MÜLLERTZ, A.; HÅKANSSON, A. E.; SCHÖNBECK, C.; YANG, M.; HOLM, R.; MU, H. Apomorphine and its esters: Differences in Caco-2 cell permeability and chylomicron affinity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 509 p. 499-506, 2016.
- CALLEJON, D. R.; RIUL, T. B.; FEITOSA, L. G.; GUARATINI, T.; SILVA, D. B.; ADHIKARI, A.; SHRESTHA, R. L.; MARQUES, L. M.; BARUFFI, M. D.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P. Leishmanicidal evaluation of tetrahydroprotoberberine and spirocyclic erythrina-alkaloids. **Molecules**, v. 19, p. 5693-5703, 2014.
- CORRECHE, E. R.; ANDUJAR, S. A.; KURDELAS, R. R.; LECHON, M. J. G.; FREILE, M. L.; ENRIZ, R. D. Antioxidant and cytotoxic activities of canadine: Biological effects and structural aspects. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3641–3651, 2008.
- CRAMER, B.; HARRER, H.; NAKAMURA, K.; UEMURA, D.; HUMPF, H. U. Total synthesis and cytotoxicity evaluation of all ochratoxin A stereoisomers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 343–347, 2010.
- CYBULSKI, W.; RADKO, L.; RZESKI, W. Cytotoxicity of monensin, narasin and salinomycin and their interaction with silybin in HepG2, LMH and L6 cell cultures. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 337–344, 2015.
- DUMONT, J.; EUWART, D.; MEI, B.; ESTES, S.; KSHIRSAGAR, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, p. 1110-1122, 2016.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use. **Guideline on bioanalytical method validation**. 2011. Available: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf >. 27th august 2016.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, p. 93–120, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. 2001. Available: < <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> >. 27th august 2016.

GADHIYA, S.; MADAPA, S.; KURTZMAN, T.; ALBERTS, I. L.; RAMSEY, S.; PILLARSETTY, N. K.; KALIDINDI, T.; HARDING, W. W. Tetrahydroprotoberberine alkaloids with dopamine and σ receptor affinity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 2060–2071, 2016.

GASQUE, K. C. S.; AL-AHJ, L. P.; OLIVEIRA, R. C.; MAGALHÃES, A. C. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 381-385, 2014.

GAYATHRI, L.; DHIVYA, R.; DHANASEKARAN, D.; PERIASAMY, V. S.; ALSHATWI, A. A.; AKBARSHA, M. A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 151-163, 2015.

GOUVEA, D. R.; RIBEIRO, A. B. B.; THORMANN, U.; LOPES, N. P.; BUTTERWECK, V. Evaluation of intestinal permeability of vicenin-2 and lychnopholic acid from *Lychnophora salicifolia* (Brazilian Arnica) using Caco-2 Cells. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 464-471, 2014.

HEMMERSBACH, S.; BRAUER, S. S.; HÜWEL, S.; GALLA, H. J.; HUMPF, H. U. Transepithelial permeability studies of flavan-3-ol-C-glucosides and procyanidin dimers and trimers across the Caco-2 cell monolayer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7932–7940, 2013.

HENRI, J.; HUGUET, A.; DELMAS, J. M.; BESSON, A.; SANDERS, P.; FESSARD, V. Low *in vitro* permeability of the cyanotoxin microcystin-LR across a Caco-2 monolayer: With identification of the limiting factors using modeling. **Toxicon**, v. 91, p. 5-14, 2014.

HIMANSHU, R.; JAKIR, P.; PRADNYA, H.; SUNEEL, P.; RAHUL, S. The impact of permeability enhancers on assessment for monolayer of colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) used in *in vitro* permeability assay. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 3, p. 20-29, 2013.

HROUZEK, PAVEL; KAPUŠCIK, A.; VACEK, J.; VORÁČOVÁ, K.; PAICHLOVÁ, J.; KOSINA, P.; VOLOSHKO, L.; VENTURA, S.; KOPECKÝ, J. Cytotoxicity evaluation of large cyanobacterial strain set using selected human and murine *in vitro* cell models. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 177–185, 2016.

HUA, F.; SHI, M. J.; ZHU, X. L.; LI, M.; WANG, H. X.; YU, X. M.; LI, Y.; ZHU, C. J. Transport and uptake of clausenamide enantiomers in CYP3A4-transfected Caco-2 cells: An insight into the efflux-metabolism alliance. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, p. 224–230, 2015.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G. E.; ARTURSSON, PER. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Protocols**, v. 2, p. 2111–2119, 2007.

LI, X.; MA, J.; WANG, J. Cytotoxicity, oxidative stress, and apoptosis in HepG2 cells induced by ionic liquid 1-methyl-3-octylimidazolium bromide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 342–348, 2015.

LIN, Z.; WILL, Y. Evaluation of drugs with specific organ toxicities in organ-specific cell lines. **Toxicological Sciences**, v. 126, p. 114–127, 2012.

MULAC, D.; HUMPF, H. U. Cytotoxicity and accumulation of ergot alkaloids in human primary cells. **Toxicology**, v. 282, p. 112–121, 2011.

PICHARDO, S.; DEVESA, V.; PUERTO, M.; VÉLEZ, D.; CAMEÁN, A. M. Intestinal transport of Cylindrospermopsin using the Caco-2 cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 38, p. 142–149, 2017.

RANA, P.; WILL, Y.; NADANACIVA, S.; JONES, L. H. Development of a cell viability assay to assess drug metabolite structure–toxicity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 4003–4006, 2016.

RIVERA, S. M.; GILMAN, A. G. A invenção de fármacos e a indústria farmacêutica. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, cap. 1, p. 3–16.

SEO, E. J.; WIENCH, B.; HAMM, R.; PAULSEN, M.; ZU, Y.; FU, Y.; EFFERTH, T. Cytotoxicity of natural products and derivatives toward MCF-7 cell monolayers and cancer stem-like mammospheres. **Phytomedicine**, v. 22, p. 438–443, 2015.

SEVIN, E.; DEHOUCK, L.; COSTA, A. F.; CECHELLI, R.; DEHOUCK, M. P.; LUNDQUIST, S.; CULOT, M. Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, p. 334–339, 2013.

SHRESTHA, R. L.; ADHIKARI, A.; MARASINI, B. P.; JHA, R. N.; CHOUDHARY, M. I. Novel inhibitors of urease from *Corydalis govani* Wall. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 228–231, 2013.

SUN, H.; PANG, K. S. Permeability, transport and metabolism of solutes in Caco-2 Cell Monolayers: A theoretical study. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, p. 102–123, 2008.

VAZQUEZ, M. M.; LOZANO, D. G. C.; REYES, R. E.; LUGO, N. M. G.; APAN, T. R.; HEINZE, G. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 733–736, 2005.

VRBA, J.; HAVLIKOVA, M.; GERHARDOVA, D.; ULRICHOVA, J. Palmatine activates AhR and upregulates CYP1A activity in HepG2 cells but not in human hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v.28, p.693–699, 2014.

WOEHRLING, E. K.; ZILZ, T. R.; COLEMAN, M. D. The toxicity of hexanedione isomers in neural and astrocytic cell lines. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, p. 249-254, 2006.

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

Apêndice

APÊNDICE A – Espectro de RMN ^1H da govaniadina (500 MHz, CDCl_3).

APÊNDICE B – Espectro de RMN ^{13}C da govaniadina (125 MHz, CDCl_3).

APÊNDICE C – Espectro de DEPT 135° da govaniadina.

APÊNDICE D – Mapa de contornos HMQC da govaniadina (500 MHz, CDCl_3).

APÊNDICE E – Mapa de contornos HMBC da govaniadina (500 MHz, CDCl_3).

APÊNDICE F- Espectro de massas sequencial (EM/EM) da govaniadina em alta resolução (E_{lab} 0-40 eV).

APÊNDICE G- Espectro de massas de múltiplos estágios (EMⁿ) da govaniadina. Amplitudes de cima para baixo: 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,4 V.

APÊNDICE H- Espectro de massas sequencial (EM/EM) da caseadina em alta resolução (E_{lab} 0-40 eV).

APÊNDICE I- Espectro de massas de múltiplos estágios (EMⁿ) da caseadina. Amplitudes de cima para baixo: 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,4; 0,4; 0,4; 0,4 V.

APÊNDICE J- Espectro de massas em alta resolução para M1 (m/z 314), M2 (m/z 340) e M3 (m/z 342).

APÊNDICE K- Espectro em alta resolução, no modo positivo, para: govaniadina $[M+H]^+ = m/z$ 326 (A); M4 $[M+H]^+ = m/z$ 502 (B); M1 $[M+H]^+ = m/z$ 314 (C) e M5 $[M+H]^+ = m/z$ 490 (D).

Parâmetro	Animais							
	1	2	3	4	5	6	7	8
α (min ⁻¹)	0,281	0,181	0,029	0,030	0,173	0,132	0,093	0,191
β (min ⁻¹)	0,028	0,020	0,005	0,009	0,021	0,024	0,015	0,012
K_{12} (min ⁻¹)	0,085	0,035	0,003	0,005	0,056	0,027	0,007	0,055
K_{21} (min ⁻¹)	0,044	0,026	0,006	0,012	0,035	0,033	0,017	0,018
K_{10} (min ⁻¹)	0,180	0,140	0,026	0,022	0,103	0,097	0,084	0,130
$t_{1/2\alpha}$ (min)	2,5	3,8	23,9	23,1	4,0	5,3	7,5	3,7
$t_{1/2\beta}$ (min)	24,8	34,7	138,6	77,0	33,0	28,9	46,2	57,8
ASC_{0-t} (min x ng mL ⁻¹)	41047,1	9744,5	84851,7	114902,9	20755,9	35488,3	18513,1	15433,2
$ASC_{t-\infty}$ (min x ng mL ⁻¹)	42057,8	10134,5	90851,7	125600,7	20972,6	35646,6	18640,4	15946,5
R areas	97,60	96,15	93,40	91,48	98,97	99,56	99,32	96,78
TMR (min)	14,7	15,3	52,4	54,0	24,0	17,6	15,6	25,6
V_d (mL kg ⁻¹)	870,1	5131,1	2357,1	967,0	2294,2	1174,1	3601,1	5399,6
Cl (mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	23,9	98,7	11,0	7,9	47,9	28,1	53,7	62,7
T_{max} (min)	9,1	13,7	73,2	57,3	13,9	15,9	23,4	15,5
$Cp_{média}$ (ng mL ⁻¹)	456,1	108,3	471,0	638,4	115,3	197,2	102,9	85,8

APÊNDICE L- Dados individuais de disposição cinética da govaniadina em ratos.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 14.1.721.53.6), intitulado "Estudo de metabolismo *in vitro* e avaliação da farmacocinética do alcaloide govaniadina extraído da planta *Corydalis govaniiana Wall*", de autoria de **Lucas Maciel Mauriz Marques e Noberto Peporine Lopes**, 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 *ad-referendum* da reunião da CEUA.

Colaboradores: Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

This is to certify that the work (Protocol number 14.1.721.53.6), entitled: "Estudo de metabolismo *in vitro* e avaliação da farmacocinética do alcaloide govaniadina extraído da planta *Corydalis govaniiana Wall*", by **Lucas Maciel Mauriz Marques and Noberto Peporine Lopes** 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 *ad-referendum* in the meeting of CEUA.

Duração prevista do projeto: 24/02/2015 a 24/02/2017

Ribeirão Preto, 24 de fevereiro de 2015.

Presidente da CEUA
Prof. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretário da CEUA
João Fernando Velho de Andrade Diniz

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 3526 – Fax: (16) 3602 3526

ANEXO A – Aprovação do trabalho pelo comitê de Ética.