UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de métodos de geração de imagem por
espectrometria de massas (MALDI e DESI-MSI) aplicados a modelos
in vitro e in vivo de permeação cutânea e sistema nervoso central**

Gabriela Amaral Buqui

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de métodos de geração de imagem por
espectrometria de massas (MALDI e DESI-MSI) aplicados a modelos
in vitro e in vivo de permeação cutânea e sistema nervoso central**

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

Orientada: Gabriela Amaral Buqui

**Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine
Lopes**

Versão corrigida da tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas em 27/01/2017. A versão original encontra-se disponível
na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

BUQUÍ, G.A.	<p>Desenvolvimento de métodos de geração de imagem por espectrometria de massas (MALDI e DESI-MSI) aplicados a modelos in vitro e in vivo de permeação cutânea e sistema nervoso central.</p>		<p>DOUTORADO FCFRP-USP 2017</p>
-------------	--	--	---

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.

Buqui, Gabriela Amaral

Desenvolvimento de métodos de geração de imagem por espectrometria de massas (MALDI e DESI-MSI) aplicados a modelos in vitro e in vivo de permeação cutânea e sistema nervoso central. 2017. 90p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. Goyazensolido. 2. MALDI-MSI. 3. DESI-MSI

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriela Amaral Buqui

Desenvolvimento de métodos de geração de imagem por espectrometria de massas (MALDI e DESI-MSI) aplicados a modelos in vitro e in vivo de permeação cutânea e sistema nervoso central.

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

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Dedico este trabalho aos meus pais Marco e Rosicler por sempre acreditarem em mim e serem eternos incentivadores dos meus sonhos. Pelos valores que me ensinaram e por sempre me darem exemplo de disciplina, determinação e respeito ao próximo. Sem vocês nada disso seria possível e por isso dedico a vocês cada conquista dessa jornada. Obrigada.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pela orientação neste trabalho. Por sempre acreditar e confiar em mim, por estimular meu crescimento pessoal e profissional. Por ser orientador, amigo e essa pessoa maravilhosa que é. Pelo exemplo de dedicação, amor pela profissão, humildade e respeito ao próximo que ele nos ensina cada dia. Foi um privilégio poder trabalhar ao seu lado todos esses anos e sou muito grata por tudo.

Gostaria de fazer um agradecimento especial a Profa. Dra Renata Fonseca Vianna Lopez pela colaboração neste trabalho, pela oportunidade de desenvolver esse projeto e por me acolher tão bem em seu laboratório, sendo sempre tão agradável e produtivo os nossos encontros.

I would like to thank Prof. Dr. Christian Janfelt for the opportunity to develop such an interesting and exciting work at his lab at the University of Copenhagen, for sharing knowledge and for the great time we had together.

Gostaria de agradecer a minha família, especialmente a minha irmã Ana Carolina, meu irmão Valdir e minha irmã Bia por fazerem meus dias mais felizes, pelo carinho, amizade e companheirismo sempre.

Agradeço a minha filha canina Lika pelo amor incondicional, pelo companheirismo e por tornar meus dias mais coloridos.

As amigas Camila e Eduarda por serem meu alicerce. Pela amizade, carinho e companheirismo. Pelos choros e pelas alegrias juntas. Por todos os momentos compartilhados. Sem vocês nada disso será possível.

As amigas Tati, Marina, Amanda, Paula e Eylinha que acompanham meus passos desde sempre, que compartilham angustias e conquistas e que estão e estarão sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

As amigas Gabi Uchida, Carol Polano, Pri Esteves, Miriam Homan , Fran Cordeiro, Thayse Canato e Paula Godeny pela amizade, por fazerem parte do meu dia a dia mesmo estando longe, por me entenderem como ninguém e por sempre incentivarem o melhor de mim.

Aos amigos Roger Gestal, Pri Esteves e Daniel Simon que mesmo do outro lado do mundo me acompanham, enfrentam fusos horários e se dedicam a nossa amizade com muito amor e carinho.

A amiga Dayana Rubio Gouvea que me acolheu no NPPNS e sempre me deu forças para continuar lutando. Exemplo de pessoa e profissional que levo para a vida.

Aos amigos que mesmo longe estão presentes no meu dia a dia e são eternos incentivadores do meu trabalho.

Agradecimento especial a Jacqueline Nakau Mendonça pela parceria na realização das análises por MALDI-MSI, pela amizade, carinho e compreensão.

I would like to thank Olivia Dzwonkowski for the help with the locust experiments, for being so kind and patient and teaching me the techniques and sharing knowledge.

I would like to thank Sophie, Meng and Christina for the wonderful time we had together in the University of Copenhagen. Thank you for being there for me, without you guys it wouldn't be possible and not funny at all. You made my days better. You are amazing.

Aos amigos Eduardo e Madeleine que me acolheram em seu lar durante minha estadia em Copenhagen e foram essenciais para que essa jornada fosse inesquecível.

Agradeço aos membros do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) por cada ideia compartilhada, pelos momentos de boas risadas e por muitos cafés juntos. Sem vocês esse trabalho não seria possível, pois cada um teve sua participação significativa em cada etapa. Muito obrigada.

Agradeço ao grupo de pesquisa NanoTop que me acolheu tão bem em seu laboratório, em especial a técnica Marina pela parceria e realização dos ensaios in vitro em célula de Franz.

Muito obrigada também aos técnicos Tomaz, Cristina e Jacqueline pelo carinho e atenção sempre que precisei. Vocês são exemplo de dedicação, amor ao trabalho e ao próximo.

Aos membros da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela atenção, carinho e dedicação aos alunos de pós-graduação.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - funcionários, professores de disciplinas, colegas de pós-graduação.

A Capes pela bolsa de estudos concedida.

Ao Santander pelo Auxílio Mobilidade Internacional USP/Santander concedido, que permitiu a realização do estágio na Universidade de Copenhague e uma experiência profissional e pessoal incrível.

“Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz.”

Renato Teixeira

RESUMO

Buqui, G. A. **Desenvolvimento de métodos de geração de imagem por espectrometria de massas (MALDI e DESI-MSI) aplicados a modelos *in vitro* e *in vivo* de permeação cutânea e sistema nervoso central.** 90f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A química de produtos naturais da família Asteraceae tem sido foco de estudo do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da FCFRP-USP que relatou diversas novas moléculas, com destaque para a classe das lactonas sesquiterpênicas. Para essas substâncias já foram atribuídas diversas atividades farmacológicas tais como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésicas e tripanossomicida. A atividade antitumoral da lactona sesquiterpênica goyazensolido (GOYA) foi avaliada no NPPNS e esse estudo revelou uma atividade farmacológica interessante para as linhagens de tumor cutâneo e cerebral. Com isso, viu-se nesta classe de substâncias uma oportunidade para explorar o potencial antitumoral assim como sua distribuição e metabolismo. Para compreender melhor a distribuição dessa substância na pele, o modelo *in vitro* de penetração utilizando células de Franz e pele de orelha de porco como membrana foi aplicado. Para esse estudo um método de geração de imagem MALDI-MSI para avaliação da distribuição do GOYA na pele, assim como, um método por UPLC-MS/MS foram desenvolvidos. Para o desenvolvimento e validação do método de MALDI-MS as substâncias doxorrubicina e minoxidil, com estudos de penetração já estabelecidos, foram utilizadas. Para avaliação da distribuição de GOYA em sistema nervoso central (SNC) um modelo em insetos, utilizando gafanhotos foi aplicado. Nesse experimento os gafanhotos receberam a dose de 500 µM de GOYA, e foram coletadas amostras de hemolinfa, fezes e cérebro nos tempos de 15 e 30 minutos, assim como amostras de gafanhoto total. Para determinação de GOYA nas amostras de gafanhoto um método quantitativo por UPLC-MS/MS e um método de geração de imagem por DESI-MSI foram desenvolvidos. Com os estudos de penetração cutânea pudemos concluir que MALDI-MSI foi capaz de confirmar a distribuição de minoxidil nas amostras de pele, no entanto, não se mostrou uma técnica eficaz para determinação de doxorrubicina. A técnica de MALDI-MSI, em adição ao método de UPLC-MS/MS foi capaz de revelar que o GOYA não penetrou na pele estando acumulado na sua camada superior, provavelmente no estrato córneo. Nos ensaios de distribuição em SNC foi possível observar através do método de UPLC-MS/MS que o GOYA está presente no cérebro, hemolinfa e fezes do gafanhoto. Com isso podemos concluir que o modelo utilizado é um bom modelo de predição de permeação a barreira-hematoencefálica, bem como para estudos de metabolismo. Conclui-se também que o método desenvolvido para essa finalidade foi adequado. A técnica de DESI-MS apesar de não gerar resultados positivos para permeação cerebral revelou a presença de GOYA no intestino do animal no tempo de 30 minutos, o que caracteriza uma rápida eliminação de GOYA do organismo.

Palavras-chave: goyazensolido, MALDI-MSI, DESI-MSI.

ABSTRACT

Buqui, G. A. **Development of mass spectrometry imaging methods (MALDI-MSI and DESI-MSI) applied to in vitro and in vivo models of cutaneous and nervous system permeation studies** . 2017. 90f. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The Natural Products' Chemistry has been the focus of the "Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos"(NPPNS) at School of Pharmaceutical Science of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FCFRP– USP). NPPNS reported a variety of unknown molecules from Asteraceae family, highlighting the sesquiterpene lactones (STL). STL showed important pharmacological activities, such as antiinflammatory, antimicrobial, analgesic and trypanosomicide. The STL goyazensolide (GOYA) exhibit antitumor activity for skin and central nervous system (CNS) cancer cell lines . With that the research group saw in this class of compounds a chance to explore the antitumor potential as well as unveil its distribution and metabolism. For a better understanding of the distribution of this compound in the skin, the Franz cell in vitro model using ear pig skin was applied. For that, a MALDI-MSI method was developed to assess the distribution of GOYA in the skin, along with a UPLC-MS/MS method, to confirm the results. In order to develop and validate a MALDI-MSI method, doxorubicin and minoxidil, known substances in the cutaneous penetration studies, were used. An insect model with locust was applied for the investigation of GOYA distribution in CNS. The locust received a 500 µM GOYA dose and hemolymph, brain and feces samples were collected in 15 and 30 minutes, as well as the entire locust. In order to assess GOYA in the locust samples, an UPLC-MS/MS method was developed, and for distribution in the entire locust a DESI-MSI was developed. The MALDI-MSI method developed for cutaneous penetration study was able to confirm the results for minoxidil experiments and allowed us to see the distribution of this compound in the skin. Unfortunately for doxorubicin MALDI-MSI by the is source analyte dissociation. The MALDI-MSI and the UPLC-MS/MS was able to show that GOYA does not permeate the skin, but is in the skin, probably interacting with the stratum corneum barrier. In the CNS studies we could see through the UPLC-MS/MS method that GOYA is present in the brain, hemolymph and feces in the in vivo model. With that we can conclude that the in vivo insect model is a good alternative for the metabolism and blood-brain-barrier studies. Also we can conclude that, although the DESI-MSI technique was not suitable for CNS permeation studies, it can be applied for metabolism studies, as it revealed the presence of GOYA in the intestine with a 30 minutes experiment, what characterizes a fast distribution and elimination of GOYA in the living organism.

Keywords: goyazensolide, MALDI-MSI, DESI-MSI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estudos de farmacocinética e atividade antitumoral aplicando a espectrometria de massas como principal ferramenta nos ensaios pré-clínicos.....	3
Figura 2. Estrutura química da lactona sesquiterpênica goyazensolido.....	4
Figura 3. Representação esquemática do fluxo de trabalho de uma análise por MALDI-MSI.....	14
Figura 4. Representação esquemática de um experimento com DESI.....	15
Figura 5. Representação esquemática da célula de Franz.....	22
Figura 6. Gafanhotos do deserto <i>Locusta schistocerca</i> . Fêmea à esquerda e o macho à direita.....	28
Figura 7. <i>Locusta schistocerca</i> fêmea mostrando local de dissecação (A) e o cérebro com olhos compostos e lamela neural (B).....	28
Figura 8. A) Incubação de cérebro macho + fêmea. B) Cérebro sem a lamela neural e olhos compostos.....	29
Figura 9. A) Gafanhoto macho eutanasiado por congelamento; B) Solução CMC 5%; C) Suporte especial para criostato; D) Gafanhoto fixado no criostato; E) Corte sagital do gafanhoto e lâmina montada.....	32
Figura 10. Espectro de massas de GOYA no modo positivo 361,1294 [M+H] ⁺	35
Figura 11. Espectro de massas da fragmentação de GOYA no modo positivo 361,1294 [M+H] ⁺ nas energias 5, 10, 15 e 20 eV.....	35
Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H do goyazensolido (CDCl ₃ /400 MHz).....	36
Figura 13. Espectro de RMN de ¹³ C goyazensolido (CDCl ₃ /100 MHz).....	37
Figura 14. A) Estrutura química do minoxidil. B) Espectro de massas no modo positivo de MINOX [M+H] ⁺ = 210 obtido por MALDI. C) Espectro de massas no modo positivo de MINOX [M+H] ⁺ = 210 e seu fragmento [M+H] ⁺ = 193 obtido por MALDI.....	39
Figura 15. Imagem gerada por MALDI-MSI mostrando a distribuição de minoxidil na pele nos tempos de 1h, 3h e 6h no experimento de penetração passiva e iontoforese. O íon monitorado foi o <i>m/z</i> 210. As áreas delimitadas com contorno branco representam as regiões de interesse. As imagens foram adquiridas utilizando uma resolução espacial de 50 µm.....	41

Figura 16. Espectro de massas de uma amostra de 6h no experimento de iontoforese na faixa de m/z 100 a 400. O íon m/z 379 corresponde ao íon da matriz α -CHCA.....	41
Figura 17. Espectro de massas de uma amostra de 6h no experimento de iontoforese ampliado na faixa m/z de 200 a 220. O íon m/z 210 corresponde ao analito de interesse MINOX.....	42
Figura 18. Espectro de massas de uma amostra de 6h no experimento de penetração passiva ampliado na faixa m/z de 200 a 220. O íon m/z 210 corresponde ao analito de interesse MINOX.....	42
Figura 19. Espectro de massas de uma amostra controle ampliado na faixa m/z de 200 a 220.....	42
Figura 20. Espectro de massas de uma amostra branco ampliado na faixa m/z de 200 a 220.....	43
Figura 21. A) Estrutura química da doxorrubicina. B) Espectro de massas no modo positivo de DOXO m/z 544 obtido por MALDI. C) Espectro de massas no modo positivo de DOXO m/z 544 e seu fragmento mais intenso m/z 397 obtido por MALDI.....	45
Figura 22. Espectro de massas no modo positivo de GOYA $[M+Na]^+ = 383$ com a matriz HCCA+DHB (1:1) 10mg mL ⁻¹ e 0.25 mg mL ⁻¹ de NaCl obtido por MALDI.....	47
Figura 23. Figura ilustrativa representando GOYA m/z 383 na camada superior da pele (estrato córneo).....	48
Figura 24. Determinação de GOYA em amostras de pele no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) Padrão de GOYA 1 μ g.mL ⁻¹ (tempo de eluição do GOYA: 2.24 minutos); C), D) e E) Amostra de pele em 1h, 3h e 6h, respectivamente.....	49
Figura 25. Análise de GOYA em amostras de cérebro de gafanhoto no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) Padrão de GOYA 5ng.mL ⁻¹ (tempo de eluição GOYA: 1.95 minutos); C) e D) Amostra de cérebro em 15 minutos de experimento.....	50
Figura 26. Gráfico da curva média de GOYA (n=3), cujo coeficiente de correlação linear (r) obtido foi superior a 0, 99.....	51
Figura 27. Análise de GOYA em amostras de cérebro de gafanhoto no modo	

MRM (361>275). A) Amostra branco; B) Padrão de GOYA 5ng.mL ⁻¹ (tempo de eluição GOYA: 1.95 minutos); C) e D) Amostra de cérebro em 15 e 30 minutos de experimento, respectivamente.....	52
Figura 28. Análise de GOYA em amostras de hemolinfa de gafanhoto no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) e C) Amostra de hemolinfa de gafanhoto macho em 15 e 30 minutos de experimento, respectivamente; D) e E) Amostra de hemolinfa de gafanhoto fêmea em 15 e 30 minutos, respectivamente.....	53
Figura 29. Análise de GOYA em amostras de fezes de gafanhoto no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) e C) Amostra de fezes de gafanhoto em 15 e 30 minutos de experimento, respectivamente.....	53
Figura 30. A) Diagrama esquemático de um experimento de DESI-MSI evidenciando as pontas do capilar expostas e niveladas (SHARIATGORJI et al., 2016); B) Capilar do solvente (interno); C) Capilar do gás nebulizador (externo).	55
Figura 31. DESI-MSI de um gafanhoto mostrando o composto endógeno lipídeo (<i>m/z</i> 796.5255).....	56
Figura 32. DESI-MSI de um gafanhoto mostrando o composto endógeno, lipídeo (<i>m/z</i> 824.5560).....	56
Figura 33. DESI-MSI de um gafanhoto que recebeu uma dose de GOYA 500 µM após 30 minutos de experimento, GOYA (aduto de K ⁺ , <i>m/z</i> 399.0840).....	57
Figura 34. DESI-MSI de um gafanhoto que recebeu uma dose de GOYA 500 µM após 30 minutos de experimento, GOYA (aduto de Na ⁺ , <i>m/z</i> 383.1100).....	57
Figura 35. DESI-MSI utilizando a ferramenta de co-localização, na qual é possível observar o lipídeo (<i>m/z</i> 824.5560) em azul, delimitando o corpo do gafanhoto, e o GOYA (<i>m/z</i> 399.0840) em vermelho.....	57
Figura 36. Coloração hematoxilina e eosina do corte do gafanhoto em 30 minutos realizada após a análise de DESI-MSI.....	57
Figura 37. Espectro obtido por DESI-MSI em full scan 200-900 no qual é possível observar os lipídeos <i>m/z</i> 824 e <i>m/z</i> 796 intensos.....	58
Figura 38. Espectros ampliados de GOYA <i>m/z</i> 399 (aduto de K ⁺) (A) e GOYA <i>m/z</i> 383 (aduto de Na ⁺) (B).....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de eluição da fase móvel.....	26
Tabela 2. Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para quantificação de GOYA.....	26
Tabela 3. Composição química do tampão inseto.....	28
Tabela 4. Gradiente de eluição da fase móvel.....	31
Tabela 5. Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para quantificação de GOYA.....	31
Tabela 6. Concentrações de GOYA (ng.mL ⁻¹) nas amostras de hemolinfa e fezes no experimento in vivo com gafanhotos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

BHE	Barreira hematoencefálica
CMC	Carboximetilcelulose
DESI	Ionização de dessorção por eletrospray (do inglês: <i>dessorption electrospray ionization</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DHB	Ácido 2,5 dihidroxibenzóico
DOXO	Doxorrubicina
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês: <i>electrospray ionization</i>)
GOYA	Goyazensólido
HCCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% da atividade
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas (do inglês: <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>)
LST	Lactona Sesquiterpênica
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MALDI	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (do inglês: <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MINOX	Minoxidil
MS	Espectrometria de massas (do inglês: <i>mass spectrometry</i>)
MSI	Geração de imagem por espectrometria de massas (do inglês: <i>mass spectrometry imaging</i>)
MRM	Monitoramento de reações múltiplas (do inglês: <i>multiple reaction monitoring</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
SNC	Sistema nervoso central
TOF	Analisador por tempo de voo (do inglês: <i>time of flight</i>)
UPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês: <i>ultra performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry</i>)

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	vi
Lista de abreviaturas.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Visão geral da proposta.....	2
1.2 Lactonas sesquiterpênicas.....	5
1.3 Modelos de estudo de distribuição.....	7
1.3.1 Ensaios de distribuição cutânea.....	7
1.3.2 Ensaios de distribuição em sistema nervoso central.....	9
1.4 Espectrometria de massas.....	11
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Isolamento da lactona sesquiterpênica goyazensolido.....	20
3.1.1 Obtenção de espécimes de <i>Eremanthus mattedgossensis</i>	20
3.1.2 Obtenção e isolamento de goyazensolido.....	20
3.2 Estudos de distribuição cutânea.....	20
3.2.1 Reagentes.....	21
3.2.2. Ensaio in viro- Célula de Franz.....	21
3.2.2.1 Minodixil.....	22
3.2.2.2 Doxorubicina.....	23
3.2.2.3 Goyazensolido.....	23
3.2.3 Desenvolvimento de um método por MALDI-MSI para localização de substâncias nos estudos de distribuição cutânea.....	24
3.2.3.1 Instrumento.....	24
3.2.3.2 Preparo da amostra.....	25
3.2.4 Análise da ocorrência do GOYA no meio líquido receptor e em tecidos por	

UPLC-MS/MS.....	25
3.2.4.1 Instrumento.....	25
3.2.4.2 Preparo das amostras.....	27
3.3. Ensaio de permeação e distribuição em sistema nervoso central (modelo inseto).....	27
3.3.1. Permeação de goyazensolido em cérebro de gafanhoto.....	27
3.3.1.1 Modelo ex vivo.....	28
3.3.1.2 Modelo in vivo.....	29
3.3.1.3 Determinação de GOYA em amostras de gafanhoto por UPLC-MS/MS...	30
3.3.1.4 Avaliação da distribuição de GOYA por DESI-MS.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Isolamento da lactona sesquiterpênica goyazensolido.....	34
4.2 Estudos de distribuição cutânea.....	37
4.2.1 Minoxidil.....	37
4.2.1.1 Análise por MALDI-MSI para localização de MINOX na pele.....	37
4.2.2 Doxorrubicina.....	43
4.2.2.1 Análise por MALDI-MSI para localização de DOXO na pele.....	43
4.2.3 Goyazensolido.....	46
4.2.3.1 Análise por MALDI-MSI para localização de GOYA na pele.....	46
4.2.3.2 Análise da ocorrência do GOYA no meio líquido receptor e em tecidos por UPLC-MS/MS.....	48
4.3. Ensaio de permeação e distribuição em sistema nervoso central (modelo inseto).....	49
4.3.1 Permeação de goyazensolido em cérebro de gafanhoto.....	49
4.3.1.1 Modelo ex-vivo.....	49
4.3.1.2 Modelo in vivo.....	51
5. CONCLUSÃO.....	61
6. REFERÊNCIAS.....	63

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Visão geral da proposta

A química de produtos naturais tem sido o foco de diversos grupos de pesquisa e possui um papel importante no descobrimento de novas substâncias. A busca por novos ativos tem encorajado muitos pesquisadores a colaborarem e trabalharem juntos aplicando as melhores ferramentas para a descoberta e seleção dos melhores candidatos para ensaios pré-clínicos e estudos mais aprofundados.

O grupo de pesquisa NPPNS (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos) vem trabalhando com a família Asteraceae nos últimos anos e tem reportado uma variedade de substâncias novas, com destaque para o grupo das lactonas sesquiterpênicas (LST). Diversas atividades farmacológicas são atribuídas para as LST como anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica, tripanossomicida e citotóxica. As LST são conhecidas como um dos maiores grupos de substâncias oriundas de plantas da família Asteraceae com propriedades citotóxica e antitumoral (KELES et al., 2010).

Com esse suporte de informações e abundância de dados relatados na literatura, o grupo NPPNS viu nesta classe de substâncias uma oportunidade para explorar esse potencial antitumoral assim como sua distribuição e metabolismo. Assim, um projeto envolvendo diversos pesquisadores em diferentes áreas foi elaborado, a fim de entender melhor o mecanismo de ação dessas substâncias (figura 1).

Figura 1. Estudos de farmacocinética e atividade antitumoral aplicando a espectrometria de massas como principal ferramenta nos ensaios pré-clínicos.

O projeto, que engloba estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de lactonas sesquiterpênicas e sua atividade antitumoral frente a diferentes linhagens celulares, principalmente linhagens do sistema nervoso central e pele, apresenta a espectrometria de massas como uma ferramenta fundamental para compreensão dos processos envolvidos nos ensaios pré-clínicos com essas substâncias. Neste trabalho será abordado principalmente o poder de absorção e distribuição dessas substâncias em pele e em sistema nervoso central, utilizando a lactona sesquiterpênica goyazensolido (figura 2) como substância representativa da classe.

Figura 2. Estrutura química da lactona sesquiterpênica goyazensolido.

Os ensaios de penetração cutânea fornecem informações fundamentais durante a etapa de desenvolvimento de sistemas de liberação tópico e transdérmico, bem como a compreensão do comportamento de substância desconhecidas em relação a sua distribuição na pele. O monitoramento da penetração de substâncias através da pele e sua quantificação nas diferentes camadas tem sido desafiador uma vez que as técnicas existentes possuem diversas limitações e a matriz biológica apresenta-se como um interferente significativo nessas análises.

Para compreender melhor a absorção e distribuição de substâncias no tecido cutâneo nos ensaios de distribuição em pele faz-se necessário um método adequado. Os métodos atualmente utilizados na determinação da localização de substâncias nesse órgão após ensaio de penetração, como a microscopia confocal de varredura a laser, por exemplo, demandam a fluorescência da molécula, característica que não é comum a muitas substâncias.

Com isso, esse estudo propõe o desenvolvimento de um método de geração de imagem por espectrometria de massas para determinação de substâncias de baixa massa molecular na pele. Esta pode se tornar uma ferramenta importante, uma vez que substâncias que não apresentam fluorescência podem ser identificadas através de sua ionização direta e geração de espectro de massas e confirmação por seu padrão de fragmentação, possibilitando assim seu mapeamento no tecido.

Sendo assim, foi avaliada a penetração cutânea do GOYA nas camadas da pele através da geração de imagens por espectrometria de massas (MALDI-MSI). Para isso estudos de penetração in vitro utilizando célula de Franz foram realizados, e o método de geração de imagem foi validado por substâncias com perfil de penetração já conhecidos e descritos na literatura, que sendo elas o minoxidil e a doxorrubicina.

Estudos recentes revelaram que modelos *in vivo* e *ex vivo* utilizando gafanhoto são capazes de discriminar o transporte de substâncias pela barreira-hematoencefálica (BHE) entre difusão paracelular e transcelular, da mesma forma como ocorre em vertebrados. Assim, esses modelos representam um poder de predição da permeabilidade à BHE que pode ser aplicado na etapa de descoberta de novas substâncias ativas, informação muito interessante para comunidades científicas, bem como P&D em indústrias farmacêuticas, contudo, esse modelo ainda não está disponível no Brasil.

Para estes ensaios, a espectrometria de massas apresenta-se como uma ferramenta importante, permitindo a avaliação da absorção e distribuição de substâncias, bem como seu metabolismo. Neste trabalho a proposta é avaliar a distribuição da LST goyazensolido em sistema nervoso central utilizando o modelo de gafanhoto proposto por Nielsen e colaboradores (2011) e Anderson et al (2013), aplicando as técnicas de LC-MS e DESI-MSI como ferramentas de análise.

1.2 Lactonas sesquiterpênicas

Aproximadamente 10% da flora mundial são representados pela família Asteraceae, que tem sido extensivamente estudada como uma das maiores famílias Angiospermae. A família Asteraceae é caracterizada não somente por sua taxonomia e diversidade morfológica, como também pela abundância de metabólitos secundários que ela apresenta (BREMER, 1994). Quimicamente, a família Asteraceae é conhecida pela sua capacidade de biossintetizar uma grande diversidade de metabólitos secundários. Os gêneros *Eremanthus* e *Lychnophora* são os mais numerosos na subtribo Lychnophorinae, pertencente à tribo Vernoniae da família Asteraceae (Compositae), e sua composição química tem sido extensivamente estudada, revelando os terpenóides como a classe de metabólitos mais abundante presente nestes gêneros, representando até 70%, seguidos pelos flavonóides, que representam 17% da composição química (CALABRIA et al, 2009 e KELES 2010).

No tocante a classificação estrutural, lactonas sesquiterpênicas são divididas em diversos grupos, sendo os de esqueleto furanoeliangolido dos tipos goyazensolido e eremantolido os mais comuns na subtribo Lychnophorinae. Os furanoeliangolidos do tipo goyazensolido (figura 2) demonstram alta atividade antiinflamatória por inibição do mediador central da inflamação NF-kB *in vitro* por

alquilação seletiva, e pode estar relacionado com a oncogênese, por desencadeamento da proliferação celular e inibição da apoptose, o que torna este fator de transcrição um alvo interessante na terapia antitumoral (SANTOS et al., 2005). Contudo estudos in vivo demonstraram a ausência de atividade antiinflamatória e alta atividade citotóxica (BIGRAGÃO et al., 2004).

Santos e colaboradores realizaram ensaios para avaliação do potencial anticancerígeno do goyazensolido, onde sete linhas de células tumorais foram tratadas com concentrações crescentes do composto isolado (0.04 a 2.5 mg mL⁻¹) e comparadas aos medicamentos controles antitumorais doxorrubicina e etoposídeo. O goyazensolido demonstrou maior atividade antitumoral que o controle etoposídeo, no entanto menor que a doxorrubicina, obtendo valores de IC₅₀ na ordem de 0.06 µg mL⁻¹ para células leucêmicas e 0.75 µg mL⁻¹ para células de melanoma (SANTOS et al., 2005).

Como citado anteriormente espécies do gênero *Eremanthus*, da família Asteraceae, acumulam quantidades significativas de lactonas sesquiterpênicas em adição a flavonóides, poliacetilenos, triterpenos, sesquiterpenos entre outros (GOUVEA et al., 2012). Suas populações são amplamente distribuídas na área oeste do Planalto Central do Brasil, em altitudes que variam de 500 a 1.000 m no Cerrado. Como já destacado, estudos de obtenção de princípios ativos isolados dessa espécie demonstraram alto teor e um bom rendimento de lactonas sesquiterpênicas do tipo goyazensolido (SOUSA et al., 2012), sendo assim essa espécie foi escolhida para a obtenção e isolamento do goyazensolido no presente trabalho.

A descoberta de novos ativos anticâncer de ocorrência natural é algo a se considerar, uma vez que menos de 2% das plantas superiores foram avaliadas para detecção de constituintes com atividade neoplásica, buscando principalmente a atividade citotóxica (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Considerando a importância farmacológica que a classe de metabólitos secundários das lactonas sesquiterpênicas representa, e os resultados obtidos em estudos de citotoxicidade, como exemplo o estudo de atividade antitumoral in vitro realizado por Santos e colaboradores com a substância goyazensolido, torna-se evidente a necessidade da avaliação mais detalhada da atividade antitumoral do composto goyazensolido.

Apesar da maioria dos ativos antitumorais serem selecionados por sua capacidade de controlar a proliferação celular, atividades específicas contra alguns

mecanismos metabólicos da célula tumoral têm sido consideradas importantes e devem ser investigadas, sendo necessário, portanto, ensaios com esses novos alvos terapêuticos (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Espécies vegetais contendo lactonas sesquiterpênicas estão distribuídas em várias regiões no mundo e seu uso popular medicinal é frequente, incluindo uso tópico. Sendo assim torna-se importante a caracterização dos seus efeitos tóxicos e a elucidação da sua cinética de absorção para que os riscos envolvidos no contato com essas substâncias sejam avaliados.

As informações acima justificam e estimulam o desenvolvimento de protocolos de estudo de distribuição cutânea do composto goyazensolido utilizando o modelo *in vitro* de célula de difusão de Franz para avaliação da sua capacidade de penetração na pele, bem como em modelos de distribuição no sistema nervoso central. Para essa avaliação a aplicação de técnicas de geração de imagens por espectrometria de massas como MALDI-MSI e DESI-MSI apresenta um grande interesse apesar de ainda muito pouco exploradas e conhecidas.

1.3 Modelos de estudo de distribuição

1.3.1 Ensaios de distribuição cutânea

A pele é o maior órgão do corpo humano e sua principal função é a proteção do organismo frente a diversidades do meio externo, incluindo agentes físicos, químicos e biológicos. Essa eficiente barreira contra penetração de substâncias exógenas, por ser tão eficiente, torna-se um fator limitante para a terapêutica cosmética (BARRY et al., 2004).

A pele é constituída pelas camadas de epiderme, derme e hipoderme, sendo que esta última não possui um papel na penetração cutânea de substâncias, pois se situa abaixo do sistema vascular, sendo importante como reserva de gordura e por sua propriedade isolante e protetora. A derme é constituída por fibras de colágeno, responsáveis pela elasticidade da pele. Sua camada superior é formada por papilas que se projetam em direção à epiderme e apresenta os vasos sanguíneos e linfáticos, bem como as terminações nervosas e apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas). A epiderme por sua vez é dividida em epiderme viável e estrato córneo. A epiderme viável trata-se da parte mais interna, onde há proliferação celular. O estrato córneo por sua vez, possui em sua composição ceramidas, ácidos graxos livres, esteroides e triacilgliceróis e assim, é

considerada a maior barreira para difusão percutânea de substâncias (JUNQUEIRA et al., 2004).

O estrato córneo pode ser atravessado por três vias distintas. São elas: intercelular, transcelular e via apêndices cutâneos. Essa capacidade de penetração por sua vez, vai depender das características físico-químicas da substância, que nas condições ideais trata-se de substâncias de baixa massa molecular (< 500 Da), com lipofilicidade para permearem através das camadas da epiderme e claro, que seja uma substância potente, que em baixa concentração é capaz de atingir o efeito terapêutico (GRATIERI et al., 2008).

Quando essas condições não são favoráveis, há a opção de uso de promotores de absorção como componentes da formulação, ou o uso de técnicas que favorecem essa penetração, como por exemplo, a iontoforese, onde há aplicação de uma corrente elétrica que promove a penetração através dos anexos da pele e também via intercelular.

Ensaio *in vitro* e *in vivo* são aplicados para estudos de perfil de penetração de substâncias na pele, com aplicações tópicas e transdérmicas, e são exigidos pelos órgãos reguladores para formulações com essa finalidade. Esses estudos são de extrema importância na fase de desenvolvimento de novas formulações, pois fornecem resultados sobre o perfil de penetração, a rota de permeação, o mecanismo de ação de sistemas carreadores e a determinação da substância nas diferentes camadas da pele (DEPIERE et al., 2015).

O modelo mais utilizado para avaliação do estudo de cinética de absorção cutânea de substâncias é o *in vitro*, utilizando o modelo de célula de Franz. Esse modelo é composto por um compartimento doador, onde a substância, em sua formulação, é aplicada; um compartimento receptor, que contém a solução na qual a substância será difundida, e entre o compartimento receptor e doador encontra-se a membrana, que faz o papel de barreira na penetração de substâncias (FRANZ, 1975). Neste modelo os parâmetros como tipo de membrana, temperatura do experimento, agitação, composição do meio receptor e doador, podem ser ajustados, de forma a mimetizar ao máximo as condições fisiológicas no organismo. Esses parâmetros podem ser determinados utilizando, por exemplo, os guias de estudo de penetração *in vitro* (OECD, 2004).

Dentre as membranas que podem ser utilizadas para os estudos de penetração *in vitro* estão as membranas de origem sintéticas e as de origem animal,

sendo as de pele humana ideais, mas de uso limitado devido principalmente, a disponibilidade e aprovação em comitê de ética. Alternativas como pele de porco, camundongo, rato, primatas, cobaias e cobra são amplamente aplicadas (DEPIERE et al., 2015). Neste estudo, optamos pelo uso da pele de orelha de porco.

1.3.2 Ensaios de distribuição em sistema nervoso central

A barreira hematoencefálica (BHE) é um dos maiores obstáculos na descoberta de novas drogas para o tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central (SNC), uma vez que a mesma tem o propósito de proteger o microambiente presente no cérebro, incluindo principalmente a seleção de entrada de substâncias. Por essa razão, os programas de pesquisas relacionadas a descobertas de novas drogas para o tratamento de doenças relacionadas ao SNC requerem informações prévias sobre a habilidade de permeação da substância ao SNC para que seja atingido seu alvo. Em contrapartida, pesquisas envolvendo substâncias com ação nos órgãos periféricos também necessitam de investigação frente a sua permeabilidade na BHE para evitar efeitos colaterais no SNC. Portanto, torna-se muito importante conhecer a permeabilidade a BHE da substância em estudo durante sua etapa de descoberta, o que torna os modelos de predição de permeação a BHE fundamentais (NIELSEN et al., 2011).

A concentração de uma substância no cérebro vai depender de vários fatores como sua concentração plasmática (farmacocinética), sua taxa de ligação à proteína plasmática, sua permeabilidade a BHE (passiva ou por mecanismos mediados por proteínas), sua modificação metabólica frente a enzimas presentes na BHE, e a constante drenagem e secreção do fluido cerebral intersticial e cerebroespinal. Atualmente existem métodos disponíveis para todas essas determinações, no entanto para a maioria das substâncias uma informação completa é de difícil obtenção. Para isso, diversas tecnologias podem ser aplicadas para estimar o comportamento dessas substâncias frente à BHE, passo fundamental para a compreensão da sua relação com o SNC (ABBOTT, 2004).

O trabalho publicado por Abbott (ABBOTT, 2004) discute a predição da permeabilidade a barreira hematoencefálica através de estudos com modelos in vivo, in vitro e in silico. Neste trabalho o autor faz uma comparação entre os modelos existentes em cada categoria, apontando as vantagens e desvantagens de cada um. Com esses resultados conclui-se que uma combinação desses ensaios é necessária

para um resultado representativo da permeabilidade de substâncias no SNC, bem como mecanismos de efluxo que podem estar envolvidos nesta etapa. Assim, dependendo o avanço na descoberta e grau de desenvolvimento da substância de interesse existe um ensaio o qual deve ser aplicado. Durante o processo de descoberta é possível o uso de um modelo *in silico* ou não baseado em células para que sejam selecionadas substâncias promissoras. Após essa etapa, durante a fase de identificação e otimização, requer-se um estudo utilizando células e que seja reprodutível e confiável.

O modelo *in silico* mais utilizado é o baseado no estudo de relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR), ideal para uma determinação preliminar de permeação a BHE, sendo capaz de identificar substâncias de interesse. Durante a etapa de otimização desses resultados faz-se necessário um conhecimento mais aprofundado dos efeitos estruturais da substância nos mecanismos de efluxo na difusão paracelular e transcelular cerebral. Para isso modelos utilizando células são necessários. Os modelos *in vitro* mais comuns utilizam células de origem não cerebral, como por exemplo, a caco-2, que difere muito das células cerebrais, principalmente em relação à presença de transportadores de membrana. Assim, novos modelos são imprescindíveis para os estudos de permeabilidade a BHE que mimetizem a BHE de mamíferos.

O modelo de triagem de permeação a BHE utilizando gafanhoto proposto por Nielsen e colaboradores (NIELSEN et al., 2011) preenche esses requisitos e ainda tem um custo menor em relação aos ensaios *in vitro*, o que o torna atrativo para os grupos de pesquisa e indústrias farmacêuticas. Eles demonstraram que os modelos *in vivo* e *ex vivo* utilizando gafanhoto é capaz de discriminar o transporte por difusão paracelular e transcelular de substâncias através da barreira cérebro-hemolinfa, assim como ocorre em vertebrados. Assim, esse modelo seria ideal para avaliação da permeabilidade de substâncias à BHE na etapa de descoberta de novas drogas (ANDERSSON et al., 2013).

Nielsen e colaboradores apresentaram diversas vantagens em se trabalhar com o modelo inseto, como sua similaridade com a barreira cerebral biológica natural, que mantém sua integridade e funções biológicas durante o experimento, assim como ocorre nos experimentos *in vivo* com vertebrados. Além disso, permite o ensaio com substâncias que apresentam baixa solubilidade, usualmente não compatíveis com os agentes solubilizantes utilizados nos ensaios *in vitro*. E

finalmente, para a realização destes ensaios a quantidade de substância necessária é muito pequena, o que se torna uma vantagem, principalmente quando se trabalha com substâncias de alto valor comercial ou ainda, substâncias isoladas de origem animal ou vegetal.

No estudo de Olsen e colaboradores o metabolismo do anti-histaminico terfenadina, substrato da enzima CYP3A4, em gafanhotos foi avaliado. Este estudo revelou que os mesmos metabólitos encontrados no metabolismo de fase I em humanos foram encontrados na hemolinfa e fezes dos gafanhotos, o que indica que os gafanhotos provavelmente possuem uma enzima com atividade bem similar a CYP3A4, exclusiva em mamíferos. Essa informação torna-se útil não somente aos estudos de permeação a BHE, mas também em estudos de metabolismo de fase I, gerando dados sobre possíveis metabólitos (OLSEN et al., 2015).

1.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas atualmente é uma ferramenta fundamental para os estudos de metabolismo no desenvolvimento de novas drogas. As técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas sequenciais apresentam alta seletividade e sensibilidade e assim se tornaram uma ferramenta padrão para a determinação de ativos em experimentos *in vitro* e *in vivo* (HSIEH, CHEN, KORFMACHER, 2007). No entanto essa técnica tem a limitação de não fornecer diretamente informações sobre a distribuição espacial de ativos e seus metabólitos nos tecidos.

Alternativamente a técnica de geração de imagens e análise de ativos utilizando a ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *Matrix Assisted Lazer Desorption/Ionization*), acoplado a um analisador de massas, por exemplo, um analisador por tempo de voo (TOF) (TANAKA, 2003). A técnica da MALDI-TOF consiste no uso de uma matriz capaz de fornecer prótons (H^+) para o processo de ionização dos componentes da amostra. Essa matriz absorve a energia emitida pelo laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os analitos da amostra, ocorrendo o processo de dessorção, que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso. Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são direcionados então para o analisador TOF, onde são acelerados através de um campo elétrico, a pressão reduzida (rotineiramente denominado de

vácuo) até que atinjam o detector. Neste percurso, os componentes da amostra são separados de acordo com suas m/z , chegando ao detector em diferentes tempos. Com essa técnica torna-se possível a geração de imagens por espectrometria de massas (MSI), na qual a um corte de tecido, animal ou vegetal, é aplicada a matriz solubilizada em um solvente, capaz de extrair o analito para a superfície do tecido; ao secar a matriz se cristaliza, e então disparos do laser são realizados e ocorre o processo de dessorção. Os íons resultantes são separados pelo analisador TOF de acordo com suas m/z , e as imagens são formadas pelo conjunto de íons detectados, sendo possível isolar e selecionar um único íon de interesse e, portanto, avaliar a sua localização no tecido. Essa imagem poderá ser correlacionada diretamente com os dados morfológicos do tecido, sendo possível a avaliação do mesmo corte, ou cortes seriados (BALLUFF, B.; SCHOME, C.; HOFER, H., 2011; COLE, 2010).

O acoplamento da fonte de MALDI com o analisador TOF permite a análise de uma extensa faixa de m/z e apresenta inúmeras vantagens, como a tolerância a contaminantes, tampões, alta sensibilidade, análises rápidas comparadas a outras técnicas, e simples instrumentação. Apesar do número de vantagens, MALDI-MSI é uma técnica desenvolvida inicialmente para análise de peptídeos e proteínas, e, portanto pouco utilizada para análise de substâncias de baixa massa molecular (< 750 Da). Isso ocorre, principalmente devido à interferência dos íons da matriz e da amostra (matriz biológica). Assim, diversos estudos têm sido desenvolvidos a fim de melhorar o processo de preparo de amostras, bem como a descoberta de novas matrizes para ionização desses compostos (COHEN; GUSEV, 2002; KAMPEN, 2011).

O monitoramento da penetração de substâncias através da pele e sua quantificação nas diferentes camadas tem sido um grande desafio bioanalítico devido a vários fatores críticos como o limite de detecção das substâncias, bem como a interferência dos componentes da matriz biológica nas análises. Técnicas de microscopia e espectroscopia têm sido amplamente utilizadas para essa finalidade e são capazes de fornecer resultados satisfatórios. No entanto, muitas vezes é necessária a combinação de duas técnicas para uma maior segurança dos dados. Também ocorre uma não uniformidade de algumas técnicas para todos os analitos, ou seja, não são aplicáveis a todas as substâncias de uma mesma formulação. Um exemplo é a técnica de microscopia de fluorescência que é capaz de fornecer informações espaciais e quantitativas referente à penetração de substâncias na pele,

no entanto é necessário que a molécula apresente fluorescência, que pode ser uma característica intrínseca, ou adquirida através de reações de acoplamento com moléculas contendo grupamento fluorocromo (DEPIERI et al., 2015).

A fluorescência não é uma característica comum a muitas substâncias e as moléculas de escolha para marcadores fluorescentes, como exemplo isotiocianato de fluoresceína, 4-nitrobenzol oxadiazol e sulforodamina, apresentam uma massa molecular próximo a muitas micromoléculas, e que podem alterar as características físico-químicas da substância em que se deseja avaliar o comportamento de penetração (BOLZINGER et al., 2012). É o caso da lactona sesquiterpênica goyazensolido que possui massa molecular de 360 Da e que a adição de um fluorocromo de massa molecular semelhante seguramente irá interferir nos resultados positivos ou negativos encontrados. Uma alternativa que vem ganhando força é o emprego da técnica de geração de imagem por espectrometria de massas (MSI), devido à capacidade de análise de substâncias que, por exemplo, não apresentam fluorescência. Nesse processo as substâncias poderiam ser identificadas através de sua ionização (íon precursor) e geração de espectro de massas em alta resolução e por seu padrão de fragmentação, possibilitando assim seu mapeamento no tecido e sua cinética de absorção.

Com a técnica de geração de imagens por espectrometria de massas é possível a obtenção da distribuição espacial da composição química de uma amostra. Essa técnica consiste em alguns passos fundamentais como demonstra a figura 3. Primeiramente há o preparo da amostra, que envolve diversas preparações e etapas para que ocorra a ionização e dessorção das moléculas da superfície da amostra. Para isso MALDI utiliza uma matriz orgânica ou coloidal que auxilia nesses processos. À medida que os íons são emitidos das amostras para o espectrômetro de massas e o analisador de massas (íon trap, TOF, ICR, OrbiTrap), o detector registra a razão massa sobre a carga (m/z) dos analitos. Dependendo da concentração do analito na amostra os íons terão distribuições relativas diferentes na varredura feita pelo espectrômetro de massas. No resultado final o íon de interesse pode ser isolado do *full scan* obtido e representado por uma cor, que sobreposta a um escaneamento da amostra que foi submetida à análise, gera uma imagem, na qual é possível observar a distribuição espacial e intensidade do íon no órgão de interesse. Quanto maior a intensidade do íon no espectro de massas,

maior será a intensidade da cor apresentada na sua imagem 2D (ESQUENAZI, et al., 2009).

Figura 3. Representação esquemática do fluxo de trabalho de uma análise por MALDI-MSI. Adaptado de Li et al., 2014.

A ionização de dessorção por eletrospray (DESI) é uma técnica de ionização ambiente descrita pela primeira vez em 2004 por Takats e seus colaboradores, e desde então tem sido amplamente aplicada em diversas áreas como química ambiental, análises farmacêuticas, análises forenses, química de alimentos e histopatologia através da geração de imagens (TAKATS et al., 2004; TILLNER et al., 2016) .

Essa técnica de ionização utiliza um eletrospray gerado por um fluxo baixo (0.5 a $10.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) de solvente, a aplicação de um gás nebulizador (nitrogênio) e um potencial de voltagem alto (4 a 5 kV) resultando em um feixe de microgotas carregadas. Quando esse feixe é direcionado a uma superfície, a mesma será umedecida e a extração, dessorção e ionização ocorrerão simultaneamente a partir do ponto de amostra situado abaixo do spray, como pode ser observado na figura 4 (TAKATS et al., 2004).

Figura 4. Representação esquemática de um experimento com DESI (TAKATS et al., 2004).

A técnica de geração de imagem utilizando DESI como fonte de ionização (DESI-MSI) foi aplicada pela primeira vez no trabalho de Wiseman e colaboradores (WISEMAN et al, 2005; WISEMAN et al., 2006) com estudos de distribuição lipídica em pâncreas de camundongo, cérebro de rato e tecido de fígado humano com metástase. Com esses estudos desenvolvidos com a técnica de DESI-MSI podemos concluir que apesar da resolução espacial não ser tão boa quanto para MALDI-MSI os resultados mostram-se promissores, colocando DESI-MSI como uma nova opção para geração de imagem por espectrometria de massas.

A técnica de DESI apresenta algumas vantagens como, por exemplo, a análise ser realizada em condições ambientes e diretamente na amostra, sem necessidade de um preparo elaborado da mesma, ou a aplicação de uma matriz. Outra vantagem em relação a outras técnicas de geração de imagem, como por exemplo, MALDI-MSI, é que tradicionalmente as análises realizadas por MALDI são preferencialmente feitas em modo positivo, enquanto que para DESI tanto o modo positivo quanto negativo funcionam igualmente bem. Isso ocorre, pois os princípios dessa técnica são muito similares aos utilizados na técnica normal de eletrospray, fazendo com que essa técnica seja aplicável a uma grande diversidade de substâncias.

No entanto como ocorre em todas as técnicas de obtenção de imagem que utilizam spray, o fator limitante para a resolução espacial é o tamanho do ponto de ionização. Num experimento de DESI o spray não pode ser ajustado da mesma

forma como o foco do laser na técnica de MALDI é ajustado. O tamanho do ponto de ionização é em torno de 200 μm , já para o MALDI valores de 5 μm são encontrados. Com a otimização dos parâmetros da análise por DESI, como por exemplo, geometria do spray em relação à superfície e entrada do capilar para o espectrômetro de massas, a composição e a vazão do solvente e do gás de nebulização, essa resolução espacial pode aumentar para 100, podendo chegar até a 50 μm , como relatado na literatura (CAMPBELL et al., 2012; TILLNER et al., 2016).

O grupo de pesquisa de Janfelt e seus colaboradores tem explorado a técnica de DESI-MSI em diferentes áreas como, por exemplo, em produtos naturais, com o estudo de metabólitos em folhas e flores (LI et al., 2013), estudos de metabolismo e transporte de substância através da pele (D'ÁLVISE et al., 2014) e recentemente a distribuição de substâncias e seus metabólitos em estudos com modelo de gafanhoto (OLSEN et al., 2015; OLSEN et al., 2016).

Tendo em vista o uso das técnicas de geração de imagem MALDI e DESI-MSI como ferramentas importantes nos estudos de metabolismo, mesmo que ainda pouco exploradas, este trabalho propõe o desenvolvimento de métodos utilizando MALDI e DESI-MSI para análise de tecidos em estudos de distribuição de substâncias na pele e em sistema nervoso central.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo principal o estudo de absorção e distribuição cutânea e em sistema nervoso central da lactona sesquiterpênica goyazensolido utilizando método desenvolvido com as técnicas de geração de imagem por espectrometria de massas MALDI-MSI e DESI-MSI.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção e isolamento da lactonas sesquiterpênica goyazensolido a partir das folhas de *Eremanthus mattogrossensis*.
- Ensaio de distribuição cutânea utilizando modelo in vitro de célula de Franz.
- Desenvolvimento de um método por MALDI-MSI para localização de Minoxidil, Doxorubicina e goyazensolido na pele de orelha de porco.
- Desenvolvimento de um método por UPLC-MS/MS para determinação de goyazensolido na pele de orelha de porco e no meio receptor de célula de Franz.
- Ensaios de distribuição em sistema nervoso central utilizando modelo ex vivo e in vivo de inseto (gafanhoto).
- Desenvolvimento de um método por DESI-MSI para localização de goyazensolido em gafanhoto.
- Desenvolvimento de um método por UPLC-MS/MS para determinação de goyazensolido em cérebro, hemolinfa e fezes de gafanhoto.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento da lactona sesquiterpênica goyazensolido

3.1.1 Obtenção de espécimes de *Eremanthus mattogrossensis*

As partes aéreas (folhas) de *Eremanthus mattogrossensis* Less. foram coletadas no cerrado nos arredores do reservatório de Furnas, no sudoeste de Minas Gerais, Brasil. Para tais estudos químicos, foi concedida a autorização de acesso ao patrimônio genético no CNPQ, sob o número 010174/2011-7. A identificação do material foi realizada pelo Professor João Semir do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista (UNICAMP). As exsicatas contendo a informação da espécie e o georreferenciamento encontram-se depositados no herbário da Unicamp com a entrada NPL-EM aguardando numeração final.

3.1.2 Obtenção e isolamento de goyazensolido

A lactona GOYA foi isolada a partir da lavagem com solvente orgânico das folhas secas de *Eremanthus Mattogrossensis* por metodologia descrita na literatura (SOUSA et al., 2012), em colaboração com o aluno de pós-doutoramento João Paulo Barreto de Sousa. A substância isolada foi submetida à espectrometria de massas de alta resolução e ressonância magnética nuclear (RMN) para confirmação estrutural. Para a determinação da massa em alta resolução foi utilizado um espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupolo e tempo de voo (UltraTOF-QBruker- Daltonics) com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo. Foram realizadas análises de RMN para ^1H e ^{13}C , utilizando o equipamento espectrômetro Bruker-Advance modelo DRX 400, operando em 400 MHz para as análises de ^1H e espectrômetro Bruker-Advance modelo DPX 300, operando em 75 MHz para as análises de ^{13}C . As amostras foram preparadas no solvente CDCl_3 . Os resultados obtidos foram comparados com dados já publicados na literatura.

3.2 Estudos de distribuição cutânea

A proposta deste estudo é a aplicação da técnica de MALDI-MSI para avaliação da distribuição de substâncias de baixa massa molecular na pele. Para isso foram selecionadas as substâncias doxorubicina (DOXO), sulfato de minoxidil (MINOX) e da lactona sesquiterpênica goyazensolido (GOYA). As escolhas foram baseadas em propriedades físico químicas dos analitos, nos estudos prévios existentes na literatura e no interesse de nosso grupo em avançar nas investigações

com produtos naturais farmacologicamente ativos provenientes de espécies da família Asteracea. As duas primeiras substâncias possuem estudos de permeação já estabelecidos e descritos na literatura por técnicas espectroscópicas podendo, portanto, ser utilizadas para validação da técnica de MALDI-MSI. Com relação às propriedades fisicoquímicas, esses dois analitos possuem significativa diferença em relação à existência de cromóforos, ponto esse que consideramos chave nessa etapa de investigação uma vez que trata-se de ionização que se utiliza de fonte de laser. Finalmente, a lactona sesquiterpênica goyazensolido tem apresentado significativa atividade em ensaios de citotoxicidade contra diferentes linhagens de células tumorais de pele e do sistema nervoso central. Além disso, mais recentemente relevou também uma significativa ação sobre linhagens de Leishmaniose em modelos cutâneos (dados em fase de proteção pelo INPI). Ambos esses fatos de relevância para nosso grupo e justificam nosso interesse.

3.2.1 Reagentes

Doxorrubicina foi doada gentilmente por Zodiac Produtos Farmacêuticos S.A. (Pindamonhangaba, Brasil). Sulfato de minoxidil foi gentilmente doado por Galena Química e Farmacêutica Ltda (Campinas, Brasil). Goyazensolido foi isolado a partir de método descrito em literatura (SOUSA et al., 2012). HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfônico), metanol e etanol foram obtidos por J.T. Baker. Monoleína foi obtida pela Kerry do Brasil (Campinas, Brasil). Propilenoglicol foi obtido da Synth (Diadema, Brasil). Água ultrapura 18 mΩ (Direct-Q, Millipore, USA).

3.2.2 Ensaio in vitro – Célula de Franz

Para a realização dos experimentos de distribuição in vitro com as substâncias MINOX, DOXO e GOYA foram utilizadas células de difusão verticais tipo “Franz” (area = 0.8 cm²), compostas por dois compartimentos: compartimento doador e compartimento receptor, e pele de orelha de porco dermatomizada (700 µm) como membrana foi colocada entre os dois compartimentos com o estrato córneo voltado para o compartimento doador (figura 5). As orelhas foram obtidas diretamente do abatedouro Olhos d’Água (Ipuã-SP). A resistividade de cada pele foi medida e para resistividades elétricas iniciais de <50kΩ cm² as peles foram consideradas danificadas e então descartadas (LOPEZ et al., 2011).

Figura 5. Representação esquemática da célula de Franz.

3.2.2.1 Minoxidil

A solução de minoxidil foi preparada de acordo com método descrito por Gelfuso e colaboradores (2013). Brevemente, sulfato de minoxidil foi dissolvido em etanol:água (60:40, v/v) sob aquecimento na concentração de 2.0% (p/v) (69.1 mmol L^{-1}). O pH da solução foi ajustado para 5.5 com uma solução de NaOH 1.0 mol L^{-1} . A mesma solução sem o minoxidil foi utilizado como controle nos experimentos.

Permeação passiva

Nos estudos de permeação passiva o compartimento doador foi preenchido com 2.0 mL de formulação contendo minoxidil ou controle e coberto com Parafilm® para prevenir evaporação. No meio receptor foi utilizado uma solução de tampão fisiológico composto por 25 mmol L^{-1} HEPES e 133 mmol L^{-1} de NaCl com pH 7.4, sob agitação constante a 300 rpm. Foram feitas três séries de experimentos em duplicata. Na primeira série a pele foi analisada após 1 h de contato com a formulação; na segunda série após 3 h de contato e na terceira série após 6 h de contato. Ao término do experimento, as peles foram removidas das células de difusão, lavadas com água destilada de modo a remover toda a formulação, e armazenadas em freezer -80°C .

Permeação iontoforética

O estudo de permeação iontoforética foi conduzido nas mesmas condições do experimento de permeação passiva, no entanto, foi aplicado uma corrente de 0.4 mA (0.5 mA cm^{-2}). A iontoforese anódica foi conduzida pela inserção de um eletrodo positivo no compartimento doador. Os eletrodos Ag/AgCl foram preparados de

acordo o trabalho de Green e colaboradores (1991) e uma corrente elétrica constante foi passada pelos eletrodos através de uma fonte de energia (Futron Data ACC 200.2.20, Brazil).

3.2.2.2 Doxorubicina

Permeação passiva

Para os estudos de permeação passiva foi preparada uma solução de doxorubicina contendo 0.1% (p/p) de DOXO, 5.0% (p/p) de monoleína e propilenoglicol suficiente, de acordo com o método descrito por Heraí et al. (2007). Uma solução controle foi preparada como descrito acima, mas sem DOXO. O compartimento doador foi preenchido com 2 mL da solução de DOXO e o compartimento receptor com tampão fosfato (pH 7.4), sendo mantido sob constante agitação a 300 rpm. Foram feitas três séries de experimentos em duplicata. Na primeira série a pele foi analisada após 1 h de contato com a formulação; na segunda série após 3 h de contato e na terceira série após 6 h de contato. Ao término do experimento, as peles foram removidas das células de difusão, lavadas com água destilada de modo a remover toda a formulação, e armazenadas em freezer -80°C.

Permeação iontoforética

O estudo de permeação iontoforética foi conduzido nas mesmas condições do experimento de permeação passiva, no entanto, foi aplicado uma corrente de 0.4 mA (0.5 mA cm^{-2}), assim como o experimento realizado com minoxidil.

3.2.2.3 Goyazenzolido

O ensaio in vitro com GOYA foi realizado nas concentrações 2.5 e 10.0% (p/v) dissolvido em propilenoglicol. O compartimento doador foi preenchido com 500 μL de solução de GOYA (2.5 e 10%), de modo a cobrir toda a superfície, e o compartimento receptor foi preenchido com etanol 20% (OECD, 2004). O experimento foi mantido sob agitação constante (300 rpm). Foram feitas três séries de experimentos em duplicata. Na primeira série a pele foi analisada após 1 h de contato com a formulação; na segunda série após 3 h de contato e na terceira série após 6 h de contato. Ao término do experimento, as peles foram removidas das células de difusão, lavadas com água destilada de modo a remover toda a

formulação, e armazenadas em freezer -80°C. O meio receptor também foi coletado ao final de cada experimento e armazenado em freezer -80°C.

Os estudos de permeação cutânea em célula de Franz foram realizados com a supervisão da Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3.2.3 Desenvolvimento de um método por MALDI-MSI para a localização de substâncias nos estudos de distribuição cutânea

3.2.3.1 Instrumento

Como citado acima, para o estudo de localização de substâncias na pele três substâncias foram analisadas: doxorubicina (DOXO), sulfado de minoxidil (MINOX) e goyazensolido (GOYA). O equipamento utilizado foi o UltrafleXtreme (BrukerDaltonics®) equipado com fonte de ionização por MALDI (laser do tipo *smartbeam*).

Para o desenvolvimento desse método foi necessário inicialmente definir a matriz adequada para ionização de cada substância. Para isso DOXO, MINOX e GOYA foram solubilizados em metanol:água (8:2), homogeneizados na proporção de 1:1 com diferentes matrizes (ácido 2,5 dihidroxibenzóico, ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, ácido sinapínico e ácido cafêico) e transferidos para uma placa metálica (Bruker®) em diferentes concentrações. Além disso, foi avaliada a adição de NaCl para favorecimento do íon sodiado no caso do GOYA, e também TFA para o íon protonado.

As condições instrumentais utilizadas para obtenção dos espectros foram: 500 laser *shots* por espectro, PIE (*pulsed ion extraction*) de 130 ns, modo positivo e frequência do laser de 1000 Hz. A voltagem do IS1 (*ion source 1*) foi de 25.00 kV e do IS2 (*ion source 2*) foi de 22.55 kV. O modo refletor foi utilizado, sendo aplicado as voltagens em RV1 (reflector) e RV2 de 26,60 e 13.35 kV, respectivamente. A intensidade do laser foi variada para melhor obtenção dos íons $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ dos analitos em cada matriz. Para a calibração externa do equipamento foi utilizada uma mistura de flavonóides (galangina, quercetina, isoquercetina e rutina). As imagens foram adquiridas com a resolução espacial de 50 μm .

3.2.3.2 Preparo da amostra

Para a análise do tecido, as peles de orelha de porco utilizadas no ensaio de distribuição (branco, controle, 1h, 3h e 6h) foram seccionadas transversalmente com espessura de 12 μm , utilizando um criostato rotativo Leica CM1860 (Leica[®]) operando a -25°C . Os cortes foram acondicionados em lâminas condutoras revestidas com óxido de índio e estanho (Bruker[®]), e então mantidas a -60°C até o momento da análise. Também foram preparadas lâminas com auxílio da fita adesiva de carbono dupla face para garantir a fixação das peles (GOODWIN et al., 2012). Cortes seriados foram acondicionados em lâminas para histologia, que posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina para análise histológica do tecido. As imagens foram obtidas em microscópio Leica DM 4000B acoplado a câmera digital científica DFC500, utilizando o programa LAS V3.8 para aquisição das imagens.

Para avaliação da influência da matriz biológica na ionização das substâncias na pele, amostras de pele branco foram contaminadas com as substâncias em concentrações variando de 0.5 a 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A essas amostras contaminadas foi aplicada a matriz previamente selecionada com o auxílio do ImagePrepTM da Bruker[®], um equipamento que alterna ciclos de aplicação da matriz e secagem (incubação) com atmosfera de N_2 . As lâminas foram colocadas então em um adaptador de lâminas para a análise por MALDI-MSI. As análises dos dados obtidos e a geração de imagens foram realizadas utilizando os softwares FlexImaging (Bruker[®]).

A partir das análises por MALDI-MSI realizadas com as amostras de pele contaminada foi possível a realização de ajustes tanto no preparo das amostras como composição e proporção do solvente extrator, concentração da matriz, ciclo de aplicação, incubação, secagem no ImagePrep e no modo de aquisição dos espectros. E assim, o procedimento estabelecido foi aplicado para as amostras obtidas nos ensaios in vitro de distribuição utilizando célula de Franz.

3.2.4 Análise da ocorrência do GOYA no meio líquido receptor e em tecidos por UPLC-MS/MS

3.2.4.1 Instrumento

Para determinação de GOYA nas amostras de meio receptor e pele foi utilizado um sistema ACQUITY TQD UPLC-MS Waters[®]. A separação

cromatográfica foi realizada com o auxílio da coluna Kynetex 1.7 μm C18 com dimensões de 2.1 x 50 mm mantida a 40°C. A fase móvel utilizada foi água (A) e metanol (B), ambos com 0.1% de ácido fórmico na vazão de 0.3 mL.min⁻¹ e no gradiente descrito na tabela 1.

As análises em fonte do tipo electrospray foram adquiridas em modo MRM (*multiple reaction monitoring*) e com ionização positiva. A fragmentação do íon precursor em m/z 361 foi monitorada utilizando o fragmento em m/z 275 previamente descrito (CROTTI et al., 2005). A energia aplicada no cone extrator foi de 25 V e energia do gás de colisão de 10 eV. Os parâmetros do detector de massas adequados para GOYA encontram-se na tabela 2.

Tabela 1. Gradiente de eluição da fase móvel.

Tempo (min)	% B
0	20
3.0	80
3.1	80
3.5	20
5.0	20

Tabela 2. Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação de GOYA.

MS TUNE			
Capilar	2.5 kV	LM resolução 1	2.7
Cone:	-	HM resolução 1	15.0
Rf lentes	0.1	energia do íon 1	0.5
Temperatura da fonte:	150 °C	Entrada	1.0
Temperatura de dessolvatação	350 °C	Colisão	10
Fluxo do gás de dessolvatação (nitrogênio)	750 L.h ⁻¹	Saída	0.5
Fluxo de gás no cone (nitrogênio)	50 L.h ⁻¹	LM resolução 2	9.3
Fluxo do gás de colisão (argônio)	0.16 L.h ⁻¹	HM resolução 2	14.9
Pressão na célula de colisão	3.02 x 10 ⁻³	energia do íon 2	0.6

3.2.3.2 Preparo da amostra

As amostras coletadas do meio receptor para os tempos de 1, 3 e 6h tiveram seus volumes finais corrigidos e então uma alíquota foi filtrada e 5 µL foram injetados no cromatógrafo líquido.

As amostras de pele foram obtidas de cortes do mesmo tecido utilizada para as análises de MALDI-MSI visando dar maior confiança as análises. Essa amostra foi transferida para tubo do tipo eppendorf de 2 mL, e então adicionou-se 500 µL de mistura de solventes metanol:água (1:1). As amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogeinizador T10 Ultra Turrax (IKA®) e após completa homogeneização foram para banho de ultrassom por dez minutos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 4 °C e 15000 x g. Finalizada a centrifugação 250 µL do sobrenadante foi transferido para frascos de menor volume e 5 µL foram injetados no cromatógrafo líquido.

3.3 Ensaio de permeação e distribuição em sistema nervoso central (modelo inseto)

3.3.1 Permeação de goyazensolido em cérebro de gafanhoto

Para compreender melhor o metabolismo e distribuição da substância GOYA faz-se necessário uma estimativa de sua permeação no sistema nervoso central. Neste trabalho, o estudo de permeação de GOYA no cérebro foi elaborado de acordo com o trabalho realizado por Andersson e colaboradores, que investigaram a permeabilidade à barreira hematoencefálica de 25 substâncias conhecidas em gafanhoto em um modelo ex vivo (ANDERSSON et al., 2013).

Os animais utilizados no experimento foram gafanhotos do deserto (machos e fêmeas), *Schistocerca gregaria* (L) obtidos de um criador comercial (Petra Aqua, Praga, República Checa) com 3-5 semanas após a muda final (figura 6). Os mesmos foram mantidos a uma temperatura variando entre 25-35°C e submetidos a um ciclo de luz claro-escuro de 12h com acesso livre a repolho e farelo de trigo. Os experimentos foram realizados na Universidade de Copenhagen sob orientação do Prof. Dr. Christian Janfelt e com a colaboração da aluna de doutorado Olivia Dzwonkowski.

Figura 6. Gafanhotos do deserto *Locusta schistocerca*. Fêmea à esquerda e o macho à direita (Foto de Tom Fayle, Universidade de Cambridge).

3.3.1.1 Modelo ex vivo

Para os experimentos ex vivo, o cérebro do gafanhoto foi dissecado por meio de um corte transversal, como mostrando na figura 7. O cérebro foi cuidadosamente retirado da cavidade utilizando ferramentas apropriadas e com auxílio de uma lupa. O cérebro, olhos compostos e lamela neural foram separados da gordura e outros tecidos e colocados em solução de tampão inseto pH 7.2 (tabela 3) para serem incubados.

Figura 7. *Locusta schistocerca* fêmea mostrando local de dissecção (A) e o cérebro com olhos compostos e lamela neural (B). (Fotos gentilmente cedidas por Olivia Dzwonkowski)

Tabela 3. Composição química do tampão inseto.

Substância	Concentração (mol.L ⁻¹)
NaCl	0.147
KCl	0.010
CaCl ₂	0.004
NaOH	0.003
HEPES	0.010

O procedimento de incubação foi realizado em triplicata, cada um sendo composto de um cérebro masculino e um feminino. Os cérebros foram incubados na concentração de 10 μ M de GOYA. Cada replicata foi processada de acordo com as seguintes etapas:

1. Dissecção de um cérebro masculino e um feminino mantendo a lamela neural e olhos compostos.
2. Transferência para tubo do tipo Eppendorf de 1.5 mL contendo 250 μ L de GOYA dissolvido em tampão de inseto pH 7.2.
3. Incubação em banho térmico com agitação por 15 minutos a 30°C.
4. Após incubação os cérebros foram lavados com 150 μ L de tampão de inseto gelado (2x).
5. A lamela neural e olhos compostos foram removidos.
6. Os cérebros foram transferidos para tubo Eppendorf de 1.5 mL contendo 150 μ L de solvente precipitador acetonitrila.
7. Os cérebros foram homogeneizados com ultrasonicador (Bandelin Eletronic) por 8 segundos com 19% de potência.
8. As amostras foram centrifugadas a 15000 x g por 10 minutos a 4 °C.
9. O sobrenadante foi transferido para tubo Eppendorf e o solvente foi evaporado.
10. As amostras foram reconstituídas em 100 μ L de fase móvel e analisadas por UPLC-MS/MS.

Figura 8. A) Incubação de cérebro macho + fêmea. B) Cérebro sem a lamela neural e olhos compostos.

3.3.1.2 Modelo in vivo

Para correlacionar com os dados ex vivo, um ensaio in vivo com gafanhotos

foi realizado. Para este experimento, GOYA foi dissolvido em DMSO e diluído com água ultrapura para atingir a concentração de 500 μM , em uma concentração final de 0.5% de DMSO. Cinquenta microlitros da solução 500 μM de GOYA foram administrados em gafanhotos macho e fêmea através de uma injeção intrahemolinfa (entre a segunda e terceira terga). O experimento foi realizado em duplicata para cada gênero e as amostras de hemolinfa, fezes e cérebro foram coletadas nos tempos de 15 e 30 minutos.

As amostras de cérebro foram processadas conforme protocolo estabelecido para o experimento ex vivo, a partir da etapa número 5. As amostras de hemolinfa foram obtidas através de uma secção longitudinal no abdômen dos gafanhotos, garantindo a integridade do intestino, e assim os gafanhotos foram colocados em tubos do tipo falcon (15 mL) e centrifugados a 2000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O volume de 150 μL de hemolinfa foi coletado e transferido para eppendorf de 1.5 mL no qual 150 μL de acetonitrila foram adicionados. As amostras foram agitadas em agitador vórtex por 15 segundos e centrifugadas a 15000 x g por 10 minutos. O sobrenadante (100 μL) foi coletado e transferido para eppendorf para que então fosse evaporado. As amostras foram reconstituídas em 100 μL de fase móvel e analisadas por UPLC-MS/MS.

As amostras de fezes foram coletadas e transferidas para eppendorf de 1.5 mL ao qual 150 μL de acetonitrila foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas com ultrasonicador (Bandelin Eletronic) por 8 segundos com 19% de potência, agitadas em vórtex por 15 segundos e centrifugadas a 15000 x g por 10 minutos. O sobrenadante (100 μL) foi coletado e transferido para eppendorf para que então fosse evaporado. As amostras foram reconstituídas em 100 μL de fase móvel e analisadas por UPLC-MS/MS.

3.3.1.3 Determinação de GOYA em amostras de gafanhoto por UPLC-MS/MS

Para quantificação de GOYA nas amostras de cérebro, hemolinfa e fezes de gafanhoto foi utilizado um sistema ACQUITY TQD UPLC-MS Waters®. A separação cromatográfica foi realizada com o auxílio da coluna Kinetex 1.7 μm C18 com dimensões de 2.1 x 50 mm que foi mantida a 40°C, utilizando a fase móvel a Água (A) e Metanol (B), ambos com 0.1% de ácido fórmico na vazão de 0.3 mL.min⁻¹ no gradiente que se encontra na tabela 4. O volume de injeção foi de 5 μL .

As análises foram novamente adquiridas em modo MRM (*multiple reaction monitoring*) operando no sistema positivo. A fragmentação do íon precursor m/z 361 foi monitorada utilizando o fragmento m/z 275, com energia do cone de 25 V e energia de colisão de 10 eV seguindo o mesmo processo anterior. Os parâmetros do detector de massas foram adequados para GOYA e encontram-se na tabela 5.

Tabela 4. Gradiente de eluição da fase móvel.

Tempo (min)	% B
0	20
3.0	100
3.6	100
3.61	20
5.0	20

Tabela 5. Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação de GOYA.

MS TUNE			
Capilar	2.5 kV	LM resolução 1	2.7
Cone:	-	HM resolução 1	15.0
Rf lentes	0.1	energia do íon 1	0.5
Temperatura da fonte:	150 °C	Entrada	1.0
Temperatura de dessolvatação	350 °C	Colisão	10
Fluxo do gás de dessolvatação (nitrogênio)	750 L.h ⁻¹	Saída	0.5
Fluxo de gás no cone (nitrogênio)	50 L.h ⁻¹	LM resolução 2	9.3
Fluxo do gás de colisão (argônio)	0.16 L.h ⁻¹	HM resolução 2	14.9
Pressão na célula de colisão	3.02 x 10 ⁻³	energia do íon 2	0.6

3.3.1.4 Avaliação da distribuição de GOYA por DESI-MSI

Os experimentos de distribuição e metabolismo em gafanhoto seguiram o protocolo descrito por Olsen e colaboradores, no qual GOYA foi dissolvido em DMSO e diluído com água ultrapura para atingir a concentração de 500 µM, em uma concentração final de 0.5% de DMSO. Cinquenta microlitros da solução 500 µM de GOYA foram administrados em gafanhotos machos através de uma injeção

intrahemolinfa (entre a segunda e terceira terga). O experimento foi realizado em duplicata e os animais foram eutanasiados por congelamento nos tempos de 15 e 30 minutos. Os gafanhotos foram mantidos em freezer -80 °C até o momento do uso (OLSEN et al., 2015).

Para a criosecção os animais foram fixados em um suporte de amostra feito sob medida para criostato com auxílio de uma solução aquosa de gel de carboximetilcelulose (CMC) a 5%. Cortes sagitais com 50 µm de espessura foram realizados a -20 °C utilizando um criomicrotomo Leica CM3050S (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os cortes foram acondicionados em lâminas de vidro para microscopia (VWR, Herlev, Dinamarca) e armazenados em freezer - 80 °C até análise (figura 9).

Figura 9. A) Gafanhoto macho eutanasiado por congelamento; B) Solução CMC 5%; C) Suporte especial para criostato; D) Gafanhoto fixado no criostato; E) Corte sagital do gafanhoto e lâmina montada.

Previamente a análise por DESI-MS as amostras foram retiradas do freezer - 80 °C e colocadas em dessecador por 10 minutos. Para visualização histológica os cortes foram corados com hematoxilina e eosina após a obtenção dos dados por DESI-MS (JANFELT et al., 2012).

As imagens dos gafanhotos obtidas por DESI foram realizadas em um espectrômetro de massas Q Exactive Orbitrap (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipado com uma fonte de ionização DESI-MSI, construída no próprio laboratório, e analisador orbitrap. As análises dos dados obtidos foram realizadas com o conversor imzML (disponível em www.maldi-msi.org) e no programa MSiReader (ROBICHAUD et al., 2013) para geração das imagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento da lactona sesquiterpênica goyazensolida

Para confirmação estrutural do composto isolado foi baseada nos resultados obtidos pelas análises de espectrometria de massas em alta resolução e ressonância magnética nuclear.

A fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_7$ foi obtida através do dado da massa observada de 361,1294 $[M+H]^+$ e o erro calculado em relação à massa teórica de 7.2 ppm. Foi realizada também análise da fragmentação do GOYA (m/z 361) no modo positivo de ionização operando em uma janela de massas entre 100 e 450 unidades. Os espectros obtidos encontram-se nas figuras 10 e 11. Foram observados os íons fragmento em m/z 275, 257, 239, 229, 211 e 183, característicos desta molécula após a eliminação neutra da cadeia lateral (CROTTI et al., 2012). Crotti e colaboradores estudaram em detalhe o mecanismo de formação dos íons fragmentos em uma série homóloga de lactonas sesquiterpênicas do tipo GOYA e de seu epímero na posição 8, a substância budleína. Em todos os casos, após a eliminação neutra da cadeia lateral o íon formado $[M+H-RCOOH]^+$, para o analito em questão em m/z 275, o mesmo sofre perdas neutras sucessivas de moléculas de H_2O (m/z 257) seguida por CO (m/z 229). Foi observado nesse estudo que apenas os derivados contendo a função álcool na posição 15, como ocorre para o GOYA, apresentam uma segunda eliminação de H_2O a partir do íon $[M+H-RCOOH-H_2O-CO]^+$ (m/z 229) levando, no caso, a formação do íon em m/z 239, o qual rapidamente inicia eliminações sequenciais de CO levando a formação principalmente dos íons em m/z 211 e 183, respectivamente.

Um dos principais íons diagnósticos em m/z 69, relativo à eliminação por assistência anquimérica da cadeia lateral, não foi observado, pois o íon acílio formado estaria fora da janela de análise. Contudo, optamos por trabalhar em uma faixa de massas possivelmente compatível com os estudos por MALDI.

Figura 10. Espectro de massas de GOYA no modo positivo 361,1294 $[M+H]^+$.

Figura 11. Espectro de massas da fragmentação de GOYA no modo positivo 361,1294 $[M+H]^+$ nas energias 5, 10, 15 e 20 eV.

Apesar de termos realizado um re-isolamento e os dados de espectrometria de massas confirmarem a presença da substância GOYA, entendemos ser importante avaliar também o produto isolado pelas análises de RMN de 1H e ^{13}C , as quais encontram-se nas figuras 12 e 13. No espectro de 1H pode-se observar a presença de dois dupletos em δ 5,48 e 6,19 referentes aos hidrogênios olefínicos H-13a e H-13b de grupamentos α -metilenos exocíclicos de γ -lactonas. Há também um simpleto em δ 5,81 que se refere ao hidrogênio olefínico H-2 de anéis

diidrofuranona. Estes sinais em conjunto com aqueles em δ 5,30 (H-6), δ 3,79 (H-7), δ 4,50 (H-8) e em δ 2,27 e 2,51 (H-9) podem caracterizar a presença de lactonas sesquiterpênicas do tipo furanoheliangolideo. A ligação dupla entre os carbonos 4 e 5 pode ser confirmada pelo sinal de H-5 desprotegido em δ 6,23, bem como pela deslocamento dos sinais de carbono em δ 134 e 133 (Figura 13) para as posições 4 e 5, respectivamente. Os sinais das metilas H-4' e H-14 podem ser visualizados como simpletos em δ 1,80 e 1,50, respectivamente. O simpleto em δ 4,34 integrado para dois hidrogênios caracteriza a presença de H-15 ligados em carbono carbinólico com deslocamento típico em δ 62 (Figura 6). Além destes sinais, existem outros dois sinais na forma de simpletos em δ 5,99 para H-3'a e δ 5,54, para H-3'b os quais são típicos aos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral do tipo metacrilato. Estes dados em comparação com aqueles divulgados na literatura (SOARES et al., 2012; SOUZA et al., 2012) foram considerados compatíveis para o composto isolado.

Figura 12. Espectro de RMN de ^1H do goyazensolido ($\text{CDCl}_3/400\text{ MHz}$).

Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C goyazensolido ($\text{CDCl}_3/100\text{ MHz}$).

Portanto, a análise conjunta de todos os dados obtidos e discutidos acima nos permitem afirmar que o re-isolamento foi realizado com sucesso e com elevado grau de pureza, permitindo assim a continuidade dos estudos propostos no projeto.

4.2 Estudos de distribuição cutânea

4.2.1 Minoxidil

4.2.1.1 Análise por MALDI-MSI para localização de MINOX na pele

Conforme apresentada na metodologia inicialmente foram testadas diferentes matrizes e suas diferentes combinações de concentração, tempo de espalhamento entre outros. Dentre as matrizes testadas, a que proporcionou melhor ionização do minoxidil (figura 14A) foi HCCA 10 mg.mL^{-1} em acetonitrila: água (7:3, v/v) com 0.1% de TFA. Na figura 14B podemos observar o íon em m/z 210 relativo à molécula protonada em adição a outros íons da matriz. Na figura 14C temos a fragmentação do íon protonado gerando apenas um fragmento majoritário em m/z 193, relativo à eliminação de 17 unidades de massas. Nesse caso, poderíamos imaginar a eliminação neutra de NH_3 como responsável pela formação deste íon fragmento. Contudo, no esquema 1 apresentamos uma proposta alternativa através da eliminação radicalar de hidroxila. Esse fato está baseado na instabilidade dos íons formados a partir da eliminação NH_3 no esqueleto em estudo.

É de se esperar que ambos os processos apresentados em A do esquema 1 levem a produtos não favorecidos termodinamicamente, uma vez que a formação de uma ligação tripla em um sistema aromáticos ao a formação de um carbocátion exige uma alta energia de ativação. Por outro lado, a formação de cátions radicais obtidos por cisão homolítica em sistemas conjugados tem sido relatada cada vez com maior frequência (DEMARQUE et al., 2016). No caso do minoxidil, caso o próton se aproxime da molécula através da região de carga negativa localizada sobre no átomo de oxigênio pode ocorrer a ressonância dos pares eletrônicos levando à alocação da carga positiva no átomo de nitrogênio cíclico não aromático (B, esquema 1). Nesse caso a localização da instauração pode favorecer a clivagem homolítica levando a um cátion radical estabilizado por ressonância, o que justificaria a formação de apenas um íon fragmento majoritário.

Figura 14. A) Estrutura química do minoxidil. B) Espectro de massas no modo positivo de MINOX $[M+H]^+ = 210$ obtido por MALDI. C) Espectro de massas no modo positivo de MINOX $[M+H]^+ = 210$ e seu fragmento $[M+H]^+ = 193$ obtido por MALDI.

Esquema 1. Possíveis vias de formação do fragmento $[M+H-17]^+$ a partir da molécula protonada do minoxidil.

Os dados apresentados acima demonstram a possibilidade da ionização por MALDI para os estudos com o minoxidil.

Cabe destacar que foram realizados um grande número de experimentos visando otimizar todas as condições de preparo de amostra e energias do equipamento, mas na tese apresentamos apenas os dados finais do melhor modelo.

No entanto, dentre os experimentos realizados na otimização desse método vale a pena a discussão do uso da fita condutiva de carbono dupla face (GOODWIN et al., 2012).

Ao trabalhar com as amostras cortes de pele montadas na lâmina revestida com óxido de índio e estanho, própria para análise por MALDI, percebemos que, ao aplicar a matriz, alguns cortes se soltavam da lâmina. Depois de otimizados parâmetros de espessura de corte e aplicação da matriz para evitar esse problema, observamos ainda que após analisar as amostras por MALDI alguns cortes estavam faltando na lâmina, e, portanto haviam caído dentro do equipamento. E por fim, ao disparo do laser durante as análises era possível visualizar o deslocamento da pele. O desprendimento da amostra dentro do equipamento causa um grande problema, pois pode sujar a fonte diminuindo a sensibilidade do equipamento ao longo das corridas. E os cortes se movimentarem durante a análise também se torna um problema, pois trata-se de um método para avaliação de distribuição espacial. Sendo assim, o uso da fita condutiva de carbono dupla face nos trouxe a resolução para esse problema e não apresentou interferentes significativos na ionização das substâncias de interesse.

Para a análise das amostras obtidas nos ensaios in vitro de penetração passiva e iontoforética do minoxidil, uma região da pele de cada experimento foi selecionada (ROI) de forma que todas as análises fossem realizadas juntas. Assim, o mesmo processamento dos parâmetros foi aplicado para todas as amostras tornando possível a comparação de intensidade do íon de interesse nas amostras analisadas. As imagens foram construídas com o íon m/z 210 $[M+H]^+$ e normalizadas utilizando o software FlexImaging (Bruker®). As imagens obtidas encontram-se na figura 15 e através da escala de cores podemos observar a distribuição do minoxidil nos tempos de 1h, 3h e 6h e sua intensidade. Podemos observar também que para as amostras branco da pele e as amostras controle de ambos os experimentos o íon m/z 210 não aparece.

Na janela de massas de interesse apresentadas nas figuras 16 e 17 é possível observar os espectros da amostra de 6h de iontoforese evidenciando o íon em m/z 379, correspondente a matriz α -CHCA e o íon m/z 210, do minoxidil $[M+H]^+$. Na figura 18 observamos o espectro obtido da amostra de 6h no ensaio de permeação passiva onde podemos observar o íon m/z 210 pouco intenso. Nas figuras 19 e 20 podemos observar o espectro da amostra controle e branco, respectivamente,

evidenciando a presença dos íons m/z 212 e 206, não identificados, porém são possivelmente produtos endógenos do tecido em estudo. Esses íons se mostraram interferentes na análise.

Figura 15. Imagem mostrando a distribuição de minoxidil na pele nos tempos de 1h, 3h e 6h no experimento de penetração passiva e iontoforese. O íon monitorado foi o m/z 210. As áreas delimitadas com contorno branco representam as regiões de interesse. As imagens foram adquiridas utilizando uma resolução espacial de 50 μm .

Figura 16. Espectro de massas de uma amostra de 6h no experimento de iontoforese na faixa de m/z 100 a 400. O íon m/z 379 corresponde ao íon da matriz α -CHCA.

Figura 17. Espectro de massas de uma amostra de 6h no experimento de iontoforese ampliado na faixa m/z de 200 a 220. O íon m/z 210 corresponde ao analito de interesse MINOX.

Figura 18. Espectro de massas de uma amostra de 6h no experimento de penetração passiva ampliado na faixa m/z de 200 a 220. O íon m/z 210 corresponde ao analito de interesse MINOX.

Figura 109. Espectro de massas de uma amostra controle ampliado na faixa m/z de 200 a 220.

Figura 20. Espectro de massas de uma amostra branco ampliado na faixa m/z de 200 a 220.

Os resultados obtidos com as análises por MALDI-MSI quando comparados ao estudo realizado por Gelfuso e seus colaboradores apresentaram-se coerentes e nos confirma a informação de que a técnica de iontoforese aumenta a penetração de minoxidil na pele (GELFUSO et al., 2013). Além do mais, com as imagens obtidas por MALDI-MSI pudemos também avaliar, em detalhes, a distribuição dessa penetração, que ocorre de forma heterogênea. Com isso podemos concluir que a técnica de MALDI-MSI pode ser uma ferramenta importante nos estudos de distribuição de substâncias na pele.

Deve-se destacar aqui que substâncias de baixa massa molecular que não possuem grupos funcionais cromóforos que permitam o uso do confocal sem derivatização são um exemplo de excelentes candidatas a técnica de MALDI-MSI. O fato de adicionar quimicamente um grupo fluorcromo (modelo mais utilizado) em um analito de baixa massa molecular pode modificar drasticamente suas propriedades de absorção e distribuição na pele e os resultados obtidos pela microscopia confocal de varredura a laser ficarem comprometidos. Com a técnica de MALDI-MSI a detecção da substância é realizada diretamente pelo íon gerado do analito e, portanto mostra o resultado real do comportamento dessa molécula no modelo utilizado.

4.2.2 Doxorrubicina

4.2.2.1 Análise por MALDI-MSI para localização de DOXO na pele

Novamente foram realizados um grande número de experimentos para avaliar o maior número de variáveis possíveis no fenômeno de ionização do analito em

questão. Dentre as matrizes testadas, a que demonstrou melhor eficiência na ionização da DOXO foi a mistura de HCCA + DHB (1:1) na concentração de 10 mg.mL⁻¹ em metanol: água (8:2). Nessas condições o íon da molécula protonada pode ser observado em m/z 544 (figura 21B). Na figura 21C é possível observar fragmentação do íon $[M+H]^+$ (m/z 544) gerando o fragmento m/z 397, previamente descrito para a molécula da doxorubicina em ionização por ESI (SLENO et al., 2006). Como pode ser observado no espectro de MALDI-MS (figura 21B), apesar de termos observado a molécula protonada, observa-se também uma alta dissociação na fonte do analito o que é um ponto preocupante e limitante do emprego de ionização por MALDI da DOXO. Em um recente estudo sistemático com uma série de flavonóides glicosilados e não glicosilados foi observado que a dissociação na fonte de alguns analito pode ser um limitante para a geração de imagens (SILVA, D.B; LOPES, N.P, 2015).

Figura 2111. A) Estrutura química da doxorubicina. B) Espectro de massas no modo positivo de DOXO m/z 544 obtido por MALDI. C) Espectro de massas no modo positivo de DOXO m/z 544 e seu fragmento mais intenso m/z 397 obtido por MALDI.

Apesar dos problemas listados acima, conduzimos as investigações com a doxorubicina, por este ser um modelo importante devido suas propriedades antitumorais e seu amplo uso no tratamento de tumores sólidos (HEYWANG et al., 1998; GEWIRTZ et al., 1999) e, principalmente, porque esse emprego estimulou diversos estudos de distribuição incluindo ensaios de permeação cutânea utilizando ferramentas de geração de imagem (HUBER et al., 2015). Devido à propriedade fluorescente que essa substância apresenta, técnicas clássicas de geração de imagem como, por exemplo, a microscopia confocal de varredura a laser é capaz de gerar excelentes resultados, além de ser uma técnica bastante sensível. Portanto, torna-se um excelente modelo para discutirmos as vantagens e desvantagens de cada técnica.

Portanto, com os dados obtidos acima a técnica de MALDI-MSI não se mostrou uma alternativa eficiente para a investigação da DOXO. Como esperado, a ocorrência de dissociação na fonte levou a completa decomposição do analito, e quando empregadas baixas energias do laser, pode ser observado no espectro na figura 2B, observamos apenas o íon relativo à dissociação na fonte e este ainda em baixa concentração. A grande vantagem para a análise da DOXO por microscopia confocal de varredura a laser é a presença do sistema altamente conjugado o que confere as propriedades de fluorescência. Por outro lado, esse mesmo sistema é

capaz de absorver com grande eficiência a energia do laser da fonte do MALDI, uma vez que o fenômeno é espectroscópico. Poderíamos ainda, considerar que alta dissociação torna muito baixa concentração desse sinal no modelo utilizando pele de porco, mesmo quando optamos por monitorar o íon fragmento. A somatória dos resultados obtidos nos experimentos do minoxidil e da doxorrubicina demonstra que apesar do grande poder da técnica de MALDI-MSI, ainda devem surgir na literatura um grande número de relatos sobre suas limitações.

4.2.3 Goyazensolido

4.2.3.1 Análise por MALDI-MSI para localização de GOYA na pele

Nesta seção novamente iremos apresentar apenas os resultados otimizados. Dentre as matrizes testadas, a que demonstrou melhor ionização para o GOYA foi a mistura de HCCA + DHB na proporção de 1:1 em metanol: água (8:2, v/v) na concentração de 10 mg.mL⁻¹ contendo NaCl 0.25mg.mL⁻¹ (SOARES et al., 2015). Nessas condições o íon $[M+Na]^+$ = 383 aparece mais intenso (figura 22). Mesmo em sistemas sem adição de sódio e com a adição de ácido não foi possível reverter esse processo. Esse fator deve ter ocorrido devido ao fato de que o tecido possui íons sódio entre outros do meio fisiológico além a estrutura química do analito que possui um significativo poder de coordenação. Por essa razão optou-se por trabalharmos com o íon sodiado.

Figura 2212. Espectro de massas no modo positivo de GOYA $[M+Na]^+ = 383$ com a matriz HCCA+DHB (1:1) 10mg mL⁻¹ e 0.25 mg mL⁻¹ de NaCl obtido por MALDI.

Depois de finalizada as etapas iniciais dos estudos de otimização passamos a análise das amostras empregando tecidos de porco. Nessa investigação é importante lembrarmos que o estrato córneo é uma barreira natural da pele e um dos principais desafios nos estudos de distribuição cutânea (GRATIERI et al., 2008). Muitas substâncias apresentam dificuldades em transpor essa barreira e acreditamos que o GOYA, assim como a maioria das substâncias, apresente uma interação significativa com o estrato córneo. O principal componente dessa camada é queratina que possui, dentre vários aminoácidos em sua composição, a cisteína.

É conhecido que as lactonas sesquiterpênicas possuem um grupamento carbonílico α - β -insaturado presente no anel lactônico que reage com grupos nucleofílicos, principalmente resíduos de sulfidril de cisteína, através da adição tipo Michael (RUNGELER et al., 1999). Com isso podemos pensar que o GOYA, por estar interagindo fortemente com a camada do estrato córneo (figura 23), não foi extraído com os solventes da matriz. Assim, não foi possível a detecção do GOYA nas amostras de pele por MALDI-MSI provavelmente devido ao fato citado acima.

Figura 2313. Figura ilustrativa representando GOYA m/z 383 na camada superior da pele (estrato córneo).

Por outro lado, uma resposta negativa obtida por MALDI-MSI para os ensaios de distribuição em pele podem indicar que seria necessária a aplicação de uma técnica para aumento de penetração como, por exemplo, a iontoforese, ou mesmo um sistema de liberação que seja capaz de promover a absorção dessa substância. Para confirmarmos essas hipóteses optamos por conduzir estudos de UPLC-MS/MS visando obter os teores de GOYA nos tecidos e nos meios receptores.

4.2.3.2 Análise da ocorrência do GOYA no meio líquido receptor e em tecidos por UPLC-MS/MS

Para confirmação dos dados iniciais obtidos por MALDI-MSI do GOYA foram realizadas análises por UPLC-MS/MS das amostras de pele e meio receptor dos experimentos de GOYA com 1h, 3h e 6h. Na figura 24 podemos observar as amostras de pele, que não foram quantificadas, pois a representatividade não seria homogênea uma vez que foi selecionada uma alíquota aleatória de aproximadamente 1 mm de cada amostra previamente utilizada para os ensaios com MALDI-MSI. No entanto esses resultados nos revelam que o GOYA passou do meio doador para a pele, estando retido provavelmente na camada de estrato córneo.

Nas amostras do meio receptor GOYA não foi detectado. Esses resultados aumentam a confirmação de que o GOYA está retido na pele, provavelmente com uma interação forte com a camada de estrato córneo e, portanto não houve penetração e passagem para o meio receptor.

Figura 24. Determinação de GOYA em amostras de pele no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) Padrão de GOYA $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ (tempo de eluição do GOYA: 2.24 minutos); C), D) e E) Amostra de pele em 1h, 3h e 6h, respectivamente.

Portanto, os resultados obtidos sugerem que para o emprego do GOYA em formulações tópicas seria necessário o planejamento de formulações que visem impedir essa interação e promover sua penetração na pele.

4.3 Ensaio de permeação e distribuição em sistema nervoso central (modelo inseto)

4.3.1 Permeação de goyazensolido em cérebro de gafanhoto

4.3.1.1 Modelo ex-vivo

As amostras de cérebro obtidas no experimento ex vivo foram devidamente processadas e analisadas por método desenvolvido em UPLC-MS/MS. Analisando os resultados constatamos que não foi possível a detecção do GOYA nas amostras de cérebro. Apesar do resultado negativo para quantificação de GOYA, não se pode afirmar que o mesmo não permeia a barreira hematoencefálica (BHE). Ainda, no trabalho de Hexum e colaboradores foi avaliada a atividade antitumoral contra glioblastoma da lactona sesquiterpênica partenolido, e constatou-se que ela atravessa a barreira hematoencefálica (HEXUM et al., 2015). Tendo em consideração essa informação esperaríamos o mesmo comportamento para a

lactona GOYA, contudo as diferenças estruturais e o maior número de aceptores de Michael que o partenolido podem ter uma significativa diferença.

Seguindo a discussão do modelo proposto por Andersson e seus colaboradores, o modelo ex vivo mostrou-se representativo para uma seleção abrangente de substâncias que atuam tanto no sistema nervoso central como periférico e levou em consideração fatores como LogP, massa molecular e número de hidrogênios aceptores e doadores, bem como a presença de substâncias substrato de glicoproteína P (P-gp) e difusores passivos (ANDERSSON et al., 2013).

Sendo assim, ensaios adicionais poderiam ser realizados, utilizando, por exemplo, uma concentração diferente de GOYA, a presença de um substrato P-gp ou ainda um diferente tempo de incubação, sendo que o GOYA, por ser uma substância de baixa massa molecular (361 Da) e com baixo número de hidrogênios aceptores, seria um bom candidato à penetração a BHE.

Neste experimento poderíamos também ter um problema analítico, com o preparo da amostra inadequado ou ainda em relação à sensibilidade do método, sendo que o limite de quantificação foi de 5 ng.mL^{-1} . Na figura 25 podemos observar os cromatogramas obtidos.

Figura 25. Análise de GOYA em amostras de cérebro de gafanhoto no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) Padrão de GOYA 5ng.mL⁻¹ (tempo de eluição GOYA: 1.95 minutos); C) e D) Amostra de cérebro em 15 minutos de experimento.

4.3.1.2 Modelo in vivo

As amostras de cérebro, hemolinfa e fezes foram devidamente processadas e analisadas por método desenvolvido em UPLC-MS/MS. Para quantificação de GOYA uma curva de calibração foi construída em triplicata e o método mostrou-se linear na faixa de 5 a 1000 ng.mL⁻¹ (figura 26)

Figura 146. A) Gráfico da curva média de GOYA (n=3), cujo coeficiente de correlação linear (r) obtido foi superior a 0,99.

Os gráficos de resíduos e o coeficiente de correlação linear ($R^2 = 0,9962$) obtidos foram satisfatórios, sendo assim conclui-se que o método analítico está adequado para a análise pretendida.

Figura 27. Análise de GOYA em amostras de cérebro de gafanhoto no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) Padrão de GOYA 5ng.mL⁻¹ (tempo de eluição GOYA: 1.95 minutos); C) e D) Amostra de cérebro em 15 e 30 minutos de experimento, respectivamente.

Pela figura 27 acima podemos observar no cromatograma a presença de GOYA no tempo de 1.95 minutos. No entanto, nessa intensidade não foi possível a quantificação do analito de interesse, pois apesar do sinal estar dentro do limite de detecção este estava fora do limite quantificação da metodologia. Esse resultado nos faz questionar a ausência de GOYA no cérebro nos experimentos ex vivo. Uma das hipóteses seria a concentração de GOYA administrada no experimento in vivo, a qual foi muito superior ao ex vivo, podendo assim ser detectado na amostra.

Outro fator a se considerado é o metabolismo, presente no experimento in vivo, o que não ocorre no experimento ex vivo uma vez que esse modelo, apesar de manter a barreira hematoencefálica íntegra e todos os mecanismos e eventos biológicos dentro do cérebro ativos, não conta com as atividades biológicas externas ao cérebro. Assim torna-se evidente a necessidade da combinação de experimentos ex vivo ou in vitro com experimentos in vivo para resultados mais conclusivos, sendo o metabolismo um fator importante a se considerar na permeação de substâncias. Em resumo, esse resultado sugere portanto que a substância GOYA é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica no modelo utilizado e suporta os dados obtidos por nosso grupo sobre a ação do GOYA em tumores no SNC (dados ainda não publicados).

Figura 28. Análise de GOYA em amostras de hemolinfa de gafanhoto no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) e C) Amostra de hemolinfa de gafanhoto macho em 15 e 30 minutos de experimento, respectivamente; D) e E) Amostra de hemolinfa de gafanhoto fêmea em 15 e 30 minutos, respectivamente.

Figura 29. Análise de GOYA em amostras de fezes de gafanhoto no modo MRM (361>275). A) Amostra branco; B) e C) Amostra de fezes de gafanhoto em 15 e 30 minutos de experimento, respectivamente

Tabela 6. Concentrações de GOYA (ng.mL⁻¹) nas amostras de hemolinfa e fezes no experimento in vivo com gafanhotos.

Tempo	Hemolinfa (ng.mL ⁻¹)		Fezes (ng.mL ⁻¹)
	Fêmea	Macho	
15 minutos	66.5	100.8	6.9
	72.4	102.4	
30 minutos	47.3	12.4	133.4
	19.5	13.1	

Nas figuras 28 e 29 e na tabela 6 podemos observar ainda os resultados obtidos para as amostras de hemolinfa e fezes no experimento realizado in vivo com gafanhotos macho e fêmea. Nos cromatogramas das análises de hemolinfa podemos observar o pico do GOYA em 1.95 minutos e em 1.75 minutos a presença de um possível metabólito de GOYA, que aumenta sua intensidade no tempo de 30 minutos. No entanto, não foi possível ainda sua identificação. Observamos que os valores obtidos para machos e fêmeas nos tempos de 15 e 30 minutos são bastante distintos, o que sugere, ainda de forma muito preliminar, uma diferença de metabolismo entre gêneros.

Nas amostras de fezes podemos observar a presença de GOYA mais intenso no tempo de 30 minutos sugerindo uma eliminação de GOYA inalterado nas fezes e também a presença de possíveis produtos de metabolismo, porém não identificados em 1.75 e 2.74 minutos. Lembrando que as fezes não foram pesadas e assim não temos uma relação de quantidade mas sim de intensidade. Contudo, podemos concluir que o modelo in vivo utilizando gafanhoto é capaz de fornecer informações sobre a permeação de substâncias pela barreira hematoencefálica, assim como metabolismo e eliminação dessa substância no organismo.

Análises DESI-MSI

Para avaliação da permeação e distribuição de GOYA em modelo in vivo de gafanhoto a técnica DESI-MSI foi utilizada. Seguindo os protocolos discutidos no trabalho de Olsen e seus colaboradores (OLSEN et al., 2015) foi adaptado um método para detecção de GOYA em cortes de gafanhotos por DESI-MSI. Para otimização da ionização de GOYA em fonte de DESI fez-se necessário o ajuste e

combinação de alguns parâmetros proposto na literatura (ABBASSI-GHADI et al., 2015), como a composição e proporção do solvente do spray: metanol, água, acetonitrila, ácido fórmico; a vazão do solvente: 1 a 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; a pressão do gás de nebulização (N_2): 7 a 9 bar; geometria: altura da ponta do spray em relação à superfície da amostra; distância da ponta do spray em relação à entrada do capilar no espectrômetro de massas e o ângulo da ponta do spray em relação à superfície; voltagem aplicada no spray: 4 a 5 v.

Ainda, no trabalho publicado por Shariatgorji e colaboradores os autores apresentam um detalhe sobre otimização que pode contribuir para a melhora na sensibilidade desta técnica, que consiste em expor as fibras de vidro e nivelá-las com auxílio de uma lixa o máximo possível (figura 30A), a fim de obter gotas simétricas e uniformes no spray (SHARIATGORJI et al., 2016). Reproduzimos esse procedimento e constatamos que de fato a sensibilidade foi aumentada, sendo assim a prática foi incluída na rotina do laboratório (figura 30B e C).

Figura 30. A) Diagrama esquemático de um experimento de DESI-MSI evidenciando as pontas do capilar expostas e niveladas (SHARIATGORJI et al., 2016); B) Capilar do solvente (interno); C) Capilar do gás nebulizador (externo).

Compostos endógenos como lipídeos, por exemplo, também foram monitorados por DESI-MSI, uma vez que estudos indicam que o metabolismo de insetos ocorre no tecido adiposo e ao mesmo tempo os lipídeos estão distribuídos por todo o corpo do animal tornando-se assim um marcador endógeno importante

para garantir a construção de uma imagem representativa por DESI-MSI (ARRESE et al., 2010).

As análises foram realizadas em modo positivo de ionização monitorando os íons $[M+H]^+ = 361$, $[M+Na]^+ = 383$, $[M+K]^+ = 399$ para GOYA e $[M+H]^+ = 824$ e $[M+H]^+ = 796$ para os lipídios marcadores (OLSEN et al., 2015). Metanol:água (95:5) em uma vazão de $1.5 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ foi utilizado como solvente de spray e a pressão do gás de nebulização (nitrogênio) foi de 7.5 bar. A voltagem aplicada no spray foi de 5 v e a temperatura do capilar de entrada para o espectrômetro de massas foi de 275°C . Os demais parâmetros foram ajustados de acordo com a calibração do equipamento. Todas as imagens foram adquiridas com uma resolução espacial de $150 \mu\text{m}$.

Os cortes dos gafanhotos nos tempos de 15 e 30 foram analisados por DESI-MSI e os espectros obtidos foram tratados no programa MSiReader. As imagens foram criadas com identificação das substâncias utilizando massa acurada e uma resolução de 2.5 ppm, uma vez que o orbitrap é um analisador de alta resolução e permite essa precisão. Os resultados para o tempo de 30 minutos encontram-se nas figuras abaixo.

Figura31. DESI-MSI de um gafanhoto mostrando o composto endógeno lipídeo (m/z 796.5255).

Figura 32. DESI-MSI de um gafanhoto mostrando o composto endógeno, lipídeo (m/z 824.5560).

Figura 33. DESI-MSI de um gafanhoto que recebeu uma dose de GOYA 500 μM após 30 minutos de experimento, GOYA (aduto de K^+ , m/z 399.0840).

Figura 34. DESI-MSI de um gafanhoto que recebeu uma dose de GOYA 500 μM após 30 minutos de experimento, GOYA (aduto de Na^+ , m/z 383.1100).

Figura 3515. DESI-MSI utilizando a ferramenta de co-localização, na qual é possível observar o lipídeo (m/z 824.5560) em azul, delimitando o corpo do gafanhoto, e o GOYA (m/z 399.0840) em vermelho.

Figura 36. Coloração hematoxilina e eosina do corte do gafanhoto em 30 minutos realizada após a análise de DESI-MSI.

Figura 37. Espectro obtido por DESI-MSI em full scan 200-900 no qual é possível observar os lipídeos m/z 824 e m/z 796 intensos.

Figura 38. Espectros ampliados de GOYA m/z 399 (aduto de K^+) (A) e GOYA m/z 383 (aduto de Na^+) (B).

Com o experimento de DESI-MSI constatou-se que com a criosecção das amostras na espessura de 50 μm ainda foi possível obter bons sinais no espectrômetro de massas, o que é algo positivo, pois abaixo de 50 μm não foi possível o corte. Além disso, é importante observar que as crio-secções dos gafanhotos devem ser realizadas o mais breve possível após a eutanásia, pois seu armazenamento em freezer $-80^{\circ}C$ dificulta a posterior secção devido ao ressecamento do material.

A identificação do GOYA nas imagens obtidas por DESI-MSI foi confirmada através de sua massa acurada que apresentou um erro de 0.2 ppm para o aduto de sódio ($[M + Na]^+ = 383.1100$) e 1.2 ppm para o aduto de potássio ($[M + K]^+ = 399.0840$). O íon protonado (m/z 361) não foi observado, nem mesmo com a adição de ácido no solvente do spray, provavelmente devido ao fato de a amostra ser rica em sais e ao poder de coordenação do GOYA, o que favorece a formação dos adutos.

Nas figuras 31 e 32 podemos observar dois lipídeos importantes na composição do tecido adiposo do animal. Esses lipídeos possuem sinais intensos no

espectro de massas, como pode ser observado na figura 37, e tornam-se assim importantes marcadores endógenos nas análises de DESI-MS. Nas figuras 33 e 34 é possível observar o sinal de GOYA m/z 399 e m/z 383, respectivamente, e com a análise do espectro obtido na figura 38 podemos concluir que o íon m/z 399 mostrou-se mais intenso.

A figura 35 foi construída a partir de uma ferramenta do programa MSiReader de co-localização onde foi possível sobrepor as imagens formadas do lipídeo, que mapeia o tecido animal, e do analito de interesse. Essa imagem em combinação com a coloração hematoxilina e eosina, obtida e apresentada na figura 36, pode nos informar que o GOYA está localizado no intestino do animal. Esse resultado é confirmado pela análise de UPLC-MS/MS realizada com as fezes do animal, onde GOYA mostrou-se presente na amostra coletada em 30 minutos. Já em 15 minutos não foi possível observar a presença de GOYA, assim como nas amostras de DESI-MSI, que por essa razão não foram apresentadas aqui.

Essa informação levanta algumas hipóteses sobre o metabolismo de GOYA, como sua rápida metabolização e excreção, bem como sua excreção inalterada nas fezes. No estudo realizado por Lachi-Silva e colaboradores a farmacocinética da lactona licofolídeo em ratos foi investigada e constatou-se que a meia vida de eliminação foi de 27.4 minutos e o clearance de 0.15 L.min^{-1} . Esses resultados comprovam a hipótese de rápida eliminação do GOYA no organismo (LACHI-SILVA et al., 2015).

Assim, estudos adicionais podem ser realizados utilizando uma dose maior de GOYA para a tentativa de detectar GOYA e seus metabólitos em outros locais no tecido animal, como por exemplo, no cérebro, e também a realização de um estudo de cinética de distribuição com coletas em tempos mais curtos. Ainda, com a técnica de DESI-MS temos a limitação da resolução espacial que pode restringir a detecção de substâncias e sua representatividade em regiões muito pequenas, como por exemplo, o cérebro, que possui 1mm.

Com isso, podemos concluir que a técnica DESI-MSI aplicada a estudos de metabolismo em modelo de inseto pode ser uma ferramenta interessante (OLSEN et al., 2014; OLSEN et al., 2015). No entanto DESI-MSI trata-se de uma técnica ainda pouco explorada, assim como o modelo de inseto, ainda muito recente e com poucos relatos na literatura. Sendo assim ainda há muito aspectos para serem desvendados e aperfeiçoados abordando ambos os assuntos.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho permitiu responder aos objetivos inicialmente propostos pontualmente listados a seguir.

- Foi possível a obtenção e isolamento da lactona sesquiterpênica goyazensolido em quantidades superiores a centenas de miligramas a partir das folhas de *Eremanthus mattogrossensis*.
- Os estudos distribuição cutânea utilizando modelo in vitro de célula de Franz e monitoramento por MALDI-MSI permitiram confirmar a distribuição da substância uniforme do minoxidil e o acúmulo do goyazensolido na parte superior do tecido.
- Desenvolvimento de um método por UPLC-MS/MS para determinação de goyazensolido na pele de orelha de porco e no meio receptor de célula de Franz confirmou a presença do analito no interior do tecido e ausência do analito no meio receptor corroborando com os dados de MALDI-MSI.
- O método por MALDI-MSI para localização da doxorubicina não se mostrou uma alternativa viável devido à alta dissociação na fonte apresentada por essa substância.
- O ensaio de distribuição em sistema nervoso central utilizando modelo ex vivo de gafanhoto não gerou resultados eficientes para as concentrações empregadas do goyazensolido.
- O desenvolvimento de um método por DESI-MSI para localização in vivo de goyazensolido em gafanhoto confirmou a eliminação de GOYA no intestino do animal em 30 minutos de experimento.
- O desenvolvimento de um método por UPLC-MS/MS para determinação de goyazensolido em cérebro, hemolinfa e fezes de gafanhoto mostrou-se adequado para a finalidade.

Sendo assim, podemos concluir que a espectrometria de massas é uma ferramenta fundamental aplicada a estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de substâncias. Ainda, podemos afirmar que as técnicas de geração de imagem por espectrometria de massas MALDI-MSI e DESI-MSI são muito recentes e, portanto apresentam muitos desafios a serem desvendados, principalmente quando aplicados a estudos de distribuição de substâncias de baixa massa molecular.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

ABBASSI-GHADI, N.; JONES, E.A.; VESELKOV, K.A.; HUANG, J.; KUMAR, S.; STRITTMATTER, N.; GOLF, O.; KUDO, H.; GOLDIN, R.D.; HANNA, G.B.; TAKATS, Z. Repeatability and reproducibility of desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS) for the imaging analysis of human cancer tissue: a gateway for clinical applications. **Analytical Methods**, v. 7, p. 71-80, 2015.

ABBOTT, N.J. Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. **Drug Discovery Today**, v.1, p.407-416, 2004.

ABDEL-MOTTALEB, M.M.A; NEUMANN, D.; LAMPRECHT, A. Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipidic-based versus polymer-based nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.79, p. 36-42, 2011.

ANDERSSON, O.; HANSEN, S.H.; HELLMAN, K.; OLSEN, L.R.; ANDERSSON, G.; BADOLO, L.; SVENSTRUP, N.; NIELSEN, P.A. The Grasshopper: a novel model for assessing vertebrate brain uptake. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 346, p. 211-218, 2013.

ANDERSSON, O.; BADISCO, L.; HANSEN, A.H.; HANSEN, S.H.; HELLMAN, K.; NIELSEN, P.A.; OLSEN, L.R.; VERDONCK, R.; ABBOTT, N.J.; BROECK, J.V.; ANDERSSON, G. Characterization of a novel brain barrier ex vivo insect-based P-glycoprotein screening model. **Pharmacology Research & Perspectives**, v.2, p.1-12, 2014.

ARRESE, E.L; SOULAGES, J.L. Insect fat body: energy, metabolism and regulation. **Annual Review of Entomology**, v.55, p. 207-225, 2010.

BALLUFF, B.; SCHOME, C.; HOFER, H. MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: technological advancements and recent applications. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 136 (3), p. 227- 44, 2011.

BARRY, B.W. Dermatological formulation. Percutaneous absorption. **Drug and Pharmaceutical Science**, v. 50, p. 480-496, 1983.

BJARNHOLT, N.; LI, B.; SÁLVISE, J.; JANFELT, C. Mass spectrometry imaging of plant metabolites- principles and possibilities. **Nature Product Report**, v.31, p.818-837, 2014.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v. 4, p.14-19, 1996.

BORELLA, J. C.; LOPES, J. L. C., VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora villosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 671-676, 1998.

BRIGAGÃO, M. R. P. L.; LOPES, N. P.; COLEPICOLO, P. Inhibitory mechanism of leukocyte respiratory burst by the sesquiterpene lactone lychnopholide through protein S-glutathionylation decrease . **XII Meeting of the International Society for Free Radical Research**, 2004.

BREMER, K. Asteraceae – Cladistics & Classification. Timber Press, Portland, p.752, 1994.

BOLZINGER, M.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17(3), p. 156–165, 2012.

BORELLA J. C.; LOPES J. L. C.; VICHNEWSKI W.; CUNHA W. R.; HERZ W., **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 671—676, 1998.

CALABRIA, L.M.; EMERENCIANO, V.P.; SCOTTI, M.T.; MABRY, T.J. Secondary Chemistry of Compositae. In: FUNK, V.A., SUSANNA, A., TUESSY, T.F., BAYER, R.J. (eds). Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae. cap 5. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009.

CAMPBELL, D.I.; FERREIRA, C.R.; EBERLIN, L.S.; COOKS, R.G. Improved spatial resolution in the imaging of biological tissue using desorption electrospray ionization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, p.389-398, 2012.

CERQUEIRA, M. B. S.; SOUZA J. T., JÚNIOR, R. A.; PEIXOTO, A. B. F., Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). **Ciência e Cultura**, v. 39, p. 551—553, 1987.

CHIARI, E.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; GRANDI, T. S. M.; STEHMANN, J. R.; ANJOS, A. M. G.;

OLIVEIRA, A. B. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytoterapy Research**, v.10, p. 636-638, 1996.

COHEN, L.H.; GUSEV, A.I. Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p.571-586, 2002.

COLE, R. B. Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities biological applications. 2nd ed, John Wiley & Sons, USA, 2010.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.R.; MORAES, M.O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da universidade federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v.2 (1), p. 47-58, 2010.

CROTTI, A.E.M.; LOPES, J.L.C., LOPES, N.P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. **Journal of Mass Spectrometry**, v.40, p. 1030-1034, 2005.

D'ALVISE, J.; MORTENSEN, R.; HANSEN, S.H.; JANFELT, C. Detection of follicular transport of lidocaine and in adipose tissue in pig ear skin by DESI mass spectrometry imaging. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.406, p.3735-3742, 2014.

DEMARQUE, P. D.; CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.C.; LOPE, N.P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, p.432-455, 2016.

DEPIERI, L.V; PRAÇA, F.S.G.; CAMPOS, P.M.; BENTLEY, M.V.L. Advances in the bioanalytical study of drug delivery across the skin. **Therapeutic Delivery**, v.6 (5), p.173-196, 2015.

DIEMBEBECK, W.; BECK,H.; BENECH-KIEFFER,F. COURTELLEMONT,P.; DUPUIS,J.; LOVELL,W.; PAYE,M.; SPENGLER,J.; STEILING,W. Teste Guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p. 191-205, 1999.

ESQUENAZI, E.; YANG, Y.; WATROUS, J.; GERWICK, W.H.; DORRESTEIN, P. Imaging mass spectrometry of natural products. **Natural Products Reports**, v.26, p.1521-1534, 2009.

FRANZ, T.J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, p.190-195, 1975.

GELFUSO, G.M.; BARROS, A.O.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H.; LOPEZ, R.F.V. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting? **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v.134, p.408-412, 2015.

GEWIRTZ, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 727-741, 1999.

GOUVEA, D.R.; MELONI, F.; AMARAL, J.G. Seasonal variation of the major secondary metabolites presente in the extract of *Eremanthus mattogrossensis* Less (Asteraceae: Vernoniae) leaves. **Química Nova**, v.35, p. 2139-2145, 2012.

GOODWIN, R.J.A.; NILSSON, A.; BORG, D.; LANGRIDGE-SMITH, P.R.R.; HARRISON, D.J.; MACKAY, C.L.; IVERSON, S.L.; ANDRÉN, P.E. Conductive carbon tape used for support and mounting of both whole animal and fragile heat-treated tissue sections for MALDI MS imaging and quantitation. **Journal of Proteomics**, v.75, p. 4912-4920, 2012.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F.V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v.31, p. 1490-1498, 2008.

GREEN, P.G.; HINZ, R.S.; CULLANDER, C.; YAMANE, G.; GUY, R.H. Iontophoretic delivery of amino acids and amino acid derivatives across the skin in vitro. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 1113-1120, 1991.

HERAI, H.; GRATIERI, T.; THOMAZINE, J.A.; BENTLEY, M.V.L.B.; LOPEZ, R.F.V. Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v.329, p. 88-93, 2007.

HEXUM, J.K.; BECKER, C.M.; KEMPEMA, A.M.; OHLFEST, J.R.; LARGAESPADA, D.A.; HARKI, D.A. Parthenolide prodrug LC-1 slows growth of intracranial glioma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.25, p. 2493-2495, 2015.

HEYWANG, C.; CHAZALET, M.S.P.; MASON, M.; BOLARD, J. Orientation of anthracyclines in lipid monolayers and planar asymmetrical bilayers: a surface-enhanced resonance Raman scattering study. **Biophysical Journal**. 75, 2368–2381, 1998.

HSIEH, Y.; CHEN, J.; KORFMACHER, W. A. Mapping pharmaceuticals in tissues using MALDI imaging mass spectrometry. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 55, p. 193–200, 2007.

HUBER, L.A.; PEREIRA, T.A.; RAMOS, D.N.; REZENDE, L.; EMERY, F.S.; SOBRAL, L.M.; LEOPOLDINO, A.M.; LOPEZ, R.F.V. Topical Skin Cancer Therapy Using Doxorubicin-Loaded Cationic Lipid Nanoparticles and Iontophoresis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.11, p. 1-14, 2015.

JANFELT, C.; WELLNER, N.; LEGER, P-L.; KOKESCH-HIMMELREICH, J.; HANSEN, S.H.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; HANSEN, H.S. Visualization by mass spectrometry of 2-dimensional changes in rat brain lipids, including N-acylphosphatidylethanolamines, during neonatal brain ischemia. **The FASEB Journal**, v.26, p.2667-2673, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; Histologia Básica, 9ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

KAMPEN, J.J.A.; BURGERS, P.C.; GROOT, R.; GRUTERS, R.A., LUIDER, T.M. Biomedical application of MALDI mass spectrometry for small-molecule analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, p.101-120, 2011.

KELES, L.A., de MELO, N.I., AGUIAR, G.P., WAKABAYASHI, K.A.L., CARVALHO, C.E.; CUNHA, W.R.; CROTTI, A.E.M.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Lychnophorinae (Asteraceae): a survey of its chemical constituents and biological activities. **Química Nova**, v.33, p. 2245-2260, 2010.

LACHI-SILVA, L., SHERWIN, K. B. S, VOELKNER, A., SOUSA, J.P.B., LOPES, J.L.C., SILVA, D.B., LOPES, N.P., KIMURA, E., DERENDORF, H., DINIZ, A. Simultaneous Characterization of Intravenous and Oral Pharmacokinetics of Lychnopholide in Rats by Transit Compartment Model. **Planta Medica**, v. 81 p. 1121-1127, 2015.

LI, B.; HANSEN, S.H.; JANFELT, C. Direct imaging of plant metabolites in leaves and petals by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.348, p.15-22, 2013.

LI, L.; HAN, J.; WANG, Z.; LIU, J.; WEI, J.; XIONG, S.; ZHAO, Z. Mass spectrometry methodology in lipid analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15(6), p.10492-10507, 2014.

LIN A.; KARIN M. NF-KB in cancer: a marked target. **Seminars in Cancer Biology**, v. 13, p. 107-114, 2003.

LOPEZ, R.F.V; SETO, J.E; BLANKSCHTEIN,, D.; LANGER, R. Enhancing the transdermal dlivery of rigid nanoparticles using simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. **Biomaterials**, v. 32, p.933-941, 2011.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

NIELSEN, P.A.; ANDERSSON, O.; HANSEN, S.H.; SIMONSEN, K.B.; ANDERSSON, G. Models for predicting blood-brain barrier permeation. **Drug Discovery Today**, v.16, p. 472-475, 2011.

OECD 428 - OECD Guideline for testing of chemicals - Guideline 428 : Skin absorption: In vitro method Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, adopted 13 April 2004.

OLIVEIRA, A. B.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species **Phytotherapy Research**, v.10, p.292-295, 1996.

OLSEN, L.R.; HANSEN, S.H.; JANFELT, C. Distribution of terfenadine and its metabolites in locusts studied by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.407, p. 2149-2158, 2015.

OLSEN, L.R.; JENSEN-GABEL, C.; WUBSHET, S.G.; KONGSTAD, K.T.; JANFELT, C.; BADOLO, L.; HANSEN, S.H. Charaterization of midazolam metabolism in locusts: the role of a CYP3A4-like enzyme in the formation of 1'-OH and 4-OH midazolam. **Xenobiotica**, v.46, p. 99-107, 2016.

ROBICHAUD, G.; GARRARD, K.P.; BARRY, J.A.; MUDDIMAN, D.C. MSiReader: an open-source interface to view and analyze high resolving power MS imaging files on matlab platform. National Institute of Health, v. 25, p. 718-721, 2013.

RUNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GOREN, N.; VICHNWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.7, p. 2343-2352, 1999.

SAKAMOTO, H. T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E. E.; STARK, C. B. W.; GATES, P.; LOPES, N. P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 693—695, 2003.

SANTOS, P.A.; AMARANTE, F.C.; PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PEREIRA, M.R.P.; LOPES, N.P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.52, p.1433-1435, 2004.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., PETROVIC, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, CMO.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. MELLO, J.CP; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R (Org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora UFSC, Capítulo 15, p. 301-332, 2001.

SEELEY, E.H.; OPPENHEIMER, S.R.; MI, D., CHAURAND, P.; CAPRIOLI, R.M. Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v.19, p.1069-1077, 2008.

SHARIATGORJI, M.; STRITTMATTERS, N.; NILSSON, A.; KÄLLBACK, P.; ALVARSSON, A.; ZHANG, X.; VALLIANATOU, T.; SVENNINGSSON, P.; GOODWIN, R.J.A.; ANDREN, P.E. Simultaneous imaging of multiple neurotransmitters and neuroactive substances in the brain by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **NeuroImage**, v. 136, p. 129-138, 2016.

SILVA, D.B.; LOPES, N.P. MALDI-MS of flavonoids: a systematic investigation of ionization and in-source dissociation mechanisms. **Journal of Mass Spectrometry**, v.50, p. 182-190, 2015.

SKELLY, *et al.* Workshop on principle and practices of in vitro percutaneous penetration studies, v.4, p.265-267, 1987.

SLENO, L.; CAMPAGNA-SLATER, V.; VOLMER, D.A. Dissociation reactions of protonated anthracycline antibiotics following electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 255-256, p. 130-138, 2006.

SOUSA, J. P. B.; TOMAZ, J. C.; 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.

SOARES, A.C.F.; SILVA, A.N.; MATOS, P.M.; SILVA, E.H.; HELENO, V.C.G.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C; SASS, D.C. Complete ¹H and ¹³C structural assignments for a group of four goyazensolid-type furanoheliangolides. **Quimica Nova**, v.35, p.2205-2209, 2012.

SOARES, M.S; SILVA, D.F.; FORIM, M.R.; SILVA, M.F.G.F; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C; SILVA, D.B; LOPES, N.P., CARVALHO, S.A; SOUZA, A.A; MACHADO, M.A. Quantification and localization of hesperidin and rutin in *Citrus sinensis* grafted in *C. limonia* after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. **Phytochemistry**, v.115, p.161-170, 2015.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J.; GOLOGAN, B.; COOKS, G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science**, v.306, p.471-473, 2004.

TANAKA, K. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42 (33), p. 3860-3870, 2003.

TANAKA, K.; WAKI,H.; IDO, Y.; AKITA,S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.2(8), p. 151-153, 1988.

TZROSS,L.; FUKUDA, T.; COSTA-LOTUFO, L.V.; JIMENEZ, P.; CLAIR, J.J., FENICAL, J. Seriniquinone, a selective anticancer agent, induces cell death by autophagocytosis, targeting the cancer-protective protein dermcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.111, p.14687-14692, 2014.

WISEMAN, J.M.; PUOLITAIVAL, S.M.; TAKÁTS, Z.; COOKS, R.G.; CAPRIOLI, R.M. Mass Spectrometry profiling in intact biological tissue by using desorption electrospray ionization. **Angewandte Chemie**, v.117, p.7256-7259, 2005.

WISEMAN, J.M.; IFA, D.R.; QINGYU, S.; COOKS, R.G. Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. **Angewandte Chemie**, v.45, p.7188-7192, 2006.

WISEMAN, J.; IFA, D.R.; ZHU, Y.; KISSINGER, C.B.; MANICKE, N.E.; KISSINGER, P.T.; COOKS, R.G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: imaging drugs and metabolites in tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.18121-18125, 2008.