

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo

Maíra Rosato Silveira Silvério

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo

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

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Maíra Rosato Silveira Silvério

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine
Lopes

Ribeirão Preto

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Silvério, Maíra Rosato Silveira

Estudo do metabolismo *in vitro* do partenolídeo. Ribeirão Preto, 2016.

74 p.: 25 il.; 30 cm.

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

Orientador: Lopes, Norberto Peporine

1. Metabolismo *in vitro*
2. Partenolídeo
3. 1,10-epóxi-partenolídeo
4. Tripanocida
5. Leishmanicida

RESUMO

SILVÉRIO, M. R. S. **Estudo do metabolismo *in vitro* do partenólídeo**. 2016. 74f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O partenólídeo é uma lactona sesquiterpênica do tipo germacrolídeo, considerado como marcador da espécie *Tanacetum parthenium* e responsável pela atividade biológica do extrato das folhas desta planta. O extrato padronizado é comercializado como medicamento fitoterápico de registro simplificado pela ANVISA para profilaxia de enxaqueca. Além disso, existem vários estudos recentes demonstrando diversas atividades biológicas desta substância, como atividade antineoplásica e antiparasitária. Desta maneira, surge a necessidade de conhecimento da toxicologia deste composto, como os dados farmacocinéticos, farmacodinâmicos e de toxicidade. Neste trabalho foi avaliado o estudo introdutório de metabolismo *in vitro* do partenólídeo, ou seja, a avaliação dos possíveis metabólitos formados através das reações que mimetizam a oxidação pelo sistema citocromo P-450, utilizando catalisadores biomiméticos e pela biotransformação utilizando microssomas de rato. Através do modelo biomimético foi verificada a formação de um metabólito putativo majoritário, o qual foi isolado da reação do partenólídeo com MCPBA catalisada pela metaloporfirina FeTFPPCI e caracterizado como 1(*R*),10(*R*)-epóxi-partenólídeo. A avaliação da reatividade do partenólídeo, neste modelo oxidativo, foi realizada através da variação do agente oxidante e do catalisador. Na catálise em meio biológico utilizando microssoma de rato foi detectado um único metabólito, o qual apresentou espectro de massas e tempo de retenção similar ao produto isolado da reação biomimética com FeTFPPCI e MCPBA, sugerindo desta maneira, tratar-se da mesma substância. Ainda, neste estudo, foram realizados ensaios preliminares de citotoxicidade do partenólídeo e de seu metabólito putativo, sendo ambos os compostos ativos.

Palavras-chave: Partenólídeo; metabolismo *in vitro*; 1,10-epóxi-partenólídeo, tripanocida; leishmanicida.

ABSTRACT

SILVÉRIO, M. R. S. ***In vitro* metabolism of parthenolide**. 2016. 74f. Dissertation Master. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Parthenolide is a sesquiterpene lactone (germacrolide moiety) considered as a chemical marker of *Tanacetum parthenium* species and described as responsible for the biological activity of the leaves extract. The standardized extract is presented in Brazilian market as an herbal medicine for headache preventing (simplified registration at ANVISA). Moreover, several investigations in the literature have demonstrated its antiparasitic and antineoplastic activity. However, there is a need for knowledge on its toxicology, such as pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicity evaluations. Thus, the aim of this work is the *in vitro* analysis of parthenolide biomimetic metabolism (like cytochrome P-450 system) applying organometallic catalysts and biotransformation by rat microsomes. A major putative metabolite was isolated from parthenolide biomimetic oxidative reaction with MCPBA catalyzed by metalloporphyrin FeTFPPCl and it was characterized as 1(*R*),10(*R*)-epoxy-parthenolide. The reactivity of parthenolide (at this oxidative model) was performed by varying the oxidizing agent and catalyst amounts. At rat microsome model, only a single metabolite was detected, which showed identical mass spectrum and retention time of the previously isolated putative metabolite (from the biomimetic reaction with MCPBA and FeTFPPCl). In addition, parthenolide and its putative metabolite were preliminary evaluated for the trypanocidal and leishmanicidal activity and both compounds showed significant biological activity.

Key-word: Parthenolide; *in vitro* metabolism; 1,10-epoxy-parthenolide; trypanocidal; leishmanicidal.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estudos de metabolismo

O metabolismo ou biotransformação compreende uma série de reações bioquímicas catalisadas por enzimas inespecíficas, as quais promovem alterações na estrutura química da substância, dentro do organismo (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O, 2008).

As alterações na estrutura química têm como intuito a eliminação da substância do organismo, através de líquidos corpóreos, tais como bile, urina e suor. O processo de metabolização torna a substância mais polar e hidrofílica, favorecendo sua eliminação (JOSEPHY; GUENGERICH; MINERS, 2005; LAINE, 2008).

As reações de metabolização são divididas em duas fases:

- Fase I: compreendem as reações de oxidação, redução e hidrólise, as quais tornam as substâncias mais polares através da inserção de grupamentos hidroxilas, sulfidrilas, aminas ou carboxilas (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O, 2008).

- Fase II: compreendem as reações de conjugação (glicuronidação, metilação, acetilação), nas quais ocorrem a incorporação de cofatores endógenos às substâncias que já passaram pela etapa de Fase I de biotransformação (JANCOVA; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2010).

As reações de fases I e II podem ocorrer em vários tecidos do organismo, como rim, pulmão, intestino delgado e pele, entretanto, o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo no organismo (THUMMEL; KUNZE; SHEN, 1997).

Nas reações de fase I existem várias enzimas responsáveis pela biotransformação de substâncias, todavia as enzimas do sistema citocromo P-450 são as principais enzimas envolvidas nesta fase de metabolização (LOHMANN; KARST, 2008).

O citocromo P-450 é uma hemeoproteína constituída de um átomo de ferro em seu núcleo. Na forma reduzida, esta hemeoproteína reage com monóxido de carbono e forma um complexo que possui absorvância máxima no comprimento de onda de 450 nm, por isso denominado citocromo P-450 (OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O, 2008). Este sistema é ainda abreviado como CYP 450, P-450 ou simplesmente CYP. Através da utilização de oxigênio molecular, as enzimas do

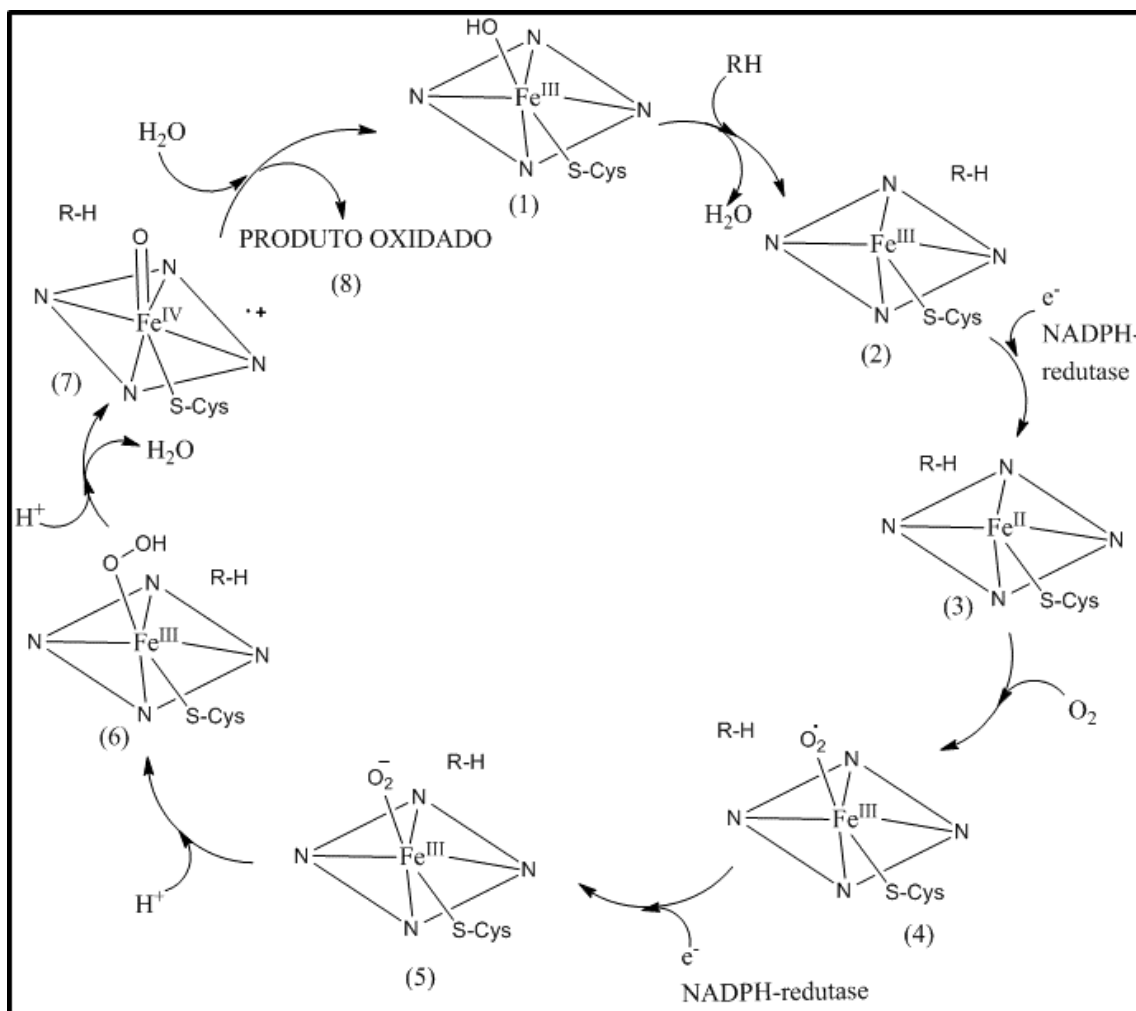
CYP 450 catalisam a inserção de um átomo de oxigênio em um substrato e a formação de água a partir do outro átomo de oxigênio (LOHMANN; KARST, 2008).

Além de participar da biotransformação, as enzimas do CYP 450 também são responsáveis pela bioativação de substâncias, as quais podem tornar-se carcinogênicas ou quimioterápicas. Participam ainda da biossíntese de hormônios esteroides e prostaglandinas (COSTAS, 2011).

A reação de oxidação realizada pelas enzimas do CYP 450 ocorre através do esquema representado na Figura 1.1, responsável pela desintoxicação de diversos xenobióticos do organismo, os quais são compostos químicos estranhos ao organismo, tais como medicamentos, pesticidas, poluentes, dentre outros (SANTOS et al, 2011). As etapas para reação de oxidação contemplam (REEDIJK; BOUWMAN, 1999; DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997):

- (1) O átomo de ferro está no estado de oxidação +3 (Fe^{3+}), com o sexto ponto de coordenação ligado a uma molécula de água.
- (2) O substrato se liga a este complexo e desloca a molécula de água, consumindo NADPH.
- (3) Ocorre a redução do ferro Fe^{3+} para Fe^{2+} .
- (4) O oxigênio molecular (O_2) se liga ao átomo de ferro, formando o radical $\text{Fe III}(\text{O}-\text{O}^{\bullet})$.
- (5) Através da transferência de elétron, forma-se o complexo $\text{Fe III}(\text{O}-\text{O})^{\bullet-}$ superóxido.
- (6) Este complexo é protonado, originando $\text{Fe III}(\text{O}-\text{OH})$.
- (7) Após segunda protonação e seguida de eliminação de água, ocorre a clivagem do oxigênio molecular, originando o complexo oxiferrilporfirina Fe IVO^{*+} . Este intermediário é considerado o responsável pela catálise de reações do CYP 450.
- (8) Na última etapa, o complexo Fe IVO^{*+} reage com o substrato, formando o produto oxidado e água.

Figura 1.1. – Ciclo catalítico de oxidação do CYP 450.



Fonte: Adaptado de LOHMANN; KARST, 2008.

A maioria dos xenobióticos são normalmente metabolizados por mais de uma subfamília do citocromo P-450. A subfamília P-450 3A4 representa 40 % do CYP 450 hepático, além de ser a mais abundante na mucosa intestinal. Estas enzimas são responsáveis por 35 % da metabolização do sistema citocromo P 450 (LAINE, 2008). As enzimas do CYP3A4 têm papel significativo no metabolismo de primeira passagem hepático e intestinal, o qual pode gerar metabólitos importantes de serem monitorados em estudos toxicológicos (THUMMEL; KUNZE; SHEN, 1997).

As reações de fase II também são importantes para a biotransformação de substâncias endógenas e xenobióticos, as quais são responsáveis pela inativação metabólica da ação farmacológica. Além disso, nesta etapa de biotransformação, os xenobióticos normalmente tornam-se substâncias mais hidrofílicas devido à reação de

conjugação com moléculas endógenas, como ácido glicurônico e ácido sulfúrico. Consequentemente, após a conjugação, os xenobióticos são mais facilmente excretados do organismo. Entretanto, existem compostos que são convertidos pelas enzimas de fase II a intermediários altamente reativos que podem agir como substâncias químicas carcinogênicas e mutagênicas por se ligarem covalentemente ao DNA (JANCOVA; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2010).

A enzima de maior participação nas reações de fase II é a glicuroniltransferase, responsável pela conjugação do ácido glicurônico com substrato, seguida da sulfotransferase, responsável pela conjugação do ácido sulfúrico com substrato (EVANS; RELLING, 1999). Além destas enzimas, podemos citar N-acetiltransferase (acetilação) e glutathione-S-transferase (conjugação com glutathione) (JOSEPHY; GUENGERICH; MINERS, 2005).

Várias metodologias foram desenvolvidas com o objetivo de mimetizar as reações de fase I e II *in vivo* que são promovidas no fígado, sendo que os principais modelos biológicos são os microsomas hepáticos, fração citosólica de fígado e fração S9 de fígado (SINZ, 2012).

Outra metodologia utilizada para mimetizar as reações de fase I envolve a utilização de catalisadores organometálicos como metaloporfirinas e/ou catalisador de Jacobsen e de agentes oxidantes. Este modelo, denominado modelo oxidativo biomimético do sistema citocromo P-450, merece destaque, pois diversos protocolos já utilizados, demonstraram a possibilidade de obtenção de possíveis metabólitos também formados *in vivo* (LOHMANN; KARST, 2008; COSTAS, 2011).

Ensaio de metabolismo *in vitro* devem ser avaliados e estudados anteriormente aos ensaios clínicos para obtenção de dados farmacocinéticos, como distribuição, metabolismo e excreção e informações referentes às possíveis interações e atividades biológicas da substância a ser testada. Estas informações prévias são importantes para conhecimento toxicológico da substância e de seus possíveis metabólitos para verificar a viabilidade de sua utilização como medicamento e para condução adequada dos ensaios clínicos com seres humanos, os quais são normalmente longos e dispendiosos (GESEF; ANVISA, 2013).

Durante o desenvolvimento de um novo medicamento, os estudos de metabolismo podem auxiliar na identificação de grupos funcionais da estrutura do fármaco que possam ser vulneráveis às reações de metabolização, estabelecer a

identidade química e toxicidade de possíveis metabólitos, além de fornecer produtos com maior atividade do que o próprio fármaco (PEARSON; WIENKERS, 2008).

Uma ferramenta bastante útil utilizada nos estudos de metabolismo é a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (IES), pois esta técnica auxilia na identificação dos produtos formados na metabolização do xenobiótico, além de apresentar sensibilidade e especificidade. Com esta técnica é possível pesquisar na amostra analisada, compostos prováveis de ocorrerem na metabolização, como por exemplo produtos oxidados ou hidratados; realizar a identificação do metabólito através da comparação dos perfis de fragmentação e da avaliação da acurácia de massas (PRASAD et al, 2011, DEMARQUE et al 2016).

Outra ferramenta utilizada é a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, a qual pode ser aplicada para caracterização e/ou elucidação dos produtos de metabolismo (LARIVE; BARDING; MEREDITH, 2015; GOWDA; GOWDA; RAFTERY, 2014). Com esta técnica é possível obter informação detalhadas sobre a estrutura química de uma substância composta por átomos que possuem núcleos ativos à ressonância magnética nuclear, como o ^1H e o ^{13}C .

1.2 Estudo de metabolismo *in vitro* por modelo oxidativo biomimético

As reações oxidativas envolvendo o uso de metaloporfirinas e/ou ligantes de Salen como catalisadores organometálicos podem simular reações de Fase I de biotransformação catalisadas pelo CYP 450. Por esta razão são utilizadas como modelo *in vitro* para avaliação do metabolismo e denominadas de reações oxidativas biomiméticas ou modelo oxidativo biomimético (ROCHA et al, 2014; NIEHUES et al, 2012; COSTAS, 2011).

A principal vantagem deste modelo, quando comparado com o modelos biológicos, é o maior rendimento de metabólitos oxidados, o que facilita o isolamento em maior escala e a identificação estrutural. Outros pontos favoráveis deste modelo são a reprodutibilidade das reações, a redução da utilização de animais e menor custo (BERNADOU; MEUNIER, 2004).

Como o isolamento de enzimas do sistema citocromo P-450 possui um custo elevado, a utilização de modelos sintéticos, como metaloporfirinas e catalisador de Jacobsen, é uma alternativa interessante para o estudo do processo de oxidação de diversos xenobióticos (SANTOS et al, 2011).

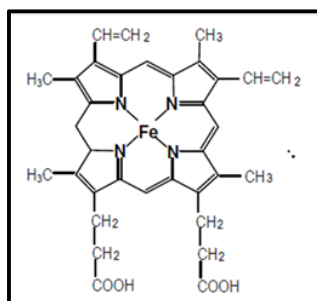
As reações oxidativas biomiméticas possuem os seguintes constituintes: o substrato (substância a ser avaliada), um agente oxidante (por exemplo, ácido cloroperbenzóico, iodosilbenzeno) e o catalisador (metaloporfirina ou ligante de Salen) (MEUNIER; BERNADOU, 2002; LOHMANN; KARST, 2008).

Estudos realizados por nosso grupo (NPPNS – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos) demonstraram correlação entre os metabólitos obtidos em diferentes ensaios *in vitro*, como modelo biomimético com metaloporfirina e ensaio de microsomas hepáticos (SANTOS; LOPES, 2008; GOUVEA, 2013), além da correlação entre metabólito obtido em ensaios *in vitro* e posteriormente em ensaio *in vivo* (NIEHUES et al., 2012; FERREIRA et al., 2012. THOMAZZINI et. al., 2016), reforçando, desta maneira, a importância da utilização de modelos *in vitro*, para avaliação da rota de metabolismo de um composto.

1.2.1 Metaloporfirinas

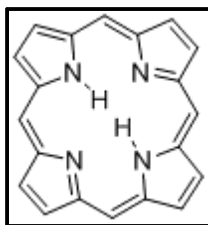
As metaloporfirinas são utilizadas nos modelos biomiméticos de reação de oxidação de xenobióticos, pois apresentam estrutura química similar à ferroportofirina IX (Figura 1.2), a qual está presente no sítio ativo das enzimas do CYP 450, local em que acontece a ligação do oxigênio molecular, posteriormente utilizado na oxidação dos xenobióticos (COSTAS, 2011; LOHMANN; KARST, 2008).

Figura 1.2. – Esquema da estrutura química da Ferroprotoporfirina IX.



As metaloporfirinas são constituídas por quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de metileno e possuem em seu centro um metal, que pode ser ferro (Fe), manganês (Mn) ou rutênio (Ru) em substituição aos dois átomos centrais de hidrogênio do anel porfirínico (Figura 1.3). O tamanho do átomo do metal influencia na conformação do anel e na estabilidade da metaloporfirina (SCHAAB, 2008).

Figura 1.3. Estrutura química do anel porfirínico base livre.



As metaloporfirinas são classificadas em primeira, segunda e terceira geração (Figura 1.4).

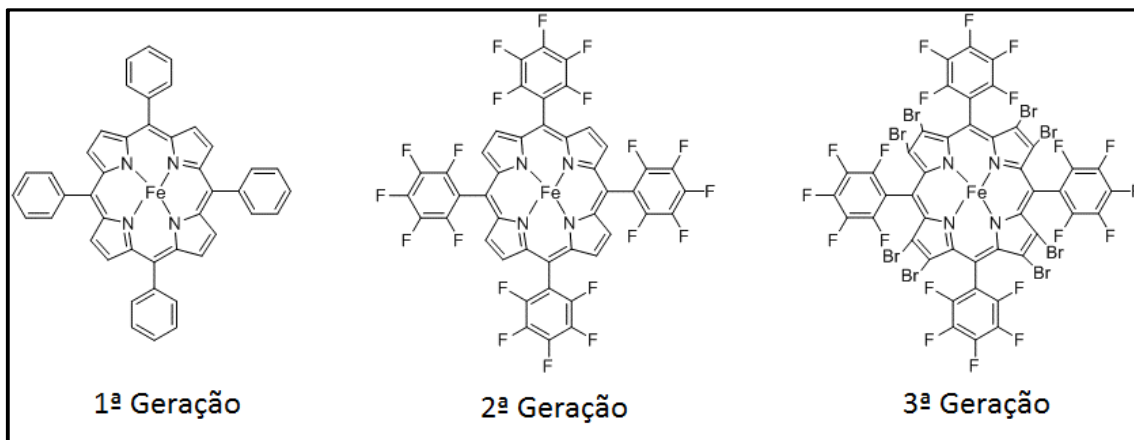
A primeira geração de metaloporfirinas possui o substituinte fenil na posição meso-arílica, representada como tetrafenil-porfirina (TPP) (GROVES et al., 1979). Entretanto, uma desvantagem destas metaloporfirinas é a rápida degradação oxidativa no meio reacional proporcionando um número limitado de sítios catalíticos para as reações (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997; LOHMANN; KARST, 2008).

A segunda geração destes catalisadores contém adicionalmente grupamentos retiradores de elétrons ou átomos eletronegativos, como cloro e flúor, ligados ao substituinte fenil das posições meso-arílicas do anel porfirínico. As substâncias meso-tetrakis (2,6-diclorofenil) manganês-porfirina (MnTDCPP) e cloreto de meso-tetrakis(pentafluorofenil) porfirina-ferro (FeTFPPCl) são exemplos de metaloporfirinas de segunda geração. Esta modificação proporcionou redução da degradação destes catalisadores e aumento da sua reatividade (COSTAS, 2011).

Nas metaloporfirinas de terceira geração há ainda a inserção de átomos de halogênios nas posições β -pirrólicas como, por exemplo, meso-tetrakis (2,6-diclorofenil)-octabromo porfirina (Br8TDCPP), meso-tetrakis (2,6-diclorofenil)- β -octacloro porfirina (Cl8TDCPP) e meso-tetrakis (pentafluorofenil)-octafluor porfirina (F8TPFPP). O elevado grau de halogenação nestes catalisadores promove largas mudanças positivas no par redox Fe (III)/(II), proteção da porfirina contra danos oxidativos, além de selar a estrutura macrolítica (COSTAS, 2011).

A porfirina ferro (metaloporfirina com átomo de ferro no centro) tem papel importante como catalisador eficaz em reações de redução-oxidação. As porfirinas ferro contendo substituintes halogenados, como a metaloporfirina utilizada neste estudo – cloreto de 5,10,15,20 Tetrakis (pentafluorofenil) porfirina-ferro (FeTFPPCl), são particularmente eficientes para reações de hidroxilação e epoxidação (KACZMARZYK et al., 2014).

Figura 1.4. Exemplos de estruturas químicas de metaloporfirinas de primeira, segunda e terceira geração.



1.2.2 Catalisador de Jacobsen

O composto denominado catalisador de Jacobsen também é utilizado em modelos biomiméticos de reação de oxidação de xenobióticos. Apesar de apresentar estrutura química diferente das metaloporfirinas, é similar quanto à estrutura eletrônica e atividade catalítica (MAC LEOD, 2007).

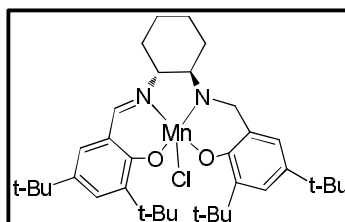
Este catalisador organometálico apresenta estrutura tetradentada e possui como ligantes dois nitrogênios e dois oxigênios. Apresenta ainda, os substituintes terc-butil nas posições 3,3' e 5,5' e cicloexil nos carbonos C1'' e C2'' (HOLBACH, WECK, 2006), conforme representado na Figura 1.5.

O fato do metal estar próximo ao centro estereogênico do complexo, possibilita que o catalisador de Jacobsen atue como um modelo para reações assimétricas, ou seja, para reações enantiosseletivas que possam gerar produtos estereoisômeros (enantiômeros e diastereoisômeros) em quantidades desiguais (VENKATARAMANAN, KUPPURAJ, RAJAGOPAL, 2005). Esta reação favorece a formação de um estereoisômero específico.

As vantagens deste catalisador quando comparado com as metaloporfirinas são estabilidade do complexo, obtenção por síntese em larga escala e de baixo custo. Este catalisador é utilizado na obtenção de epoxidação enantiosseletiva de oleofinas (HOLBACH, WECK, 2006).

A epoxidação que ocorre quando utilizado o catalisador de Jacobsen está relacionada com a estereoquímica do complexo e com a formação de um oxo complexo $MnV=O$ (MCGARRIGLE, GILHEANY, 2004). Desta maneira, a utilização deste catalisador é interessante para a obtenção de produtos epóxidos.

Figura 1.5. – Estrutura química do Catalisador de Jacobsen.



1.3 Estudo de metabolismo *in vitro* por modelo de microsossoma hepático

Além do modelo biomimético, o estudo de metabolismo *in vitro* pode ser também avaliado através da catálise biológica utilizando microsossomas hepáticos. Este estudo é realizado através da incubação do substrato com o precipitado de microsossoma ressuspenso em tampão, na presença de cofatores (BRANDON et al., 2003).

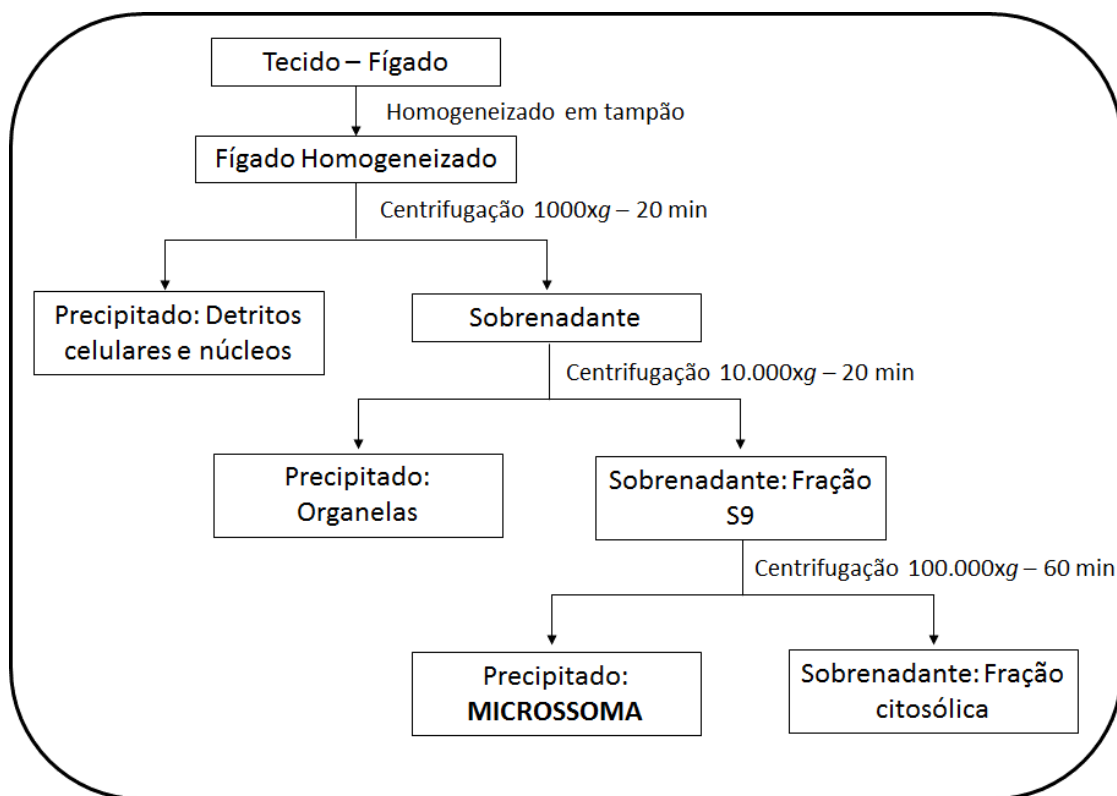
O precipitado microsossomal é obtido através da homogeneização de tecido do fígado e posterior centrifugação diferencial, conforme demonstrado na Figura 1.6. Resumidamente, inicia-se o procedimento com arrefecimento do fígado excisado com tampão, à temperatura de 4°C, para assegurar a estabilidade das enzimas. O fígado então é homogeneizado em tampão com banho de gelo e centrifugado para remoção de células inteiras, restos celulares e núcleos. Posteriormente o sobrenadante é centrifugado para separação de organelas indesejáveis, como mitocôndrias e lisossomos. Após nova centrifugação é possível obter um precipitado, correspondente à fração de microsossomas (SINZ, 2012).

O precipitado microsossomal é a fração sub-celular mais utilizada para a avaliação do metabolismo *in vitro* de fármacos, pois neste modelo há presença das enzimas envolvidas nas reações de Fase I e II, tais como as enzimas do sistema citocromo P- 450 e glicuroniltransferase (SINZ, 2012).

O modelo de microsossoma hepático é considerado um dos melhores sistemas *in vitro* para avaliação da biotransformação de fármacos, especialmente por fornecer

informações relevantes sobre os possíveis metabólitos a serem formados e avaliados em estudos *in vivo*, os quais são onerosos e demorados (BRANDON et al., 2003).

Figura 1.6. Esquema exemplificado para isolamento da fração microsomal do fígado para utilização em estudo de metabolismo *in vitro*.



Fonte: adaptado de SINZ, 2012.

1.4 Cinética de Reações

A determinação da taxa de reação, ou seja, a variação da concentração do reagente ou produto com o passar do tempo, possibilita o entendimento do comportamento da reação química (ATKINS; JONES, 1999). Esta determinação é útil nas reações oxidativas biomiméticas, pois pode-se conhecer o tempo ideal de reação (FERREIRA, 2013), entender a transformação do substrato em possíveis metabólitos putativos, a dependência do catalisador e oxidante e a velocidade da reação (PAN; NEWCOMB, 2007).

A taxa de reação é definida como a mudança da concentração $\Delta[\text{Reagente}]$ dividida pelo intervalo de tempo, Δt , na qual ela ocorre (Equação 1).

$$\text{Taxa de reação} = - \frac{\Delta [\text{Reagente}]}{(\Delta t)} \quad (1)$$

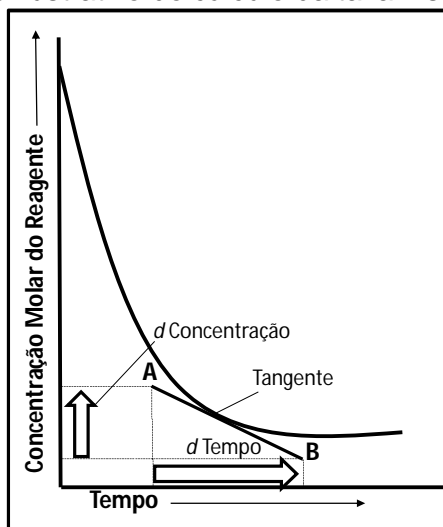
Quando a concentração do reagente diminui, ($\Delta [\text{Reagente}]$ é negativa) inclui-se o sinal negativo para representar que a substância foi consumida, ou seja, a concentração final é menor do que a inicial. Entretanto o resultado é expresso como positivo pois há o sinal negativo na equação, conforme demonstrado na equação 1. Para cálculo da taxa de reação de um produto não há o sinal negativo na equação.

Para medir a taxa de reação em um dado tempo, utiliza-se a tangente do gráfico no tempo de interesse e não a média, conforme equação 2. Após desenho da tangente utiliza-se dois pontos conhecidos de concentração e dois pontos conhecidos de tempo. Determina-se a taxa instantânea da reação através da divisão da diferença de concentração pela diferença de tempo (Figura 1.7). Esta taxa varia conforme a reação ocorre.

$$\text{Taxa instantânea de reação} = \frac{(d [\text{Reagente}])}{(d t)} \quad (2)$$

Através da avaliação cinética, utilizando as taxas de reações, é possível otimizar as condições experimentais dos parâmetros que se desejam utilizar, como por exemplo, nas reações oxidativas biomiméticas.

Figura 1.7. Gráfico ilustrativo do cálculo da taxa instantânea de reação.

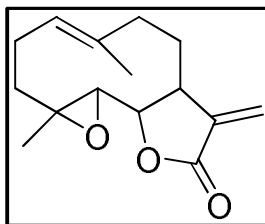


Fonte: Adaptado de ATKINS; JONES, 1999.

1.5 Partenólídeo e sua importância

O partenólídeo (ou ainda vulgarmente denominado de partenolido ou partenolídio) é uma lactona sesquiterpênica, do tipo germacrolídeo (Figura 1.8) que está presente nas folhas da espécie *Tanacetum parthenium*, sendo o principal composto bioativo e também marcador desta planta (GEORGE et al., 2012). Por ser comumente referido como partenólídeo e assim denominado na IN 2/2014 da ANVISA, neste trabalho utilizaremos o termo partenólídeo para se referir a esta substância.

Figura 1.8. Estrutura química da lactona sesquiterpêncica Partenólídeo – marcador da espécie *Tanacetum parthenium*.



A espécie *Tanacetum parthenium* está presente na Instrução Normativa nº 02 de 2014 da ANVISA, indicada como um medicamento fitoterápico de notificação simplificada para profilaxia de enxaqueca. O medicamento é administrado via oral, sendo o extrato produzido a partir das folhas da planta. A dose indicada de partenólídeo é de 0,2 a 0,6 mg por dia.

Popularmente esta espécie é ainda utilizada para aumento do fluxo menstrual, diminuição do corrimento vaginal, auxiliar no tratamento de espasmos, de desordens estomacais e da febre (CARVALHO, 2009).

Mais recentemente, os estudos sobre o partenólídeo estão voltados para sua atividade anti-inflamatória, antiparasitária e, especialmente, anticâncer (KIM et al., 2015; POPIOLEK-BARCZYK et al., 2015; NAM et al., 2015; TIUMAN et al., 2014). O partenólídeo possui em relevante efeito citotóxico, sendo portanto, promissor para utilização como fármaco antitumoral, assim como alguns de seus derivados químicos e metabólitos (KOLEV et al., 2014; KEMPEMA et al., 2015; HEXUM et al., 2015).

Desta maneira, o partenólídeo tem sido alvo de muitos estudos em relação às suas possíveis atividades biológicas, entretanto há poucos trabalhos sobre ensaios de metabolismo, os quais são imprescindíveis tanto para a observação da atividade

biológica como para o desenvolvimento de um medicamento baseado no partenolideo e seus derivados.

Um estudo de Fase I foi realizado para verificar o efeito do tratamento de câncer utilizando extrato padronizado de *Tanacetum parthenium* contendo 500 mg de partenolideo por cápsula. Os resultados deste estudo mostraram que não foi possível detectar partenolideo no plasma dos voluntários, atribuído à possível baixa biodisponibilidade do ativo e à pureza inadequada do extrato utilizado no estudo, embora tenha declarado utilizar um extrato padronizado (CURRY III et al., 2003). Os resultados deste trabalho demonstram a importância dos ensaios para o estudo do metabolismo *in vitro* do partenolideo, pois estes testes podem sugerir as enzimas envolvidas no processo de metabolização, bem como identificar os metabólitos formados na biotransformação para monitoramento em estudos clínicos.

Recentemente, um estudo avaliou a disposição farmacocinética do partenolideo em ratos. Os resultados deste estudo comprovaram a baixa biodisponibilidade do partenolideo, além de curto tempo de meia-vida (ZHAO et al., 2016). O baixo valor de $T_{1/2}$ pode sugerir rápida biotransformação do partenolideo por enzimas do CYP 450.

Em outro estudo, o metabolismo *in vitro* do partenolideo foi avaliado pela catálise oxidativa de variantes do CYP 450 de bactéria, em que os metabólitos obtidos foram identificados pelas técnicas de espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia de raio-X, sendo dois produtos hidroxilados e um epoxidado. Posteriormente foi avaliada comparativamente a atividade antileucêmica e citotóxica do partenolideo, destes metabólitos e seus derivados, demonstrando importante aplicabilidade de reações mediadas pelo CYP 450 para obtenção de metabólitos ativos (KOLEV et al., 2014).

Neste contexto, o estudo do metabolismo *in vitro* do partenolideo, por meio de catálise oxidativa, é uma estratégia interessante para conhecimento e obtenção de metabólitos oxidados. Tais metabólitos podem ser importantes para auxiliar na avaliação toxicológica do partenolideo, visto que estudos já publicados em literatura sugerem significativa biotransformação desta lactona sesquiterpênica por meio do sistema citocromo P-450.

5. CONCLUSÕES

Através deste trabalho foi possível concluir que:

- a) o partenólídeo é um substrato reativo para o modelo oxidativo biomimético e através do estudo cinético, verificou-se que o MCPBA é o oxidante que reage mais rapidamente com o substrato e o diacetato de iodobenzeno é o oxidante que possibilita maior formação do metabólito putativo majoritário, ambos na presença do catalisador porfirínico FeTFPPCI.
- b) o escalonamento da reação do partenólídeo com FeTFPPCI e MCPBA possibilitou a caracterização do metabólito putativo majoritário como 1,10-epóxi-partenólídeo, através das técnicas de RMN e EMAR-IES.
- c) a análise de DCV juntamente com cálculos teóricos, possibilitou a determinação da configuração absoluta do metabólito putativo como 1(*R*),10(*R*)-epóxi-partenólídeo.
- d) na metabolização do partenólídeo por microssoma hepático de rato foi detectado apenas um metabólito, o qual sugere tratar-se do produto 1,10-epóxi-partenólídeo.
- e) os ensaios realizados de citotoxicidade sugerem que o metabólito 1(*R*),10(*R*)-epóxi-partenólídeo apresenta efeito semelhante ao partenólídeo para o modelo testado de atividade tripanocida, entretanto redução do efeito leishmanicida. Estes resultados, reforçam a necessidade de avaliação deste metabólito nos estudos farmacológicos e toxicológicos do partenólídeo.

6. REFERÊNCIAS

AL-FATLAWI, A.A.; et al. Effect os parthenolide on growth and apoptosis regulatory genes of human cancer cell lines. **Pharmaceutical Biology**. v. 53, n. 1, p. 104-109, 2014.

AVULA, B., et al. Quantification of parthenolide in *Tanacetum* species by LC-UV/LC-MS and microscopic comparison of Mexican/US feverfew samples. **Pharmazie**. v. 61, p. 590-594, 2006.

BERNADOU, J., MEUNIER, B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. **Advanced Synthesis & Catalysis**. v. 346, n. 2-3, p. 171-184, 2004.

BRANDON, E.F.A. et al. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 189, p. 233-246, 2003.

CARVALHO, L.M. Documentos 144 – Artemísia. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 1-17, 2009.

CHAVES, J.S.; COSTA, F.B. A proposal for the quality controlo of *Tanacetum parthenium* (feverfew) and its hydroalcoholic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 3, 2008.

COSTAS, M. Selective C-H oxidation catalysed by metalloporphyrins. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 255, p. 2912-2932, 2011.

CURRY III, E.A., et al. Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with câncer. **Investigational New Drugs**. v. 22, p. 299-305, 2004.

DEMARQUE, D.P., et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: na importante tool for the sctructural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**. v. 33, p. 432-455, 2016.

DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T.G.; XIE, L.Y. Polyhaloporphyrins: unusual ligands for metals and metal-catalyzed oxidations. **Accounts of Chemical Research**. v. 30, n. 6, p. 251-259, 1997.

EVANS, W.E.; RELLING, M.V.; Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. **Science**. v. 286, p. 487 – 491, 1999.

FERREIRA, L.S., et al. *In vitro* metabolismo of grandisin, a lignan with anti-chagasic activity. **Planta Medica**. v. 78, p. 1939-1941, 2012.

FERREIRA, L.S. **Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

GEORGE, V.C, et al. A review on the therapeutic potentials of parthenolide: a sesquiterpene lactone. **International Research Journal of Pharmacy**. v. 3, n. 2, p. 69-73, 2012.

GEORGE, V.C; KUMAR, D.R.N.; KUMAR, R.A. Relative *in vitro* potentials of parthenolide to induce apoptosis and cell cycle arrest in skin câncer cells. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2016.

GESEF. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, versão 2, 2013.

GOWDA, G.A.N.; GOWDA, Y.N.; RAFTERY, D. Expanding the Limits of Human Blood Metabolite Quantitation Using NMR Spectroscopy. **Analytical Chemistry**. v. 87, p. 706-715, 2015.

McGARRIGLE, E.M.; GILHEANY, D.G. Chromium- and manganese-salen promoted epoxidation of alkenes. **Chemical Reviews**. v. 105, n. 5, p. 1564-1598, 2005.

GOUVEA, D.R. **Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart.**

(Asteracea: Vernoniae). Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2013.

HEXUM, J.K., et al. Parthenolide prodrug LC-1 slows growth of intracranial glioma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 25, n. 12, p. 2493-2495, 2015.

INSTRUÇÃO NORMATIVA n02. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, mai. 2014.

JANCOVA, P.; ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Phase II drug metabolizing enzymes. **Biomedical Papers**. v. 154, n. 2., p. 103-116, 2010.

JIN, P.; MADIEH, S.; AUGSBURGER, L.L. Selected physical and chemical properties of feverfew (*Tanacetum parthenium*) extracts important for formulated product quality and performance. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. v.9, n. 1, p. 22-30, 2008.

JOSEPHY, P.D.; GUENGERICH, F.P.; MINERS, J.O. "Phase I" and "Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out?. **Drug Metabolism Review**. v. 37, p. 575-580, 2005.

KACZMARZYK, T., et al. Mössbauer study of a tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin iron (III) chloride in comparison with the fluorine unsubstituted analogue. **Nukleonika**. v. 60, n. 1, p. 57-61, 2015.

KARIN, J.P-R., et al. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**. v. 18, n. 1, p. 36-39, 2010.

KEMPEMA, A.M., et al. Synthesis and antileukemic activities of C1-C10 modified parthenolide analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 23, n. 15, p. 4737-4645, 2015.

KIM, S-L., et al. Parthenolide enhances sensitivity of colorectal cancer cells to TRAIL by inducing death receptor 5 and promotes TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**. v. 46, p. 1121-1130, 2015.

KOLEV, J.N., et al. Discovery of potente parthenolide-based antileukemic agentes enable by late-stage P450-mediated C-H functionalization. **ACS Chemical Biology**. v. 9, n. 1, p. 164-173, 2014.

LAINE, R. Metabolic stability: main enzymes involved and best tools to assess it. **Current Drug Metabolism**. v. 9, n. 9, p. 921-927, 2008.

LARIVE, C.K.; BARDING, G.A.; MEREDITH, M.D. NMR spectroscopy for metabolomics and metbolic profiling. **Analytical Chemistry**. v. 87, n. 1, p. 133-146, 2015.

LIU, Y., et al. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**. v. 69, n. 2, p. 581-593,1997.

LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 391, n. 1, p. 79-96, 2008.

MAC LEOD, T.C.O., et al. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v. 273, n. 1-2, p. 259-264, 2007.

MEUNIER, B.; BERNADOU, J. Metal-oxo species in P450 enzymes and biomimetic models. Oxo-hydroxo tautomerism with water-soluble metalloporphyrins. **Topics in Catalysis**. v. 21, n. 1-3, p. 47-54, 2002.

NAM, Y.J., et al. Sesquiterpene lactone parthenolide attenuates production of inflammatory mediators by suppressing the Toll-like receptor-4-mediated activation of the Akt, mTOR, and NK- κ B pathways. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 388, p. 921-930, 2015.

NIEHUES, M., et al. Biomimetic *in vitro* oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the *in vivo* phase I metabolismo of bioactive compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 54, p. 804-812, 2012.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ed. Atheneu Editora São Paulo LTDA, 2008.

PAN, Z.; NEWCOMB, M. Kinetics and mechanism of oxidation reactions of porphyrin-iron(IV)-oxo intermediates. **Inorganic Chemistry**. v. 46, n. 16, p. 6767-6774, 2007.

PEARSON, P.G.; WIENKERS, L.C. **Handbook of Drug Metabolism**. 2ed. Informa Healthcare USA, 2008.

PERROT, S., et al. Resazurin metabolismo assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. **Toxicological Sciences**. v. 72, n. 1, p. 122-129, 2003.

POPIOLEK-BARCZYK, K., et al. Parthenolide relieves pain and promotes M2 microglia/macrophage polarization in rat modelo f neuropathy. **Neural Plasticity**. v. 2015, p- 1-15, 2015.

PRASAD, B., et al. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 30, n. 2, p. 360-337, 2011.

REEDIJK, J.; BOUWMAN, E. **Bioinorganic Catalysis**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 1999.

ROCHA, B. A., et al. Jacobsen catalyst as a cytochrome P450 biomimetic model for the metabolismo of a monensin A. **BioMed Research International**. v. 2014, p.1-8, 2014.

ROLÓN, M., et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanossoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**. v.99, n. 2, p. 103-107, 2006.

SANTOS, J.S., et al. Biomimetic simazine oxidation catalyzed by metalloporphyrins. **Applied Catalysis A: General**. v. 408, n. 1-2p. 163-170, 2011.

SANTOS, M.D.; LOPES, N.P. HPLC-ESI-MS/MS analysis of oxidized di-caffeoylquinic acids generated by metalloporphyrin-catalyzed reactions. **Química Nova**. v. 31, n. 4, p. 767-770, 2008.

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

SIGMA-ALDRICH. Certificate of Analysis – Parthenolide (Product Number: P0667 Batch Number: MKBS4351V). Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/COFA/P0/P0667/P0667-BULK_MKBS4351V_.pdf>. Acesso em: 20 outubro 2014.

SINZ, M.A. *In vitro* and *in vivo* models of drug metabolism. In LYUBIMOV, A.V. **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. 1 ed, John Wiley & Sons, 2012.

THUMMEL, K.E.; KUNZE, K.L.; SHEN, D.D. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 27, p. 99-127, 1997.

TIUMAN, T.S., et al. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 1, p. 176-182, 2005.

TIUMAN, T.S., et al. Cell death in amastigote forms of *Leishmania amazonensis* induced by parthenolide. **BMC Microbiology**. v. 14, p. 152, 2014.

THOMAZZI, S.M., et al. Formation of a predominant metabolite of hydroxydihydrocarvone evaluated by a biomimetic oxidative model and in rat liver microsomes. **Planta Medica Letters**. v. 2, p. e61-e64, 2015.

VENKATARAMANAN, N.S.; KUPPURAJ, G.; RAJAPOGAL, S. Metal–salen complexes as efficient catalysts for the oxygenation of heteroatom containing organic compounds—synthetic and mechanistic aspects. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 249, p. 1249-1268, 2005.

HOLBACH, M.; WECK, M. Modular approach for the development of supported, monofunctionalized, Salen catalysts. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 71, n. 5, p. 1825-1836, 2006.

ZHAO, A-Q., et al. Determination of parthenolide in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 119, n. , p. 99-103, 2016.