

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

JÚLIA MARTINS

Estudos de metabolismo e inibição enzimática in vitro de moléculas hidrofóbicas: avaliação de um produto natural e um complexo de rutênio

Ribeirão Preto
2019

JÚLIA MARTINS

Estudos de metabolismo e inibição enzimática in vitro de moléculas hidrofóbicas: avaliação de um produto natural e um complexo de rutênio

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira

Ribeirão Preto
2019

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.

Martins, Júlia.

Estudos de metabolismo e inibição enzimática in vitro de moléculas hidrofóbicas: avaliação de um produto natural e um complexo de rutênio. Ribeirão Preto, 2019.

99 p.; 30cm.

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

Orientador: De Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes.

1. Iangambina. 2. Rutênio. 3. Metabolismo. 4. Microsomas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Júlia Martins

Estudos de metabolismo e inibição enzimática in vitro de moléculas hidrofóbicas: avaliação de um produto natural e um complexo de rutênio.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Henriqueta, que sempre me apoiou, acreditou no meu potencial e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos e objetivos. Graças a você, me tornei a pessoa que sou. Exemplo de perseverança e caráter, eu não poderia ter escolhido mãe melhor. Essa vitória não é somente minha, é nossa! Amo você!

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre indicar o melhor caminho e me proteger em todas as etapas de minha vida.

Ao Professor Doutor Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, por ser providencial para que este trabalho acontecesse. Muito obrigada pelos conselhos, ensinamentos, por toda a orientação e disponibilidade em ajudar, ouvir e me dar coragem para continuar! Além de um profissional exemplar e dedicado, você é um ser humano sensacional!

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo in vitro e Técnicas de Separação. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela convivência, amizade, risadas e momentos de aprendizado.

À minha mãe, Henriqueta, por não me deixar desistir e sempre estar presente, apesar da distância física. Sua força, perseverança e vontade de vencer são uma verdadeira inspiração para mim.

À Fernanda Zampieri Leandro, por fazer eu me apaixonar pela área acadêmica e não me deixar desistir mesmo nos momentos mais difíceis. Muito obrigada pelos puxões de orelha, pelos conselhos e por sempre estar lá por mim. Você sempre será um exemplo de força, motivação, inovação e pesquisadora para mim.

À Lidiane Leal Andriolla, por ser essa amiga para a vida toda, tão presente mesmo que distante e que sempre me apoia e está ao meu lado. Por querer me ver bem e saber me aconselhar melhor que qualquer outra pessoa!

À Camila Camarotti, pela amizade, risadas e sinceridade em todos os momentos.

À Dra. Franciane Marquele de Oliveira e à Apis Flora, por ceder a iangambina e permitir que este trabalho acontecesse e também por toda a disponibilidade e orientações.

À Profa. Dra. Sofia Nikolaou e à Dra. Bruna Possato por ceder o complexo de rutênio que faz parte deste trabalho e pelos ensinamentos em Química Inorgânica.

Ao Departamento de Química da FFCLRP – USP pela estrutura disponibilizada e pelo suporte à pesquisa.

A todos os envolvidos no Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela oportunidade de realizar este trabalho de doutorado e pela bolsa de estudos concedida com apoio da CAPES.

Às agências de fomento FAPESP, CAPES e CNPq pelo fomento fornecido a este trabalho.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001” .

*Os que questionam são sempre os
mais perigosos. Responder não é
perigoso. Uma única pergunta pode
ser mais explosiva do que mil
respostas.*

Jostein Gaarder

RESUMO

MARTINS, J. **Estudos de metabolismo e inibição enzimática in vitro de moléculas hidrofóbicas: avaliação de um produto natural e um complexo de rutênio.** 2019. 99 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) recebem essa denominação por serem doenças de países tropicais em que a maior parte da população é pobre e não tem condições de pagar por um tratamento sofisticado. Devido a isso, a maior parte das farmacêuticas não manifesta interesse em investir em pesquisas para a cura e/ou tratamento dessas doenças. Porém, pesquisadores de diversos países vêm concentrando seus esforços para desenvolver tratamentos para essas doenças. Dentre elas, estão a Doença de Chagas e a leishmaniose, abordadas nesse trabalho, e a duas moléculas promissoras para seu tratamento. Um produto natural (iangambina e seu epímero epi-iangambina, para leishmaniose) e um complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8- tetraidroisoquinolina (THIQ-Ru, para doença de Chagas). Quando uma molécula ou composto apresenta características promissoras para se tornar um candidato a fármaco, diversos testes e experimentos in vitro e in vivo devem ser realizados para avaliar o quanto essa molécula é segura para ser aplicada em um organismo vivo. Para fixar parâmetros como doses e toxicidade, os experimentos in vitro são feitos a priori, pois não envolvem o organismo propriamente dito e geralmente são menos dispendiosos. Alguns dos parâmetros mais importantes de serem avaliados é a metabolização dessa molécula e seu potencial em provocar interações medicamentosas, que podem ser testadas a partir de ensaios in vitro utilizando microsomas hepáticos de humano (HLM), uma fração dos hepatócitos que possui uma quantidade significativa de enzimas da família do citocromo P450 (CYP450), responsáveis por 75% da metabolização dos fármacos. O CYP450 possui diversas subfamílias, chamadas de isoformas, cuja afinidade por determinados compostos (tanto endógenos quanto exógenos) pode ser maior ou menor. Quando um substrato é metabolizado unicamente por uma isoforma do CYP450, diz-se que esse substrato é seletivo, e seu metabólito é utilizado como marcador das reações dessa isoforma. As principais isoformas do CYP450 são: CYP1A2, 2C9 2D6, 2C19, 2E1 e 3A4. A partir dessas informações, desenham-se os experimentos de metabolização e de interação medicamentosa. Nos experimentos de metabolização, o THIQ-Ru foi testado como substrato das enzimas do CYP450. Seu perfil cinético foi sigmoidal, indicando um cooperativismo homotrópico positivo, o que indica que o THIQ-Ru se liga à enzima, modificando sua conformação e fazendo com sua velocidade de metabolização seja aumentada. Também foram realizados experimentos de fenotipagem, para determinar qual isoforma do CYP450 participa majoritariamente de sua metabolização, em que o resultado foi a CYP3A4. Nos experimentos de interações medicamentosas, foram traçadas curvas de IC₅₀, nas quais a atividade remanescente da isoforma é plotada em função do logaritmo da concentração do potencial inibidor. Um inibidor forte apresenta um IC₅₀ abaixo de 10 µmol L⁻¹, enquanto o IC₅₀ de um inibidor moderado situa-se entre 10 e 100 µmol L⁻¹, caso o IC₅₀ fique acima de 100 µmol L⁻¹, o composto é considerado um inibidor fraco da isoforma. O complexo THIQ-Ru inibiu fortemente a atividade de todas as isoformas nas quais foi testado, CYP1A2, 2C9, 2D6, 2E1 e 3A4. A iangambina apresentou-se como um inibidor fraco das isoformas CYP2C9, 2D6 e moderado da 3A4, enquanto aumentou a atividade enzimática das isoformas CYP1A2 e 2E1. Já seu epímero, a epi-iangambina, apresentou-se como um inibidor fraco da CYP2C9, moderado da CYP2D6 e forte da CYP3A4 e aumentou a atividade enzimática das isoformas CYP1A2 e 2E1. Os resultados apresentados já indicam uma direção para futuros estudos in vitro e in vivo, que avaliarão a viabilidade dos compostos testados neste trabalho como candidatos a fármacos.

Palavras-chave: CYP450, microsomas hepáticos de humano, iangambina, rutênio, metabolismo hepático.

ABSTRACT

MARTINS, J. ***In vitro* metabolism and enzymatic inhibition studies with hydrofobic molecules: evaluation of a natural product and a ruthenium compound.** 2019. 99 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Neglected Tropical Diseases (DTN) are illnesses that affect tropical countries which have a poor population. As this population cannot pay for sophisticated treatments, pharmaceutical companies are not so interested in develop treatments for NTD. However, there is reseachers that, seeing the situation in tropical countries, are studying new molecules that can be applied as treatment for NTD. This work evaluates two new molecules: a natural product (yangambin and its epimer, epi-yangambin, for leishmaniasis) and a ruthenium compound with ligand 5,6,7,8-tetrahydroisoquinolin (THIQ-Ru, for Chaga's Disease). The development of new drugs requires many phases, but the pre-clinical phase are crucial for determining the next steps of this development. Human liver microsomes (HLM) are useful model to evaluate how these molecules will behave in human liver. HLM are made of CYP450 enzymes, which are responsible for liver metabolism of 75% drugs that enter human body. By using HLM, studies can evaluate the new drug candidate kinect behavior, which CYP450 isoform mostly participates of molecules metabolism and if the drug candidate can cause CYP450 isoforms inhibition by plottig IC₅₀ curves. If IC₅₀ value is higher than 100 µmol L⁻¹, the molecule is a weak inhibitor; if the value is between 10 and 100 µmol L⁻¹, the inhibition is moderate; values lower than 10 µmol L⁻¹ are strong inhibition. Yangambin is a weak inhibitor of all evaluated CYP450 isoforms and even increased the activity of CYP1A2 and 2E1. However, its epimer, epi-yangambin strongly inhibited CYP3A4 and also increased CYP1A2 and 2E1 activity. THIQ-Ru presented a sigmoidal Kinect profile and a positive homotropic cooperativity. It means that THIQ-Ru bonds in the enzymes activity site, increasing its own metabolism. The isoform that major participates of THIQ-Ru metabolism is CYP3A4. THIQ-Ru strongly inhibits all CYP450 isoforms evaluated.

Keywords: CYP450; yangambin; ruthenium; human liver microsomes; liver matabolism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química da iangambina (A) e da epi-iangambina (B).....	5
Figura 2 Estrutura do complexo $[Ru_3O(CH_3COO)_6(C_9H_{11}N)_3]PF_6$	7
Figura 3 Cromatogramas representativos em escala analítica da epi-iangambina (1) e iangambina (2).....	32
Figura 4 Cromatograma representativo da epi-iangambina (1) e iangambina (2) em escala semi-preparativa.....	33
Figura 5 Cromatograma representativo da fração de lignoides totais contendo epi-iangambina (1) e iangambina (2) em escala semi-preparativa.....	33
Figura 6 Cromatograma referente a análise do pico correspondente a epi-iangambina coletado após a injeção do extrato FLT nas condições cromatográficas estabelecidas em escala semi-preparativa.....	34
Figura 7 Cromatograma referente a análise do pico correspondente a iangambina coletado após a injeção do extrato FLT nas condições cromatográficas estabelecidas em escala semipreparativa.....	34
Figura 8 Solubilidade da iangambina na concentração $200 \mu mol L^{-1}$ em solução tampão fosfato $100 mmol L^{-1}$ pH 7,4, com e sem tensoativos (resultados expressos como média \pm SE).....	38
Figura 9 Solubilidade da epi-iangambina na concentração $200 \mu mol L^{-1}$ em solução tampão fosfato $100 mmol L^{-1}$ pH 7,4, com e sem tensoativos (resultados expressos como média \pm SE).....	38
Figura 10 Gráficos de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da isoforma CYP1A2. Gráficos de barras mostrando o aumento da atividade da CYP1A2 ao aumentar a concentração de iangambina (C) e epi-iangambina (D).....	42
Figura 11 Gráfico de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da CYP2C9.....	43
Figura 12 Gráficos de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da CYP2C19.....	44
Figura 13 Gráfico de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da isoforma CYP2D6.....	44
Figura 14 Gráficos de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da isoforma CYP2E1. Gráficos de barras mostrando o aumento da atividade da CYP2E1 ao aumentar a concentração de iangambina (C) e epi-iangambina (D).....	46
Figura 15 Gráficos de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina e da epi-iangambina na atividade da isoforma CYP3A4/5 com diferentes substratos. (A) iangambina como inibidor e nifedipina como substrato; (B) iangambina como inibidor e midazolam como substrato; (C) epi-iangambina como inibidor e nifedipina como substrato; (D) epi-iangambina como inibidor e midazolam como substrato.....	47
Figura 16 Cromatograma representativo da análise do complexo de rutênio (1) e padrão interno fenacetina (2) após definição das condições de análise.....	50
Figura 17 Solubilidade do THIQ-Ru na concentração $10 \mu mol L^{-1}$ em solução tampão fosfato $100 mmol L^{-1}$ pH 7,4, com e sem tensoativos (resultados expressos como média \pm SE).....	52

Figura 18 Solubilidade do THIQ-Ru na concentração 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando os tensoativos Pluronic F-127 [®] , Tween 20 [®] e SensactiveC-30 [®] , em solução de tampão Tris-KCl e solução tampão fosfato, pH 7,4 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (resultados expressos como média \pm SE).....	52
Figura 19 Avaliação do potencial de inibição enzimática do tensoativo Sensactive C-30 [®] na concentração de 0,1% em meio microsomal.....	53
Figura 20 Cromatogramas representativos da seletividade do método desenvolvido.....	55
Figura 21 Gráficos representativos de faixa linear da reação enzimática do THIQ-Ru frente às enzimas do CYP450 em três diferentes concentrações.....	58
Figura 22 Perfil cinético enzimático representativo da reação enzimática do THIQ-Ru frente às enzimas do CYP450.....	59
Figura 23 Gráfico de Eadie-Hofstee utilizando os dados da cinética enzimática do THIQ-Ru frente as enzimas do CYP450.....	60
Figura 24 Avaliação das enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo do complexo utilizando enzimas recombinantes do CYP450 (supersomas [®]).....	61
Figura 25 Gráfico de IC ₅₀ para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP1A2.....	62
Figura 26 Gráfico de IC ₅₀ para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP2C9.....	63
Figura 27 Gráfico de IC ₅₀ para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP2D6.....	64
Figura 28 Gráfico de IC ₅₀ para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP2E1.....	65
Figura 29 Gráfico de IC ₅₀ para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP3A4 utilizando midazolam (A) e nifedipina (B) como substratos.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração dos analitos em meio microsomal empregados na validação analítica.....	24
Tabela 2 - Condições utilizadas nos estudos de inibição.....	28
Tabela 3 – Preparo de amostra empregando a ELL.....	29
Tabela 4 - Concentrações de substrato utilizadas nos ensaios de determinação do IC ₅₀	29
Tabela 5 – Tempos de incubação e concentração de proteína utilizadas.....	30
Tabela 6 -Resultados da análise de espectrometria de massa de alta resolução da iangambina e epi-iangambina.....	35
Tabela 7 - Teste de metabolização da iangambina pelas enzimas do CYP450.....	39
Tabela 8 – Teste da metabolização da iangambina em baixas concentrações.....	40
Tabela 9 – Precisão e exatidão intraensaio do método analítico.....	56
Tabela 10 – Precisão e exatidão interensaio do método analítico.....	56
Tabela 11 – Estabilidade na condição de incubação.....	57
Tabela 12 – Estabilidade na condição de incubação (tempo).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficiente de variação
CYP450	Citocromo P450
EMA	do inglês, <i>European Medicine Agency</i>
EPI	Epi-iangambina
ER	Erro relativo
ESI	Electrospray Ionization
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FLT	Fração de lignóides totais
HLM	do inglês, <i>Human Liver Microsomes</i>
HPLC	do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAN	Iangambina
IC ₅₀	Concentração de inibidor que inibe 50% da atividade enzimática
K _{0,5}	Afinidade aparente
K _M	Constante de Michaelis-Menten
n	Constante de Hill
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
RMN	Ressonância magnética nuclear
[S]	Concentração de substrato
THIQ-Ru	Complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina
UV	Radiação ultravioleta
V ₀	Velocidade inicial
V _{MAX}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas	1
1.1.1 Doença de Chagas	2
1.1.2 Leishmaniose	3
1.2 Desenvolvimento de novos fármacos	3
1.3 Xenobióticos escolhidos para os estudos	4
1.3.1 Iangambina (IAN) e epi-iangambina (EPI-IAN)	4
1.3.2 Complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8- tetraidroisoquinolina (THIQ-Ru).6	
1.4 O metabolismo e as enzimas do CYP450	8
1.4.1 Isoforma CYP1A2	9
1.4.2 Isoforma CYP2C9	9
1.4.3 Isoforma CYP2D6	10
1.4.4 Isoforma CYP2E1.....	10
1.4.5 Isoforma CYP3A4	11
1.5 Estudos in vitro envolvendo o CYP450	11
1.5.1 Microssomas hepáticos.....	11
1.5.2 Enzimas recombinantes do citocromo P450 (superssomas®)	12
1.6 Cinética enzimática	12
1.6.1 Cinética enzimática e cooperatividade	13
1.6.1.1 Coeficiente de Hill.....	14
1.7 Estudos de inibição enzimática e interações medicamentosas	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos Gerais	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Materiais e Reagentes	18
3.1.1 Padrões Analíticos	18
3.1.2 Solventes e Reagentes	18
3.2 Recebimento do Extrato Etanólico Bruto	19

3.3 Obtenção de iangambina e epi-iangambina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	19
3.4 Análise dos marcadores por espectrometria de massas	21
3.5 Caracterização estrutural da iangambina e epi-iangambina por ressonância magnética nuclear	21
3.6 Solubilidade da iangambina e epi-iangambina em meio aquoso.....	21
3.7 Desenvolvimento de método analítico para o THIQ-Ru	22
3.8 Solubilidade do THIQ-Ru em meio aquoso	22
3.9 Avaliação do efeito dos agentes solubilizantes no metabolismo do THIQ-Ru	23
3.10 Validação do método	23
3.10.1 Seletividade	24
3.10.2 Linearidade	24
3.10.3 Efeito Residual	24
3.10.4 Limite Inferior de Quantificação	25
3.10.5 Precisão e Exatidão.....	25
3.10.6. Estabilidade.....	25
3.10.6.1 Estabilidade em banho metabólico	26
3.10.6.2 Estabilidade em auto-injetor	26
3.11 Estudo de Pré-cinética do complexo THIQ-Ru frente às enzimas do CYP450	26
3.12 Cinética Enzimática do THIQ-Ru frente às enzimas do CYP450.....	26
3.13 Determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do THIQ-Ru empregando isoformas recombinantes da CYP450.....	27
3.14 Separações Cromatográficas para fins de avaliação dos xenobióticos como inibidores das enzimas do CYP450	27
3.15 Preparo de Amostra	28
3.16 Avaliação do potencial inibitório dos xenobióticos sobre as isoformas do CYP450 - Determinação do IC₅₀	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Estudos com os produtos naturais iangambina e epi-iangambina.....	31
4.1.1 Obtenção da iangambina e epi-iangambina.....	31
4.1.2 Caracterização estrutural da iangambina e epi-iangambina por espectrometria de massas de alta resolução e RMN.....	35
4.1.3 Solubilidade dos epímeros iangambina e epi-iangambina em meio aquoso	36
4.1.3.1 Solubilidade da iangambina e epi-iangambina	37
4.1.4 Ensaio preliminar de metabolismo da iangambina.....	38
4.1.5 Estudos de Inibição.....	41
4.1.5.1 Avaliação da iangambina e epi-iangambina como inibidores da CYP1A2	41

4.1.5.2 Avaliação da iangambina e epi-iangambina como inibidores da CYP2C9	43
4.1.5.3 Avaliação da iangambina e epi-iangambina como inibidores da CYP2C19	43
4.1.5.4 Avaliação da iangambina e da epi-iangambina como inibidores da CYP2D6	44
4.1.5.5 Avaliação da iangambina e da epi-iangambina como inibidores da CYP2E1	45
4.1.5.6 Avaliação da iangambina e da epi-iangambina como inibidores da CYP3A4	46
4.2 Estudos com o Complexo de Rutênio com o ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina (THIQ-Ru).....	49
4.2.1 Desenvolvimento de um método cromatográfico para análise do THIQ-Ru... ..	49
4.2.2 Avaliação da solubilidade do THIQ-Ru em meio aquoso.....	50
4.2.3. Avaliação da influência do tensoativo no metabolismo do THIQ-Ru pelas enzimas do CYP450	53
4.2.4 Validação de método analítico para quantificação do THIQ-Ru em meio microsomal.....	54
4.2.4.1 Linearidade	54
4.2.4.2 Seletividade	54
4.2.4.3 Efeito Residual	55
4.2.4.4 Limite Inferior de Quantificação	55
4.2.4.5 Precisão e Exatidão.....	56
4.2.4.6 Estabilidade.....	57
4.2.5 Determinação dos parâmetros enzimáticos do complexo THIQ-Ru após metabolismo pelas enzimas microsomais do CYP450 de humanos.....	57
4.2.6 Determinação das Isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do THIQ-Ru (Fenotipagem)	60
4.2.7 Inibição enzimática utilizando o THIQ-Ru como potencial inibidor das isoformas do CYP450	61
4.2.7.1 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP1A2.....	62
4.2.7.2 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP2C9.....	63
4.2.7.3 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP2D6.....	64
4.2.7.4 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP2E1	65
4.2.7.5 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP3A4/5.....	66
5 CONCLUSÕES.....	68
6 REFERÊNCIAS	69
7 ANEXOS	74
7.1 Espectros de massa da iangambina e epi-iangambina	74
7.1.1 Espectro de massas da iangambina.....	74

7.1.2 Espectro de massas da epi-iangambina	75
7.2 Espectros de RMN da iangambina e epi-iangambina	76
7.2.1 Espectro de ¹ H-RMN da iangambina (CDCl ₃ , 500 MHz).....	76
7.2.2 Espectro de HMBC da iangambina (CDCl ₃ , 500 MHz).....	76
7.2.3 Espectro de HMQC da iangambina (CDCl ₃ , 500 MHz)	77
7.2.4 Espectro de ¹ H-RMN da epi-iangambina (CDCl ₃ , 500 MHz)	77
7.2.5 Espectro de HMBC da epi- iangambina (CDCl ₃ , 500 MHz)	78
7.2.6 Espectro de HMQC da epi-iangambina (CDCl ₃ , 500 MHz).....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

Doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo de doenças infecciosas que estão relacionadas pela negligência que vêm sofrendo em termos de investimento para sua prevenção e controle. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera dezessete doenças como DTN: úlcera de Buruli, doença de Chagas, cisticercose, dengue, dracunculíase, equinococose, fasciolíase, tripanossomíase humana africana, leishmaniose, hanseníase, filariose linfática, oncocercose, raiva, esquistossomose, helmintíase transmitida pelo solo, tracoma e boubá (JOHNSTON; FORD; TAYLOR, 2014). Além do alto poder de causar epidemias, as DTN ainda podem causar problemas de crescimento em crianças, desenvolvimento intelectual e problemas para conseguir trabalho.

O Ministério da Saúde e o Ministério da Ciência e Tecnologia, na Segunda Oficina de Prioridades de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, em 2008, colocaram em evidência sete doenças como prioridade: dengue, doença de Chagas, leishmaniose, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose (WERNECK; HASSELMANN; GOUVÊA, 2011).

Tais doenças contribuem para a segregação social e perpetuação dos ciclos de pobreza, pois geralmente atingem as populações de baixa renda, especialmente crianças (WERNECK; HASSELMANN; GOUVÊA, 2011). As principais regiões afetadas são África, Ásia e América do Sul.

A descoberta de novos fármacos e vacinas é dificultada tanto pela complexa biologia dos parasitas, mas principalmente pelo desinteresse das indústrias farmacêuticas em investir em pesquisa de fármacos que terão como mercado consumidor populações mais carentes. Embora as DTN sejam responsáveis por 11,4% da carga global de doença, apenas 21 (1,3%) dos 1.556 novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004, foram desenvolvidos especificamente para essas doenças (VALVERDE, 2015).

Porém, pesquisadores (principalmente dos países mais atingidos) tentam reverter esse quadro. Há uma rede de pesquisadores provenientes de 15 países cujo nome é *Research Network Natural Products against Neglected Diseases* - ResNet NPND, que foi fundada em abril de 2011 durante um workshop na Universidade de Muenster e tem por objetivo estabelecer colaborações que facilitem o desenvolvimento de novas terapias para as DTN e a malária (que não é considerada uma DTN pela OMS). Dessa forma, os pesquisadores estudam moléculas que podem interagir com alvos específicos nos parasitas, controlando sua proliferação

(RESEARCH NETWORK NATURAL PRODUCTS AGAINST NEGLECTED DISEASES, 2015). Dentre as DTN existentes, as que serão abordadas neste trabalho são a Doença de Chagas e a leishmaniose.

1.1.1 Doença de Chagas

A doença, causada por um protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta por Carlos Chagas em 1909 e recebeu seu nome. Também conhecida como tripanossomíase americana, a Doença de Chagas pode ser transmitida a humanos com o parasita na forma de tripomastigota metacíclico (responsável pela fase aguda da doença) que está presente nas fezes de um inseto popularmente conhecido como barbeiro.

Milhões de pessoas estão infectadas em toda a América Latina, sendo que grande parte dos casos está localizada no Brasil, principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul (COURA; DIAS, 2009). É uma doença de evolução crônica, debilitante, que determina no homem quadros clínicos com características e consequências muito variadas. Ela está intimamente relacionada às más condições das moradias, pois essas favorecem a proliferação do agente transmissor (COURA, 2013).

Na última década, a contaminação por alimentos se tornou a principal forma de transmissão da Doença de Chagas. Pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz afirmam que a reação do corpo humano para contaminações via oral é mais grave, chegando a fazê-los afirmar que é uma “nova forma de uma doença antiga” (VALVERDE, 2015). Esses mesmos pesquisadores afirmam que quando a contaminação se dá por via oral em camundongos, a principal causa de morte deixa de ser cardiopatia e passa a ser a grande quantidade de moléculas pró-inflamatórias, que danificam órgãos e podem levar à morte. Em humanos, há sintomas como edema de face, hemorragia e dor abdominal, além dos sintomas de cardiopatia (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014).

O tratamento de primeira escolha para a Doença de Chagas é o benznidazol, sendo que em casos de intolerância ou ineficácia, é utilizado o nifurtimox. Ambos são compostos nitrogenados heterocíclicos e foram introduzidos no mercado nas décadas de 1960 e 1970. Os resultados obtidos com esses fármacos variam de acordo com a fase da doença, o período e dose do tratamento, a idade e a origem geográfica (COURA, DE CASTRO, 2002). Ambos os medicamentos apresentaram excelentes resultados com altas taxas de cura parasitológica durante a fase aguda, mas sua eficácia decai com o avanço da infecção, sendo desta forma crucial para seu sucesso, detecção e intervenção o mais cedo possível (COURA, BORGES-

PEREIRA, 2011). A alta incidência de efeitos colaterais, especialmente em adultos, levou ao abandono do tratamento em muitas situações (PINAZO et al., 2009), levando a mortes precoces.

1.1.2 Leishmaniose

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae. De modo geral, essas enfermidades se dividem em leishmaniose tegumentar americana, que ataca a pele e as mucosas, e leishmaniose visceral (ou calazar), que ataca órgãos internos (COURA, 2013).

A leishmaniose apresenta ampla distribuição no Brasil, Venezuela, Guiana Francesa, nas áreas florestais dos Andes, Suriname, Panamá, Oriente Médio, região neotropical e planície litorânea do golfo do México, Guatemala, Belize, Bacia Amazônica e outros (VILELA, M., MENDONÇA, S., 2013).

O parasita responsável pelas leishmanioses humanas é um protozoário que durante seu ciclo evolutivo necessita de hospedeiros vertebrados e de hospedeiros invertebrados (flebotomos). A transmissão acontece quando uma fêmea infectada de flebotomo passa o protozoário a uma vítima sem a infecção, enquanto se alimenta de seu sangue. Tais vítimas, além do homem, são vários mamíferos silvestres (como a preguiça, o gambá, roedores, canídeos) e domésticos (cão, cavalo etc). Os flebotomos são insetos pequenos, de cor amarelada e pertencem à ordem Diptera, mesmo grupo das moscas, mosquitos, borrachudos e maruins (COURA, 2013).

Os fármacos antimoniais pentavalentes (como o antimoniato de meglumina) ainda são a principal forma de tratamento da doença, apesar de os efeitos colaterais serem contundentes. Como segunda escolha, destacam-se a anfotericina B e a pentamidina, todos com toxicidade considerável (VILELA, M., MENDONÇA, S., 2013).

1.2 Desenvolvimento de novos fármacos

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO, ANDRICOPULO, OLIVA, 2010). Dessa forma, o investimento que é feito nesse setor tanto pelo setor público (em universidades e centros de pesquisa) quanto pelo setor privado (empresas farmacêuticas) influencia diretamente no desenvolvimento.

Tal desenvolvimento deve ser de caráter multidisciplinar, abrangendo diversas especialidades, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia

molecular e estrutural, entre outras. E, além da descoberta de moléculas bioativas, o desenvolvimento de fármacos também incorpora os estudos do metabolismo e relações entre a estrutura química e atividade (WERMUTH, 2003).

A primeira etapa de desenvolvimento de um novo fármaco é a de estudos pré-clínicos. Nessa etapa, são feitos diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* para determinar alvos biológicos, possíveis interações medicamentosas, como ocorre a absorção e distribuição dessa molécula pelo organismo e também como será sua eliminação. (DIAS et al., 2013) De uma forma geral, são avaliadas a segurança e eficácia do candidato a fármaco, por isso muitas moléculas são descartadas já nessa etapa por não apresentarem o perfil desejado (DIAS et al., 2013).

Caso seja bem-sucedido na fase de estudos pré-clínicos, o candidato a fármaco pode ser submetido às agências regulamentadoras de cada país, como a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), no caso do Brasil para ser autorizado a realizar testes em humanos através da licença para investigação de um novo candidato a fármaco (DIAS et al., 2013). Nessa etapa, são feitos diversos testes clínicos para avaliar a segurança e eficácia da molécula candidata. As fases clínicas são compostas por três etapas e, caso o candidato seja bem-sucedido e chegue a ser comercializado, há a fase IV pós-comercialização.

Na fase clínica I são realizados vários testes de dosagem dos princípios ativos em grupos de voluntários saudáveis para avaliação da segurança. Já na fase clínica II, a avaliação é feita em indivíduos que apresentam a doença ou disfunção alvo, para a avaliação de parâmetros como dosagem, eficácia e segurança da composição. Na fase clínica III a avaliação é feita em um número elevado de pacientes, que estão distribuídos em diferentes regiões geográficas, que são escolhidas de forma representativa, para uma melhor avaliação das propriedades farmacocinéticas, da eficácia e da segurança. Caso o candidato a fármaco seja bem-sucedido nas três fases, os dados clínicos obtidos são organizados e submetidos à agência reguladora para solicitação da aprovação de um novo fármaco. Após o início da comercialização, há a fase clínica IV, na qual é realizado o monitoramento do fármaco pós-comercialização em longo prazo (DIAS et al., 2013).

1.3 Xenobióticos escolhidos para os estudos

1.3.1 Iangambina (IAN) e epi-iangambina (EPI-IAN)

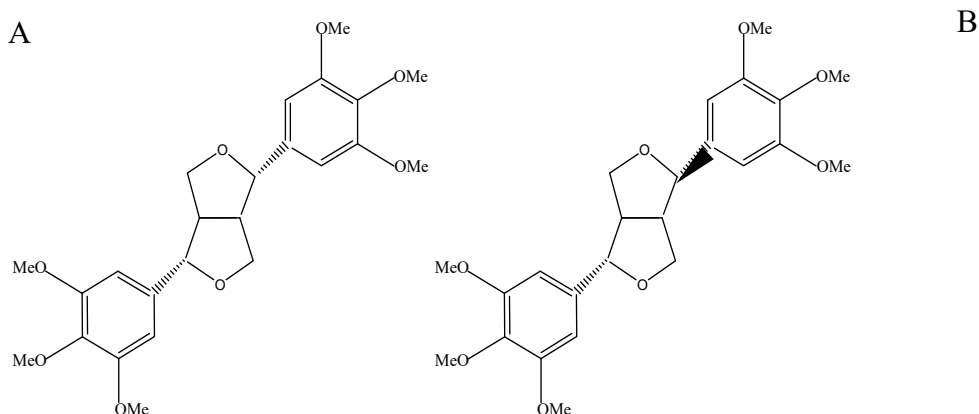
A iangambina (**Figura 1A**) faz parte da classe das lignanas, que são metabólitos secundários com uma grande variedade de estruturas derivadas dos fenilpropanoides. Esses

compostos provêm da via de biossíntese do ácido chiquímico e são estruturas compostas de unidades C_6C_3 ligadas por uma ligação β - β (8-8') (WARD, 2000). Vários compostos dessa classe apresentam propriedades anti-inflamatórias, antitumorais e antivirais.

A iangambina já foi encontrada em cerca de 20 espécies de plantas em diversas partes do mundo, como as Américas do Sul e do Norte, a África e a Europa (TIBIRIÇÁ, 2001). Algumas das espécies nas quais a iangambina está presente são: *Rollinia pickeli*, *Rollinia exalbida* e *Rollinia mucosa*, que pertencem à família Annonaceae. Na família Magnoliaceae, é encontrada na *Magnolia biondii* e na família Lauraceae, está presente na *Ocotea duckei* (TIBIRIÇÁ, 2001; MESQUITA et al, 1988; MORAIS et al, 1999).

A *Ocotea duckei* Vattimo é um vegetal de porte arbóreo, conhecida popularmente como louro de cheiro, louro pimenta ou louro canela. Essa planta é encontrada em florestas úmidas tropicais e subtropicais. No Brasil, está presente principalmente no Nordeste, nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Sergipe e Bahia (MORAIS et al, 1999). Este gênero apresenta uma grande diversidade de classes de substâncias cujos principais metabólitos são monoterpenos, alcaloides, lignanas e neolignanas (BARBOSA et al, 1999). A iangambina geralmente é extraída das folhas e das cascas do caule da *Ocotea duckei* Vattimo.

Figura 1- Estrutura química da iangambina (A) e da epi-iangambina (B).



Fonte: Autoria própria

Dentre suas atividades mais promissoras, destaca-se seu efeito anti-leishmania. Estudos mostraram que a fração rica em lignoides obtida da planta *Ocotea duckei* Vattimo demonstrou atividade promissora contra as cepas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* ao promover uma inibição do crescimento in vitro destas formas. Seu desempenho foi superior ao do fármaco antimoniato de meglumina (Glucantime[®]). A atividade biológica nesse estudo foi avaliada para o extrato

bruto, fração lignana (ou extrato purificado), e para a iangambina isolada da fração lignoide, todos extraídos das folhas e cascas do caule da planta. Os resultados se mostraram estatisticamente maiores do que os obtidos pelo Glucantime® (MONTE NETO et al, 2007), sugerindo que a nova alternativa (iangambina) parece ser bastante potente quando comparada com a terapêutica atual. Os efeitos in vitro da iangambina contra *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram avaliados e observou-se que os parasitas tratados apresentaram alterações significativas no padrão de morfologia celular, incluindo o aparecimento de células com formato anormal e com perda de motilidade, além da presença de picnose nuclear. A análise ultraestrutural mostrou características de morte celular por apoptose, bem como por autofagia (MONTE NETO et al, 2011).

Em outro estudo, pesquisadores utilizaram a iangambina nos experimentos de mutagenicidade em linhagens de *Salmonella typhimurium*, utilizando o teste de Ames. Os resultados foram negativos, mesmo na presença de ativação metabólica (MARQUES et al, 2003). Já em estudos de toxicidade aguda, a iangambina não induziu morte em camundongos por um período de 48 horas na concentração de até 1 g kg⁻¹, com administração oral ou intraperitoneal (JESUS-MORAIS et al, 2000).

Dessa forma, a iangambina é uma molécula com propriedades biológicas promissoras que podem ser úteis principalmente no tratamento da leishmaniose. Contudo, uma etapa importante no desenvolvimento de novos fármacos é a determinação de seu comportamento metabólico frente às enzimas do CYP450. Estudos de inibição podem determinar o comportamento da iangambina, como potencial inibidor das isoformas do CYP450, o que pode prever possíveis interações medicamentosas com outros fármacos (LAINE, 2008).

1.3.2 Complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8- tetraidroisoquinolina (THIQ-Ru)

O rutênio é conhecido por ter baixa toxicidade, o que geralmente está relacionado com a variedade de números de oxidação (NOX) por ele alcançado. Dessa forma, o rutênio tornou-se uma alternativa ao ferro em meios biológicos, já que alcança NOX variados (II, III, IV) inclusive em ambientes fisiológicos (CACITA et al, 2015).

O rutênio pode ser complexado na forma de complexos trinucleares de fórmula geral [Ru₃O(CH₃COO)₆(L)₃]ⁿ. De uma forma geral, complexos nos quais o rutênio possui NOX (III) ou superior, são estabilizados por ligantes (L) σ-doadores, enquanto ligantes π-aceptores estabilizam complexos cujo NOX do rutênio é inferior a (III). Os complexos trinucleares apresentam estrutura triangular, as quais os íons de rutênio são mantidos unidos por pontes μ-

oxo e de carboxilatos. Nesses complexos, os átomos de rutênio são mantidos próximos, gerando uma forte interação metal-metal tanto magneticamente quanto eletronicamente, favorecendo a deslocalização dos elétrons no núcleo $(\text{Ru}_3\text{O})^+$, fazendo-o se comportar como um único centro metálico (TOMA, ALEXIOU, DOVIDAUSKAS, 2002).

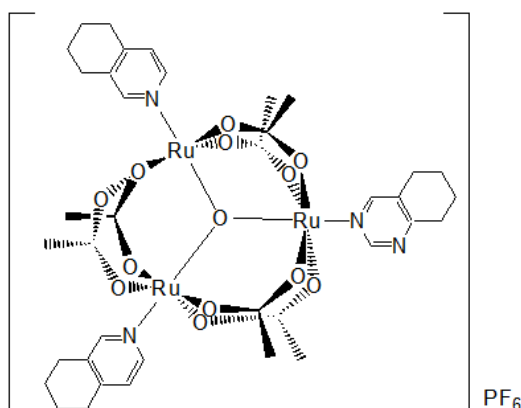
Além da variedade de NOX, das propriedades eletrocromicas e catalíticas, espécies contendo ligantes lábeis ou em ponte podem atuar como “tijolos” que permitem a construção de estruturas supramoleculares estáveis (CACITA et al, 2015).

Devido a essas propriedades, os complexos trinucleares de rutênio vêm se destacando em várias aplicações biológicas, como potenciais fármacos antitumorais, na terapia fotodinâmica e contra doenças tropicais negligenciadas. Geralmente, uma de suas principais fontes de atividade é o ligante NO que pode participar de diversas reações fisiológicas e pode ser tanto liberado quanto capturado pelos complexos de rutênio (TOMA, ALEXIOU, DOVIDAUSKAS, 2002).

Porém, o complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8- tetraidroisoquinolina (THIQ-Ru), que apresenta a fórmula $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N})_3]\text{PF}_6$ (**Figura 2**), não age liberando NO para o meio fisiológico, já que seus três ligantes são moléculas de 5,6,7,8- tetraidroisoquinolina. Apesar de seus mecanismos de ação serem ainda desconhecidos, o THIQ-Ru possui uma ação contra o *Trypanosoma cruzi* equiparada ao medicamento de referência no mercado (benzonidazol – Rochagan®, Rodanil®), (POSSATO et al., 2017). O THIQ-Ru também diminuiu a infestação de *Trypanosoma cruzi* do tecido cardíaco a valores abaixo de 10% (POSSATO et al., 2017).

Dessa forma, o estudo do complexo THIQ-Ru como potencial inibidor das isoformas do CYP450 traz informações importantes, já que sua ação na Doença de Chagas o justifica como um futuro candidato a fármaco.

Figura 2 – Estrutura do complexo $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N})_3]\text{PF}_6$.



Fonte: Autoria Própria

1.4 O metabolismo e as enzimas do CYP450

Quando um fármaco ou qualquer outro xenobiótico é ingerido, a tendência é que o corpo humano transforme essas substâncias através do metabolismo. O metabolismo consiste em um conjunto de reações, catalisadas por enzimas, que transformam os xenobióticos que entram no organismo em compostos mais polares, facilitando sua excreção pela urina. Dessa forma, o corpo impede que o xenobiótico permaneça por muito tempo ou em concentração muito alta no organismo, causando efeitos indesejáveis (BARREIRO et al., 2001).

As reações metabólicas são divididas em fase 1 (oxidação, redução e hidrólise) e fase 2 (conjugação). Os produtos de degradação (metabólitos), por sua vez, podem ser inativos ou ativos. Os metabólitos ativos podem agir por mecanismos de ação similares ou diferentes, ou até mesmo por antagonismo em relação ao fármaco de origem. O conhecimento da cinética da formação dos metabólitos ativos é importante não apenas para previsão do resultado terapêutico, mas também para explicar a toxicidade de um dado fármaco (OLGIVIE et al., 2008).

O fígado é o principal órgão metabolizador (incluindo a geração de metabólitos ativos ou tóxicos, depuração, interações farmacológicas e variabilidade individual). O bloqueio, ou mesmo a promoção do metabolismo, podem ser manipulados no sentido de obter fármacos com perfis farmacológicos mais favoráveis. A redução do número de metabólitos ativos, favorece uma cinética mais previsível e reduz a variabilidade individual, na medida em que a depuração metabólica dá lugar à depuração renal (OLGIVIE et al., 2008).

As principais responsáveis pelo metabolismo são famílias de enzimas, dentre elas estão as enzimas do citocromo P450 (CYP450), que são encontradas principalmente no fígado e no epitélio do intestino. A nomenclatura que define os vários elementos das famílias não reflete seus aspectos funcionais. Por exemplo, a CYP3A4, em que CYP diz respeito ao citocromo P450, 3 à família genética, A à sub-família genética e 4 ao gene específico. Qualquer pequena alteração na sequência de aminoácidos pode resultar em consequências incalculáveis para o metabolismo. A CYP2C19 metaboliza o omeprazol, mas a CYP2C9 não tem tal capacidade. Em termos de quantidade xenobióticos metabolizados, pode-se dizer que a ordem decrescente é 3A4, 2D6, 2C9, 2C10, 2C18, 2C19, 1A2 e 2E1, estes últimos com igual importância (SANTIAGO, 2003).

As enzimas do CYP450, por serem os catalisadores mais importantes envolvidos na oxidação de xenobióticos, representam um campo de pesquisa significativo para cientistas das áreas de toxicologia e farmacologia. As reações catalisadas pelas enzimas do CYP450 podem

resultar em baixa biodisponibilidade do composto em questão ou toxicidade, incluindo interações medicamentosas. Informações sobre quais isoformas do CYP450 estão envolvidas na metabolização de candidatos a fármaco já são requeridas para a aprovação dessas moléculas em muitos países, assim como os estudos sobre sua indução/inibição são cruciais para determinar se a molécula pode tornar-se uma promissora candidata a fármaco.

1.4.1 Isoforma CYP1A2

A isoforma CYP1A2, no que diz respeito à sua atividade catalítica para hidroxilações e outras transformações oxidativas, apresenta preferência por aminas aromáticas e compostos heterocíclicos. Suas biotransformações prototípicas são: *O*-desetilação da 7-etoxiresorufina, *O*-desetilação da fenacetina (utilizada neste trabalho) e N3-desmetilação da cafeína à paraxantina. Essas reações são comumente utilizadas para experimentos de fenotipagem e inibição (ZANGER, SCHWAB, 2013).

Devido à sua expressão relativamente alta no fígado, a CYP1A2 participa significativamente do metabolismo de uma série de fármacos, como analgésicos e antipiréticos (fenacetina, lidocaína), antipsicóticos (onlazapina e clozapina), antidepressivos (duloxetina), antiinflamatórios (nabumetona) e anti-hipertensivos (propranolol). Seu papel no metabolismo de fármacos para o tratamento de Alzheimer (tacrina), esclerose lateral amiotrófica (riluzol) e insônia (zolpidem) também é considerável. Fármacos como a flutamida são bioativados pela CYP1A2 (ZANGER, SCHWAB, 2013). Tratando-se de metabolismo de endógenos, os substratos da CYP1A2 incluem o ácido araquidônico, prostaglandinas, melatonina e ácido retinoico. Além disso, benzopirenos e diversos compostos carcinogênicos presentes em comida industrializada e combustão de produtos industrializados são bioativados pela CYP1A2 em intermediários que podem causar danos ao DNA. Os principais inibidores da CYP1A2 são o α -naftoflavona e a fluvoxamina (ZANGER, SCHWAB, 2013).

1.4.2 Isoforma CYP2C9

A isoforma CYP2C9 é o membro com maior expressão na subfamília CYP2C. Sua expressão, em níveis proteicos, é comparada à da CYP3A4, enquanto a CYP2C19, segunda mais expressa da subfamília, tem sua expressão por volta de dez vezes menor que a CYP2C9 (WILLIAMS, et al., 2003).

A CYP2C9, metaboliza ácidos fracos, incluindo o anticoagulante varfarina, os anticonvulsivantes fenitoína e ácido valpróico, o antagonista de receptor angiotensina

candesartana, antidiabéticos orais como clibenclamida e tolbutamida e a maioria dos anti-inflamatórios não-esteroides (WILLIAMS, et al., 2003).

Diclofenaco (utilizado neste trabalho) e tolbutamida são substratos clássicos utilizados em fenotipagem e estudos de inibição. Alguns estudos de cristalografia apontam que a CYP2C9 apresenta um sítio adicional para ligação de substratos (WILLIAMS, et al., 2003). A inibição da CYP2C9 é causada por fármacos como a sulfonamida sulfafenazol e o antimicótico fluconazol, e torna-se especialmente relevante nos casos de tratamento com o anticoagulante varfarina.

1.4.3 Isoforma CYP2D6

A quantidade de fármacos metabolizada pela CYP2D6 é considerada grande, se comparada à sua expressão relativamente pequena no fígado. Cerca de 15 a 25% de todos os fármacos clinicamente utilizados (de praticamente todas as classes) são metabolizados pela CYP2D6 (GELSTON et al., 2011). Fármacos como o tamoxifen, e analgésicos opióides como tramadol e codeína também são metabolizados por essa isoforma. A fenotipagem e inibição dessa isoforma são realizadas utilizando substratos como metoprolol, tramadol, bufuralol (utilizado neste trabalho) e debriosquina. A CYP2D6 é inibida por vários fármacos que não são substratos, mas se ligam a ela com grande afinidade, como quinidina ou metadona (GELSTON et al., 2011).

1.4.4 Isoforma CYP2E1

A isoforma CYP2E1 apresenta preferência por substratos de baixo peso molecular, como etanol, acetona e outros solventes orgânicos e narcóticos como halotano e alguns fármacos como clorzoxazona e paracetamol (ZANGER, SCHWAB, 2013). Muitas substâncias tóxicas para o ambiente e o ser humano, bem como carcinogênicos são substratos para essa isoforma. A participação da CYP2E1 na oxidação do etanol depende das condições apresentadas (ZANGER, SCHWAB, 2013). A principal enzima que oxida o etanol em acetaldeído é a álcool desidrogenase e a CYP2E1 apresenta maior participação somente em altas concentrações ou em casos de consumo crônico.

O substrato marcador da CYP2E1 classicamente é a clorzoxazona, que é um relaxante muscular também utilizado para reumatismo. Os inibidores mais conhecidos da CYP2E1 são dietilditiocarbamato (quimioterápico), dissulfiram (utilizado no tratamento de alcoolismo) e 4-

metilpirazol (também conhecido como fomepizol, utilizado no envenenamento por metanol e etilenoglicol).

1.4.5 Isoforma CYP3A4

A subfamília CYP3A representa o principal papel no metabolismo de fármacos, catalisando ~30% das reações de quase todas as classes de fármacos. O sítio ativo da CYP3A4 é grande e flexível, podendo acomodar e metabolizar uma grande variedade de moléculas, com preferência por aquelas lipofílicas, de estruturas comparativamente grandes. Substratos típicos de moléculas grandes são: imunossupressores, como ciclosporina A e tacrolimus; antibióticos macrolídeos, como a eritromicina (NIWA et al., 2008). Mas há também substratos menores, como: isofosfamida, tamoxifen, benzodiazepínicos, estatinas, opióides, dentre outros. A CYP3A4 também é uma eficiente hidroxilase de esteróis, tendo um papel importante no catabolismo de esteroides endógenos, como testosterona, progesterona, androstenediona, cortisol e ácidos biliares (ROBERTS et al., 2011).

A alta similaridade entre as isoenzimas da subfamília CYP3A (CYP3A4 e CYP3A5 compartilham >85% de suas sequências de aminoácidos) leva a uma grande similaridade de substratos seletivos entre as isoformas. Midazolam, nifedipina (ambos utilizados neste trabalho), alprazolam e eritromicina são utilizados para estudos de fenotipagem, porém não diferenciam as isoformas nem permitem considerar a regulação alostérica da enzima (ROBERTS et al., 2011). A inibição dessas isoformas é causada por fármacos como cetoconazol, irinotecano e diltiazem (FOTI et al., 2010).

1.5 Estudos in vitro envolvendo o CYP450

1.5.1 Microssomas hepáticos

Estudos de metabolismo in vitro possuem o intuito de elucidar as vias metabólicas de um determinado substrato. Os microssomas hepáticos são o modelo in vitro mais utilizado em estudos de metabolismo. A fração hepática microssomal utilizada nos ensaios corresponde aos fragmentos do retículo endoplasmático liso de fragmentos do fígado que sofreram sucessivas etapas de centrifugação. As enzimas que constituem o sistema da CYP450 localizam-se predominantemente na superfície do retículo endoplasmático (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Dentre as vantagens desta técnica estão o baixo custo e a simplicidade no uso; é um dos modelos in vitro melhor caracterizados na pesquisa de metabolismo de fármacos e podem ser

armazenados por longos períodos sem perder a atividade enzimática, sendo um modelo reprodutível para o estudo do metabolismo *in vitro* de xenobióticos pelas enzimas do CYP450 (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Além disso, a quantidade de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido-Citocromo P450 redutase (NADPH-CYP redutase), de citocromo b5 e de lipídeos nos microsomas hepáticos é a mesma encontrada no fígado intacto (OGILVIE et al., 2008).

1.5.2 Enzimas recombinantes do citocromo P450 (superssomas®)

O superssoma® é obtido por engenharia genética através de células de inseto infectadas por baculovírus, que expressam uma isoforma específica do citocromo e NADPH-P450 redutase, o que é uma vantagem visto que se trabalha somente com uma isoforma da CYP450. Esta é a principal vantagem do uso de enzimas recombinantes, já que as isoformas podem ser empregadas em estudos de polimorfismos como também na avaliação da interação entre fármacos (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). A utilização desse estudo é extremamente útil para a triagem de novas moléculas candidatas a fármacos, pois é possível conhecer a isoforma responsável pelo metabolismo desse novo substrato. Alguns exemplos de isoformas comercializadas são: CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 3A4 entre outras.

1.6 Cinética enzimática

Enzimas são biomoléculas que catalisam uma reação química específica. Tais biomoléculas não afetam o equilíbrio da reação catalisada, contudo aumentam a velocidade da reação, fornecendo uma via com menor energia de ativação (NELSON; COX, 2002). A atividade enzimática é tipicamente caracterizada em termos de velocidades iniciais de reação, que são determinadas para várias concentrações de substrato. A expressão matemática mais amplamente utilizada para velocidade de reações enzimáticas foi proposta por Michaelis e Menten em 1913 (GOLICNIK, 2011).

A equação de Michaelis-Menten (**Equação 1**) é de fundamental importância para a cinética enzimática tanto por razões teóricas quanto práticas. A equação é baseada em um modelo de equilíbrio para reações enzimáticas envolvendo apenas um substrato, no qual a reação é considerada como um processo de duas etapas. Na primeira, ocorre uma reação reversível, na qual o substrato (S) liga-se à enzima (E) formando um complexo intermediário, enzima/substrato (ES), instável (etapa rápida da reação). A segunda etapa é irreversível,

havendo a dissociação deste complexo e formação do produto (P), liberando a enzima. Esta é denominada etapa limitante da velocidade da reação enzimática (MARANGONI, 2003).

A equação de Michaelis-Menten é uma expressão da relação quantitativa entre a velocidade inicial V_0 , a velocidade máxima V_{MAX} e a concentração do substrato, todas relacionadas através da constante de Michaelis-Menten ou K_M . A K_M é equivalente à concentração de substrato na qual V_0 é igual à metade de V_{MAX} , e pode indicar a afinidade de uma enzima pelo seu substrato (VENKATAKRISHNAN; VON MOLTKE; GREENBLATT, 2001) Nesse modelo, a curva que expressa a relação entre $[S]$ e V_0 se aproxima de uma hipérbole retangular. Porém, algumas condições devem ser atendidas: a enzima deve ser estável ao longo do tempo nas condições utilizadas para determinação da velocidade de reação; a reação inversa deve ser insignificante; e o produto não deve ser inibitório para a atividade enzimática (MARANGONI, 2003).

$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equação 1})$$

Existem casos, porém, em que a enzima possui sítios catalíticos de alta e baixa afinidade pelo substrato. Essas enzimas são chamadas de cooperativas. Nesses casos, quando uma molécula do substrato liga-se a um sítio ativo da enzima, sua configuração estrutural se altera, modificando a afinidade do sítio ativo livre pelo substrato. A cinética enzimática nesse caso resulta em um gráfico de V_0 versus $[S]$ com características similares a uma sigmoide. Para tratar os dados obtidos de uma cinética cooperativa, o modelo mais simples é aquele proposto por Hill em 1910. A premissa básica desse modelo é que mudanças significativas na conformação da enzima ocorrem após essa ligar-se ao substrato, o que leva à mudança de afinidade por parte dos sítios ativos restantes (MARANGONI, 2003).

1.6.1 Cinética enzimática e cooperatividade

Cooperatividade enzimática é um fenômeno no qual a forma de uma subunidade de uma enzima se altera, podendo modificar a forma de diversas outras subunidades, o que altera a forma com a qual um ligante vai ligar-se à enzima (NELSON; COX, 2002). Esse ligante pode ser um substrato ou qualquer outro ligante que altere a forma com a qual o substrato vai ligar-se à enzima. Se o ligante induz mudanças no sítio da enzima que facilitam a ligação do substrato, diz-se que a cooperatividade é positiva, mas caso o ligante iniba a ligação do substrato com a enzima, diz-se que a cooperatividade é negativa (OGILVIE et al., 2008).

Dessa forma, a cooperatividade é uma forma de interação presente principalmente nos fenômenos envolvendo enzimas com muitas subunidades de ligações, o que leva a uma curva de cinética enzimática sigmoidal, em oposição à hipérbole de Michaelis-Menten.

1.6.1.1 Coeficiente de Hill

O modelo cinético de uma reação enzimática de uma enzima que possui somente um sítio ativo é Michaelis-Menten. Porém esse modelo não se aplica àquelas enzimas que possuem mais de um sítio ativo, ou seja, são alostéricas. Essas enzimas possuem múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos de ligação, onde podem se ligar diferentes moléculas. Nas enzimas alostéricas, a ligação de um substrato em um sítio ativo pode modificar diferentes subunidades e afetar a ligação desse mesmo substrato em outro sítio ativo, localizado em uma subunidade diferente (NELSON; COX, 2002). Por essa razão, a ligação torna-se cooperativa, ou seja, a ligação do substrato em um sítio ativo da enzima aumenta ou inibe a ligação em outros sítios ativos. Para enzimas que apresentam cooperatividade positiva, geralmente a curva da cinética é sigmoidal (tem forma de “S”) no gráfico velocidade de reação *versus* concentração de substrato

A cinética sigmoidal é representado pela equação de Hill (**Equação 2**), desenvolvida por Archibald Hill em 1910 para tentar explicar a ligação das moléculas de O₂ à hemoglobina (uma proteína alostérica) (OGILVIE et al., 2008).

$$V = \frac{V_{\max}[S]^n}{K_{0,5}^n + [S]^n} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde V é a velocidade da reação; V_{\max} é a velocidade máxima da reação; $[S]$ é a concentração de substrato; $K_{0,5}$ é constante que indica a concentração de substrato na qual a enzima atinge 50% de sua V_{\max} , essa constante é utilizada como indicador da “afinidade aparente” da enzima pelo substrato, ou seja, o quão fortemente o substrato se liga à enzima; n é o coeficiente de Hill, que é um parâmetro empírico e demonstra uma medida da cooperatividade do substrato ligado à enzima (OGILVIE et al., 2008).

O coeficiente de Hill é um parâmetro determinante, pois indica qual o tipo de cooperatividade está ocorrendo naquela reação. Se $n=1$, significa que a reação não é cooperativa e todos os sítios ativos da enzima se comportam de forma independente, de forma que a ligação de um substrato em um sítio não afeta a ligação em outro sítio. Caso $n>1$, a reação apresenta

cooperatividade positiva, em que a ligação do substrato em um sítio aumenta a afinidade da enzima para a ligação de outra molécula de substrato. Quanto maior o valor de n , maior o grau de cooperatividade e mais sigmoideal será a curva. Todavia, se $n < 1$, a cooperatividade é negativa, ou seja, a ligação do substrato em um sítio inibe a ligação em outro sítio (MARAGONI, 2003).

O comportamento de cooperatividade de uma enzima só é possível devido a mudanças conformacionais na estrutura da enzima devido à ligação de um substrato em determinado sítio ativo. Esse tipo de comportamento permite a regulação de diversas atividades celulares e vias metabólicas (MARAGONI, 2003).

Em proteínas formadas por diversas subunidades, a ligação de um ligante ou substrato em um sítio pode alterar significativamente a ligação dessa mesma molécula em outro sítio. Esses eventos “cooperam” porque agem de maneira conjunta. Esse conceito é aplicável somente a enzimas que possuem mais de um sítio ativo/subunidade (NELSON; COX, 2002). Quando um ligante/substrato influencia na ligação de um mesmo ligante/substrato a cooperatividade é chamada de homotrópica. Caso a ligação de um ligante/substrato influencie na ligação de uma molécula diferente, a cooperatividade é heterotrópica (MARAGONI, 2003).

1.7 Estudos de inibição enzimática e interações medicamentosas

Estudos *in vitro* de inibição enzimática levam a resultados importantes sobre interações medicamentosas que o xenobiótico pode provocar nas enzimas do CYP450. Essas interações são de grande interesse na área de saúde e podem ser decisivas para definir se um candidato a fármaco vai ser comercializado ou não. É sabido que 20% das reações adversas de um medicamento estão ligadas a interações medicamentosas (BACHMANN; RING; WRIGHTON, 2003). As interações medicamentosas ocorrem quando um medicamento interfere na ação (farmacodinâmica) ou na concentração (farmacocinética) de outro medicamento ingerido concomitantemente. Automedicação, idade avançada e falta de interesse do médico em saber quais medicamentos o paciente já utiliza regularmente estão entre as principais causas de interações medicamentosas (DECHANONT et al., 2014).

As interações medicamentosas ocorrem principalmente por inibição direta (interações reversíveis do fármaco com as enzimas do CYP450) ou tempo-dependente (interação irreversível ou quase-irreversível das enzimas do CYP450) (STEPAN et al., 2013).

De forma a evitar que um medicamento seja lançado no mercado para logo após ser retirado devido interações indesejáveis, tornou-se necessário realizar ensaios *in vitro* para

estudar o perfil de inibição dos candidatos a fármaco sobre as enzimas do CYP450. Agências como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *European Medicines Agency* (EMA) recomendam fortemente que tais estudos sejam realizados antes da comercialização de um fármaco (NASSAR; HOLLENBERG; SCATINA, 2000).

Os estudos *in vitro* de inibição das enzimas do CYP450 são realizados monitorando uma reação específica catalisada por uma das isoformas do CYP450 que tenha parâmetros cinéticos bem definidos (Velocidade máxima da reação (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_M)). A incubação de um substrato específico da isoforma estudada juntamente com o composto em estudo é feita por um tempo otimizado utilizando no meio microsomas hepáticos de humano (HLM – *human liver microsomes*) e NADPH. Monitora-se então a velocidade de formação de um metabólito específico da reação.

Com os resultados obtidos, verifica-se o efeito que o composto em análise tem na atividade das enzimas do CYP450 determinando-se parâmetros como a concentração deste composto que inibe em 50% a atividade da isoforma estudada (IC_{50}) e, se pertinente, os mecanismos de inibição e as constantes de inibição (OGILVIE et al., 2008).

Caso o composto em estudo apresente IC_{50} menor do que $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ele pode ser classificado como um inibidor forte da isoforma avaliada, enquanto que compostos com valores de IC_{50} compreendidos entre $10-100 \mu\text{mol L}^{-1}$ são classificados como inibidores moderados e compostos com IC_{50} maior do que $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ são classificados como inibidores fracos. Caso a inibição seja considerada significativa (moderada ou forte), seguem-se os estudos para determinação dos mecanismos e das constantes de inibição (OGILVIE et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o comportamento dos xenobióticos iangambina e epi-iangambina (produtos naturais) e um complexo de rutênio ligado a 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina perante as enzimas do citocromo P450 tanto como substratos dessa família de enzimas como potenciais inibidores de sua atividade.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o perfil cinético dos produtos naturais iangambina e epi-iangambina e do complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina como substratos das enzimas do CYP450;
- Determinar quais as principais isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo dos produtos naturais iangambina e epi-iangambina e do complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina;
- Determinar como se comportam os produtos naturais iangambina e epi-iangambina e o complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina como inibidores das isoformas do CYP450.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e Reagentes

3.1.1 Padrões Analíticos

A iangambina e epi-iangambina foram isoladas a partir da purificação do extrato da planta *Ocotea duckei*, obtida em colaboração com a empresa Apis Flora, localizada em Ribeirão Preto, SP. O complexo de rutênio com o ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina foi sintetizado pela então aluna de doutorado Bruna Possato, do Laboratório de Atividade Biológica e Química Supramolecular de Compostos de Coordenação (LABiQSC²) do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, coordenado pela Prof. Dra. Sofia Nikolaou. Os substratos e metabólitos utilizados nos estudos de inibição enzimática (fenacetina, acetaminofeno, diclofenaco 4'-hidroxiclofenaco, nifedipina, deidronifedipina, bufuralol, 1'-hidroxibufuralol, clorzoxazona, 6-hidroxiclorzoxazona, midazolam e 1'-hidroximidazolam, todos com pureza $\geq 98,0\%$, exceto o 1'-hidroximidazolam cuja pureza é $\geq 95,0\%$) e os padrões internos (caféina, diazepam, metoprolol, isradipina e ibuprofeno) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), da Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canadá) e da Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, EUA).

3.1.2 Solventes e Reagentes

Os solventes metanol, acetonitrila, acetato de etila, hexano, isopropanol e clorofórmio (todos grau HPLC) foram adquiridos da Panreac (Castellar Del Vallès, Barcelona, Espanha). A água purificada foi obtida utilizando o sistema Milli-Q Direct-Q3 UV (Millipore, Bedford, EUA).

Outros reagentes necessários, como fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico di-hidratado, ácido fórmico, ácido clorídrico, ácido trifluoroacético e hidróxido de sódio, grau PA, foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil); cloreto de potássio granular da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg, NJ, EUA); macrogol glicerol ricinoleato (Cremofor EL[®] MM= 2500 g mol⁻¹) da Vetec Química Fina (Duque de Caxias, RJ, Brasil), monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween 80[®]), polisorbato 20 (Tween 20[®]) e poloxâmero 407 (Pluronic F-127[®]) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA), cocoil sarcosinato de sódio (Sensactive C-30[®]) adquirido da Chemyunion (Sorocaba, SP, Brasil) e cocoamidopropilbetaína foi adquirido da Macler (Blumenau, SC, Brasil).

Os microsossomas hepáticos de humanos (HLM), preparados a partir do fígado de doadores de ambos os sexos, foi adquirido da Corning Life Sciences (Phoenix, AZ, EUA). O sistema de regeneração de NADPH (NADP⁺, glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). Os HLM foram estocados a -80°C e as soluções do sistema de regeneração NADPH foram estocadas a -20 °C.

3.2 Recebimento do Extrato Etanólico Bruto

Para os experimentos desenvolvidos nesse trabalho, foi recebida uma massa viscosa, com aspecto de cera, que continha iangambina, epi-iangambina e impurezas, que foi denominada de Fração de Lignóides Totais (FLT) e armazenada a 4°C.

A FLT foi obtida após uma série de extrações feitas a partir da planta louro-de-cheiro, presente no nordeste brasileiro, essas extrações foram feitas pela empresa Apis Flora, que forneceu o extrato para este trabalho.

3.3 Obtenção de iangambina e epi-iangambina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para o desenvolvimento do método de separação e isolamento da IAN e EPI-IAN por cromatografia líquida em escala semipreparativa foi escolhido o modo normal, uma vez que facilita o isolamento dos compostos marcadores de interesse devido à alta volatilidade dos solventes presentes na fase móvel, facilitando assim a posterior evaporação do mesmo.

As análises para o isolamento dos marcadores foram inicialmente realizadas em escala analítica empregando um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Quioto, Japão), composto de uma bomba LC-20AT operando a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹, degaseificador DGU-20A5, injetor com amostrador de 50 µL SIL-10AF, detector de arranjo de diodo SPD-M20A operando no intervalo entre 190 a 800 nm, controladora CBM-20A e forno para coluna modelo CTO-20A. As injeções foram realizadas automaticamente e o programa empregado na aquisição dos dados foi o Software LC Solution (Shimadzu, Quioto, Japão).

Após o desenvolvimento do método em escala analítica, a transposição para a escala semipreparativa foi realizada de acordo com as dimensões da coluna semipreparativa (Guillarme et al. 2007), de acordo com as **Equações 3 e 4**, abaixo:

$$V_{\text{prep}} = V_{\text{an}} \frac{(D_{\text{prep}})^2}{(D_{\text{an}})^2} \times \frac{h_{\text{prep}}}{h_{\text{an}}} \quad \text{(Equação 3)}$$

$$F_{\text{prep}} = F_{\text{an}} \frac{(D_{\text{prep}})^2}{(D_{\text{an}})^2} \times \frac{h_{\text{prep}}}{h_{\text{an}}} \quad \text{(Equação 4)}$$

Onde, D_{prep} = diâmetro da coluna cromatografia preparativa; D_{an} = diâmetro da cromatografia analítica, F = vazão da fase móvel; V = volume da amostra; h_{prep} = comprimento da coluna preparativa; h_{an} = comprimento da coluna analítica.

Para as análises em escala semipreparativa foi empregado um equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Quioto, Japão), constituído por duas bombas LC10AS, um sistema controlador SCL10A, um detector por absorção no UV-Vis SPD10A operando em 217 nm e um injetor Rheodyne modelo 7125 (Cotati, CA, EUA) com amostrador de 2,0 mL. O software Class-VP (Shimadzu, Quioto, Japão) foi utilizado para aquisição e processamento dos dados.

O kit Shim-pack PREP-SIL(H)®, composto por duas colunas, uma analítica (4,6 mm di, 25 cm de comprimento) e outra semipreparativa (20 mm di, 25 cm de comprimento), ambas com diâmetro de partícula de 5 μm , e diâmetro do poro de 100 \AA , foram utilizadas na otimização da separação dos epímeros no modo normal.

Posteriormente, a resolução entre os picos da IAN e EPI foi determinada, e a transposição para o modo preparativo foi realizado quando os valores obtidos foram superiores a 1,5. A resolução (R_s) foi calculada de acordo com a **Equação 5**, abaixo (Snyder, Kirkland, and Dolan 2009):

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_{b1} + W_{b2}} \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde, t_{R2} é o tempo de retenção do analito mais retido de t_{R1} do menos retido. W_{b1} e W_{b2} são as respectivas larguras das bases dos picos, calculadas pelo método da tangente.

Na quantificação dos compostos marcadores IAN e EPI presentes na FLT foi empregado um sistema para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu, composto por uma bomba quaternária LC-20AT, um detector de arranjo de diodo SPD-M 20A, um controlador CBM-20A e um software Shimadzu LC Solution, versão 1.21 SP1. Uma coluna Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula de 5 μm , diâmetro de poro de

100 Å) foi usada. A fase móvel consistiu em uma mistura de acetonitrila:água (50:50, v/v) e vazão de 1 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL. A temperatura da coluna foi mantida em 30°C e detecção foi feita 217 nm.

3.4 Análise dos marcadores por espectrometria de massas

Os picos isolados por cromatografia líquida de alta eficiência correspondentes a EPI e IAN foram diluídos em metanol:H₂O (1:1, v/v) + 0,1% de ácido fórmico e diretamente introduzido no espectrômetro de massa micrOTOF II-ESI-Q-TOF da Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA), equipado com analisador de massas do tipo quadrupolo – tempo de voo (Q-TOF), com o auxílio de uma bomba de infusão (Kd Scientific, EUA) com vazão de 300 µL h⁻¹. A tensão do capilar e do *end plate* foram 3500 V e -500 V (modo positivo de ionização), *transfer* 100 µs, temperatura do gás de secagem (nitrogênio) 180°C, vazão de 4 L min⁻¹ e pressão de 2 Bar. Para calibração interna utilizou-se solução de ácido trifluoroacético sodiado (Na-TFA), com concentração de 10 mg mL⁻¹. O programa empregado na aquisição dos dados foi o software Bruker Compass Data Analysis 4.1 (Bremen, Alemanha).

3.5 Caracterização estrutural da iangambina e epi-iangambina por ressonância magnética nuclear

A segunda etapa para confirmar as estruturas química da iangambina e da epi-iangambina foi a análise por ressonância magnética nuclear (RMN).

Foram feitas duas soluções, separadamente, de iangambina e epi-iangambina na concentração de 3 mg mL⁻¹ em CDCl₃. O equipamento utilizado foi Espectrômetro Bruker (Billerica, MA, EUA) - Modelo DRX500 - Ultra Shield (R), com magneto de 11,74 T e sonda multinuclear de detecção inversa (1H: 500,13 MHz e 13C: 125,77 MHz) para tubos de 5 mm de diâmetro, com sistema de "lock" de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm⁻¹). Os espectros gerados foram de ¹H (500 Hz), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) e HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*).

3.6 Solubilidade da iangambina e epi-iangambina em meio aquoso

Para avaliar a solubilidade da iangambina e da epi-iangambina, primeiramente fez-se uma solução controle, cujo solvente era metanol, no qual esses analitos são completamente

solúveis até $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (concentração máxima utilizada nos estudos). Alíquotas dessas soluções foram evaporadas sob fluxo de ar comprimido e solubilizadas em (i) solução tampão fosfato 100 mmol L^{-1} pH 7,4 sem tensoativo, (ii) solução tampão fosfato 100 mmol L^{-1} pH 7,4 com 0,1% de Tween 80®, e (iii) solução tampão fosfato 100 mmol L^{-1} pH 7,4 com 2,5% de Cremophor EL®. As amostras foram injetadas no sistema cromatográfico e analisadas de acordo com o método descrito na **seção 3.2** e a área da banda cromatográfica referente aos analitos foi monitorada, tomando-se como 100% solúvel a solução de iangambina/epi-iangambina preparada em metanol.

3.7 Desenvolvimento de método analítico para o THIQ-Ru

O complexo THIQ-Ru possui uma intensa absorvidade molar nos comprimentos de onda de 285 nm e de 690 nm. Para desenvolver o método foi utilizado um sistema para cromatografia líquida da Shimadzu equipado com duas bombas LC-10AD, degaseificador DGU-20A, forno CTO-10A a 30°C , controladora SCL-10A e detector de arranjo de diodos SPD-M20A operando a 285 nm, 690 nm e 245 nm (P.I). A obtenção dos dados cromatográficos foi feita utilizando o software LC Solution versão 1.25 SP1.

A análise foi realizada empregando uma coluna C18 (250mm x 4,6 mm; 5 μm) da Phenomenex (Torrance, CA, EUA). A fase móvel consistia em uma proporção 75:25 (v/v) metanol:água e modificador ácido fórmico 0,1%. O volume de injeção utilizado foi de 50 μL e, sendo que a amostra era diluída com a mesma proporção da fase móvel. A vazão empregada foi de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e o diazepam foi empregado como padrão interno.

3.8 Solubilidade do THIQ-Ru em meio aquoso

A avaliação da solubilidade do THIQ-Ru no meio aquoso empregando agentes solubilizantes foi realizada empregando o mesmo método descrito no **item 3.7**. Os agentes solubilizantes utilizados foram: cocoamidopropil betaina, macrogol glicerol ricinoleato (Cremophor EL®), polietilenoglicol 400 (PEG 400®), poloxâmero 407, sensactive C-30®, polisorbato 20 (Tween 20®) e polisorbato 80 (Tween 80®) nas concentrações finais no meio microssomal de 0,05 e 0,10% (m v^{-1}). A solubilidade do THIQ-Ru no meio microssomal foi avaliada na concentração máxima de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. As condições em que a solubilidade do THIQ-Ru foi maior ou igual a 60% ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram consideradas satisfatórias.

3.9 Avaliação do efeito dos agentes solubilizantes no metabolismo do THIQ-Ru

Após os resultados da **seção 3.8**, o tensoativo que melhor solubilizou o THIQ-Ru em meio aquoso foi submetido a uma avaliação na qual foi utilizado um controle na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de THIQ-Ru (concentração na qual o THIQ-Ru é completamente solúvel em meio aquoso sem a adição de tensoativo). A concentração de proteínas microsossomais foi de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e 60 minutos foi empregado como tempo de incubação (tempo máximo utilizado em um metabolismo). As amostras contendo o tensoativo foram preparadas da mesma maneira, porém com adição do tensoativo na concentração final de 0,10% no meio microsossomal. As análises cromatográficas foram executadas de acordo com a **seção 3.8** e avaliou-se se houve queda na atividade enzimática utilizando a **Equação 6**.

$$\% \text{ Atividade enzimática remanescente} = (A_i/A_o) \times 100 \text{ (Equação 6)}$$

Onde A_i é a razão obtida nas reações com a presença de tensoativo e A_o é a razão obtida nos controles negativos (sem tensoativo).

3.10 Validação do método

O método analítico desenvolvido foi validado avaliando os seguintes parâmetros: linearidade, limite inferior de quantificação, seletividade, efeito residual, precisão, exatidão e estabilidade. Como critério de aceitabilidade foi empregado os valores descritos pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012).

Em frascos do tipo Eppendorf foram adicionados $5 \mu\text{L}$ de THIQ-Ru, $50 \mu\text{L}$ de solução tampão tris-KCl $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,4, $50 \mu\text{L}$ de microsossomas hepáticos, na concentração proteica final de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e $95 \mu\text{L}$ de solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) + 0,1% (m/v) Sensactive C-30®. As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra e analisadas empregando o método analítico desenvolvido (**seção 3.7**). A **Tabela 1** apresenta as concentrações de THIQ-Ru, em meio microsossomal, que foram empregadas na validação do método analítico.

Tabela 1 – Concentração dos analitos em meio microssomal empregados na validação analítica

Ponto	Definição	THIQ-Ru ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1	LIQ	0,1
2	CQB	0,2
3	CQ1	2,5
4	CQ2	10
5	CQM	20
6	CQA	60
7	LSQ	80

LIQ – Limite inferior de quantificação
 CQ1 – Controle de qualidade 1
 CQM – Controle de qualidade médio
 LSQ – Limite superior de quantificação

CQB – Controle de qualidade baixo
 CQ2 – Controle de qualidade 2
 CQA – Controle de qualidade alto

3.10.1 Seletividade

A seletividade do método analítico foi avaliada através da análise de amostras de meio microssomal na ausência do analito. Posteriormente, foi avaliada a presença de interferentes da matriz nos tempos de retenção do analito e do PI. A presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos e do padrão interno foi considerada aceitável caso os valores de áreas dos interferentes fossem inferiores a 20% referente aos valores de área do LIQ do THIQ-Ru e inferior a 5% para o PI.

3.10.2 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada nos intervalos de concentração de 0,1 – 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o THIQ-Ru. A correlação linear entre as concentrações nominais e as razões das áreas do analitos pelo PI foram avaliadas, ponderando a curva analítica (peso $1/x^2$), e foram determinados o coeficiente de correlação (r) e a equação da reta.

3.10.3 Efeito Residual

O efeito residual (*carry over*) foi avaliado através da análise amostras de meio microssomal na ausência dos analitos (amostra branca), seguida de uma amostra do limite

superior de quantificação (LSQ) e duas amostras brancas. O efeito residual máximo aceito é de até 20% para os analitos e de até 5% para o PI, em comparação com as amostras do limite inferior de quantificação (LIQ).

3.10.4 Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) para cada analito foi definido como a menor concentração dos mesmos que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis ($\pm 20\%$). A precisão (**Equação 7**) foi expressa como coeficiente de variação (CV %) e a exatidão (**Equação 8**) como erro relativo percentual (ER %).

$$CV (\%) = \frac{s}{X} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

em que, s – desvio padrão e X – média das concentrações obtidas.

$$ER (\%) = \frac{C_{exp} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

em que, C_{exp} – concentração experimental e C_{nom} – concentração nominal.

3.10.5 Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão do método analítico foram avaliadas em quatro níveis de concentração (LIQ CQB, CQM e CQA, **item 3.10**). A precisão e exatidão foram expressas na forma de coeficiente de variação (CV %) e erro relativo percentual (ER %), respectivamente.

A precisão e exatidão intraensaio foram realizadas no mesmo dia ($n = 5$), já os experimentos de precisão e exatidão interensaio foram realizados em três dias consecutivos ($n = 3$). Curvas analíticas para a quantificação dos analitos nesses ensaios foram preparadas diariamente. Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com os critérios de aceitação para o CV (%) e o ER (%), de $\pm 20\%$ para o LIQ e $\pm 15\%$ para o CQB, o CQM e o CQA.

3.10.6. Estabilidade

A estabilidade dos analitos ($n = 5$) foi avaliada em dois níveis de concentração (CQB e CQA) para cada analito. As amostras de estabilidade foram quantificadas utilizando curvas analíticas preparadas no mesmo dia do estudo. A concentração média obtida para cada concentração foi comparada com a respectiva concentração nominal. As amostras foram consideradas instáveis se observado uma degradação dos analitos maior do que 15% em relação

a concentração nominal. Neste ensaio foram avaliadas a estabilidade nas (i) condições de incubação e no (ii) auto injetor por 24 horas.

3.10.6.1 Estabilidade em banho metabólico

As amostras foram submetidas as condições de incubação, ou seja, em banho-maria a 37°C por 60 minutos. A seguir, realizou-se o procedimento de preparo de amostra e as mesmas foram analisadas.

3.10.6.2 Estabilidade em auto-injetor

As amostras foram submetidas as condições de incubação e, posteriormente, foi realizado o procedimento de preparo de amostra. Após serem solubilizadas na fase móvel, as amostras foram acondicionadas no auto-injetor e analisadas após 24 horas.

3.11 Estudo de Pré-cinética do complexo THIQ-Ru frente às enzimas do CYP450

Para que a cinética enzimática fosse realizada em concentrações que englobassem a faixa linear de aumento de velocidade de reação em função da concentração de substrato foram determinadas as condições de velocidade inicial da reação enzimática (V_0) em relação ao tempo de incubação. Empregando-se as concentrações de 0,50; 4,00 e 8,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de THIQ-Ru, variando-se o tempo de incubação entre 10 e 50 minutos (utilizando-se o tempo zero como controle) e fixando a concentração proteica em 0,2 mg mL^{-1} (utilizada previamente em outros experimentos do laboratório), foi definida a faixa linear de decaimento da concentração de THIQ-Ru em função do tempo de incubação.

3.12 Cinética Enzimática do THIQ-Ru frente às enzimas do CYP450

Após a determinação do melhor tempo de incubação para obter-se condições de V_0 na cinética, determinou-se, utilizando os dados obtidos, a cinética enzimática utilizando 15 concentrações diferentes do THIQ-Ru. Utilizou-se concentrações entre 0,10 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com tempo de incubação de 20 minutos e concentração de proteínas microsossomais de 0,20 mg mL^{-1} . Para tanto, foram adicionados 5 μL de solução de THIQ-Ru solubilizadas em acetonitrila, 50 μL de microsomas hepático de humanos (na concentração proteica final de 0,20 mg mL^{-1}) e 95 μL de solução tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) + 0,1% (m/v) Sensactive C-30®. As amostras foram pré-incubados a 37°C em banho-maria durante 5 minutos e, a seguir, as reações foram iniciadas pela adição de 50 μL do sistema de geração de NADPH. Após 20 minutos de

incubação as reações foram interrompidas com a adição de 1,00 mL de acetato de etila, dando início ao procedimento de preparo de amostra. As amostras foram analisadas e quantificadas com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia do estudo. A velocidade da reação enzimática, para cada concentração, foi determinada através da normalização da queda de concentração de THIQ-Ru pela concentração proteica e pelo tempo de incubação. Os resultados obtidos foram plotados em gráfico de velocidade de reação enzimática pela concentração do substrato e analisados por regressão não-linear utilizando o programa GraphPad Prism 5.01 (La Jolla, CA, EUA).

3.13 Determinação das isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do THIQ-Ru empregando isoformas recombinantes da CYP450

Para determinar quais as isoformas responsáveis pelo metabolismo do complexo THIQ-Ru, utilizou-se isoformas recombinantes da CYP450, desenvolvidas através da engenharia genética (supersomas®). Para isso, adicionou-se ao THIQ-Ru em sua concentração S_{50} (concentração equivalente ao K_M), as isoformas CYP3A4, 3A5, 1A2, 2C9, 2B6, 2D6 ou 2C19 na concentração final de 50 pmol L^{-1} e as isoformas CYP2C8 ou 2E1 na concentração final foi 25 pmol L^{-1} . Posteriormente foi adicionado o sistema de regeneração NADPH para iniciar a reação após 5 minutos de pré-incubação. As amostras foram mantidas em banho metabólico por 20 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 1,00 mL de acetato de etila, como descrito na **seção 3.12**. As amostras foram analisadas de acordo com a **seção 3.7** e os resultados expressos de acordo com o decaimento da área de THIQ-Ru. Um controle negativo sem isoformas, somente com a matriz da recombinação genética (células de insetos) também foi utilizado.

3.14 Separações Cromatográficas para fins de avaliação dos xenobióticos como inibidores das enzimas do CYP450

As separações cromatográficas dos analitos envolvidos nos estudos de inibição das enzimas do CYP450 foram realizadas em um equipamento Shimadzu equipado com bomba LC-20AT unitária e degaseificador DGU-20A5, forno CTO-20A (temperatura utilizada de acordo com a separação a ser feita), controladora CBM-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A operando em comprimento de onda de acordo com o analito a ser quantificado e injetor automático SIL-10AF. A obtenção dos dados cromatográficos foi feita utilizando o software LC Solution versão 1.25 SP1. As análises foram realizadas utilizando uma coluna

Ascentis Express Fused Core C18 (100 mm x 4,6 mm; 2,7 μm , Supelco, PA, EUA), coluna de guarda Ascentis Express C18 (3,0 mm x 4,6 mm; 2,7 μm , Supelco, PA, EUA), e volume de injeção de 10 μL . As demais condições de análise estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Condições utilizadas nos estudos de inibição

Isoforma / Substrato	Eluição	Fase Móvel	Vazão (mL min^{-1})	Temperatura forno ($^{\circ}\text{C}$)	Referência
CYP1A2 / Fenacetina	Gradiente	Metanol: água; trietilamina 0,1%	0,6	23	SUN; LIU; WANG, 2006
CYP2C9 / Diclofenaco	Isocrático	Metanol: água (60:40 v/v); ácido fórmico 0,1%	0,9	32	ASFAK et al., 2007
CYP3A4 Nifedipina	Gradiente	Metanol: água	0,9	32	PATKI; VON MOLTKE; GREEBLATT; 2003
CYP3A4 Midazolam	Gradiente	Acetonitrila: água	0,9	30	PATKI; VON MOLTKE; GREEBLATT; 2003
CYP2D6 / Bufuralol	Gradiente	Acetonitrila: água; trifluoroacético 0,1%	0,7	32	SAXENA et al., 2014
CYP2E1 / Clorzoxazona	Gradiente	Metanol: água; ácido fosfórico 0,05%	1,0	35	ZEBOTHSEN; KUNZE; CLEMENT, 2006

* As metodologias foram adaptadas a partir das referências.

3.15 Preparo de Amostra

A técnica de preparo de amostra escolhida para ser usada nos ensaios foi a extração líquido-líquido (ELL). A ELL também foi utilizada como forma de interromper as reações enzimáticas, utilizando solventes descritos na **Tabela 3**, de acordo com os analitos a serem analisados. Após a adição do solvente ao meio reacional, um volume apropriado de padrão interno (PI) foi adicionado aos tubos de ensaio e as amostras foram submetidas ao processo de extração, que consiste em agitação a 1000 rpm por 15 minutos em agitador orbital do tipo Vibrax VXR[®] (IKA, Staufen, Alemanha) e centrifugação a 940 \times g por 10 minutos (Hitachi CF16RXII[®], Himac, Tóquio, Japão). A fase orgânica foi coletada e evaporada a vácuo utilizando um concentrador de amostras a vácuo (*Speed vacuum*, Eppendorf, Alemanha), sendo o resíduo solubilizado em 80 μL de fase móvel. As amostras foram analisadas no sistema cromatográfico conforme as condições descritas na **seção 3.14**.

Tabela 3 – Preparo de amostra empregando a ELL

Isoforma / Substrato	Solvente orgânico	Padrão Interno (PI)	Comprimento de onda (nm)
CYP1A2 / Fenacetina	Acetato de etila	Caféina	245 272 (PI)
CYP2C9 / Diclofenaco	Clorofórmio+ 120 µL HCl 0,5 mol L ⁻¹	Isradipina	270 330 (PI)
CYP3A4 Nifedipina	Acetato de etila	Diazepam	270 230 (PI)
CYP3A4 Midazolam	Acetato de etila + 200 µL NaOH 0,5 mol L ⁻¹	Diazepam	239 230 (PI)
CYP2D6 / Bufuralol	Acetato de etila +200µL NaOH 1,0 mol L ⁻¹	Metoprolol	245 275 (PI)
CYP2E1 / Clorzoxazona	Clorofórmio	Fenacetina	295 245 (PI)

3.16 Avaliação do potencial inibitório dos xenobióticos sobre as isoformas do CYP450 - Determinação do IC₅₀

Em 400 µL meio reacional foram adicionados solução padrão de um dos xenobióticos (complexo de rutênio, EPI ou IAN), respeitando seus limites de solubilidade em meio aquoso, solução padrão do substrato marcador (concentração próxima ao valor de K_M para a reação específica catalisada pela isoforma avaliada, **Tabela 4**), solução do sistema de regeneração de NADPH e solução tampão fosfato de sódio pH 7,4 100 mmol L⁻¹. Os controles negativos, apresentando 100% de atividade enzimática, foram preparados simultaneamente, sem os xenobióticos.

Tabela 4 - Concentrações de substrato utilizadas nos ensaios de determinação do IC₅₀

Isoforma	Substrato	Metabólito	K _M substrato (µmol L ⁻¹)
CYP1A2	Fenacetina	Acetaminofeno	12,03
CYP2C9	Diclofenaco	4'-hidroxiclofenaco	49,45
CYP3A4	Nifedipina	Deidronifedipina	7,00
CYP3A4	Midazolam	1'-hidroximidazolam	5,00
CYP2D6	Bufuralol	1'-hidroxibufuralol	5,00
CYP2E1	Clorzoxazona	6-hidroclorzoxazona	145,9

As amostras (n=5) foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C, e as reações foram iniciadas pela adição de NADPH, ocorrendo pelo tempo adequado de acordo com a **Tabela 5**. Transcorridos os tempos incubação, as reações foram interrompidas pela adição de solvente

orgânico, e submetidas às etapas de preparo de amostra (**seção 3.15**). Por fim, estas foram analisadas por cromatografia conforme descrito na **seção 3.14**.

Tabela 5 – Tempos de incubação e concentração de proteína utilizadas

Isoforma / Substrato	Tempo de incubação (min)	Concentração de proteína (mg mL ⁻¹)
CYP1A2 / Fenacetina	30	0,30
CYP2C9 / Diclofenaco	20	0,10
CYP3A4 / Nifedipina	15	0,15
CYP3A4 / Midazolam	10	0,10
CYP2D6 / Bufuralol	30	0,25
CYP2E1 / Clorzoxazona	20	0,40

Os valores obtidos para a razão entre a área do metabólito e a área do padrão interno foram comparados com os valores obtidos para os respectivos controles negativos de acordo com a **Equação 9**.

$$\% \text{ Atividade enzimática remanescente} = (A_i/A_o) \times 100 \text{ (Equação 9)}$$

Onde A_i é a razão obtida nas reações com a presença de xenobiótico e A_o é a razão obtida nos controles negativos (QI et al., 2013). Os gráficos da porcentagem de atividade enzimática remanescente vs. logaritmo da concentração de xenobiótico foram plotados empregando o programa GraphPad Prism® versão 5.01 (La Jolla, CA, EUA) e os valores de IC_{50} foram obtidos através de regressão não-linear.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos com os produtos naturais iangambina e epi-iangambina

4.1.1 Obtenção da iangambina e epi-iangambina

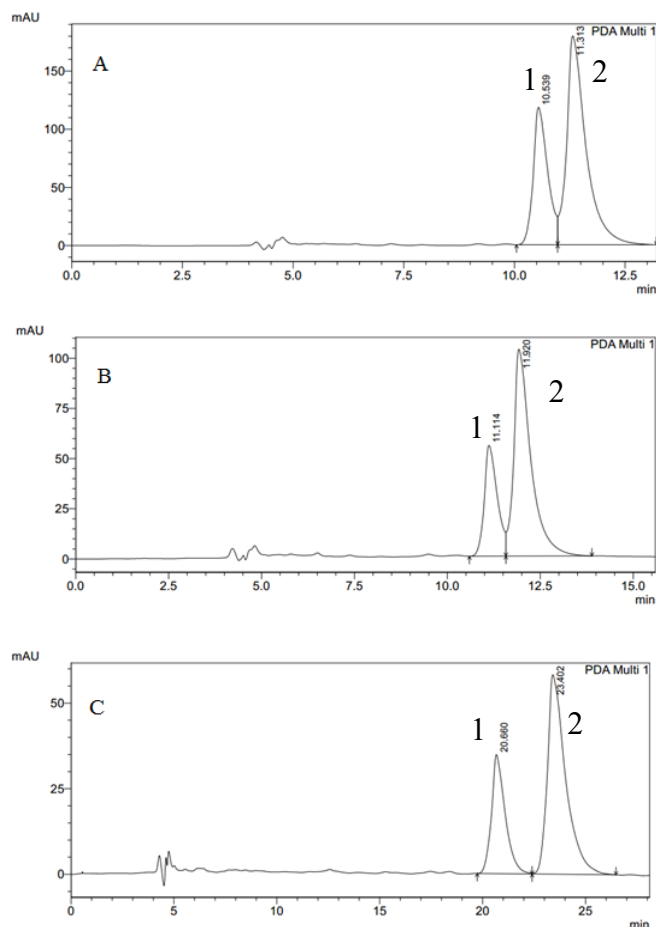
Na separação de compostos por HPLC em escala semi-preparativa visando seu isolamento para futuras aplicações, deve-se considerar principalmente a resolução das bandas cromatográficas, ou seja, a separação entre as bandas dos compostos de interesse. Estes devem estar com uma separação satisfatória, de forma a não acarretar uma corrida muito longa e morosa, o que leva a um consumo excessivo de solvente orgânico e geração de resíduo químico.

O isolamento cromatográfico dos compostos foi desenvolvido em fase normal devido a maior facilidade de evaporação de solventes apolares presentes na fase móvel, como por exemplo hexano, facilitando posterior recuperação dos compostos de interesse na forma de pó ou cristais.

Dessa forma, as primeiras tentativas de separação entre os analitos foram feitas empregando como fase móvel hexano:isopropanol em diferentes proporções. Com os resultados obtidos durante o desenvolvimento do método de separação em escala analítica, visando a otimização da separação entre as bandas de iangambina e epi-iangambina, a princípio foi escolhido a condição que utiliza como fase móvel hexano:isopropanol (90:10, v/v) e vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, por apresentar o maior valor de resolução entre as bandas cromatográficas. Com base nesses dados, o método foi adaptado para a escala semi-preparativa, ajustando a vazão da fase móvel para 14 mL min^{-1} , de acordo com as dimensões da coluna (GUILLARME et al., 2007), e o volume de injeção da amostra foi de 2,00 mL.

Porém, quando o isolamento a partir do extrato passou efetivamente a ser realizado, notou-se que a solubilidade da fração de lignoides totais (iangambina e epi-iangambina) na fase móvel contendo apenas hexano e isopropanol era baixa e, portanto, insatisfatória. Com isso, outros solventes foram avaliados, ainda utilizando como componentes majoritários da fase móvel hexano e isopropanol. Os melhores resultados foram obtidos com os solventes diclorometano e clorofórmio. A **Figura 3** mostra a separação dos analitos em escala analítica empregando uma fase móvel com hexano e isopropanol com diferentes proporções de clorofórmio.

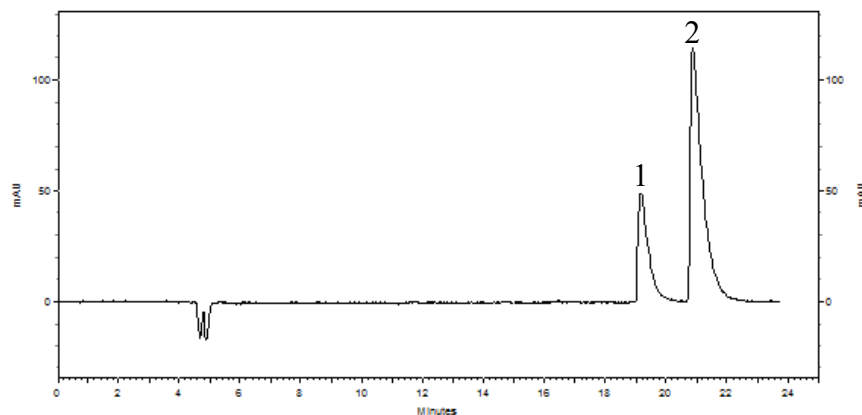
Figura 3 – Cromatogramas representativos em escala analítica da epi-iangambina (1) e iangambina (2).



(A) Fase móvel hexano: isopropanol: clorofórmio (80:15:5 v/v/v) resolução de 1,17; (B) Fase móvel hexano: isopropanol: clorofórmio (85:10:5, v/v/v) resolução de 1,15; (C) Fase móvel hexano: isopropanol: clorofórmio (90:5:5, v/v/v) resolução de 2,07. Condições cromatográficas: coluna Shim-pack PREP-SIL(H) (4,6 mm di, 25 cm de comprimento, partícula de 5 μ m, e diâmetro do poro de 100 Å) e vazão de 0,8 mL min⁻¹. Temperatura de análise 25°C e volume injetado 50 μ L. Detecção em 217 nm. Fonte: autoria própria

Considerando que a maior resolução entre bandas cromatográficas foi obtida pela fase móvel composta por hexano:isopropanol:clorofórmio (90:5:5 v/v/v), essa mistura foi escolhida para realizar-se as análises da iangambina e epi-iangambina em escala semi-preparativa. Apesar de apresentar um maior tempo de retenção, a resolução em escala analítica obtida com a condição da **Figura 3C**, é um fator crucial para evitar a contaminação entre os constituintes presentes na mistura. Da mesma forma, como descrito anteriormente, a transposição entre as escalas foi realizada (**Equações 3 e 4**) e a separação foi realizada em escala semi-preparativa. A **Figura 4** apresenta um cromatograma referente à separação em escala semi-preparativa.

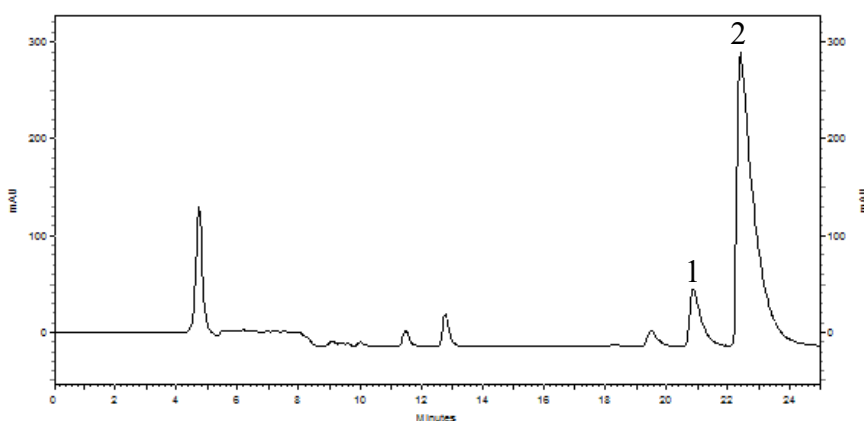
Figura 4 – Cromatograma representativo da epi-iangambina (1) e iangambina (2) em escala semi-preparativa.



Condições cromatográficas: coluna Shim-pack PREP-SIL(H) (20 mm x 250 mm; 5 μ m), fase móvel hexano:isopropanol:clorofórmio (90:5:5, v/v/v) e vazão de 14 mL min⁻¹. Temperatura de análise 25°C e volume injetado 2,0 mL. Detecção em 217 nm. Resolução: 2,01. Fonte: autoria própria

A **Figura 5** apresenta a separação do extrato da fração de lignoide totais (FLT). Como pode ser observado no cromatograma, a resolução em escala semi-preparativa referentes à iangambina e à epi-iangambina apresentou uma boa correlação com os resultados obtidos em escala analítica.

Figura 5 – Cromatograma representativo da fração de lignoide totais contendo epi-iangambina (1) e iangambina (2) em escala semi-preparativa.

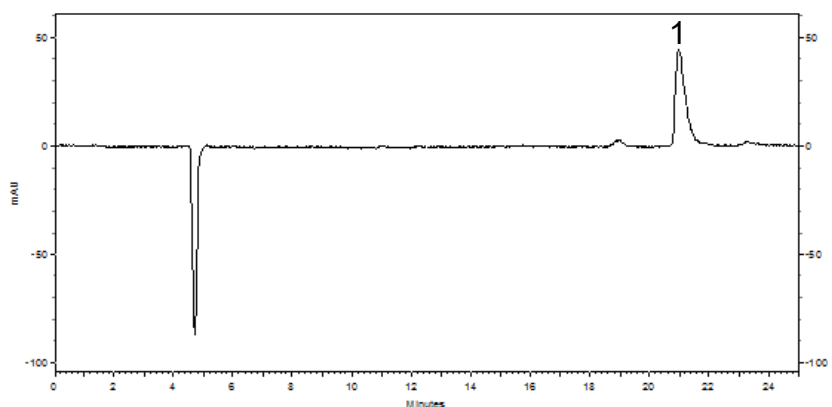


Condições cromatográficas: coluna Shim-pack PREP-SIL(H) (20 mm x 250 mm; 5 μ m), fase móvel hexano:isopropanol:clorofórmio (90:5:5, v/v/v) e vazão de 14 mL min⁻¹. Temperatura de análise 25°C e volume injetado 2,0 mL. Detecção em 217 nm. Fonte: autoria própria

O isolamento cromatográfico dos epímeros iangambina e epi-iangambina foi realizado, o solvente foi evaporado e posteriormente, os resíduos obtidos a partir do isolamento foram solubilizados separadamente em fase móvel e injetados nas condições cromatográficas otimizadas (**Figuras 6 e 7**). Como pode ser observado, um único pico majoritário é detectado

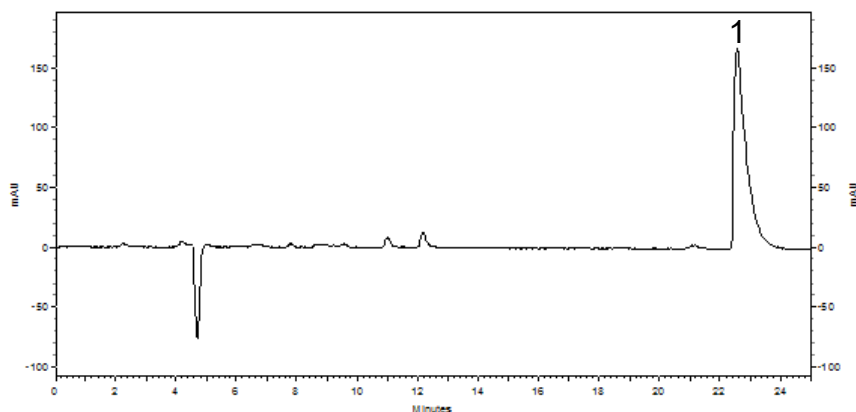
referente ao epímero em questão, demonstrando assim a seletividade no procedimento de obtenção dos isômeros.

Figura 6 - Cromatograma referente a análise do pico correspondente a epi-iangambina coletado após a injeção do extrato FLT nas condições cromatográficas estabelecidas em escala semi-preparativa.



Condições cromatográficas: coluna Shim-pack PREP-SIL(H) (20 mm x 250 mm; 5 μ m) e fase móvel composta por hexano: isopropanol: clorofórmio (90:5:5, v/v/v), vazão de 14 mL min⁻¹, volume injetado 2,0 mL; temperatura de análise 25°C. Detecção em 217 nm. (1) epi-iangambina. Fonte: autoria própria

Figura 7 - Cromatograma referente a análise do pico correspondente a iangambina coletado após a injeção do extrato FLT nas condições cromatográficas estabelecidas em escala semipreparativa.



Condições cromatográficas: coluna Shim-pack PREP-SIL(H) (20 mm x 250 mm; 5 μ m) e fase móvel composta por hexano: isopropanol: clorofórmio (90:5:5, v/v/v), vazão de 14 mL min⁻¹, volume injetado 2 mL; temperatura de análise 25°C. Detecção em 217 nm. (1) iangambina. Fonte: autoria própria

Dessa forma, ficou definido o método de separação e isolamento dos epímeros iangambina e epi-iangambina por cromatografia líquida em escala semi-preparativa com uma fase móvel composta por hexano:isopropanol:clorofórmio 90:5:5 (v/v/v).

4.1.2 Caracterização estrutural da iangambina e epi-iangambina por espectrometria de massas de alta resolução e RMN

A espectrometria de massas é uma técnica reconhecida, que trouxe grandes avanços para a química analítica e é de grande aplicabilidade na análise de produtos naturais. No caso da iangambina e epi-iangambina, suas estruturas já são conhecidas e a análise por espectrometria de massas é usada como ferramenta de confirmação da identidade das bandas isoladas por cromatografia líquida semi-preparativa. O analisador quadrupolo – tempo de voo (Q-TOF) permite a obtenção da massa nominal do composto químico analisado com apurada exatidão e, dessa forma, é possível confirmar a fórmula química do mesmo.

As Figuras no **Anexo I** mostram os espectros obtidos para a iangambina e epi-iangambina, respectivamente. Na análise da iangambina foram detectados os íons m/z 447,2009 e 469,1834 e na análise da epi-iangambina e os íons m/z 447,2010 e m/z 469,1832 foram detectados. Tais íons correspondem aos íons da molécula protonada $[M+H]^+$ e sodiada $[M+Na]^+$, respectivamente.

A **Tabela 6** apresenta as fórmulas químicas propostas para os íons detectados da iangambina e epi-iangambina com o respectivo erro em relação a massa exata da fórmula química proposta.

Tabela 6-Resultados da análise de espectrometria de massa de alta resolução da iangambina e epi-iangambina

Íon diagnóstico	Fórmula química	m/z Acurada	m/z Exata	Erro (ppm)	Composto
$[M+H]^+$	$C_{24}H_{31}O_8^+$	447,2009	447,2013	-0,89	Iangambina
$[M+Na]^+$	$C_{24}H_{30}O_8Na^+$	469,1834	469,1832	-0,42	
$[M+H]^+$	$C_{24}H_{31}O_8^+$	447,2010	447,2013	-0,67	Epi-iangambina
$[M+Na]^+$	$C_{24}H_{30}O_8Na^+$	469,1832	469,1832	0,00	

A partir desses dados, pode-se afirmar que a fórmula dos compostos isolados é $C_{24}H_{30}O_8$, o que corresponde à massa de 446,4902 u, como o erro calculado é pequeno, pode-se afirmar que o isolamento dos compostos foi satisfatório e que os estudos posteriores podem ser feitos com maior segurança.

A análise por RMN é muito útil para elucidar e caracterizar as moléculas investigadas, bem como detectar impurezas e eventuais diferenças entre elas. Como a iangambina e a epi-iangambina são isômeros estruturalmente diferentes, torna-se viável diferenciá-las pelos

espectros de RMN ^1H , HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) e HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*).

O epímero iangambina possui simetria em sua estrutura, portanto os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos dos dois anéis aromáticos metoxilados se sobrepõem nos espectros de RMN. Tal simetria não ocorre na estrutura do epímero epi-iangambina, que não apresenta sobreposição dos hidrogênios e carbonos dos anéis aromáticos metoxilados.

O **Quadro 1 (Anexo I)** apresenta os deslocamentos químicos (δ_{H}) dos epímeros em RMN ^1H e o **Quadro 2 (Anexo I)** apresenta os deslocamentos dos epímeros (δ_{C}) em RMN ^{13}C . Apesar da análise de ^{13}C não ter sido feita diretamente, os espectros HMBC e HMQC, que são espectros bidimensionais que relacionam hidrogênio e carbono, permitem que esses valores sejam obtidos.

Nos espectros, as bandas com deslocamentos entre 0,5 e 2,0 ppm são correspondentes a impurezas remanescentes do isolamento das moléculas, que estão frequentemente presentes, considerando-se que é um produto natural (CONSTANTINO, 2008). Tais impurezas são desprezíveis em relação à quantidade de composto recuperada, portanto não interferem em experimentos desenvolvidos com os compostos isolados.

Utilizando os dados dos **Quadros 1 e 2**, bem como as Figuras (**Anexo I**), é possível identificar a iangambina e seus espectros característicos de molécula simétrica, bem como a falta de simetria nos espectros da epi-iangambina.

4.1.3 Solubilidade dos epímeros iangambina e epi-iangambina em meio aquoso

Produtos naturais geralmente são produzidos por plantas ou fungos e possuem uma função metabólica nesse organismo. Em seu organismo de origem, esses compostos são produzidos em quantidade que permita sua solubilidade nos fluidos biológicos. Porém, em face da necessidade de detectabilidade e quantificação desses compostos durante os experimentos a serem realizados, concentrações maiores são utilizadas e a sua solubilidade em meio aquoso, como soluções-tampão, torna-se um desafio. A iangambina e epi-iangambina possuem poucos grupos polares disponíveis para serem solvatados pela água, o que a torna pouco solúvel em meio aquoso.

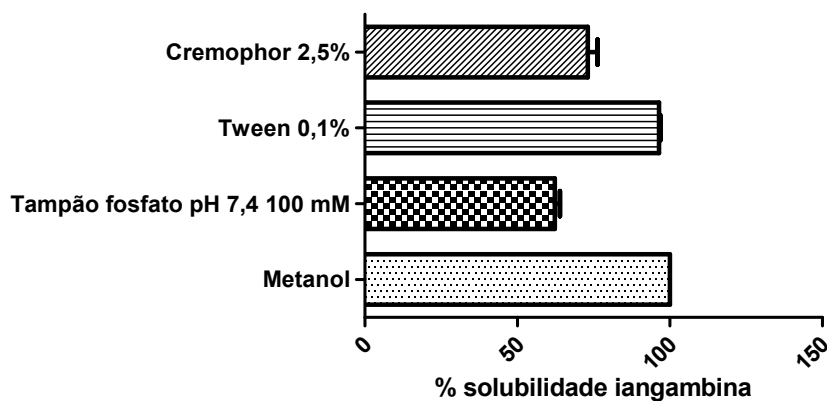
Uma alternativa para aumentar a solubilidade dos epímeros em meio aquoso é a utilização de tensoativos usualmente aplicados na indústria farmacêutica. Dentre eles, foram avaliados o Tween 80® e Chemophor EL®. Devido a possibilidade de inibição das enzimas do CYP450 por esses tensoativos (CHRISTIANSEN et al., 2011), eles devem ser utilizados em

concentrações baixas (geralmente até 2,5% do volume de meio), de forma a evitar sua interferência nos experimentos.

4.1.3.1 Solubilidade da iangambina e epi-iangambina

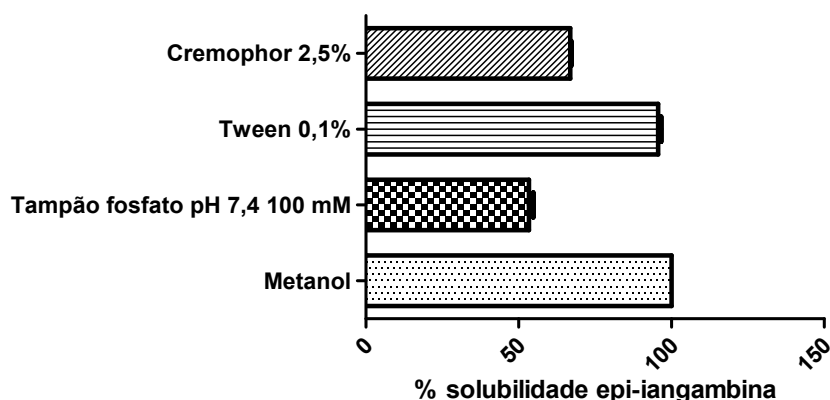
A solubilidade em meio aquoso viabiliza a utilização de concentrações maiores do composto de interesse nos experimentos de metabolismo *in vitro*, de forma que os ensaios de inibição sejam realizados de maneira adequada. Tais experimentos ocorrem em pH fisiológico, logo, o meio deve ser composto pelos substratos ou inibidores de interesse, HLM e solução-tampão. Dessa forma, avaliou-se a solubilidade dos epímeros iangambina e epi-iangambina, separadamente, em solução-tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7,4 sem tensoativos e essa mesma solução-tampão com a adição de tensoativos. Os resultados estão apresentados nas **Figuras 8 e 9**.

Figura 8 – Solubilidade da iangambina na concentração 200 µmol L⁻¹ em solução tampão fosfato 100 mmol L⁻¹ pH 7,4, com e sem tensoativos (resultados expressos como média ± SE).



Fonte: autoria própria

Figura 9 - Solubilidade da epi-iangambina na concentração $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato 100 mmol L^{-1} pH 7,4, com e sem tensoativos (resultados expressos como média \pm SE).



Fonte: autoria própria

Para a interpretação dos dados, os epímeros na mesma concentração foram solubilizados em metanol (100% solúvel) e, a partir da área obtida nas bandas cromatográficas, calculou-se a porcentagem de solubilidade dos epímeros nas soluções tampão com e sem tensoativos. Como pode ser observado, a adição de 0,1% de Tween® à solução tampão aumentou significativamente a solubilidade da iangambina e epi-iangambina no meio aquoso e, com valores próximos a 100%; portanto, esse tensoativo será empregado nos experimentos de metabolismo *in vitro*.

4.1.4 Ensaio preliminar de metabolismo da iangambina

Experimentos de cinética enzimática, principalmente quando se trata de um *pool* de enzimas, como as enzimas do CYP450, requerem testes prévios para garantir se o substrato realmente será metabolizado por essas enzimas e se não há interferentes que possa vir causar resultados errôneos no futuro. Dessa forma, primeiramente, uma concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de iangambina foi submetida ao metabolismo pelas enzimas do CYP450. Para tanto, foi utilizado 1 mg mL^{-1} proteínas microsossomais (HLM) e o ensaio foi realizado por 1 h em banho metabólico. Tempos maiores do que 1 h não são recomendados, pois a partir deste tempo, há a possibilidade de ocorrer inibição das enzimas pelo substrato ou diminuição de atividade das enzimas (OGILVIE et al., 2008), o que não seria desejável nessa etapa do desenvolvimento do projeto. O decaimento da banda cromatográfica da iangambina, e, portanto, a evidência de sua metabolização, deveria ser superior a 15% para concentrações mais altas e 20% para concentrações mais baixas, pois esses valores são superiores ao CV estipulado para esses

experimentos. Como resultado desse experimento, obteve-se um decaimento na área da banda cromatográfica da iangambina de 30% com coeficiente de variação (CV) inferior a 15%, ou seja, o composto havia sido metabolizado pelas enzimas do CYP450.

Com esse resultado positivo, partiu-se para um experimento variando-se as concentrações de iangambina (100, 50 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$), porém mantendo-se 1 mg mL^{-1} de concentração proteica (HLM) e 1 h em banho metabólico. Os resultados estão na **Tabela 7**.

Tabela 7- Teste de metabolização da iangambina pelas enzimas do CYP450

Concentração iangambina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% de metabolização
10	44
50	29
100	13

Analisando-se os dados da **Tabela 7**, nota-se que os resultados são promissores e que a metabolização vai diminuindo conforme aumenta-se a concentração de substrato, atingindo-se um platô, o que é esperado em cinética enzimática. Na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, porém, a porcentagem de metabolização já está abaixo do valor estipulado para o CV, o que poderia levar a interpretações errôneas dos resultados.

A próxima etapa dos experimentos foi tentar uma redução na quantidade de proteínas microsomais, pois grandes quantidades de proteínas podem levar a adsorção inespecífica do substrato além de encarecer muito o ensaio.

Dessa forma, foram testadas concentrações menores de proteína, de 0,1; 0,3 e 0,5 mg mL^{-1} e um tempo menor de metabolização, 30 minutos, fixando-se a concentração de iangambina no meio em 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, pois tal concentração já havia apresentado resultados promissores em experimentos anteriores. Como resultado, obteve-se uma metabolização não perceptível da iangambina pelos métodos analíticos utilizados. Tal resultado não foi considerado negativo, devido à considerável diminuição da concentração proteica e do tempo de metabolização. Dessa forma, testou-se concentrações maiores de proteína (0,6; 0,7 e 0,8 mg mL^{-1}) e um tempo maior de metabolização: 50 minutos. O decaimento máximo nesse experimento foi de 5%, o que não é considerável, já que o CV aceito é de até 15%.

A partir desses resultados, pode-se afirmar que a iangambina não estava respondendo de forma linear ao metabolismo, o que é um comportamento indesejável na determinação dos parâmetros cinéticos. Como o experimento inicial havia apresentado um resultado positivo, este foi refeito, com 1 mg mL^{-1} de concentração proteica e 1 h de incubação e adição 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$

de iangambina ao meio. O resultado positivo obtido primeiramente não se repetiu. Dentre as possibilidades de incorreção, considerou-se que a concentração de substrato poderia estar interferindo na metabolização e por isso, diminuiu-se a concentração de iangambina para 25 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no meio microsomal. A concentração de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou uma metabolização de 20%, porém uma repetição do experimento apresentou taxa de metabolismo abaixo do CV.

Todos os fatores que poderiam estar influenciando desfavoravelmente no metabolismo da iangambina foram testadas: novas soluções de sistema regenerador de NADPH e até mesmo a retirada desse sistema, novas soluções padrão, mudança de solvente extrator e novos testes de solubilidade, porém não houve alteração favorável nos resultados.

O último experimento foi realizado com diversas concentrações de iangambina (1; 5; 10; 15 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), todas baixas, pois ainda se considerava que em concentrações mais altas o decaimento poderia não ser observado, pois poderia ser alcançado um platô. A concentração proteica foi de 1 mg mL^{-1} e o tempo de metabolização foi de 1 h. Os resultados estão na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Teste da metabolização da iangambina em baixas concentrações

Concentração iangambina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	% de metabolização
1,0	19
5,0	4
10	14
15	2
20	0

Em posse desses resultados, é possível afirmar que a iangambina não sofre metabolismo pelas enzimas do CYP450 nas condições avaliadas. É possível observar que nenhuma taxa de metabolização foi superior valor de CV do método analítico. Dessa forma, descartou-se o objetivo de determinar os parâmetros enzimáticos dos epímeros, e passou-se a avaliar a possibilidade desses epímeros estarem atuando como inibidores das enzimas do CYP450.

4.1.5 Estudos de Inibição

Uma forma simples, porém, eficiente de determinar o potencial inibitório de uma molécula em relação a uma enzima é determinar em que concentração essa molécula inibe em 50% a atividade da enzima avaliada (IC_{50}). Esses ensaios tendem a servir de base para ensaios mais complexos (OGILVIE et al., 2008).

O valor de IC_{50} é obtido a partir de curvas de dose-resposta, que são gráficos que avaliam o efeito que mudanças na concentração de um composto provocam em um determinado sinal (COPELAND, 2000). Os dados para a construção desse gráfico são obtidos incubando uma única concentração de substrato (geralmente equivalente ao valor de K_M para uma reação específica) com diversas concentrações do composto em estudo (LI, 2008).

Os valores de IC_{50} são utilizados para comparar o potencial que múltiplos compostos têm de inibir a mesma enzima em condições bem controladas. Diversos compostos já são conhecidos por inibir seletivamente e fortemente as enzimas do CYP450, portanto, através da determinação do IC_{50} pode-se ter uma ideia inicial do potencial inibitório de um candidato a fármaco ao comparar o resultado obtido para este composto com o resultado obtido para inibidores já bastante estudados e bem estabelecidos.

Segundo Spaggiari e colaboradores (2014), caso o composto em estudo apresente IC_{50} menor do que $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ele pode ser classificado como um inibidor forte da isoforma avaliada, enquanto que compostos com valores de IC_{50} compreendidos entre $10-100 \mu\text{mol L}^{-1}$ são classificados como inibidores moderados e compostos que apresentam IC_{50} maior do que $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ são classificados como inibidores fracos (OGILVIE et al., 2008).

4.1.5.1 Avaliação da iangambina e epi-iangambina como inibidores da CYP1A2

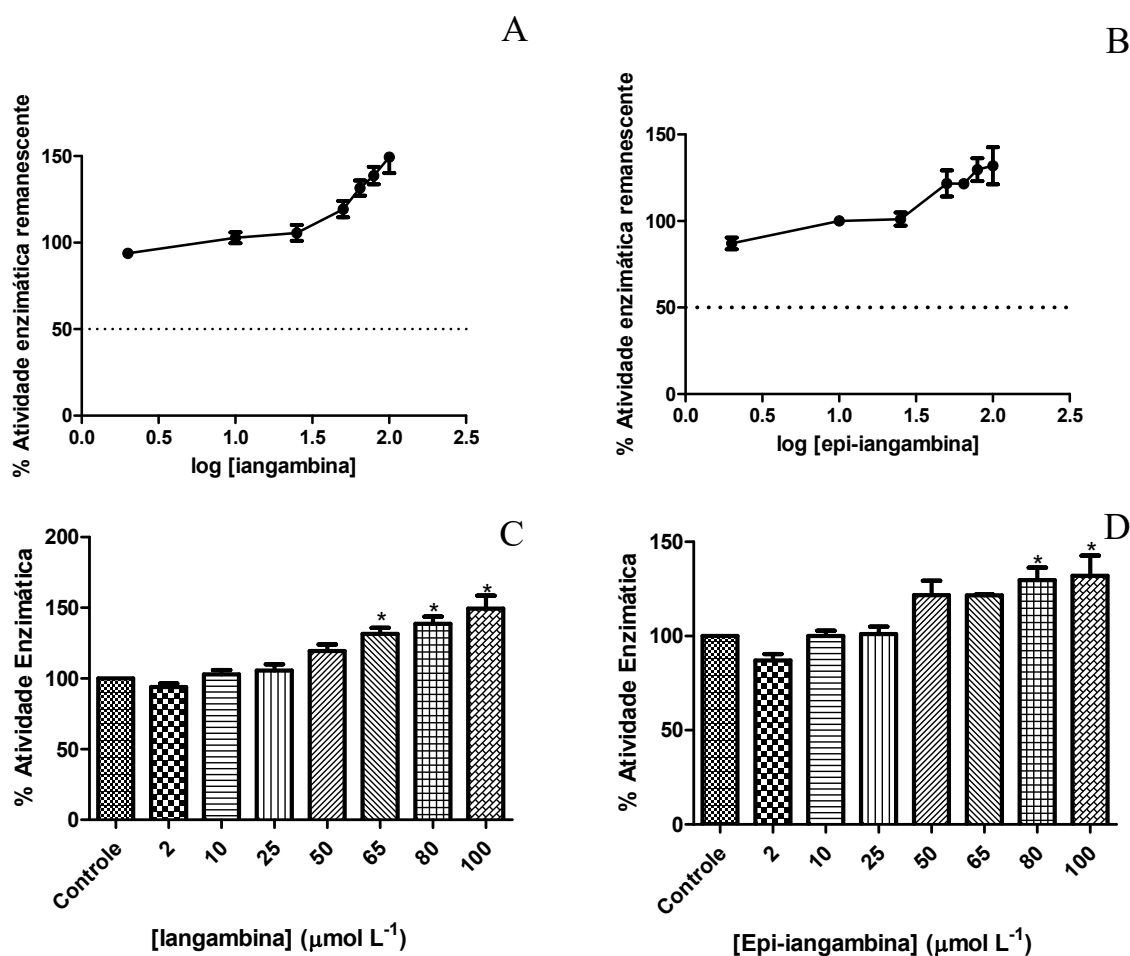
Na avaliação do potencial inibitório dos epímeros sobre a CYP1A2 e determinação do IC_{50} , foi utilizado como substrato dessa isoforma a fenacetina, em uma concentração próxima a seu K_M ($12 \mu\text{mol L}^{-1}$) que sofre *O*-desetilação, transformando-se no seu metabólito, acetaminofeno (marcador dessa isoforma). A iangambina e seu epímero não apresentaram potencial inibitório da atividade da CYP1A2 nas concentrações avaliadas ($2 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$), como representado na **Figura 10**.

O efeito apresentado foi um aumento na atividade da isoforma. Na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, a iangambina aumentou a atividade da enzima em 49%, enquanto a epi-iangambina, na mesma concentração, aumentou em 32% a atividade dessa enzima. Para avaliar se o aumento na atividade enzimática era significativo, foi realizado o teste estatístico *t-Student* (não-

pareado). Nesse teste, os valores de atividade enzimática remanescente dos xenobióticos empregados foram comparados com o valor do controle negativo, sendo significativos valores com $p < 0,05$. Dessa forma, as concentrações acima de $65 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ para iangambina e epi-iangambina, respectivamente, aumentaram a atividade enzimática da CYP1A2 de forma estatisticamente significativa.

O aumento da atividade da isoforma é devido, provavelmente, ao efeito heterotrópico da iangambina e epi-iangambina, ou seja, ao se ligar a CYP1A2, mudanças conformacionais e eletrônicas são provocadas, aumentando sua afinidade pelo substrato (fenacetina) e, conseqüentemente, a atividade enzimática (ZHANG et al., 2012).

Figura 10 – Gráficos de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da isoforma CYP1A2. Gráficos de barras mostrando o aumento da atividade da CYP1A2 ao aumentar a concentração de iangambina (C) e epi-iangambina (D).



* representa as concentrações cujo aumento foi estatisticamente significativo.

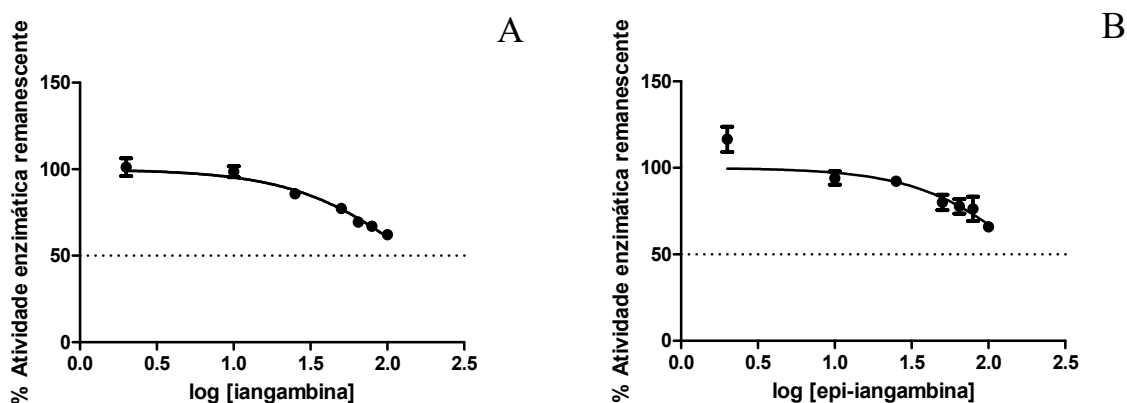
Fonte: autoria própria.

4.1.5.2 Avaliação da iangambina e epi-iangambina como inibidores da CYP2C9

Na avaliação do potencial inibitório dos epímeros sobre a CYP2C9 e determinação do IC_{50} , os experimentos foram realizados utilizando diclofenaco como substrato na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a reação monitorada foi a sua 4'-hidroxilação, gerando o metabólito 4'-hidroxiciclofenaco (marcador dessa isoforma).

A iangambina, como mostrado na **Figura 11A**, não causou uma inibição significativa na CYP2C9 (valor de IC_{50} acima de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Seu IC_{50} , obtido através da extrapolação da curva, foi de $148,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já a epi-iangambina apresentou um IC_{50} de $179 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Figura 11B**), também podendo ser classificada como um inibidor fraco.

Figura 11 – Gráfico de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da CYP2C9.



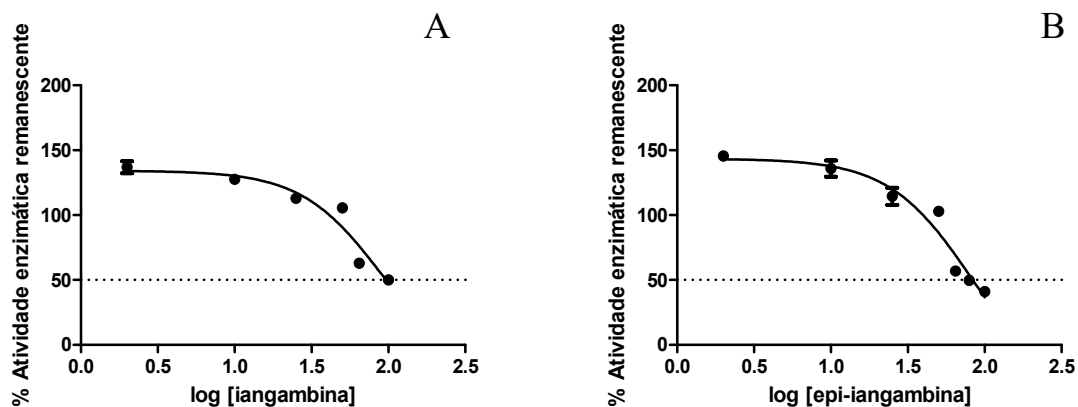
Fonte: autoria própria

4.1.5.3 Avaliação da iangambina e epi-iangambina como inibidores da CYP2C19

Na avaliação do potencial inibitório dos epímeros sobre a CYP2C19 e determinação do IC_{50} foi utilizado substrato a S-mefenitoína, em uma concentração próxima a seu K_M ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$) que sofre 4'-hidroxilação em sua metabolização pela CYP2C19.

Avaliando-se os efeitos inibitórios da iangambina e da epi-iangambina sobre a atividade enzimática da CYP2C19, os epímeros apresentaram um potencial inibitório relativamente maior do que para as outras isoformas estudadas até então. A iangambina, como mostrado na **Figura 12A**, causou inibição moderada na CYP2C19 (valor de IC_{50} $90,69 \mu\text{mol L}^{-1}$). Já a epi-iangambina apresentou um IC_{50} de $82,26 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Figura 12B**), também podendo ser classificada como um inibidor moderado.

Figura 12 – Gráficos de IC₅₀ para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da CYP2C19.

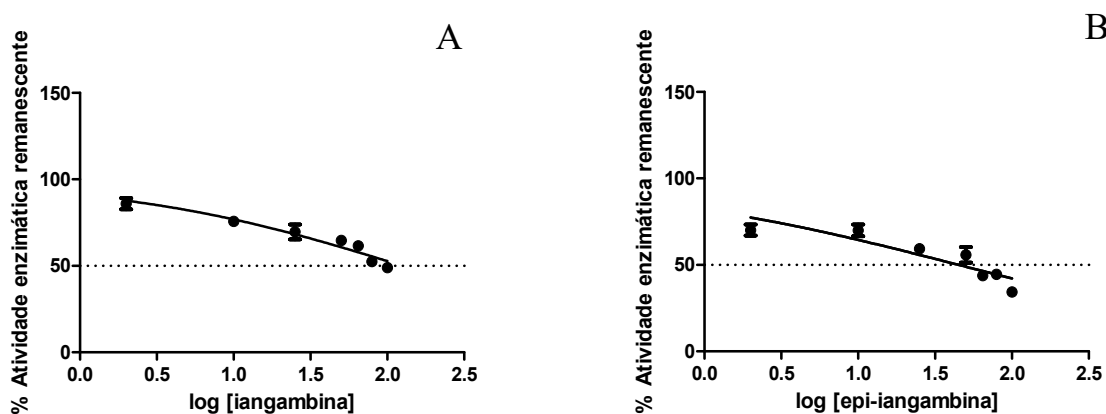


Fonte: autoria própria

4.1.5.4 Avaliação da iangambina e da epi-iangambina como inibidores da CYP2D6

A reação de hidroxilação do bufuralol (empregado como substrato, na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$) gerando o metabólito 1'-hidroxibufuralol, foi utilizada para monitorar a atividade da CYP2D6 na presença dos epímeros. Como apresentado na **Figura 13A**, a iangambina apresentou um IC₅₀ de $126,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ (obtido através da extrapolação da curva), sendo considerada um inibidor fraco, enquanto a epi-iangambina (**Figura 13B**) apresentou um IC₅₀ de $45,05 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que a coloca como um inibidor moderado da CYP2D6.

Figura 13 – Gráfico de IC₅₀ para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da isoforma CYP2D6.



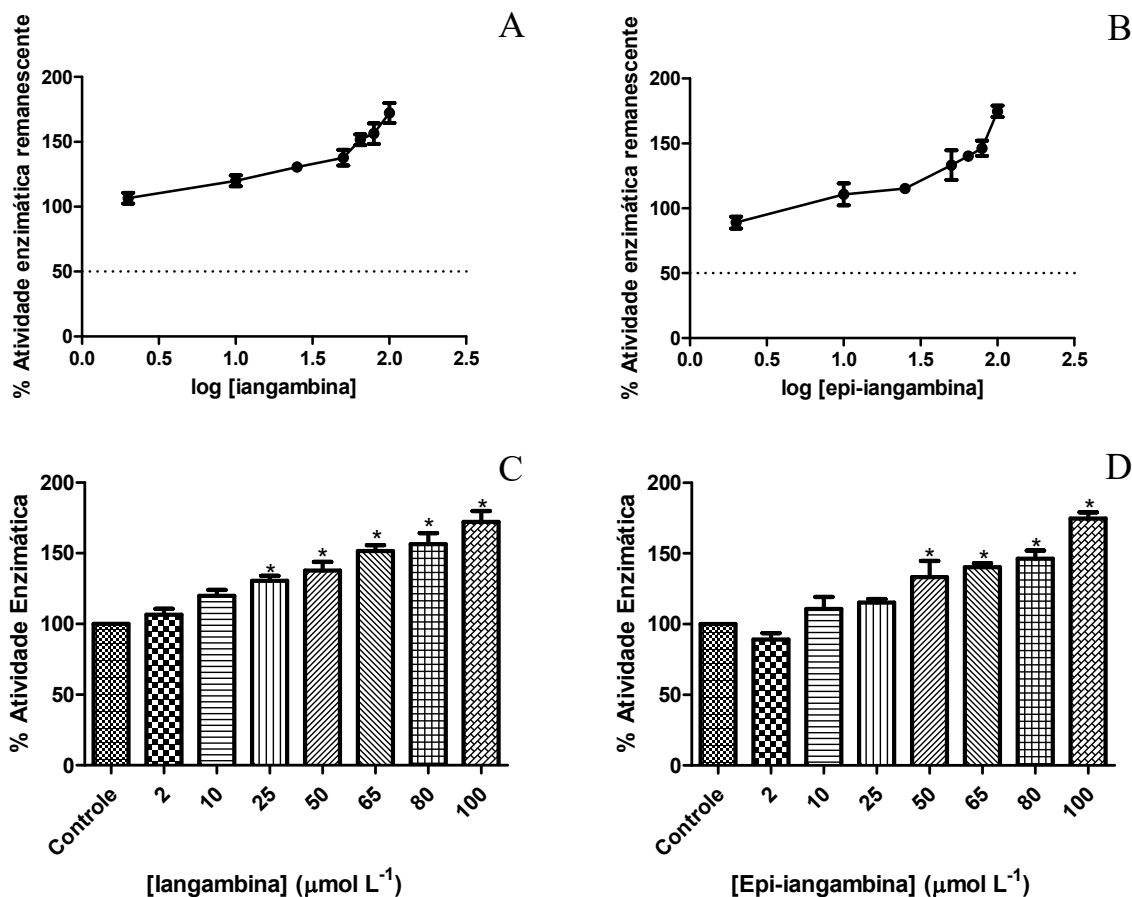
Fonte: autoria própria

4.1.5.5 Avaliação da iangambina e da epi-iangambina como inibidores da CYP2E1

Na avaliação do potencial inibitório dos epímeros sobre a CYP2E1 e determinação do IC₅₀, a reação de hidroxilação da clorzoxazona (empregada como substrato na concentração 145 $\mu\text{mol L}^{-1}$) gerando 6'-hidroxiclorzoxazona foi utilizada para monitorar a atividade dessa isoforma.

Nos estudos de inibição enzimática com os epímeros, ambos aumentaram a atividade enzimática da isoforma CYP2E1 (**Figura 14**). Tal fato já havia ocorrido com a CYP1A2 (**Figura 10**) e pode ser explicado pelo mesmo efeito heterotrópico, no qual, iangambina e epi-iangambina ligando-se à isoforma, mudam sua conformação e aumentam sua afinidade pelo substrato, aumentando, conseqüentemente sua atividade (ZHANG et al., 2012). Esse efeito já foi observado com outro produto natural, a grandisina (HABENSCHUS et al., 2017). Na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, iangambina e epi-iangambina aumentaram a atividade enzimática em 72 e 75%, respectivamente. Aplicando-se novamente o teste *t-Student* (não-pareado) entre os controles negativos e as concentrações de xenobiótico, considerando valores de $p < 0,05$ estatisticamente significativos, as concentrações acima de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para iangambina e epi-iangambina, respectivamente, aumentaram a atividade enzimática da CYP2E1 de forma estatisticamente significativa. Esse comportamento pode causar interações medicamentosas nas quais iangambina e epi-iangambina podem aumentar a atividade da CYP2E1 de forma a diminuir a concentração plasmática de outros medicamentos administrados concomitantemente. Por isso, deve ser levado em consideração caso os epímeros venham a se tornar fármacos futuramente.

Figura 14 – Gráficos de IC₅₀ para avaliação do potencial inibitório da iangambina (A) e da epi-iangambina (B) na atividade da isoforma CYP2E1. Gráficos de barras mostrando o aumento da atividade da CYP2E1 ao aumentar a concentração de iangambina (C) e epi-iangambina (D).



* representa as concentrações cujo aumento foi estatisticamente significativo.

Fonte: autoria própria

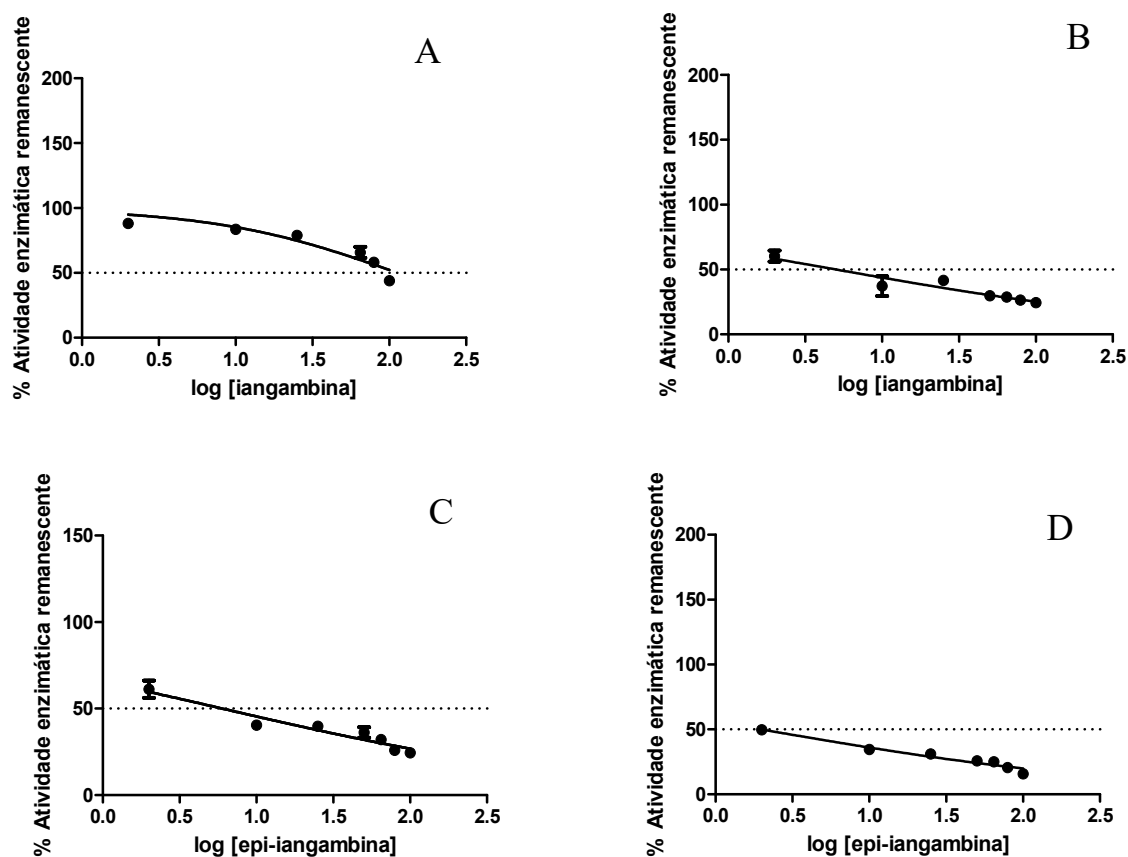
4.1.5.6 Avaliação da iangambina e da epi-iangambina como inibidores da CYP3A4

Devido à grande participação da CYP3A4 na metabolização de fármacos, o FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda que os estudos de metabolismo e inibição sejam feitos utilizando mais de um substrato. Dessa forma, foram utilizados a nifedipina (7 μmol L⁻¹) e o midazolam (5 μmol L⁻¹), cujos metabólitos marcadores são a deidronifedipina e o 1'-hidroximidazolam, respectivamente.

A iangambina apresentou um IC₅₀ de 113 μmol L⁻¹ (**Figura 15A**) para a CYP3A4/5 utilizando como substrato a nifedipina e de 5,0 μmol L⁻¹ tendo com substrato o midazolam (**Figura 15B**). A epi-iangambina, por sua vez, se comportou como um inibidor forte da

CYP3A4/5, tanto para a reação de metabolização da nifedipina (IC_{50} $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) (**Figura 15C**) quanto para a metabolização do midazolam (IC_{50} $1,98 \mu\text{mol L}^{-1}$) (**Figura 15D**).

Figura 15 – Gráficos de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório da iangambina e da epi-iangambina na atividade da isoforma CYP3A4/5 com diferentes substratos. (A) iangambina como inibidor e nifedipina como substrato; (B) iangambina como inibidor e midazolam como substrato; (C) epi-iangambina como inibidor e nifedipina como substrato; (D) epi-iangambina como inibidor e midazolam como substrato.



Fonte: autoria própria

Tal fato pode ser explicado pelo comportamento alostérico da CYP3A4. Como muitos xenobióticos são metabolizados por essa isoforma, já foi demonstrado que ela possui diversos sítios de ligação (ZANGER, SCHWAB, 2013), o que permite que os compostos no meio reacional possam agir de diversas formas na atividade dessa isoforma.

Os epímeros iangambina e epi-iangambina apresentaram diferentes comportamentos de acordo com a isoforma em que foram avaliados com inibidores. Considerando as isoformas

CYP1A2 e 2E1, tanto iangambina quanto epi-iangambina aumentaram a atividade enzimática. Já no caso das isoformas CYP2C9, 2D6 e 3A4, iangambina e epi-iangambina inibiram a atividade das enzimas, sendo que a iangambina se apresentou como um inibidor forte somente para a metabolização do midazolam pela CYP3A4, enquanto foi um inibidor fraco das outras isoformas (com $IC_{50} > 100 \mu\text{mol L}^{-1}$). Já a epi-iangambina inibiu a CYP2D6 moderadamente e a CYP3A4 fortemente para ambos os substratos.

No caso da CYP3A4, a isoforma é, conhecidamente, a isoenzima da família CYP450 responsável pelo metabolismo da maior parte dos xenobióticos que adentram a corrente sanguínea e passam pelo metabolismo de primeira-passage. A CYP3A4 apresenta maior afinidade metabólica por moléculas grandes e hidrofóbicas, como corticosteroides (dexametasona e prednisolona), antibióticos macrolídeos (azitromicina e eritromicina) e hormônios endógenos como a testosterona. Porém, seu sítio ativo facilmente se molda a diversas classes e tamanho de moléculas. Dessa forma, um candidato a fármaco que iniba a CYP3A4 tende a ser analisado com cautela, todavia tal fato não é impeditivo para sua aplicação.

Considerando-se que tanto iangambina quanto epi-iangambina inibiram fortemente a CYP3A4, seria o caso de analisar-se o custo-benefício de sua utilização contra a leishmaniose. Como a leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, cujo tratamento é pouco efetivo e com graves efeitos colaterais, ter um fármaco que é eficiente contra o parasita e que possa eliminá-lo do enfermo com eficácia parece ser um bom motivo para estudá-lo com maior acuidade.

Não obstante, o resultado mostra a importância de isômeros serem estudados separadamente, já que a iangambina aparentemente apresenta um potencial inibitório menor quando comparado com a epi-iangambina. Caso a iangambina seja mais efetiva contra a leishmania é possível considerar a utilização apenas desse epímero como fármaco.

As possibilidades são diversas e o processo é longo até que uma molécula seja considerada realmente apta a se tornar um fármaco. Porém é importante que a ciência não pare de progredir e achar esses candidatos a fármacos, principalmente para aqueles males que parecem esquecidos pelas grandes indústrias farmacêuticas, como as doenças tropicais negligenciadas. Quanto mais alternativas existirem, maior a chance desses males serem erradicados de vez.

4.2 Estudos com o Complexo de Rutênio com o ligante 5,6,7,8-tetraidroisoquinolina (THIQ-Ru)

4.2.1 Desenvolvimento de um método cromatográfico para análise do THIQ-Ru

No desenvolvimento de um método cromatográfico para análise do THIQ-Ru foi levado em consideração dois pontos: ser seletivo, podendo-se distinguir e, conseqüentemente, identificar e, quando oportuno, quantificar o THIQ-Ru e o padrão interno e não ser desnecessariamente extenso, evitando, assim, consumo desnecessário de solventes da fase móvel.

Apesar de apresentar uma cor azul intensa, o THIQ-Ru absorve com maior intensidade na região de 290 nm. O comprimento de 690 nm (que corresponderia à faixa de absorção de uma solução azul) apresentava uma banda até cinco vezes menos intensa que a de 290 nm e, por isso, foi utilizado somente para confirmar se a banda cromatográfica realmente correspondia ao THIQ-Ru.

O próximo passo para o desenvolvimento de um método para análise do THIQ-Ru foi a escolha da coluna cromatográfica. Com o objetivo de injetar um volume maior de amostra para alcançar um limite de quantificação menor, uma coluna C18, com 250 mm de comprimento foi inicialmente escolhida.

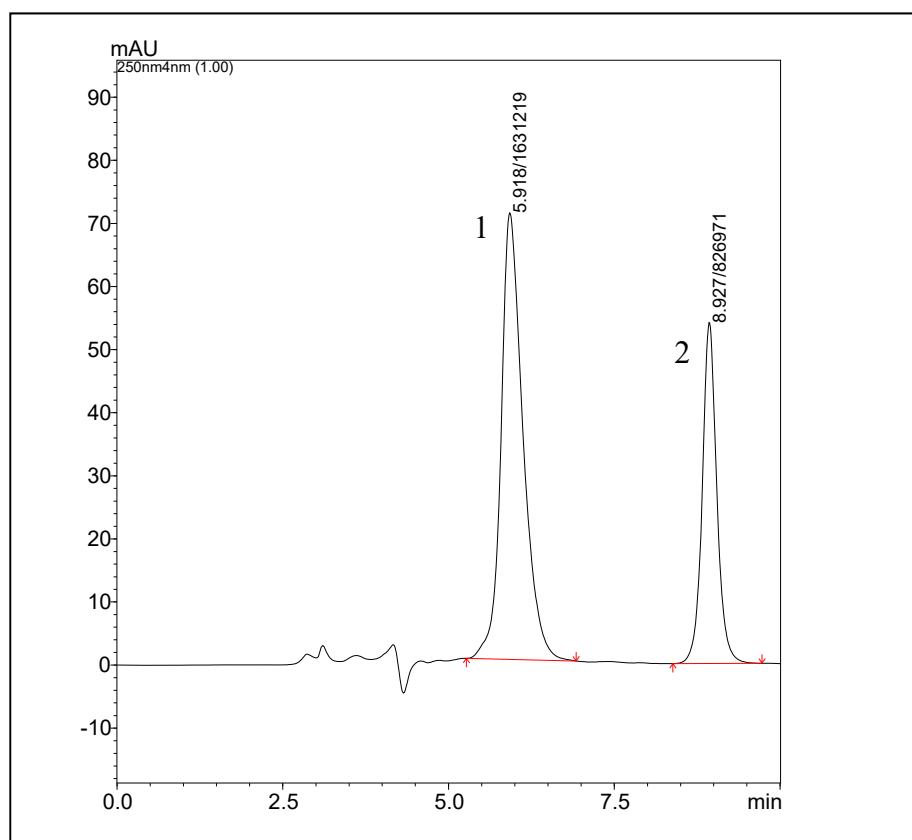
Dentre os solventes para a fase móvel foi avaliado metanol e água, na proporção 80:20 (v/v), respectivamente. Apesar de o THIQ-Ru ser mais solúvel em acetonitrila, a adição de tal solvente à fase móvel fez com que o composto tivesse afinidade demasiada pela fase móvel, eluindo próximo ao volume morto. Não obstante, composições de fase móvel com proporções de água acima de 30% alargavam demais a banda cromatográfica do THIQ-Ru, levando a picos assimétricos. A adição de 0,1% de ácido fórmico à fase móvel contribuiu para que a banda cromatográfica ficasse simétrica, contribuindo para uma análise mais adequada por cromatografia líquida de alta eficiência.

A próxima etapa foi definir um padrão interno adequado à análise. Em relação ao padrão interno, este deveria ter propriedades físico-químicas semelhantes ao analito de interesse. No caso de THIQ-Ru, as propriedades verificadas foram a capacidade de extração com acetato de etila na extração líquido-líquido (ELL) e o tempo de retenção nas condições cromatográficas já citadas acima. Dessa forma, o padrão interno escolhido foi a fenacetina, que teve seu tempo de retenção dois minutos maior que o THIQ-Ru. Esse analito apresentou uma extração satisfatória com o uso de acetato de etila além de não co-eluição com o analito de interesse. Outros

compostos avaliados geralmente aumentavam muito o tempo de análise ou eluíam próximo ao volume morto da coluna.

Dessa forma, o método cromatográfico desenvolvido teve como parâmetros: coluna cromatográfica Phenomenex® C18 250 mm, fase móvel metanol:água 80:20 (v/v) + 0,1% de ácido fórmico, volume de injeção 50 µL, vazão 0,7 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 30 °C. A **Figura 16** apresenta um cromatograma relativo a análise do THIQ-Ru (tempo de retenção de 5,9 min) e fenacetina (tempo de retenção de 8,9 min).

Figura 16- Cromatograma representativo da análise do complexo de rutênio (1) e padrão interno fenacetina (2) após definição das condições de análise.



Condições de análise: coluna cromatográfica Phenomenex C18 250 mm, fase móvel metanol:água 80:20 (v/v) + 0,1% de ácido fórmico, volume de injeção 50 µL, vazão 0,7 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 30 °C. Fonte: autoria própria

4.2.2 Avaliação da solubilidade do THIQ-Ru em meio aquoso

O complexo THIQ-Ru apresenta baixa solubilidade em meio aquoso. Tal propriedade pode ser devida a seus ligantes (5,6,7,8-tetraidroisoquinolina), que possuem alta massa molar e são apolares. A água também pode alterar o número de oxidação (NOX) do metal, levando a

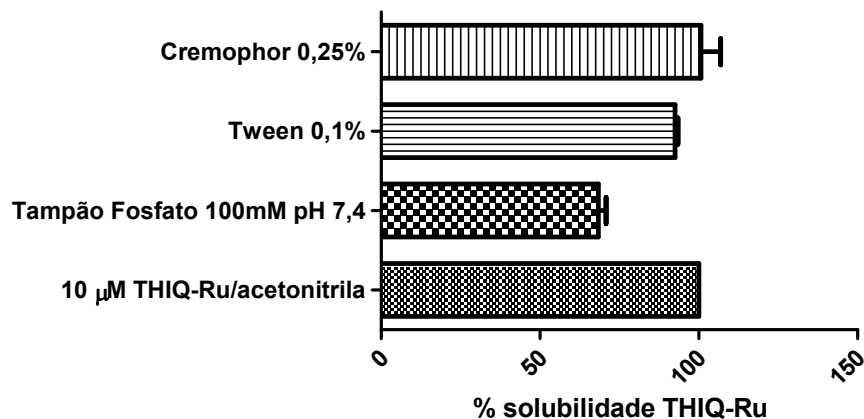
degradação do complexo e perda da atividade. Como o complexo THIQ-Ru possui ligante σ -doador, o NOX do rutênio tende a permanecer mais alto. Dessa forma, levando em consideração os futuros ensaios de metabolismo *in vitro*, estudos de solubilidade bem como sua estabilidade em solução aquosa foram avaliados.

A utilização de tensoativos e surfactantes para aumentar a solubilidade de compostos pouco solúveis em meio aquoso se faz necessária, para que os experimentos sejam realizados com eficiência. Dois estudos de solubilidade com o THIQ-Ru foram realizados. O primeiro (**Figura 17**), utilizou apenas os tensoativos Tween 80® (0,10 e 0,25%) e Chemophor EL® (0,25%), que estavam disponíveis à época no laboratório. Os resultados obtidos foram aplicados, pois como, primeiramente, seriam feitos somente estudos de inibição, caso o tensoativo inibisse a atividade enzimática, isso ocorreria tanto no controle quanto nas amostras e como o resultado de IC₅₀ seria plotado em forma de porcentagem em relação ao controle, a inibição causada pelo tensoativo não seria determinante para o êxito do experimento. O segundo experimento de solubilidade utilizou tensoativos que foram adquiridos posteriormente e se mostrou necessário, pois, no contexto em que se havia desenvolvido o projeto, foi conveniente realizar a determinação dos parâmetros enzimáticos utilizando o THIQ-Ru como substrato. Os experimentos de cinética, nesse caso, foram baseados no decaimento da banda cromatográfica do THIQ-Ru (depleção do complexo do meio microsomal), logo, se houvesse uma grande inibição da atividade enzimática causada pelo tensoativo, isso interferiria diretamente, e de forma prejudicial, nos resultados. Além disso, fez-se necessário o uso de um tensoativo que fosse capaz de solubilizar o complexo o THIQ-Ru em meio aquoso em concentrações acima de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que havia sido a concentração máxima solubilizada no primeiro experimento. No segundo experimento foram utilizados os tensoativos Tween 20® (0,10%), SensactiveC-30® (0,10%), Pluronic F-127® (0,10%), cocoamidopropilbetaína (0,10%).

No primeiro experimento, o THIQ-Ru foi solubilizado em meio aquoso somente em concentrações abaixo de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ainda que com a utilização de tensoativos. O Cremophor EL® foi escolhido como tensoativo para solubilizar o THIQ-Ru em meio aquoso, por apresentar um melhor resultado em comparação ao Tween 80®.

A **Figura 17** apresenta o resultado do primeiro experimento de solubilidade do THIQ-Ru, no qual se tomou a solução de THIQ-Ru em acetonitrila como 100% solúvel.

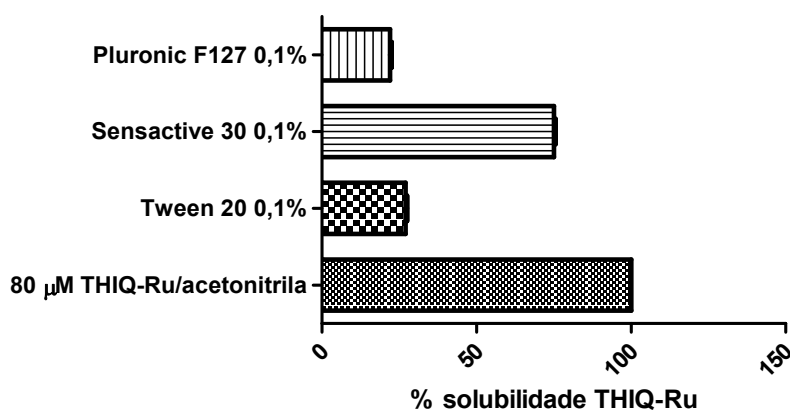
Figura 17 - Solubilidade do THIQ-Ru na concentração $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato 100 mmol L^{-1} pH 7,4, com e sem tensoativos (resultados expressos como média \pm SE).



Fonte: autoria própria

No segundo experimento, cujo resultado está apresentado na **Figura 18**, somente três dos quatro tensoativos avaliados apresentaram algum resultado positivo, sendo que o tensoativo cocoamidopropilbetáina não foi capaz de promover a solubilização do complexo THIQ-Ru em meio aquoso.

Figura 18 - Solubilidade do THIQ-Ru na concentração $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando os tensoativos Pluronic F-127[®], Tween 20[®] e SensactiveC-30[®], em solução de tampão Tris-KCl e solução tampão fosfato, pH 7,4 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (resultados expressos como média \pm SE).



Fonte: autoria própria

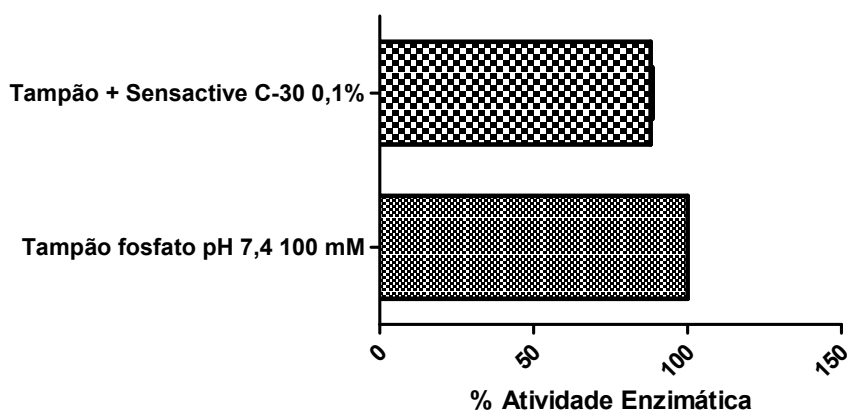
Dentre os tensoativos avaliados no segundo experimento, o tensoativo Sensactive C-30[®] foi o que apresentou melhor resultado, solubilizando 80% da solução $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de THIQ-

Ru. Tal valor foi utilizado para corrigir a concentração de THIQ-Ru solubilizada em meio aquoso nos experimentos de cinética.

4.2.3. Avaliação da influência do tensoativo no metabolismo do THIQ-Ru pelas enzimas do CYP450

Dentre os tensoativos avaliados no segundo experimento de solubilidade, o Sensactive C-30[®] foi aquele que apresentou maior capacidade de solubilizar o complexo THIQ-Ru em meio aquoso. A partir desse resultado, foi realizado um experimento no qual se avalia a capacidade do Sensactive C-30[®] de inibir a atividade das enzimas do CYP450. Para tanto utilizou-se uma concentração de THIQ-Ru em meio aquoso que se sabe ser completamente solúvel em tampão fosfato pH 7,4 100 mmol L⁻¹ sem a presença de tensoativos (5 µmol L⁻¹). Dessa forma, o metabolismo foi realizado com e sem a presença de tensoativo no meio. Tomou-se as amostras sem tensoativo no meio como 100% de atividade enzimática. Os resultados estão apresentados na **Figura 19**.

Figura 19 – Avaliação do potencial de inibição enzimática do tensoativo Sensactive C-30[®] na concentração de 0,1% em meio microsomal.



Fonte: autoria própria

O tensoativo Sensactive C-30[®] inibiu em 12% a atividade enzimática das enzimas do CYP450. Considerando que o coeficiente de variação aceito nos ensaios é de 15%, pode-se afirmar que esse é um resultado aceitável para que o Sensactive C-30 seja utilizado como tensoativo para a solubilizar o THIQ-Ru em meio aquoso, já que não inibe de forma relevante a atividade enzimática.

4.2.4 Validação de método analítico para quantificação do THIQ-Ru em meio microssomal

Com o objetivo de determinar os parâmetros enzimáticos após metabolismo pelos microssomais hepáticos de humanos, o método cromatográfico foi validado avaliando os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão, efeito matriz, efeito residual e estabilidade. Os critérios de aceitação para cada parâmetro foram baseados no guia para Validação para Métodos Bioanalíticos (*Guideline on bioanalytical method validation*) da *European Medicine Agency* (EMA) (EMA, 2011).

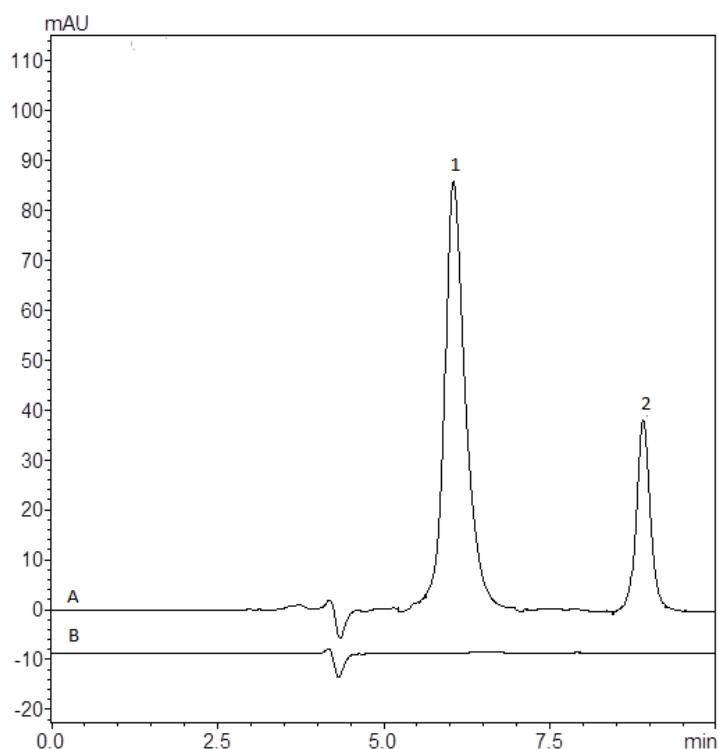
4.2.4.1 Linearidade

A linearidade de um método analítico relaciona-se com a capacidade desse método em apresentar resultados proporcionais à concentração do analito na amostra, em um determinado intervalo de concentração (RAMBLA; ESTEVE; CARLA, 2012). Na validação de métodos analíticos, quando há um amplo intervalo de concentração do analito a ser avaliada, utiliza-se a ponderação para a análise da regressão linear (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCÃO, 2002). Para avaliar a linearidade do método analítico foram empregadas as regressões lineares com ponderação utilizando os pesos de $1/x$, $1/x^2$ e $1/x^{1/2}$. A ponderação $1/x^2$ foi a que apresentou os melhores resultados (menor ΣER %), para o analito. A equação linear para a curva de quantificação do THIQ-Ru foi $y=0,0661x-0,06689$. O valor do coeficiente de correlação (r) 0,9962. O intervalo avaliado foi de 0,1 a 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, foram realizados testes de validade de regressão e de falta de ajuste. No teste de validade de regressão, o valor de F calculado foi de 6250,02 e foi maior que o valor crítico (2,79) e o valor de p foi de zero, e apresenta-se menor que 0,005 ($\alpha = 0,005$), comprovando a validade da regressão. No teste de falta de ajuste (*lack of fit*), o valor de F calculado foi menor que o valor crítico (2,79) e ficou em 1,85 e o valor de p foi maior que 0,05 e ficou em 0,275.

4.2.4.2 Seletividade

A seletividade de uma análise garante que nenhum interferente proveniente da matriz ou de quaisquer outros elementos envolvidos na análise interfiram na análise (EMA, 2011; ANVISA, 2012). A **Figura 20** demonstra que não há interferentes nos mesmos tempos de retenção do THIQ-Ru e do padrão interno, portanto o método analítico desenvolvido foi seletivo.

Figura 20 – Cromatogramas representativos da seletividade do método desenvolvido.



A) Amostra de meio microsomal fortificada com THIQ-Ru ($80 \mu\text{mol L}^{-1}$) e o PI ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Amostra de branco do meio microsomal. (1) THIQ-Ru. (2) PI. Fonte: autoria própria

4.2.4.3 Efeito Residual

O efeito residual (*carryover*) avalia a presença do analito e do padrão interno em corridas posteriores sem a presença dos mesmos. Para tanto, são injetadas amostras sem o analito e o PI (branco) logo após a análise de amostras que contenham o analito em seu LSQ e o PI. As análises não apresentaram *carryover*, o que assegura a confiabilidade dos resultados, considerando este parâmetro. Dados não apresentados.

4.2.4.4 Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor concentração de analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão dentro de limites pré-determinados aceitáveis (RAMBLA; ESTEVE; CARLA, 2012). O método desenvolvido permite a quantificação do THIQ-Ru na concentração mínima de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. O erro relativo percentual (ER %) encontra-se entre -7% a 7% e coeficiente de variação (CV %) foi de, no máximo, 13% . Esses valores de exatidão e precisão estão dentro do intervalo aceitável para o LIQ do método analítico, que se encontra entre $\pm 20\%$ para o erro relativo e 20% para o coeficiente de variação (EMA, 2011; ANVISA, 2012).

4.2.4.5 Precisão e Exatidão

A precisão do método analítico está relacionada com a proximidade dos resultados obtidos em análises realizadas a partir da mesma amostra, podendo ser expressa como coeficiente de variação (CV %). Já a exatidão do método é a proximidade entre o valor de concentração do analito obtido na análise e o valor considerado real, podendo ser expressa como erro relativo percentual (ER %). A precisão e exatidão foram avaliadas em quatro níveis de concentração (LIQ, CQB, CQM e CQA) em um mesmo dia (intraensaio) (Tabela 9) e em três dias diferentes (interensaio) (Tabela 10).

Tabela 9– Precisão e exatidão intraensaio do método analítico

	Concentração nominal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Precisão CV(%)	Exatidão ER(%)
LIQ	0,10	0,090	4,4	-10
CQB	0,20	0,19	2,7	-5
CQM	20,0	20,2	2,1	1
CQA	60,0	60,6	6,6	1

LIQ – Limite inferior de quantificação
CQM – Controle de qualidade médio
CV – Coeficiente de variação

CQB – Controle de qualidade baixo
CQA – Controle de qualidade alto
ER – Erro relativo

Tabela 10 – Precisão e exatidão interensaio do método analítico

	Concentração nominal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Precisão CV(%)	Exatidão ER(%)
LIQ	0,10	0,11	9,8	10
CQB	0,20	0,22	5,0	10
CQM	20,0	20,5	3,0	3
CQA	60,0	58,6	4,9	-2

LIQ – Limite inferior de quantificação
CQM – Controle de qualidade médio
CV – Coeficiente de variação

CQB – Controle de qualidade baixo
CQA – Controle de qualidade alto
ER – Erro relativo

Os valores de precisão e exatidão em ambos os ensaios estão dentro do que é preconizado pelo guia de validação (CV % e ER % menores do que 15% e $\pm 15\%$, respectivamente).

4.2.4.6 Estabilidade

A realização de ensaios de estabilidade dos analitos nas condições de incubação do estudo de metabolismo *in vitro* é de fundamental importância para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. A estabilidade do THIQ-Ru (CQB e CQA) foi avaliada simulando situações reais de estudos de metabolismo *in vitro* (60 minutos a 37°C no banho metabólico), na ausência do cofator NADPH, e também no auto-injetor do equipamento de cromatografia líquida por 24 horas. Com o auxílio de uma curva analítica preparada no mesmo dia, as amostras foram quantificadas e os resultados obtidos.

O estudo de estabilidade do THIQ-Ru nas condições de incubação sugere que as amostras permanecem estáveis durante 60 min a 37°C (Tabela 11).

Tabela 11 – Estabilidade na condição de incubação

	Concentração nominal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Precisão CV(%)	Exatidão ER(%)
CQB	0,20	0,18	13,1	-10
CQA	60,0	61,8	4,8	3

CQB – Controle de qualidade baixo CQA – Controle de qualidade alto
CV – Coeficiente de variação ER – Erro relativo

Em relação aos estudos de estabilidade no injetor automático, os resultados obtidos sugerem que o THIQ-Ru também é estável por 24 horas (Tabela 12).

Tabela 12 – Estabilidade na condição de incubação (tempo)

	Concentração nominal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Precisão CV(%)	Exatidão ER(%)
CQB	0,20	0,19	2,6	-5
CQA	60,0	57,2	4,4	-5

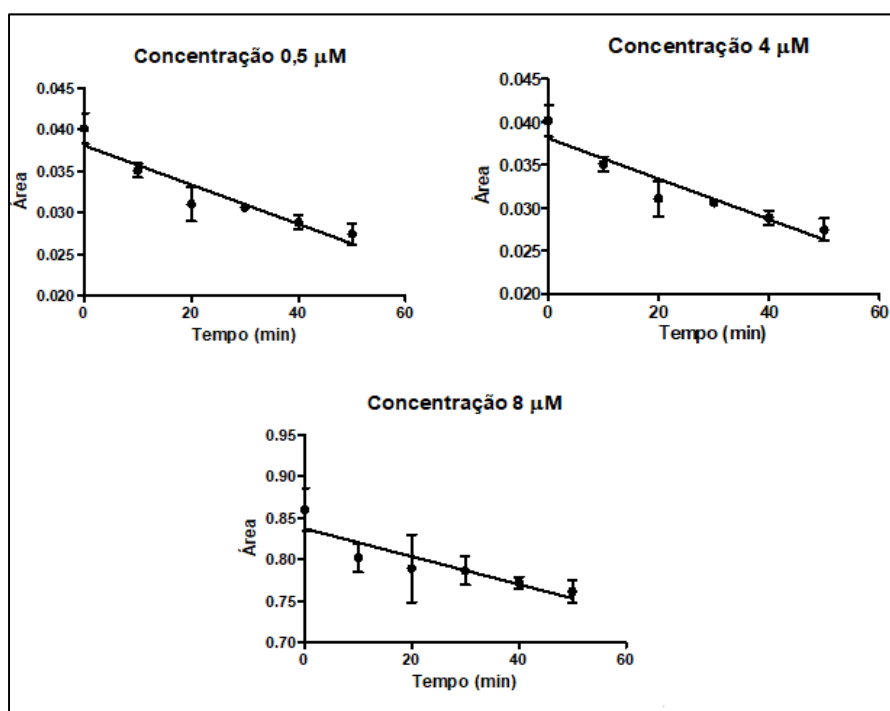
CQB – Controle de qualidade baixo CQA – Controle de qualidade alto
CV – Coeficiente de variação ER – Erro relativo

4.2.5 Determinação dos parâmetros enzimáticos do complexo THIQ-Ru após metabolismo pelas enzimas microsossomais do CYP450 de humanos

Para a determinação dos parâmetros enzimáticos é necessário determinar o tempo de incubação onde o consumo do substrato (complexo THIQ-Ru) pelas enzimas do CYP450 é linear. Para tanto, três concentrações do complexo foram avaliadas. A Figura 21 apresenta os

gráficos representativos de três concentrações diferentes (0,5; 4,0 e 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de THIQ-Ru com um tempo de incubação entre zero e 50 minutos, analisando-se intervalos de 10 minutos.

Figura 21 – Gráficos representativos de faixa linear da reação enzimática do THIQ-Ru frente às enzimas do CYP450 em três diferentes concentrações.

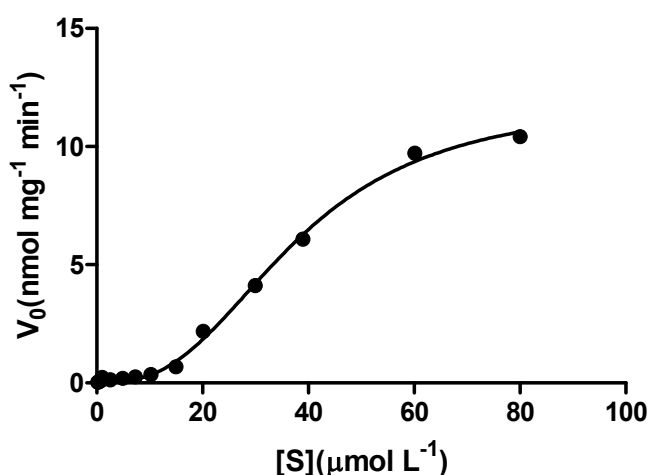


Concentração de proteínas microsossomais: 0,2 mg mL^{-1} ; para conc. 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$: $y = 0,0002364x + 0,0312$; $r = 0,9845$; para conc. 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$: $y = 0,0002502x + 0,03883$; $r = 0,9863$; para conc. 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$: $y = 0,001681x + 0,8375$; $r = 0,9806$. Fonte: autoria própria.

A partir da **Figura 21** é possível verificar que nas três concentrações utilizadas o consumo do substrato é linear durante os 50 minutos de reação. Com o objetivo de evitar um longo tempo de incubação, 20 minutos foi o tempo escolhido para a determinação dos parâmetros enzimáticos.

Após estabelecer o tempo de incubação e utilizando como concentração de proteínas microsossomais 0,2 mg mL^{-1} a determinação dos parâmetros enzimáticos foram realizados e o perfil cinético encontra-se representado na **Figura 22**.

Figura 22 – Perfil cinético enzimático representativo da reação enzimática do THIQ-Ru frente às enzimas do CYP450.



Tempo de incubação: 20 min; concentração de proteínas microsossomais: 0,2 mg mL⁻¹. Fonte: autoria própria

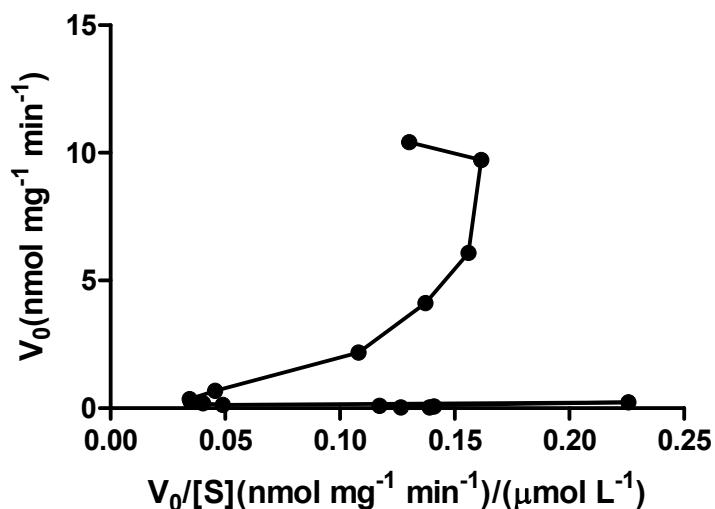
Dentre os diversos modelos de cinética enzimática possíveis, as enzimas do CYP450 apresentaram um comportamento sigmoide ou cooperativo homotrópico positivo. Isso significa que a presença do substrato em um sítio ativo da enzima molda os demais sítios de forma a aumentar a atividade enzimática para metabolizar as demais moléculas de substrato (OGILVIE et al., 2008). A equação que torna possível o cálculo dos parâmetros enzimáticos desse modelo de cinética é a equação de Hill (**Equação 10**) (MARAGONI, 2003).

$$v = \frac{V_{\max}[S]^n}{S_{50}^n + [S]^n} \quad (\text{Equação 10})$$

Nessa equação, S_{50} é o equivalente ao K_M da equação de Michaelis-Menten, ou seja, a concentração de substrato na qual a enzima atinge metade de sua velocidade máxima. Para o THIQ-Ru, o S_{50} foi de 37,69 μmol L⁻¹. Já n é o fator que indica se o cooperativismo homotrópico é positivo ou negativo. Se $n < 1$, o cooperativismo é negativo, ou seja, a presença do substrato diminuiria a atividade enzimática; e se $n > 1$, o cooperativismo é positivo, no qual a presença de substrato aumenta a atividade enzimática. No caso do THIQ-Ru, $n = 2,7$ o que indica um cooperativismo positivo. Utilizando a **Equação 10**, é possível calcular a V_{\max} da reação enzimática, que para o THIQ-Ru ficou em 12,01 nmol mg⁻¹ min⁻¹.

Outra forma de confirmar o comportamento sigmoidal é a transformada de Eadie-Hofstee, na qual um gráfico na forma de gancho indica o comportamento sigmoidal das enzimas com o substrato (OGILVIE et al., 2008). A **Figura 23** apresenta a transformada de Eadie-Hofstee.

Figura 23 – Gráfico de Eadie-Hofstee utilizando os dados da cinética enzimática do THIQ-Ru frente as enzimas do CYP450.



Fonte: autoria própria

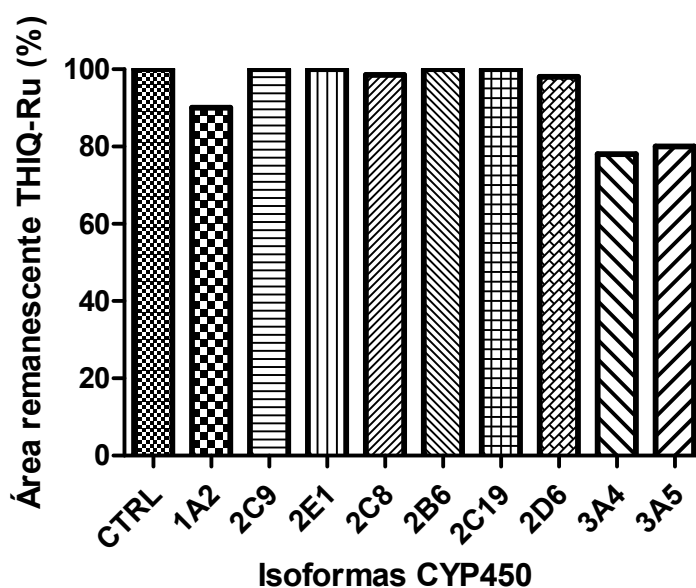
O formato de gancho do gráfico de Eadie-Hofstee indica que o perfil da cinética do THIQ-Ru realmente é sigmoidal ou cooperativo homotrópico positivo e isso implica que quando uma molécula de THIQ-Ru se liga ao sítio de uma enzima do CYP450 durante o metabolismo, induz uma mudança estrutural ou eletrônica que favorece a ligação de uma outra molécula de THIQ-Ru, aumentando a atividade da enzima.

4.2.6 Determinação das Isoformas do CYP450 responsáveis pelo metabolismo do THIQ-Ru (Fenotipagem)

O estudo das isoformas responsáveis pelo metabolismo de um fármaco (também chamado de estudo de fenotipagem ou mapeamento enzimático) visa identificar quais enzimas são responsáveis pelo metabolismo de um candidato a fármaco (OGILVIE et al., 2008). A realização desses estudos nas etapas iniciais de desenvolvimento de um medicamento é muito importante, uma vez que através dos resultados se obtêm informações acerca da rota de eliminação desse composto e também acerca de interações medicamentosas que ele possa provocar (LI, 2008).

A partir dos resultados obtidos no experimento de fenotipagem (**Figura 24**) é possível sugerir que as isoformas CYP3A4, CYP3A5 são aquelas que mais participam do metabolismo do THIQ-Ru, pois foram as isoformas que geraram maior decaimento na área do THIQ quando comparado ao controle. Tal resultado é esperado já que a CYP3A4 e CYP3A5 é a isoforma que metaboliza a maior parte dos xenobióticos que entram no corpo humano, principalmente os hidrofóbicos e de alta massa molar (um de seus marcadores clássicos é a testosterona, que apresenta alta massa molar e hidrofobicidade) (ZANGER; SCHWAB, 2013). Esse resultado vai ao encontro da curva cinética sigmoidal obtida utilizando o THIQ-Ru como substrato. A sigmoide é característica dos substratos da isoforma CYP3A4, e os estudos de fenotipagem de fato indicam que é essa a isoforma que participa majoritariamente do metabolismo do THIQ-Ru.

Figura 24 – Avaliação das enzimas do CYP450 envolvidas no metabolismo do complexo utilizando enzimas recombinantes do CYP450 (supersomas[®]).



Fonte: autoria própria

4.2.7 Inibição enzimática utilizando o THIQ-Ru como potencial inibidor das isoformas do CYP450

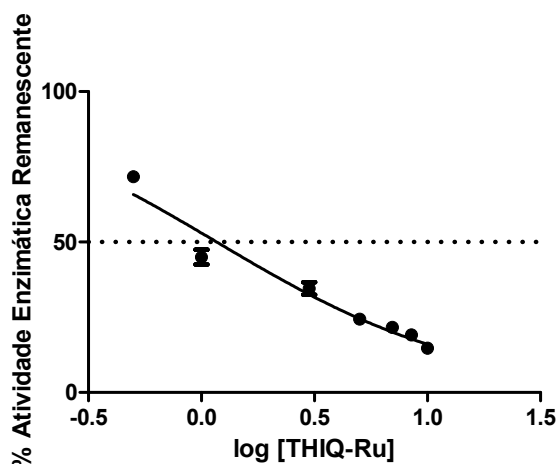
Para avaliar o comportamento do THIQ-Ru como inibidor da atividade das enzimas do CYP450, determinou-se o IC₅₀ para as principais isoformas do CYP450. Os resultados obtidos

estão apresentados em gráficos de atividade enzimática remanescente versus concentração de THIQ-Ru.

4.2.7.1 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP1A2

Para a determinação do IC_{50} com a CYP1A2, foi utilizado o substrato fenacetina, em uma concentração próxima a seu K_M ($12 \mu\text{mol L}^{-1}$) que sofre *O*-desetilação, transformando-se no seu metabólito, acetaminofeno. A **Figura 25** mostra o perfil de IC_{50} do complexo THIQ-Ru, que foi avaliado nas concentrações entre $0,5 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 25 – Gráfico de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP1A2.



Fonte: autoria própria

Como demonstrado na **Figura 25**, o THIQ-Ru apresentou um considerável potencial inibitório sobre a atividade da CYP1A2 (OGILVIE et al., 2008). O valor de IC_{50} apresentado foi de $1,17 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo considerado um inibidor forte dessa isoforma.

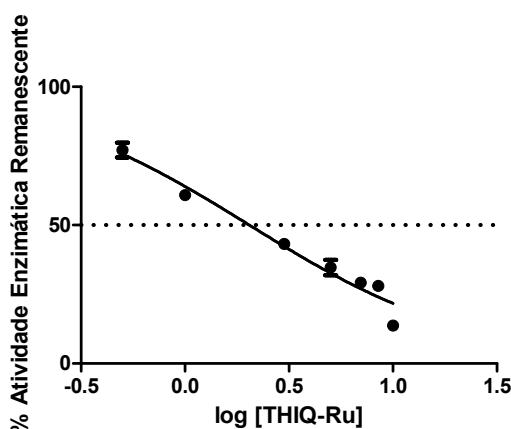
A isoforma CYP1A2, no que diz respeito à sua atividade catalítica para reações de hidroxilação e outras transformações oxidativas, apresenta preferência por aminas aromáticas e compostos heterocíclicos (ZANGER; SCHWAB, 2013). Seu sítio ativo possui uma cavidade maior que da CYP2D6, porém menor que da CYP3A4. Devido à sua expressão relativamente alta no fígado, a CYP1A2 participa significativamente do metabolismo de uma série de fármacos, como analgésicos e antipiréticos, antipsicóticos, antidepressivos, anti-inflamatórios e anti-hipertensivos. Além disso, benzopirenos e diversos compostos carcinogênicos presentes

em alimentos industrializados são bioativados pela CYP1A2 em intermediários que podem causar danos ao DNA (ZANGER; SCHWAB, 2013).

4.2.7.2 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP2C9

Os experimentos para a determinação do IC_{50} da CYP2C9 foram realizados utilizando diclofenaco na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a reação monitorada foi a 4'-hidroxilação do diclofenaco, gerando o metabólito 4'-hidroxidiclofenaco. O complexo THIQ-Ru foi avaliado como inibidor da CYP2C9 nas concentrações $0,5 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o gráfico de IC_{50} é apresentado na **Figura 26**.

Figura 26 – Gráfico de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP2C9.



Fonte: autoria própria

O complexo THIQ-Ru apresentou um IC_{50} de $2,04 \mu\text{mol L}^{-1}$, que o torna um inibidor forte da CYP2C9 (OGILVIE et al., 2008).

A isoforma CYP2C9 metaboliza ácidos fracos, incluindo o anticoagulante varfarina, os anticonvulsivantes fenitoína e ácido valpróico, antidiabéticos orais como clibenclamida e tolbutamida e a maioria dos anti-inflamatórios não-esteroides (ZANGER; SCHWAB, 2013). Alguns estudos de cristalografia apontam que a CYP2C9 apresenta um sítio adicional para ligação de substratos (ZANGER; SCHWAB, 2013). A inibição da CYP2C9 é causada por fármacos como o sulfafenazol e o antimicótico fluconazol, e torna-se especialmente relevante nos casos de tratamento com o anticoagulante varfarina (ZANGER; SCHWAB, 2013).

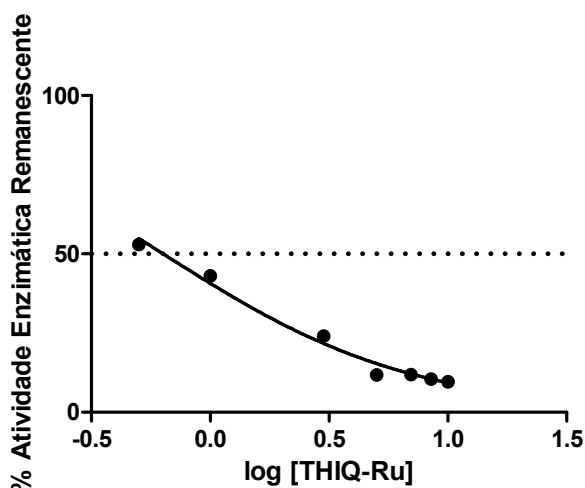
4.2.7.3 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP2D6

Para avaliar o THIQ-Ru como inibidor da CYP2D6, a reação de hidroxilação do bufuralol (empregado na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$) gerando o metabólito 1'-hidroxibufuralol, foi utilizada para monitorar a atividade da CYP2D6.

O complexo THIQ-Ru novamente mostrou seu potencial como forte inibidor, apresentando um IC_{50} de $0,63 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a CYP2D6 (**Figura 27**). O THIQ-Ru apresenta um valor comparável ao do inibidor seletivo da CYP2D6, quinidina, que possui um IC_{50} compreendido entre $0,02 - 0,22 \mu\text{mol L}^{-1}$ (TESTINO; PATONAY, 2003).

A quantidade de fármacos metabolizada pela CYP2D6 é considerada grande, se comparada à sua expressão relativamente pequena no fígado (ZANGER; SCHWAB, 2013). Cerca de 15 a 25% de todos os fármacos clinicamente utilizados (de praticamente todas as classes) são metabolizados pela CYP2D6, com preferência por moléculas básicas com o nitrogênio protonável entre 4 e 7 Å do sítio metabólico, incluindo alcaloides e antidepressivos tricíclicos e de segunda geração (ZANGER; SCHWAB, 2013). Analgésicos opioides como tramadol e codeína também são metabolizados por essa isoforma (ZANGER; SCHWAB, 2013).

Figura 27 – Gráfico de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP2D6.



Fonte: autoria própria

4.2.7.4 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP2E1

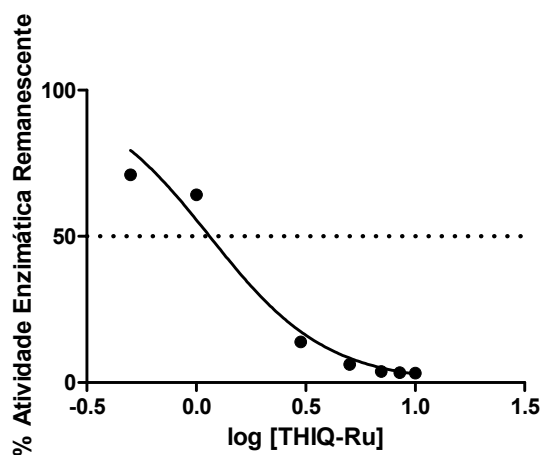
A reação de hidroxilação da clorzoxazona (empregada na concentração $145 \mu\text{mol L}^{-1}$) gerando 6'-hidroxiclorzoxazona foi utilizada para monitorar a atividade da CYP2E1 e avaliar o THIQ-Ru como inibidor dessa isoforma.

O complexo THIQ-Ru apresentou um IC_{50} de $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a isoforma CYP2E1 (**Figura 28**), o que, novamente, indica que o complexo é um forte inibidor das isoformas do CYP450. O THIQ-Ru apresentou um valor de IC_{50} menor que o de um inibidor seletivo da CYP2E1, o dietilcarbamato ($\text{IC}_{50} \sim 6 \mu\text{mol L}^{-1}$) (EAGLING; TIJA; BACK, 1998).

A isoforma CYP2E1 apresenta preferência por substratos de baixo peso molecular, como etanol, acetona e outros solventes orgânicos e narcóticos como halotano e alguns fármacos como clorzoxazona e paracetamol (ZANGER; SCHWAB, 2013). Muitas substâncias tóxicas para o ambiente e o ser humano, bem como carcinogênicos são substratos para essa isoforma. A participação da CYP2E1 na oxidação do etanol depende das condições apresentadas. A principal enzima que oxida o etanol em acetaldeído é a álcool desidrogenase e a CYP2E1 apresenta maior participação somente em altas concentrações ou em casos de consumo crônico (ZANGER; SCHWAB, 2013).

Uma importante característica da oxidação do etanol pela CYP2E1 é a geração de espécies reativas de oxigênio, que contribui para danificar as células hepáticas. O fato de uma quantidade significativa das enzimas da CYP2E1 localizar-se no interior da mitocôndria, contribui para o aumento dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio (ZANGER; SCHWAB, 2013).

Figura 28 – Gráfico de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP2E1.

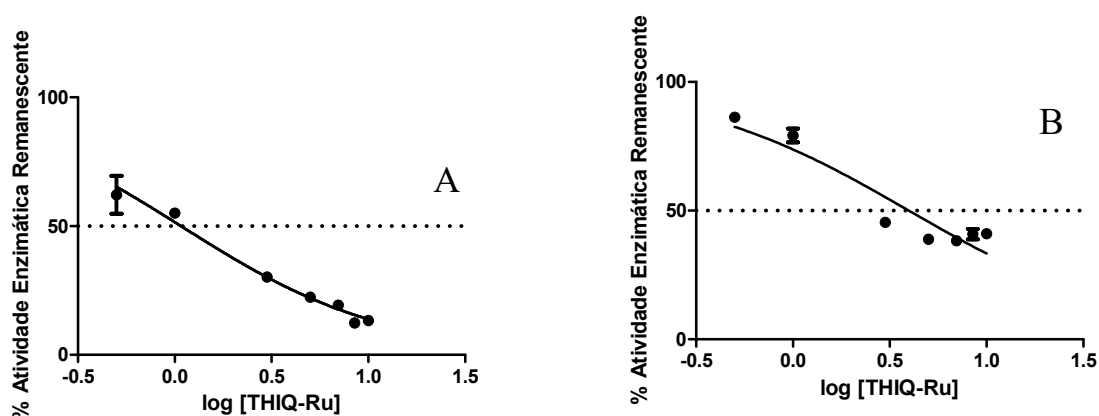


Fonte: autoria própria

4.2.7.5 Avaliação do THIQ-Ru como inibidor da CYP3A4/5

Devido à grande participação da CYP3A4/5 na metabolização de fármacos, a FDA recomenda que os estudos de metabolismo e inibição sejam feitos utilizando mais de um substrato, neste trabalho serão utilizados a nifedipina ($7 \mu\text{mol L}^{-1}$) e o midazolam ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$), cujos metabólitos são a deidronifedipina e o 1'-hidroximidazolam, respectivamente.

Figura 29 – Gráfico de IC_{50} para avaliação do potencial inibitório do complexo THIQ-Ru na atividade da isoforma CYP3A4 utilizando midazolam (A) e nifedipina (B) como substratos.



Fonte: autoria própria

Utilizando o midazolam como substrato da CYP3A4, o THIQ-Ru inibiu a atividade da isoforma fortemente (**Figura 29A**), apresentando um IC_{50} de $1,08 \mu\text{mol L}^{-1}$. O cetoconazol, inibidor seletivo da CYP3A4, é reportado na literatura científica com um IC_{50} de $\sim 0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$ (SAKAEDA et al., 2005), porém, apesar de o THIQ-Ru apresentar um IC_{50} mais de dez vezes maior, ainda assim é considerado um inibidor forte, pois inibe abaixo de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A determinação do IC_{50} do THIQ-Ru com nifedipina (**Figura 29B**) também resultou em uma inibição forte, com um valor de IC_{50} de $3,97 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A subfamília CYP3A apresenta um papel importante no metabolismo de fármacos, catalisando $\sim 30\%$ das reações de quase todas as classes de fármacos (ZANGER; SCHWAB, 2013). O sítio ativo da CYP3A4 é grande e flexível, podendo acomodar e metabolizar uma grande variedade de moléculas, com preferência por aquelas lipofílicas, de estrutura relativamente grandes, o que não impede a isoforma de metabolizar moléculas menores (ZANGER; SCHWAB, 2013).

A CYP3A4 também é uma eficiente hidroxilase de esteróis, tendo um papel importante no catabolismo de esteroides endógenos, como testosterona, progesterona, androstenediona, cortisol e ácidos biliares. A alta similaridade entre as isoenzimas da subfamília CYP3A (CYP3A4 e CYP3A5 compartilham >85% de suas sequências de aminoácidos) leva à uma grande similaridade de substratos seletivos entre as isoformas (ZANGER; SCHWAB, 2013). Devido à grande participação da CYP3A4/5 na metabolização de fármacos, a FDA recomenda que os estudos de metabolismo e inibição sejam feitos utilizando mais de um substrato.

O complexo THIQ-Ru inibiu fortemente ($IC_{50} < 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) todas as isoformas do CYP450 estudadas até então (CYP1A2, 2C9, 2D6, 2E1 e 3A4/5). Tal resultado, em um primeiro momento, parece inviabilizar a molécula como um potencial candidato a fármaco, já que quando uma molécula inibe as principais isoformas do CYP450, outros fármacos e substâncias administrados concomitantemente ao inibidor podem ter seus níveis séricos elevados, pois não são devidamente metabolizados, podendo levar a efeitos tóxicos. Porém, outros parâmetros devem ser considerados antes de descartar o THIQ-Ru como candidato a fármaco. Primeiramente, deve-se conhecer, através de experimentos criteriosos, quais as doses do composto são eficientes contra o parasita da Doença de Chagas. Caso essas doses sejam inferiores aos valores de IC_{50} para as isoformas, o composto pode ser utilizado como medicamento, mesmo que com monitoramento dos níveis séricos. Outro critério é o número de doses necessárias para alcançar-se o efeito. Caso poucas doses já eliminem o parasita do organismo, cuidados podem ser tomados durante o período de administração, como cessar temporariamente a utilização de outros medicamentos ou utilizá-los em concentrações menores.

Além de todos os fatores já citados, é relevante lembrar que vários fármacos possuem grandes efeitos adversos, como forte inibição das isoformas da CYP450, mas sua utilização é autorizada, pois os benefícios superam os efeitos colaterais. É o caso de imunossuppressores utilizados em transplantes e doenças autoimunes; fármacos anticâncer, que causam enfraquecimento dos folículos capilares e do organismo de uma forma geral, mas combatem as células neoplásicas; medicamentos antirretrovirais, que combatem o HIV, mas inibem diversas enzimas do organismo, dentre muitos outros exemplos.

Dessa forma, o estudo do perfil de inibição do THIQ-Ru para as isoformas do CYP450 deve ser realizado de modo a ser conhecido, mas de forma alguma deve ser o único critério para descartá-lo como um candidato a fármaco. Esse estudo tem como função fornecer maiores informações, para auxiliar a modelar vias e doses de administração e precauções a serem tomadas durante a administração.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho permitem concluir que os produtos naturais iangambina e epi-iangambina não apresentaram um comportamento de metabolização reprodutível a ponto de ser possível fazer a cinética desses compostos como substratos das enzimas do CYP450 presentes nos microsomas hepático de humanos. Com isso, estudos de fenotipagem também não foram possíveis. Isso indica que possivelmente esses substratos não serão metabolizados pelo CYP450 de humanos.

Porém, os estudos de inibição foram realizados com êxito, permitindo concluir que as isoformas CYP1A2 e 2E1 apresentaram um aumento de sua atividade quando incubadas na presença de iangambina e epi-iangambina. A epi-iangambina apresentou resultados de IC_{50} que sugerem que esse epímero é um inibidor mais forte das isoformas do CYP450, se comparado com seu isômero iangambina. Esse resultado mostra a importância de realizar estudos com os isômeros de compostos candidatos a fármacos separadamente, pois os resultados podem ser diferentes a ponto de influenciar numa futura formulação.

O complexo de rutênio THIQ-Ru apresentou resultados que sugerem que esse composto é um forte inibidor de todas as isoformas do CYP450 estudadas. No entanto, o perfil cinético do THIQ-Ru como substrato das enzimas do CYP450 indicou uma cooperatividade positiva homotrópica, na qual a presença do substrato remodela a conformação da enzima, aumentando a velocidade de metabolização do próprio substrato. Além disso, estudos de fenotipagem indicam que a isoforma CYP3A4/5 é majoritariamente responsável pela metabolização do THIQ-Ru, resultado que vai ao encontro do perfil cinético sigmoidal apresentado pelo THIQ-Ru, considerando que os principais substratos da CYP3A4 também apresentam perfil cinético sigmoidal.

6 REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para validação de métodos bioanalíticos**. RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: 20 dez. 2017.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatographic B**, v. 774, p. 215-222, 2002.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, p. 1-10, 2014.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Tirupati, v. 160, p. 1699-1722, 2010.

BACHMANN, K. A.; RING, B. J.; WRIGHTON, S. A. Drug-Drug Interactions and the Cytochromes P450. In: LEE, J. S.; OBACH, R. S.; FISHER, M. B. **Drug Metabolizing Enzymes- Cytochrome P450 and Other Enzymes in Drug Discovery and Development**. New York: CRC Press, 2003. Cap. 9, p. 311- 336.

BARBOSA FILHO, J. M. et al. Ocotea duckei: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 231-238, 1999.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

CACITA, N. et al. Investigation of a novel trinuclear l-oxo ruthenium complex as a potential nitric oxide releaser for biological purposes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 429, p. 114-121, 2015.

CONSTANTINO, M. G. **Química Orgânica: Curso básico universitário**. Volume 2. São Paulo:LTC. 1 ed. 592 p. 2008.

CHRISTIANSEN, A. et al. Effects of non-ionic surfactants on cytochrome P450-mediated metabolism in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Berlin, v. 78, p. 166- 172, 2011.

COPELAND, R. A. **Enzymes- A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis**. 2ª. ed. New York: Wiley- VCH, 2000.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

COURA, J. R., BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 286-296, 2012.

COURA, J. R., DE CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104(Suppl. I), p. 31-40, 2009.

DECHANONT, S. et al. Hospital admissions /visits associated with drug–drug interactions:a systematic review and meta-analysis. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, Phitsanulok, v. 23, p. 489- 497, 2014.

DIAS, L. C., et al. Neglected tropical diseases: a new era of challenges and opportunities. **Química Nova**, v. 36, p. 1552-1556, 2013.

EAGLING, V. A.; TIJA, J. F.; BACK, D. J. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probesubstrates in human and rat liver microsomes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Liverpool, v. 45, p. 107- 114, 1998.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on bioanalytical method validation, 21 de julho de 2011.** Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2017.

FOTI, R. S. et al. Selection of alternative CYP3A4 probe substrates for clinical drug interaction studies using in vitro data and in vivo simulation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, p.981-987, 2010.

GELSTON, E. A., et al. Methadone inhibits CYP2D6 and UGT2B7/2B4 in vivo: a study using codeine in methadone- and buprenorphine-maintained subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, p. 786-794, 2011.

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

GUIDO, R. V. C., ANDRICOPULO, A. D., OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81-98, 2010.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part I: Isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.66, p. 475–482, 2007.

HABENSCHUS, M. D.; MOREIRA, F. L.; LOPES, N. P.; DE OLIVEIRA, A. R. M. In Vitro Inhibition of Human CYP450s 1A2, 2C9, 3a4/5, 2D6 and 2E1 by Grandisin. **Planta Medica**, v. 83, n. 8, p. 727 – 736, 2017.

JESUS-MORAIS, C. M. Q. et al. Yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*, differentiates putative PAF receptor subtypes in the gastrointestinal tract of rats. **Planta Medica**, v. 66, p. 211-216, 2000.

JOHNSTON, K. L.; FORD, L.; TAYLOR, M. J. Overcoming the Challenges of Drug Discovery for Neglected Tropical Diseases: The A.WOL Experience. **Journal of Biomolecular Screening**, 2014, v.19, p. 335–343, 2014.

LAINE, R. Metabolic Stability: Main Enzymes Involved and Best Tools To Assess It. **Current Drug Metabolism**, v.9, p.921-927, 2008.

LI, A. P. In Vitro Evaluation of Metabolic Drug–Drug Interactions: Concepts and Practice. In: LI, A. P. **Drug- Drug Interactions in Pharmaceutical Development**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008. Cap. 1, p. 1- 26.

MARANGONI, A.G. **Enzyme Kinetics- A modern Approach**. 1ª edição. New Jersey: John Wiley and Sons Inc., p. 48-90, 2003.

MARQUES, R. C. P. et al. Evaluation of the mutagenic potential of yangabin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research**, v. 536, p. 117-20, 2003.

MESQUITA, L. M. et al. Lignans from *Rollinia* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.16, p.379 - 380, 1988.

MONTE NETO, R. L. et al. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) show antileishmanial activity. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C*. **Journal of Biosciences**, v. 62, p. 348-352, 2007.

MONTE NETO, R. L. et al. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1-10, 2011.

MORAIS, L. C. S. L. et al. Further lignans from *Ocotea duckei*. **Pharmaceutical Biology**, v.37, p.144 - 147,1999.

NASSAR, A. F.; HOLLENBERG, P. F.; SCATINA, J. (Eds.). **Drug Metabolism Handbook- Concepts and Applications**. [S.l.]: Wiley, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3ª edição. USA. W. H Freeman and Company, 2002.

NIWA, T. et al., Comparison of kinetic parameters for drug oxidation rates and substrate inhibition potential mediated by cytochrome P450 3A4 and 3A5. **Current Drug Metabolism**, v. 9, p. 20-33, 2008.

OGILVIE, B. W. et al. In vitro Approaches for Studying the Inhibition of Drug- Metabolizing Enzymes and Identifying the Drug- Metabolizing Enzymes Responsible for the Metabolism of Drugs (Reaction Phenotyping) with Emphasis on Cytochrome P450. In: RODRIGUES, A. D. **Drug- Drug Interactions**. 2ª. ed. [S.l.]: Informa Healthcare, 2008.

PINAZO, M. J. et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterologia y Hepatologia**, v. 33, p. 191-200, 2009.

POSSATO, B.; DEFLON, V. M.; NAAL, Z.; FORMIGA, A. L. B.; NIKOLAOU, S. An extended π -system and enhanced electronic delocalization on symmetric $[\text{Ru}_3\text{O}(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{L})_3]_n$ complexes combined with azanaphthalene ligands. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 7926-7938, 2017.

RAMBLA-ALEGRE, M.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARLA-BROCH, S. Is it necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatographic A**, v. 1232, p. 101-109, 2012.

RESEARCH NETWORK NATURAL PRODUCTS AGAINST NEGLECTED DISEASES. **Neglected tropical diseases - The diseases of the poor**. 2015. Disponível em [<http://resnetnpnd.org/Facts-about-NTDs/>]. Acesso em 15 jan. 2015.

ROBERTS, A. G. et al., The structural basis for homotropic and heterotropic cooperativity of midazolam metabolism by human cytochrome P450 3A4. **Biochemistry**, v. 50, p. 10804-10818, 2011.

SANTIAGO, L. M. A metabolização no sistema do citocromo P450 e a sua importância em Clínica Geral. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 19, p. 121-129, 2003.

SAKAEDA, T. et al. Effect of micafungin on cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1 activities, and its comparison with azole antifungal drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Chuo-ku, v. 57, p. 759- 764, 2005.

SPPAGIARI, D. et al. A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: An overview of current methodologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Geneva, v. 101, p. 221- 237, 2014.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. USA: Wiley, p. 960, 2009.

STEPAN, A. F. et al. Metabolism-guided drug design. **Medical Chemical Communications**, v. 4, p. 631- 652, 2013.

TESTINO, S. A.; PATONAY, G. High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Marietta, v. 30, n. 5, p. 1459- 1467, 2003.

TIBIRIÇÁ, E. Cardiovascular Properties of yangambin, a Lignan Isolated from Brazilian Plants. **Cardiovascular Drug Reviews**, v.19, p.313 - 327, 2001.

TOMA, H. E.; ALEXIOU, A. D. P.; DOVIDAUSKAS, S. Extended Electronic Interactions in a Triangular μ -Oxotriruthenium Acetate Cluster Containing Nitric Oxide. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 3010-3017, 2002.

VALVERDE, R. **Doença de Chagas: Fiocruz na vanguarda do estudo da enfermidade.** Disponível em [<https://agencia.fiocruz.br/doenca-de-chagas-fiocruz-na-vanguarda-do-estudo-da-enfermidade>]. 2015. Acesso em 20 jul. 2019.

VALVERDE, R. **Doenças Negligenciadas.** Disponível em [<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>]. 2015. Acesso em 20 jul. 2019.
VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Human drug metabolism and cytochromes P450: Application and relevance of in vitro models. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 41, p. 1149-1179, 2001.

VILELA, M., MENDONÇA, S. **Leishmaniose.** Disponível em [<https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>]. 2013. Acesso em 20 jul. 2019.
WARD, R. S. Recent advances in the chemistry of lignans. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 24, p. 739-798, 2000.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry.** London: Academic Press. 2003.
WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVEA, T. G.. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência e saúde coletiva**, v.16, n.1, p.39-62, 2011.

WILLIAM, P. A., et al. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. **Nature**, v. 24, p. 464-468, 2003.

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

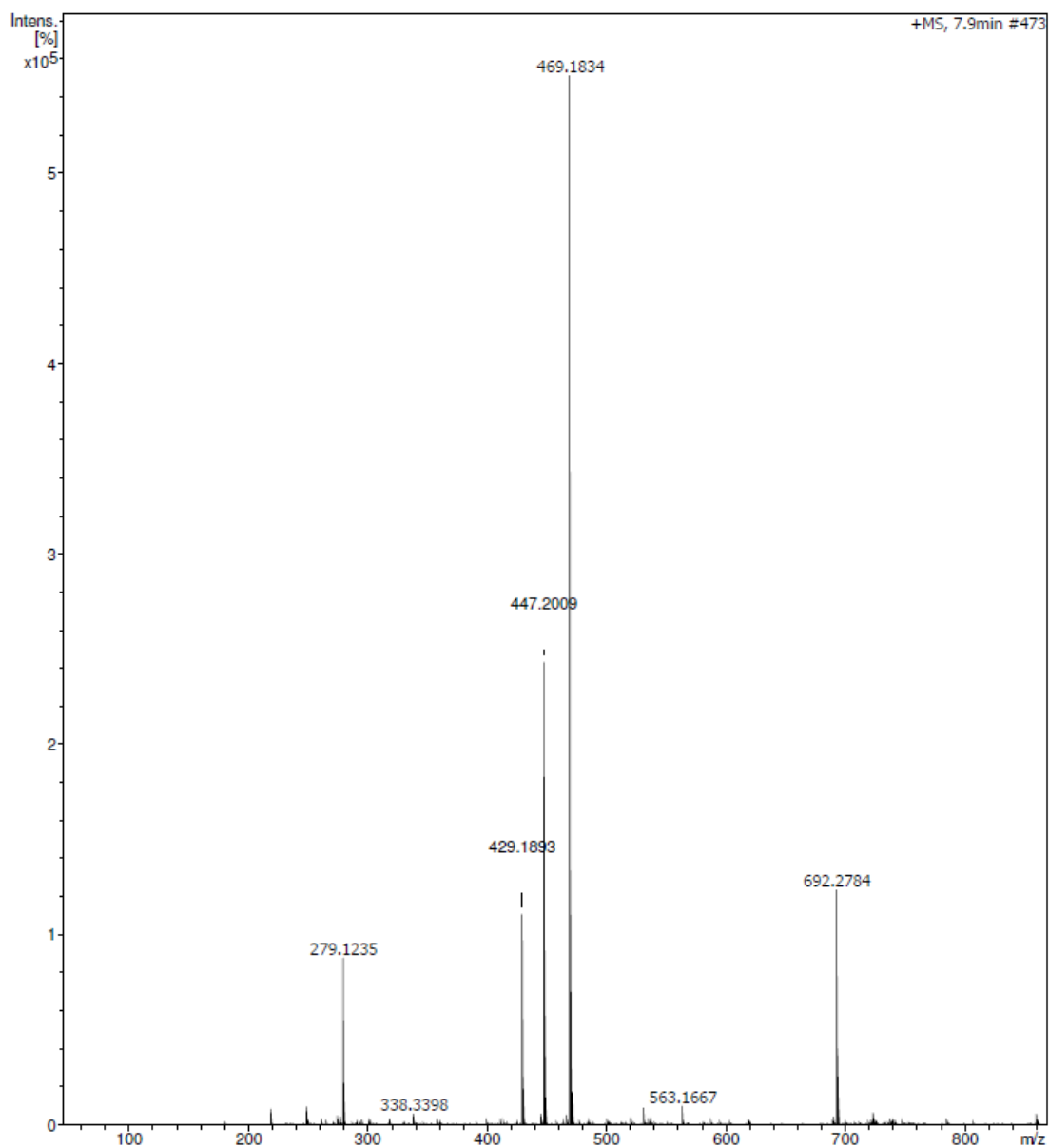
ZHANG, H. et al. Potent Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P450 2B4 by - Ethynylphenanthrene: Implications for Allosteric Modulation of Cytochrome P450 Catalysis. **Biochemistry- including biophysical chemistry & molecular biology**, Chicago, v. 52, p. 355-364, 2012.

7 ANEXOS

7.1 Espectros de massa da iangambina e epi-iangambina

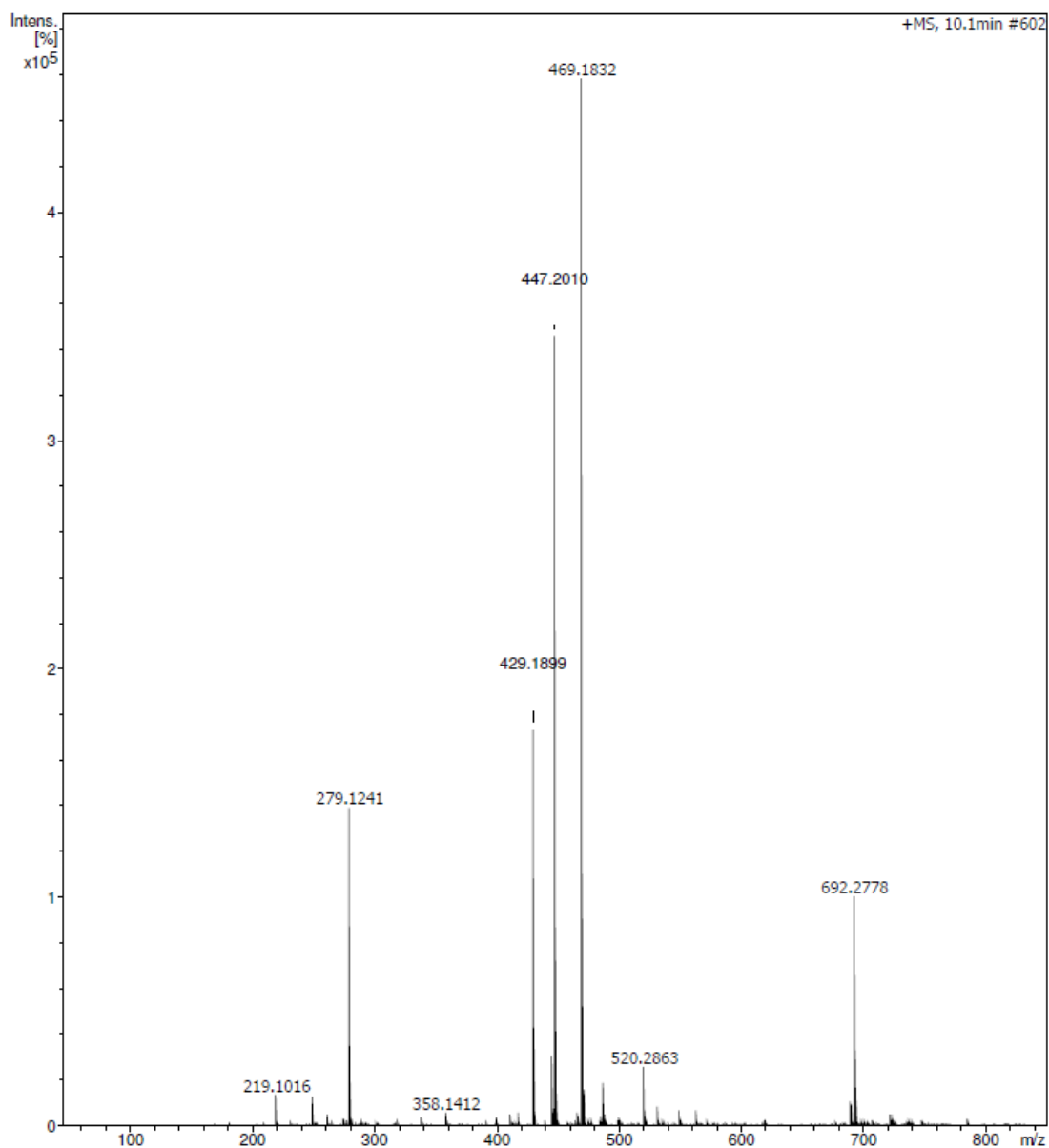
7.1.1 Espectro de massas da iangambina

Espectro de massa alta resolução da iangambina no modo positivo de ionização. Espectrômetro de massa micrOTOF II-ESI-Q-TOF, voltagem do capilar e do end plate 3500 V e -500 V, respectivamente.



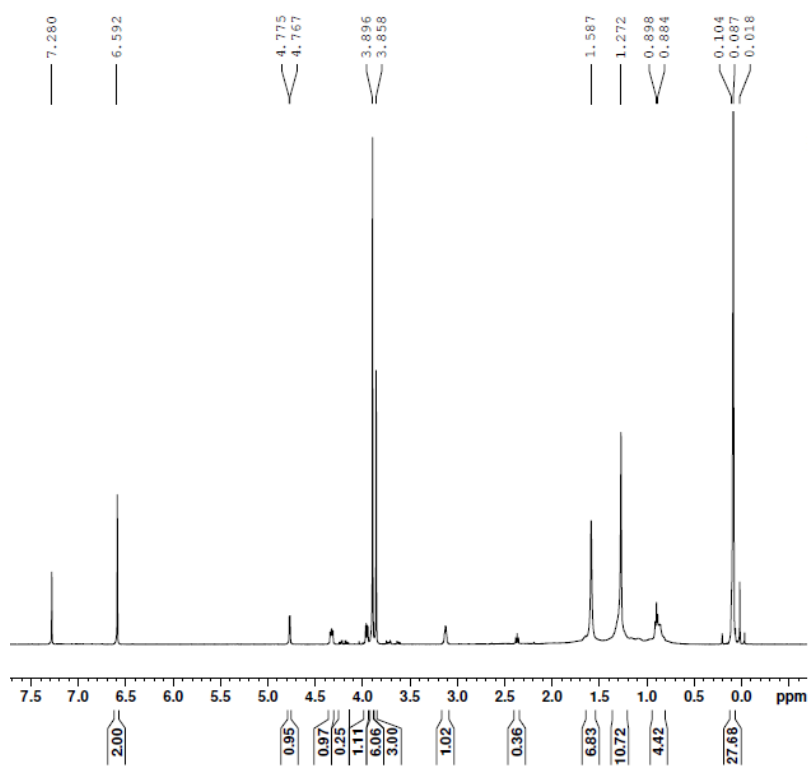
7.1.2 Espectro de massas da epi-iangambina

Espectro de massa alta resolução da epi-iangambina no modo positivo de ionização. Espectrômetro de massa micrOTOF II-ESI-Q-TOF, voltagem do capilar e do end plate 3500 V e -500 V, respectivamente.

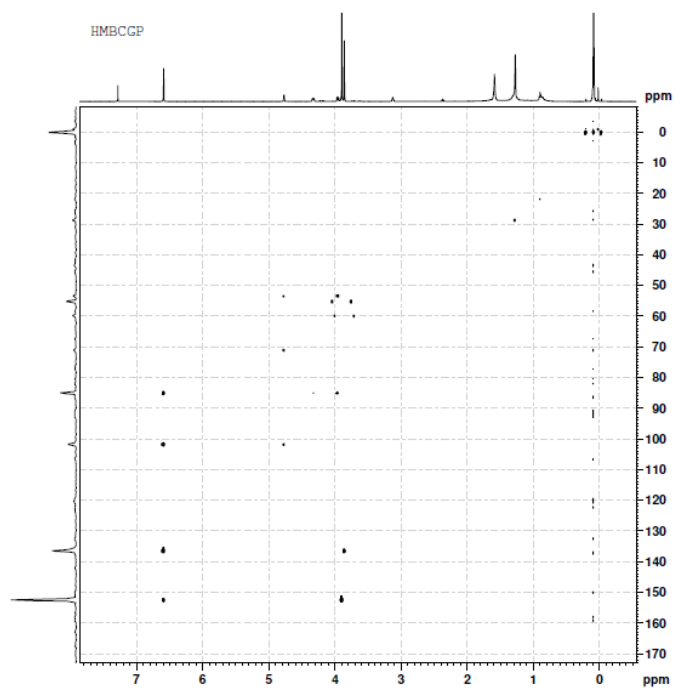


7.2 Espectros de RMN da iangambina e epi-iangambina

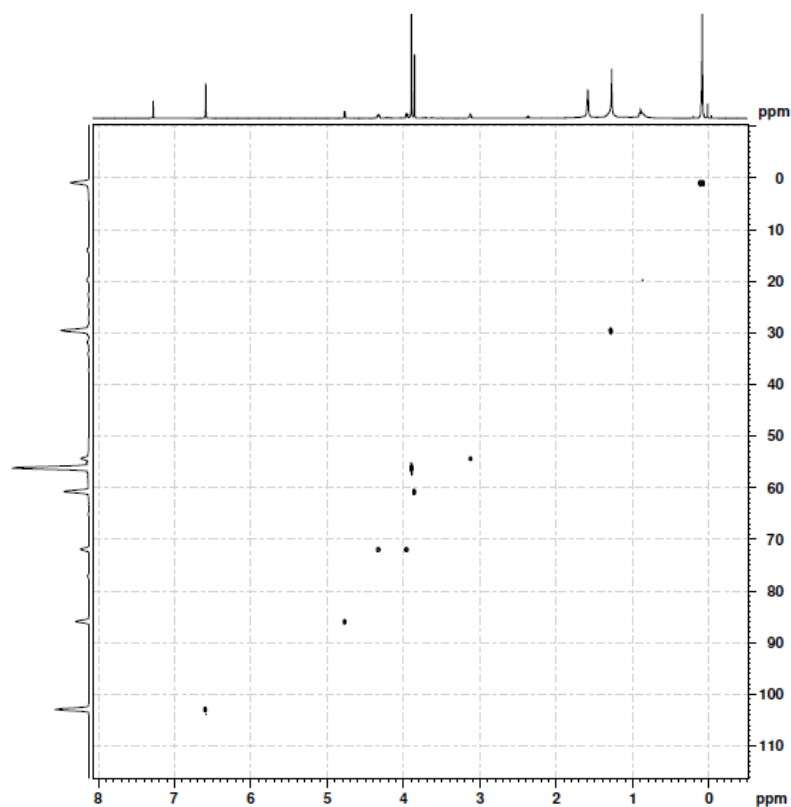
7.2.1 Espectro de ^1H -RMN da iangambina (CDCl_3 , 500 MHz)



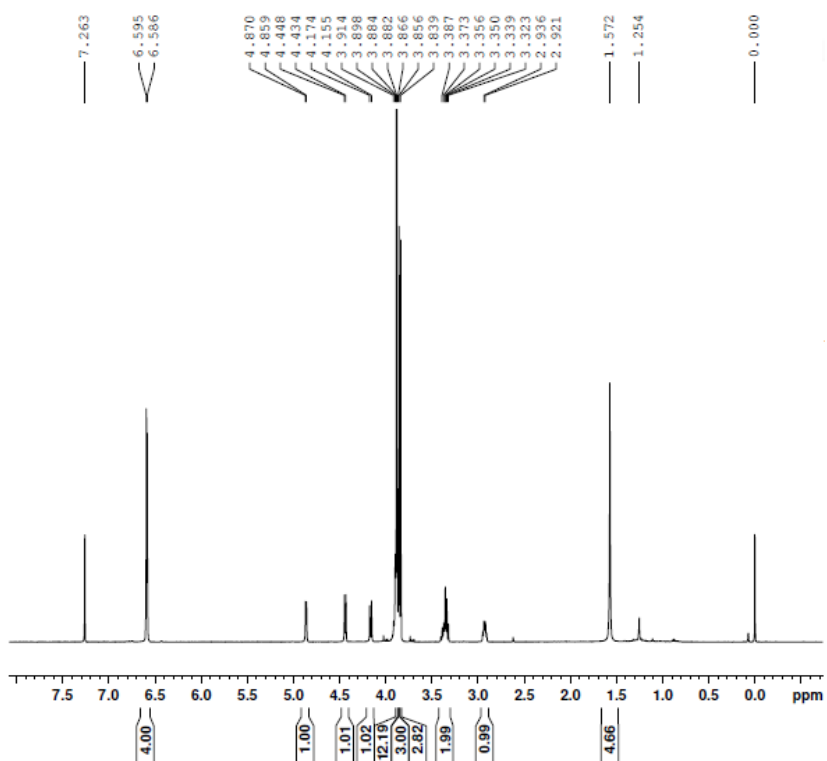
7.2.2 Espectro de HMBC da iangambina (CDCl_3 , 500 MHz)



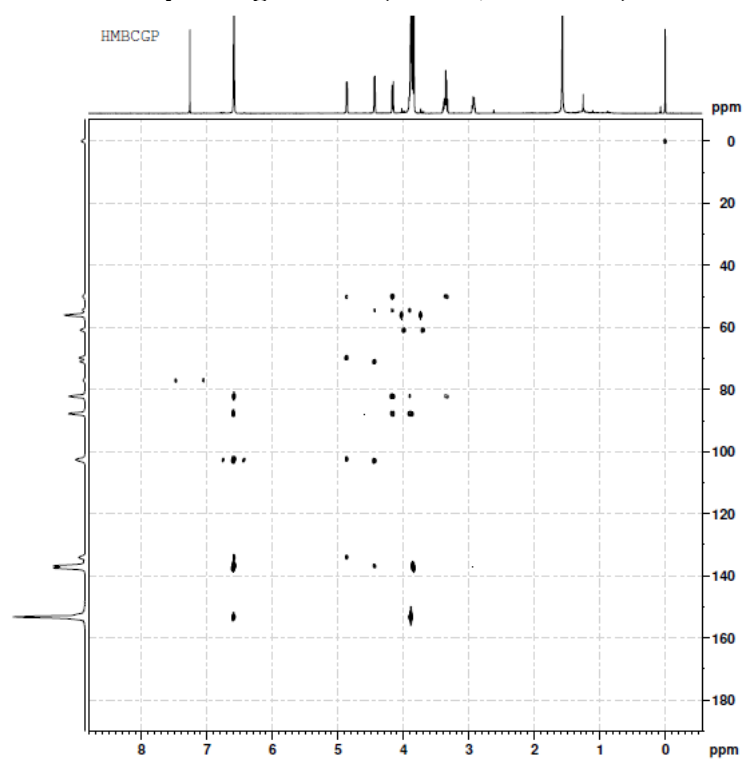
7.2.3 Espectro de HMQC da iangambina (CDCl₃, 500 MHz)



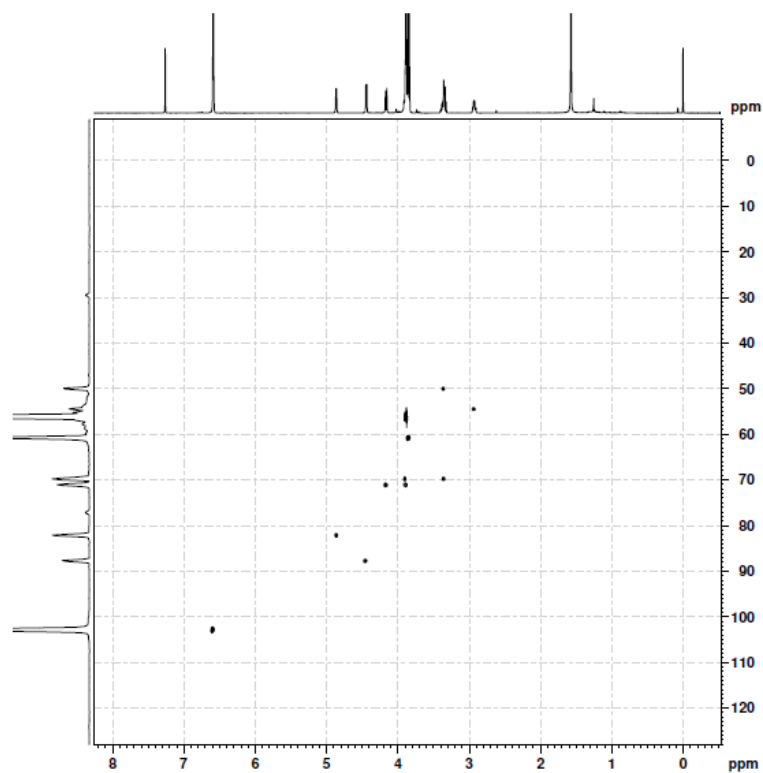
7.2.4 Espectro de ¹H-RMN da epi-iangambina (CDCl₃, 500 MHz)



7.2.5 Espectro de HMBC da epi- iangambina (CDCl₃, 500 MHz)



7.2.6 Espectro de HMQC da epi-iangambina (CDCl₃, 500 MHz)



Quadro 1 – Dados de RMN ^1H da iangambina e epi-iangambina em CDCl_3 , comparando-os com os dados achados na literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999)

Iangambina			Epi-iangambina	
	δ_{H}	Literatura	δ_{H}	Literatura
1	3,04 (m)	3,11 (m)	2,93 (q)	2,89 (q)
2	4,68 (d)	4,76 (d)	4,44 (d)	4,40 (d)
4ax	3,87 (dd)	3,80-3,96 (m)	3,36 (m)	3,27-3,40 (m)
4eq	4,24 (dd)	4,30-4,40 (m)	3,90 (m)	3,87-3,90 (m)
5	3,04 (m)	3,11 (m)	3,36 (q)	3,27-3,40 (m)
6	4,68 (d)	4,76 (d)	4,86 (d)	4,81 (d)
8ax	3,87 (dd)	3,80-3,96 (m)	3,90 (m)	3,87-3,90 (m)
8eq	4,24 (dd)	4,30-4,40 (m)	4,16 (m)	4,27 (d)
2'	6,51 (s)	6,59 (s)	6,59 (s)	6,57 (s)
2''	6,51 (s)	6,59 (s)	6,59 (s)	6,57 (s)
6'	6,51 (s)	6,59 (s)	6,59 (s)	6,57 (s)
6''	6,51 (s)	6,59 (s)	6,59 (s)	6,57 (s)
OCH₃ (4')	3,77 (s)	3,86 (s)	3,84 (s)	3,81 (s)
OCH₃ (4'')	3,77 (s)	3,86 (s)	3,86 (s)	3,83 (s)
OCH₃ (3')	3,81 (s)	3,88 (s)	3,88 (s)	3,85 (s)
OCH₃ (3'')	3,81 (s)	3,88 (s)	3,88 (s)	3,85 (s)
OCH₃ (5')	3,81 (s)	3,88 (s)	3,88 (s)	3,85 (s)
OCH₃ (5'')	3,81 (s)	3,88 (s)	3,88 (s)	3,85 (s)

*Siglas: s= singletto; d= dubleto; dd= duplo dubleto; m= multipleto; ax= axial; eq= equatorial.

Quadro 2 – Dados de RMN ^{13}C da iangambina e epi-iangambina em CDCl_3 , comparando-os com os dados achados na literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1999)

Iangambina			Epi-iangambina	
	δ_c	Literatura	δ_c	Literatura
1	53,4	54,6	54,4	54,5
2	85,0	86,2	87,7	87,8
4	71,0	72,2	69,7	71,1
5	53,4	54,6	49,9	50,0
6	85,0	86,2	82,1	82,2
8	71,0	72,2	71,1	69,8
1'	136,48	136,9	136,9	136,9
1''	136,48	136,9	134,0	134,1
2'	102,0	103,2	102,9	103,0
2''	102,0	103,2	102,9	102,6
3'	152,4	153,7	153,4	153,4
3''	152,4	153,7	153,3	153,2
4'	136,45	137,8	137,6	137,6
4''	136,45	137,8	136,8	137,0
5'	152,4	153,7	153,4	153,4
5''	152,4	153,7	153,3	153,2
6'	103,3	103,2	104,1	103,0
6''	103,3	103,2	104,1	102,6
OCH₃ (4')	59,8	61,0	60,7	60,8
OCH₃ (4'')	59,8	61,0	60,7	60,8
OCH₃ (3', 5')	55,2	56,0	56,1	56,2
OCH₃ (3'', 5'')	55,2	56,0	56,1	56,2

*Siglas: s= singleto; d= dubleto; dd= duplo dubleto; m= multipleto; ax= axial; eq= equatorial.