

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Gabriela Amaral Buqui

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientada: Gabriela Amaral Buqui

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

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

Ribeirão Preto

2017

RESUMO

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

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

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

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Visão geral da proposta

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

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

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

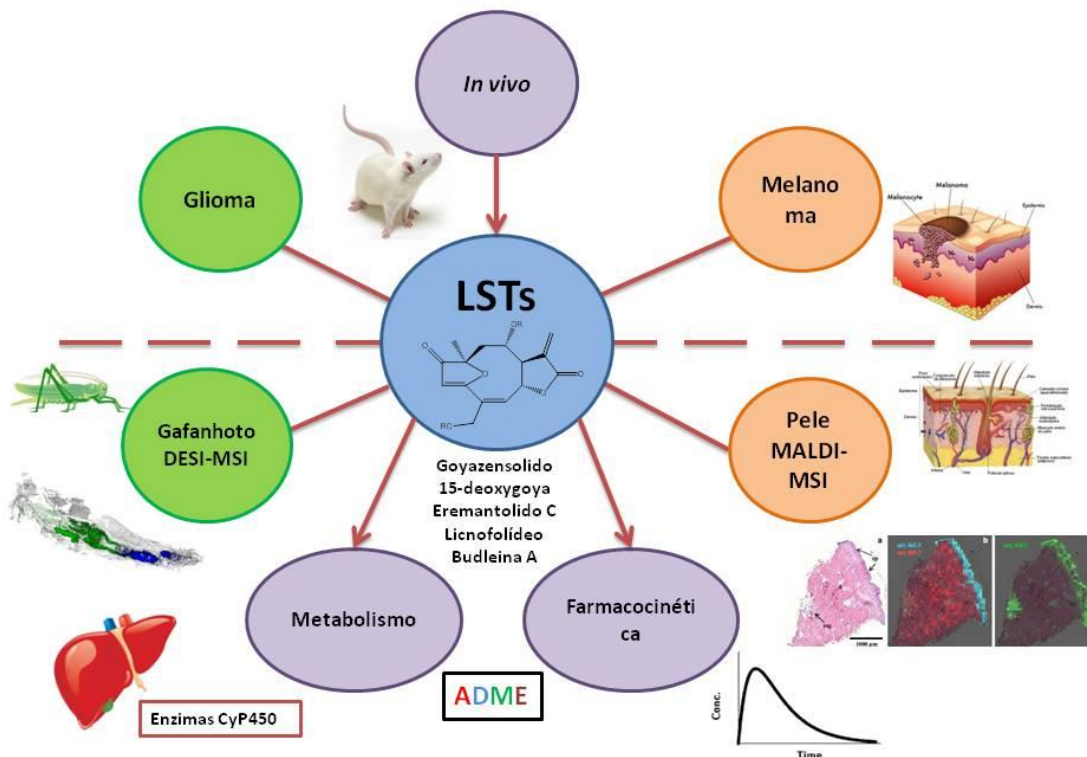


Figura 1. Estudos de farmacocinética e atividade antitumoral aplicando a espectrometria de massas como principal ferramenta nos ensaios pré-clínicos.

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

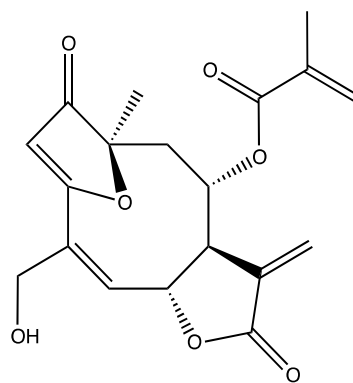


Figura 2. Estrutura química da lactona sesquiterpênica goyazensolido.

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

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

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

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

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

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

1.2 Lactonas sesquiterpênicas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Modelos de estudo de distribuição

1.3.1 Ensaio de distribuição cutânea

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2 Ensaio de distribuição em sistema nervoso central

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Espectrometria de massas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

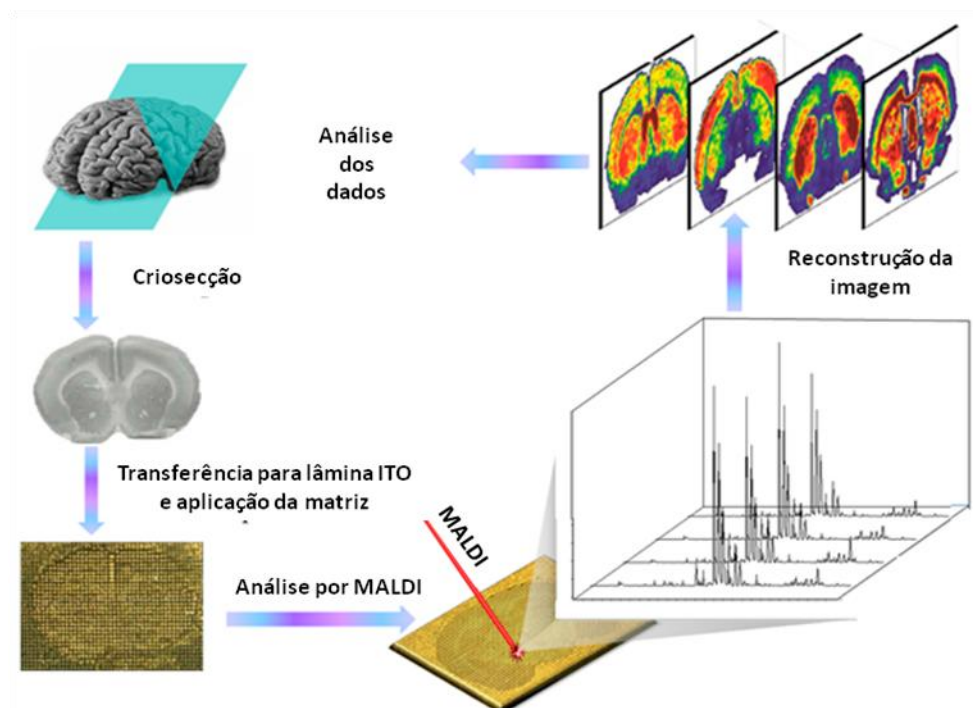


Figura 3. Representação esquemática do fluxo de trabalho de uma análise por MALDI-MSI. Adaptado de Li et al., 2014.

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

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

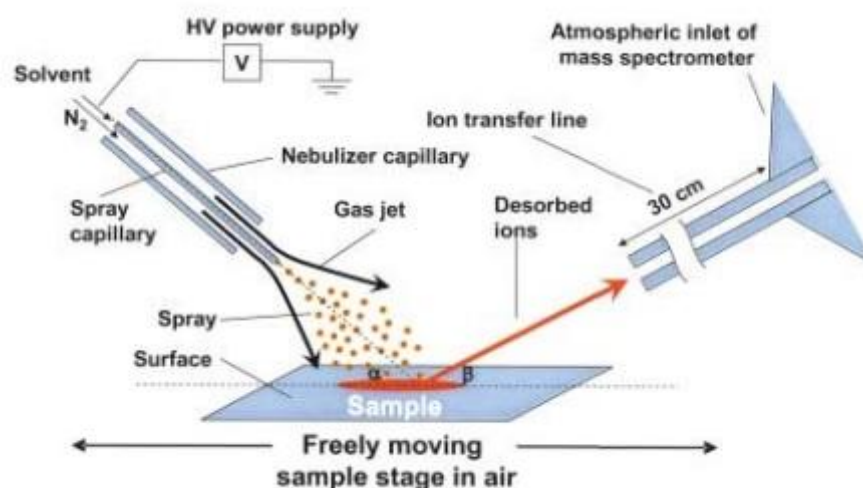


Figura 4. Representação esquemática de um experimento com DESI (TAKATS et al., 2004).

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHIARI, E.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; GRANDI, T. S. M.; STEHMANN, J. R.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytoterapy Research**, v.10, p. 636-638, 1996.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SHARIATGORJI, M.; STRITTMATTERS, N.; NILSSON, A.; KÄLLBACK, P.; ALVARSSON, A.; ZHANG, X.; VALLIANATOU, T.; SVENNINGSSON, P.; GOODWIN, R.J.A.; ANDREN, P.E. Simultaneous imaging of multiple neurotransmitters and neuroactive substances in the brain by desorption

electrospray ionization mass spectrometry. **NeuroImage**, v. 136, p. 129-138, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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