

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA**

EDNA MÁRCIA ALMEIDA COSTA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO *IN VITRO* DO CNFD (6B, 7-DI-HIDRO-5H-
CICLOPENTA [B] NAFTO [2,1-D] FURANO-5,6 (9AH) –DIONA)**

**MANAUS
2022**

EDNA MÁRCIA ALMEIDA COSTA

AVALIAÇÃO DO METABOLISMO *IN VITRO* DO CNFD (6B, 7-DI-HIDRO-5H-CICLOPENTA [B] NAFTO [2,1-D] FURANO-5,6 (9AH) –DIONA)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito obrigatório para obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica.

**ORIENTADOR: PROF. DRA. MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS
COORIENTADOR: PROF. DR. IGOR RAFAEL DOS SANTOS MAGALHÃES**

**MANAUS
2022**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837a Costa, Edna Márcia Almeida
Avaliação do metabolismo in vitro do CNFD (6b, 7-dihidro-5Hciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) – diona) / Edna Márcia Almeida Costa . 2022
82 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos
Coorientador: Igor Rafael dos Santos Magalhães
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Naftoquinona. 2. Cinética enzimática. 3. Esterases plasmáticas. 4. Microssomas hepáticos. 5. Antineoplásico. I. Vasconcellos, Marne Carvalho de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

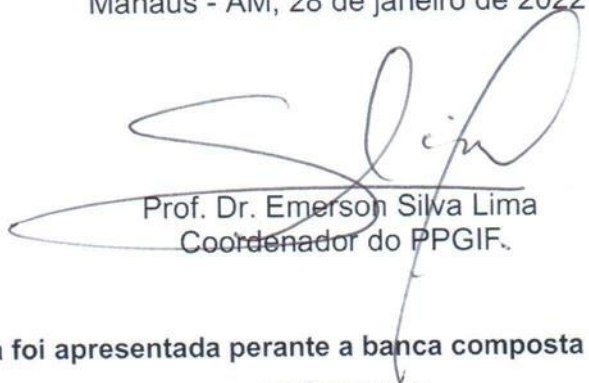
“Avaliação do metabolismo *in vitro* do CNFD (6b, 7-dihidro-5h-ciclopenta [b]
nafto [2,1-d] furano-5,6 (9ah) –diona)”

DISCENTE: EDNA MÁRCIA ALMEIDA COSTA

PARECER:


Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 28 de janeiro de 2022




Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGIF.


A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:



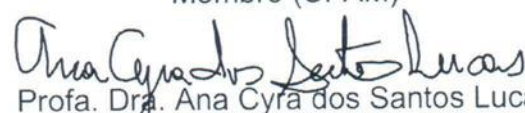
Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães
Coorientador e presidente da banca




Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira
Membro (USP/RP)



Profa. Dra. Rita de Cassia Saraiva Nunomura
Membro (UFAM)



Profa. Dra. Ana Cyra dos Santos Lucas
Membro (UFAM)



Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa
Membro (UFAM)

Dedico este trabalho a Deus e
aos grandes amores da minha vida:
meus pais Olinda e José, meu esposo Fabrício e
meus filhos (*in memoriam*) Inácio, Flor e Liz.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu maior mestre, pelo dom da vida, pelas bênçãos diárias e pela força que sempre me acompanha e guia meus passos;

Ao **Fabrizio Rolim**, meu marido, pelo amor, dedicação, carinho e incentivo. Por compartilhar a vida bela e simples como ela é comigo. Por ser o meu amparo e o meu abrigo em todos os momentos;

Aos **meus pais Olinda Almeida e José Francisco**, pelo amor, auxílio, compreensão, incentivo, apoio e exemplos de perseverança, força e caráter;

Meus sinceros agradecimentos aos meus **orientadores Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos e Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães** por compartilhar seus conhecimentos, pela dedicação, competência, confiança, apoio, respeito e amizade empregada ao longo deste trabalho. Gratidão também por acreditarem em mim;

Aos **familiares** que se fizeram presentes, que me apoiaram e que acreditaram nesta conquista, em especial, **meus irmãos Edson Almeida e Márcio Almeida**, meus sobrinhos **Davi Almeida, Isadora Almeida e Isabel Almeida**, meus cunhados **Chyntia Lima, Marília Beckman, Fábio Rolim e Sâmila Rolim**, e minha sogra **Maria Rita Rolim**;

Aos **colegas do Núcleo de Estudos em Farmacocinética (NePK)**, especialmente a **Cybele de Souza**, e do **Laboratório de Atividade Biológica (Biophar)** pela amizade e pelos momentos de descontração e auxílio na realização de alguns ensaios;

À amiga **Tallita Machado** pelo auxílio em experimentos, por compartilhar conhecimento e amizade;

Ao professor **Dr. Emerson Silva Lima** e professora **Dra. Fernanda Guilhon** por gentilmente cederem seus laboratórios para realização de alguns ensaios;

Ao professor **Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira** pela oportunidade de estágio no Laboratório de Metabolismo *in vitro* e Técnicas de Separação (LABMETS) da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto;

Aos **amigos do LABMETS, Daniel Carrão** pela disponibilidade e auxílio nos experimentos com microssomas; e aos colegas **Ícaro Salgado, Jade Bucci, Maíke Santos e Carolina Oliveira** pela ajuda e apoio;

À **Universidade Federal do Amazonas**, à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** e ao **Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica** pela oportunidade e suporte para realização do trabalho;

Às **agências de fomento**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Edital MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 - Faixa A), pelo suporte financeiro;

Aos **meus formadores, Camila Lima, João Costa e Geórgia Gama**, e aos **irmãos de célula da Comunidade Católica Shalom** por tantas vezes acolherem as minhas dores e vibrarem com as minhas conquistas e por, acima de tudo, rezarem e intercederem por mim;

Aos **meus amigos, Maria José, Liviane Pinheiro, Léia Regina e Jackeline Marinho**, que sempre se fizeram presentes com lembranças e palavras de encorajamento;

Aos chefes que estiveram comigo durante esses anos, **Vanessa Xavier, Rafael Gomes e Vanessa Homobono**, pelo apoio e incentivo todas as vezes que precisei me ausentar do trabalho para me dedicar aos experimentos;

Aos **meus colegas de trabalho** da Policlínica Governador Gilberto Mestrinho e atualmente da Central de Medicamentos do Amazonas por toda torcida durante esses anos;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, quanta gratidão em meu coração! Muito obrigada.

*“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,
nem jamais penetrou em coração humano o que Deus
tem preparado para aqueles que o amam.” (1 Cor 2, 9)*

RESUMO

Em virtude do impacto do câncer nos sistemas de saúde e dos efeitos adversos causados pelos medicamentos antineoplásicos, diversas estratégias têm sido investigadas na busca de novos protótipos de fármacos, em especial os de origem de plantas, a qual têm gerado substâncias com grande potencial terapêutico. Nesse contexto, destaca-se a lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) e seus derivados, que são naftoquinonas com atividade antitumoral, antifúngica, antimalárica, antiviral e antibacteriana. O CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona) é um desses derivados, que apresentou potente atividade antineoplásica em células tumorais *in vitro* e *in vivo*, sendo um promissor candidato a novo fármaco. Desta forma, considerando que o mesmo é um composto farmacologicamente ativo, esforços devem ser direcionados para investigação da etapa de metabolismo ainda nas etapas iniciais de desenvolvimento dessa nova entidade química. Para esta pesquisa, primeiramente, um método bioanalítico com emprego de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por absorção ultravioleta (HPLC-UV) foi desenvolvido para quantificação do composto no plasma e em microssomas hepáticos humanos. Além disso, foram apresentados os dados de cinética enzimática, os parâmetros farmacocinéticos previstos *in vivo* e o estudo de fenotipagem. Os principais sítios de metabolismo e metabólitos foram sugeridos *in silico*. O método de HPLC desenvolvido com a matriz microssomal foi linear, reprodutível, seletivo, preciso e estável. Os parâmetros cinéticos enzimáticos revelaram um perfil sigmoidal. A depuração metabólica hepática foi de $10,39 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ de proteína e a taxa de extração hepática foi de 51%. A depuração *in vivo* associada a uma razão de extração hepática indica que o metabolismo hepático é a principal via de eliminação. Apesar de todas as enzimas do citocromo P450 avaliadas metabolizarem CNFD, as isoformas CYP2C9 e CYP3A4 apresentaram maior capacidade metabólica. O metabolismo do CNFD foi descrito pela primeira vez e servirá como ponto de partida para continuidade de estudos de inibição enzimática e de farmacocinética *in vivo*.

Palavras-chave: naftoquinona, cinética enzimática, esterases plasmáticas, microssomas hepáticos, antineoplásico

ABSTRACT

Due to the impact of cancer on health systems and the adverse effects caused by antineoplastic drugs, several strategies have been investigated in the search for new drug prototypes, especially those originating from plants, which have generated substances with great therapeutic potential. In this context, lausone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) and its derivatives, which are naphthoquinones with antitumor, antifungal, antimalarial, antiviral and antibacterial activity, stand out. CNFD (6b, 7-dihydro-5H-cyclopenta[b]naphtho[2,1-d]furan-5,6(9aH)-dione) is one of these derivatives, which showed potent antineoplastic activity in tumor cells *in vitro* and *in vivo*, being a promising candidate for a new drug. Thus, considering that it is a pharmacologically active compound, efforts should be directed towards investigating the metabolism stage in the early stages of development of this new chemical entity. For this research, firstly, a bioanalytical method using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet absorption detector (HPLC-UV) was developed to quantify the compound in plasma and in human liver microsomes. In addition, data on enzyme kinetics, predicted *in vivo* pharmacokinetic parameters and the phenotyping study were presented. The main sites of metabolism and metabolites were suggested *in silico*. The HPLC method developed with the microsomal matrix was linear, reproducible, selective, accurate and stable. The enzyme kinetic parameters revealed a sigmoidal profile. The hepatic metabolic clearance was $10.39 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ of protein and the hepatic extraction rate was 51%. *In vivo* clearance associated with a hepatic extraction ratio indicates that hepatic metabolism is the major route of elimination. Although all the cytochrome P450 enzymes evaluated metabolized CNFD, CYP2C9 and CYP3A4 isoforms showed greater metabolic capacity. The metabolism of CNFD was described for the first time and will serve as a starting point for further studies of enzyme inhibition and *in vivo* pharmacokinetics.

Keywords: naphthoquinone, enzyme kinetics, plasma esterases, liver microsomes, antineoplastic

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Classificação das quinonas quanto ao sistema aromático.....	233
Figura 2 - Estrutura química do CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) – diona)	244
Figura 3 - Processo de desenvolvimento de um novo fármaco.....	255

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Espectro de absorção ultravioleta de CNFD (10µg mL ⁻¹ em metanol). Comprimento de onda máximo: 260nm.....	46
Figura 2 - Cromatograma da análise do CNFD. Condições cromatográficas (HPLC-DAD): coluna analítica Zorbax Agilent C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm, fase móvel metanol: água (55:45, v/v), taxa de fluxo de 0,8 mL min ⁻¹ , o volume de injeção foi de 10 µL e a temperatura foi de 25 °C. A detecção foi realizada a 260 (A) para CNFD.....	47
Figura 3 - Avaliação da estabilidade do CNFD (12,5 µg mL ⁻¹) nas condições de temperatura de incubação a 37°C por 30 minutos, na presença de luz artificial a 25°C por 6 horas (A) e no fluxo de ar comprimido (B).....	47
Figura 4 - Avaliação da solubilidade do CNFD (12,5 µg/mL) em solução tampão Tris-HCl (pH 7,4; 50mM), solução tampão Tris-HCl (pH 7,4; 50mM) + 0,1% (m/v) Cremophor® e solução tampão Tris-HCl (pH 7,4; 50mM) + 0,2% (m/v) Cremophor®.....	48
Figura 5 - Avaliação do solvente extrator na ELL do CNFD em plasma.....	49
Figura 6 - Seletividade da metodologia analítica para o CNFD em plasma (A) CNFD (0,5µg mL ⁻¹), (B) Branco.....	53
Figura 7 - Efeito residual da metodologia analítica do CNFD em plasma (A) Branco anterior à amostra, (B e C) Branco posterior à amostra, (D) CNFD (100µg mL ⁻¹)	53
Figura 8 - Estudo prévio do metabolismo do CNFD (10µg mL ⁻¹) em plasma humano nos tempos de 30, 60 e 90 minutos.....	54

CAPÍTULO 3

Figura 1: Estrutura química do CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) - diona).....	60
Figura 2: Cromatograma da análise do CNFD. Condições cromatográficas (HPLC-DAD): coluna de guarda Ascentis Express C18 (3,0 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e uma coluna analítica Ascentis Express Fused Core C18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm), fase móvel metanol: água (55:45, v/v), taxa de fluxo de 0,8 mL min ⁻¹ , o volume de injeção	

foi de 30 μ L e a temperatura foi de 30 $^{\circ}$ C. A detecção foi realizada a 260 (A) para CNFD e 247 nm (B) para PI.....	67
Figura 3: (A) Perfil cinético <i>in vitro</i> (gráfico sigmoidal) de CNFD catalisado por enzimas CYP. (B) Gráfico de Eadie-Hofstee.....	69
Figura 4: Determinação da isoforma CYP envolvendo o metabolismo de CNFD usando enzimas recombinantes. (A) Velocidade da reação enzimática. (B) Taxa normalizada total.....	70
Figura 5: Local de metabolismo por CYP3A4 (A) CYP2D6 (B) CYP2C9 (C), de acordo com a plataforma online SMARTCyp. O código de cores pode ser encontrado na Tabela 3.....	70
Figura 6: Previsão de metabólitos CNFD e suas respectivas reações químicas. Hidrogenação: M1 (93,93%) e M2 (88,42%); Epoxidação: M3 (84,82%) e M4 (71,09%); C-Oxidação: M5 (67,39%).....	72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Principais enzimas envolvidas no metabolismo dos fármacos.....277

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Condições cromatográficas estabelecidas.....41
Tabela 2 – Parâmetros analíticos da curva de calibração para determinação do CNFD em plasma humano.....44
Tabela 3: Parâmetros de validação do método CNFD em meio plasmático.....52

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Limites de confiança obtidos para a análise do método CNFD em meio microsomal.....68
Tabela 2: Determinação da fração livre não ligada às proteínas microsomais e plasmáticas e aos parâmetros farmacocinéticos *in vivo*.....69
Tabela 3: Previsão do metabolismo CNFD usando a plataforma online (os valores foram calculados pelo servidor SMARTCyp).....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSE	Carboxilesterase
CYP	Citocromo P450
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma oxidada
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida
Tris HCl	Tris (hidroximetil) aminometano com ácido clorídrico
DPR	Desvio padrão relativo
ER	Erro relativo percentual
LIQ	Limite inferior de quantificação
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CQA	Controle de qualidade alto
LSQ	Limite superior de quantificação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	19
GERAL	19
ESPECÍFICOS	19
CAPÍTULO 1	21
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 Câncer	21
1.2 Naftoquinonas	22
1.3 Desenvolvimento de novos fármacos	24
1.4 Fase pré-clínica: metabolismo de fármacos	26
1.4.1 O metabolismo de fármacos antineoplásicos	29
2. REFERÊNCIAS	31
CAPÍTULO 2	38
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DE CNFD EM PLASMA HUMANO	38
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.1 Reagentes e solventes	39
2.2 Análise do CNFD por espectrofotometria	40
2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência	40
2.4 Avaliação prévia da estabilidade	41
2.5 Avaliação da solubilidade	42
2.6 Condições de incubação e extração	42
2.7 Recuperação da extração líquido-líquido (ELL)	43
2.8 Validação da metodologia analítica em meio plasmático	43
2.9 Estudo da estabilidade metabólica em plasma humano	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	46
3.2 Avaliação prévia da estabilidade	47
3.3 Avaliação da solubilidade	48
3.4 Recuperação da extração líquido-líquido (ELL)	49
3.5 Validação da metodologia analítica em plasma humano	50
3.6 Estudo prévio da estabilidade metabólica em plasma humano	54
4. CONCLUSÃO	54

5. REFERÊNCIAS	55
CAPÍTULO 3.....	59
METABOLISMO DO CYP450 DE UMA NAFTOQUINONA SEMISSINTÉTICA, UM CANDIDATO A MEDICAMENTO ANTICÂNCER, POR MICROSSOMAS HEPÁTICOS HUMANOS.....	59
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.1 Reagentes e solventes.....	61
2.2 Condições de incubação microsossomal.....	61
2.3 CLAE	62
2.4 Validação de método	62
2.5 Cinética enzimática.....	63
2.6 Predição de parâmetros farmacocinéticos <i>in vivo</i>	64
2.7 Fenotipagem CYP450.....	65
2.8 Predição do metabolismo usando o software SMARTCyp.....	66
3. RESULTADOS	66
3.1 Validação de método	66
3.2 Cinética enzimática.....	69
3.3 Predição de parâmetros farmacocinéticos <i>in vivo</i>	69
3.4 Fenotipagem CYP450.....	70
3.5 Previsão do metabolismo usando software SMARTCyp e Metatox.....	70
4. DISCUSSÃO.....	72
5. CONCLUSÃO	74
6. REFERÊNCIAS	74
CONCLUSÃO FINAL.....	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO	82

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer tem sido um dos mais complexos problemas de saúde no mundo (AGYARE et al., 2018; ZANETTI et al., 2018). O câncer é uma variedade de doenças a nível tecidual, que tem o diagnóstico específico e a eficácia de tratamento como grandes desafios (HASSANPOUR & DEHGhani, 2017). Embora o tratamento com a quimioterapia tenha avançado, os efeitos adversos e a resistência das células cancerígenas aos agentes antineoplásicos convencionais levaram à busca de moléculas ativas obtidas de plantas (BENARBA & PANDIELLA, 2018).

Nesse contexto, vários fármacos antitumorais derivados de plantas já foram introduzidos na prática clínica, como paclitaxel, vimblastina ou vincristina, *irinotecano*, camptotecina e seus derivados ou análogos (BENARBA & PANDIELLA, 2018). No entanto, pesquisas ainda são desenvolvidas na procura por novas moléculas com atividades anticancerígenas oriundas de fontes naturais (AGYARE et al., 2018; IJAZ et al., 2018).

As naftoquinonas, metabólitos secundários de plantas, como o lapachol e a lausona, têm sido descritas com atividades farmacológicas consideráveis, incluindo a atividade antineoplásica (SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2012; SALUNKE-GAWALI et al., 2017). De Almeida (2021) estudou o derivado da lausona, CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) –diona) em várias linhagens de células tumorais. Os resultados foram promissores para o desenvolvimento de um novo fármaco antineoplásico a partir desse composto.

Ressalta-se que o desenvolvimento de um novo fármaco se estende por anos e abrange uma série de processos e estudos (MOHS et al., 2017). Geralmente, nas fases iniciais de planejamento, as moléculas devem ser otimizadas em relação a várias propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas (GUIDO et al., 2010). A modelagem molecular tem sido amplamente utilizada como instrumento na previsão de atividade farmacológica, mecanismo de ação, toxicidade, caracterização de perfil farmacocinético, entre outros (PINERO et al., 2018). Além disso, são utilizados ensaios biológicos em nível molecular, celular, orgânico e de animais integrais para definir a atividade e a seletividade do futuro candidato a fármaco, para então partir para os estudos clínicos (SINGH, 2018).

Nos estudos de farmacocinética, destaca-se a investigação do metabolismo desse novo candidato a fármaco, visto que esse processo pode comprometer a

eficácia do mesmo e ainda provocar efeitos adversos consideráveis (FAKUNLE et al., 2012). O fígado constitui o principal órgão envolvido no metabolismo dos fármacos, pois possui o complexo enzimático citocromo P450, que é responsável pelo metabolismo da maioria dos fármacos disponíveis para uso clínico (OH et al., 2017). Além do fígado, enzimas presentes no plasma, como as butirilcolinesterases e as paraoxonases, também são capazes de realizar o metabolismo de fármacos (MAKHAEVA et al., 2016).

Para os estudos de metabolismo de um novo fármaco, além das ferramentas de ancoragem molecular, técnicas *in vitro*, utilizando microssomas de fígado, por exemplo, são extremamente importantes para identificar os metabólitos formados e avaliar a toxicidade dos mesmos (FAKUNLE et al., 2012; SINGH, 2018). Os metabólitos ativos são muito mais propensos a causar reações adversas a medicamentos do que o seu fármaco (CHAGAS et al., 2018). Atualmente, fármacos importantes, como paclitaxel e análogos da Vinca, utilizados para vários tipos de câncer são metabolizados por enzimas do citocromo P450 e possuem metabólitos menos tóxicos que o composto original, mas ainda assim tóxicos para o organismo, induzindo efeitos adversos importantes (SAINI et al., 2018). Esses efeitos são causados pela capacidade dos metabólitos ativos de se ligarem a diferentes áreas, longe do alvo terapêutico do fármaco (CHAGAS et al., 2018).

Diante do exposto, visto que o CNFD é um candidato a novo fármaco antineoplásico, é extremamente importante a avaliação da atividade metabólica desta droga *in vitro* e a identificação dos metabólitos formados com a finalidade de conhecer a sua toxicidade antes dos estudos *in vivo*.

O desenvolvimento da presente tese está apresentado em 3 capítulos, onde são mencionados a revisão bibliográfica, os materiais, as metodologias, os resultados e discussão, de acordo com a apresentação abaixo:

Capítulo 1: *Revisão bibliográfica.*

Capítulo 2: *“Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico por CLAE para determinação de CNFD em plasma humano”.*

Capítulo 3: *“Metabolismo do CYP450 de uma naftoquinona semissintética, um candidato a medicamento anticâncer, por microssomas hepáticos humanos”.* Este capítulo está formatado na forma de artigo (versão em português) de acordo com a revista Journal of the Brazilian Chemical Society (ISSN 1678-4790). Foi submetido em 18 outubro de 2021 e aceito em 09 de janeiro de 2022.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

GERAL

Investigar o metabolismo *in vitro* do CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) –diona) utilizando enzimas do citocromo P450 e esterases plasmáticas humanas.

ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver e validar um método bioanalítico para determinação do CNFD em plasma e microsomas hepáticos humanos;
- b) Avaliar o metabolismo do CNFD empregando plasma e microsomas hepáticos humanos *in vitro*;
- c) Identificar as enzimas envolvidas no metabolismo do CNFD;
- d) Caracterizar os parâmetros cinéticos enzimáticos após metabolismo para predição dos parâmetros farmacocinéticos *in vivo*.
- e) Sugerir os possíveis metabólitos formados *in silico*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Câncer

O câncer refere-se a uma variedade de doenças resultantes de mutações genéticas, ou seja, modificações na estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico) dos genes. Essas alterações levam à proliferação anormal de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (HASSANPOUR; DEHGhani, 2017; INCA, 2020). Atualmente, existem mais de 277 tipos diferentes da doença, variando de acordo com o nível no tecido, o que torna um grande desafio para o diagnóstico específico, seguido pela eficácia do tratamento (ALMEIDA et al., 2005; HASSANPOUR; DEHGhani, 2017).

O câncer é um importante problema de saúde pública para países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo a segunda causa de mortalidade em todo o mundo (HASSANPOUR; DEHGhani, 2017). O número de pessoas com câncer está em constante crescimento em todo o mundo. Estima-se que em 2040, a incidência de novos casos será de 29,5 milhões (SMITH; OEFFINGER, 2020). No Brasil, a maior incidência no sexo feminino é o câncer de mama, seguido do câncer colorretal e de colo uterino. No sexo masculino, o tipo mais incidente é o câncer de próstata, seguido do câncer colorretal e de traquéia, brônquio e pulmão (INCA, 2020).

O tratamento do câncer pode ser realizado através de radioterapia, quimioterapia, cirurgia, transplante de medula óssea, ou combinação de mais de uma modalidade. A escolha do melhor método depende da extensão do tumor e do prognóstico (REN; XU, 2020; INCA, 2020). Um dos tratamentos mais utilizados é quimioterapia, utilizada para tratar a doença em estágio avançado ou em estágio de metástase e que contribui para reduzir o risco de recorrência e de mortes (REN; XU 2020; C. LI et al., 2020).

A quimioterapia é o tratamento que utiliza medicamentos quimioterápicos (ou antineoplásicos) administrados em intervalos regulares (INCA, 2020). Esses agentes são originalmente sintéticos, semi-sintéticos ou naturais, sendo divididos em classes diferentes: agentes antimetabólicos, hormonais, produtos naturais, alquilantes e complexos de coordenação de platina (ALMEIDA et al., 2005).

Dentre os quimioterápicos naturais, a vimblastina e a vincristina (extraídas de *Catharrantus roseus*), o etoposídeo, o teniposídeo e o paclitaxel são importantes fármacos utilizados no tratamento do câncer (KUTTIKRISHNAN et al., 2021). A introdução desses fármacos na terapêutica nos últimos anos tem despertado ainda mais o interesse das indústrias farmacêuticas pelos produtos naturais, que já representam 74% dos medicamentos antineoplásicos do mercado (FIORITO et al., 2014).

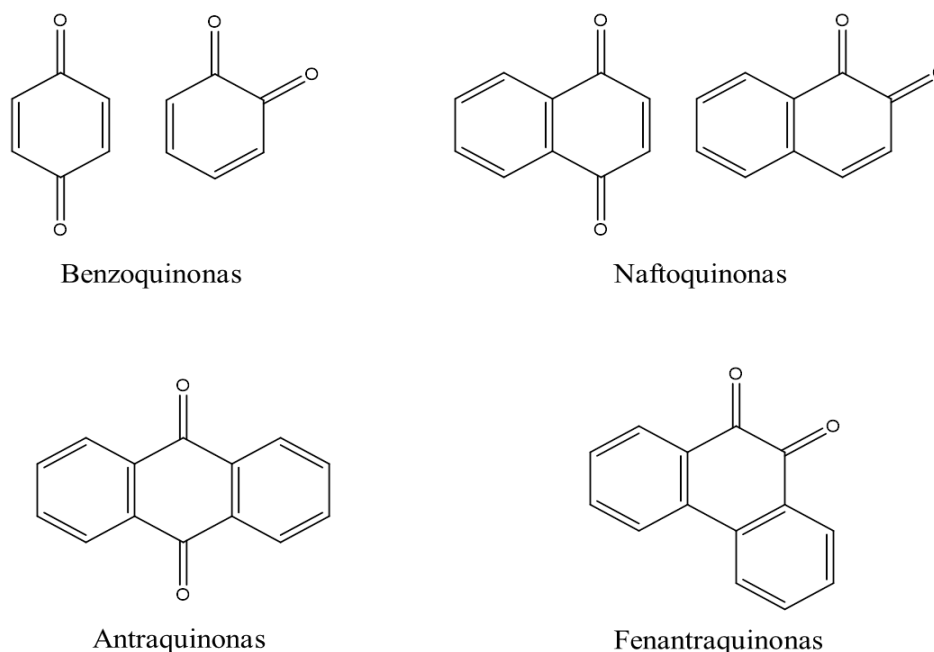
Atualmente, a busca por novos agentes antitumorais tem se tornado cada vez mais necessária visando encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou a descoberta de novas estratégias (C. LI et al., 2020; KHAN et al., 2022). Os metabólitos secundários de plantas, incluindo alcalóides, flavonóides, cumarinas, quinonas, entre outros, apresentam atividades antineoplásicas consideráveis (KHAN et al., 2022; PANDEY; KHAN, 2021).

Na última década, moléculas derivadas de plantas, como artesunato, resveratrol, β -lapachona, entre outras, têm apresentado resultados satisfatórios para atividade antineoplásica (AGYARE et al., 2018; IJAZ et al., 2018). Algumas naftoquinonas já foram extensivamente estudadas, como o lapachol, que teve os estudos interrompidos por causa dos efeitos adversos. A lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) é outro composto bioativo que exibe várias atividades, dentre elas antimicrobiana e antitumoral. A lausona é facilmente obtida por síntese e é muito utilizada como matéria de partida na preparação de derivados bioativos (OTTONI et al., 2020).

1.2 Naftoquinonas

As quinonas representam uma ampla família de metabólitos secundários presentes na natureza. Elas são classificadas de acordo com o sistema aromático presente em sua estrutura: benzoquinonas - um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular; e fenantraquinonas - um anel fenantrênico (FIGURA 1) (SOUSA; LOPES; DE ANDRADE, 2016). Um grande número de moléculas desse grupo possui aplicações práticas reconhecidas, como as vitaminas K, as mitomicinas e as antraciclina (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; FIORITO et al., 2014).

Figura 1 - Classificação das quinonas quanto ao sistema aromático



Fonte: Elaboração própria (2022).

Nota: Sousa *et al* (2016).

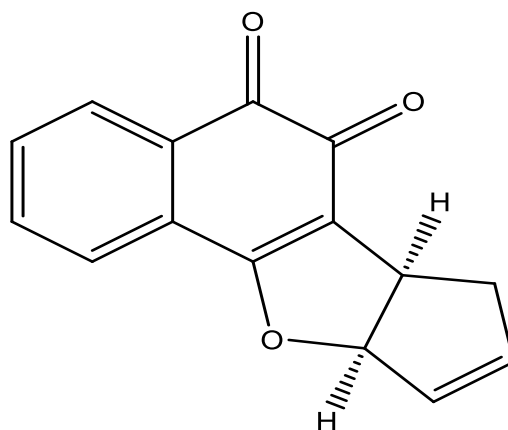
Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol (2-hidroxi-3-[3-metil-2-butenil]-1,4- naftoquinona), extraído da *Tabebuia* sp., que possui muitas atividades farmacológicas, como antimicrobiana, antifúngica, tripanossomicida, leishmanicida, antimalárica, anti-inflamatória, antineoplásica, entre outras (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003). A β -Lapachona (3,4-dihidro- 2,2-dimetil-2H-nafto [1,2-b] pirano-5,6-diona), uma naftoquinona natural derivada do lapachol, têm sido amplamente estudada principalmente por apresentar efeitos seletivos em linhagens tumorais quando comparados a linhagens normais (SALUNKE-GAWALI et al., 2017; SILVA et al., 2012).

O extrato da folha de *Lawsonia inermis*, conhecida como Henna, contém a lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), outra naftoquinona de grande interesse farmacológico (OTTONI et al., 2020). Pesquisadores relataram a síntese de naftoquinonas a partir da lausona, IVS320 (1H-ciclopenta [b] nafto [2,3-d] furano-5,10 (3aH, 10bH) - diona) e IVS322 (6b,7-di-hidro-5H ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) - diona), e verificaram um novo composto com grande potencial antifúngico (FREIRE et al., 2010a).

O potencial antineoplásico da CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) – diona) em diferentes linhagens de células foi estudado. Os

resultados sugerem que o CNFD é um candidato potencial para uso na terapia antitumoral (DE ALMEIDA et al., 2021). A estrutura química do CNFD é demonstrada na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química do CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) – diona)



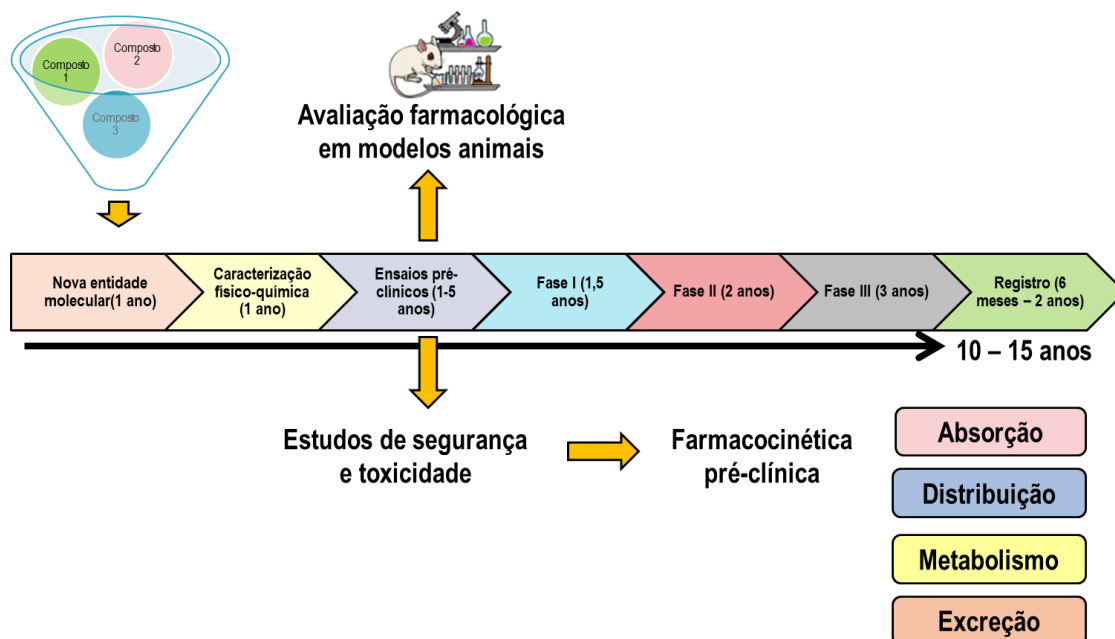
Fonte: Elaboração própria (2022).
Nota: (NAIR et al., 2001).

1.3 Desenvolvimento de novos fármacos

O desenvolvimento de um novo fármaco geralmente inicia-se quando há o estudo de um alvo biológico diferente envolvido no processo de uma doença. Nesse caso, o medicamento desenvolvido é completamente inovador, pois tem um modo de ação diferente dos que já existem no mercado. O início do processo de desenvolvimento também pode se dar a partir da descoberta ou síntese de uma molécula com potencial ativo e a sua correlação com um alvo biológico apropriado já estudado. O melhoramento dos medicamentos atuais também é fundamental, pois pode oferecer benefícios em relação à potência, segurança, tolerabilidade ou conveniência (MOHS; GREIG, 2017).

O desenvolvimento de um novo fármaco, a partir da identificação do alvo, pode levar 12 anos ou mais (FIGURA 3). O custo para desenvolver uma nova entidade molecular é estimado em cerca de 2,6 bilhões de dólares (MOHS; GREIG, 2017; ZHANG; TANG, 2018). A cooperação entre ciências químicas, biológicas, farmacêuticas, médicas, físicas e computacionais, e entre estudos pré-clínicos e clínicos é essencial para o programa de desenvolvimento (MOHS; GREIG, 2017).

Figura 3 - Processo de desenvolvimento de um novo fármaco



Fonte: Elaboração própria (2022).

Nota: Adaptado de Fakunle *et al.* (2012).

As moléculas bioativas de produtos naturais ou compostos sintéticos podem ser identificadas a partir de triagens experimentais, ou computacionais mediante planejamento racional (ZHU *et al.*, 2018). A abordagem *in silico* tem sido bastante utilizada pelo custo e rapidez nas análises (AMMAR, 2017). Cerca de 70% das indústrias farmacêuticas utilizam modelagem molecular no desenvolvimento de novos fármacos. Por meio dessa ferramenta, é possível prever o mecanismo de ação dos fármacos, avaliar a toxicidade, compreender alterações moleculares, otimizar a dose, programar esquemas terapêuticos, entre outros (PIÑERO; FURLONG; SANZ, 2018).

Os candidatos a fármacos que passam com sucesso pelos procedimentos iniciais de triagem seguem para os estudos pré-clínicos, com a finalidade principal de serem avaliados em sistemas *in vitro* e em animais *in vivo* para a obtenção do maior conhecimento possível acerca das propriedades farmacológicas, farmacocinéticas e da toxicidade do fármaco em desenvolvimento (SINGH, 2017). Cerca de 70% dos candidatos a fármacos falham nessa etapa (FAKUNLE; LORING, 2012).

Os estudos clínicos correspondem à pesquisa conduzida em seres humanos, sendo voluntários saudáveis ou enfermos, e abrange desde o momento que se administra a substância pela primeira vez ao ser humano, até a obtenção dos dados sobre sua eficácia e segurança terapêutica em grandes grupos de população (DINGEMANSE;

KRAUSE, 2017). Esses estudos são divididos em quatro fases (ARÁNYI, 2018; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015):

- Fase I: o medicamento será testado pela primeira vez em voluntários saudáveis. O principal objetivo desta fase é verificar a tolerância, posologia e a segurança do novo fármaco;
- Fase II: os voluntários são pacientes acometidos pela doença. O objetivo dessa fase é avaliar a eficácia do novo fármaco, estabelecer o intervalo de dose e determinar os regimes de administração. Esta fase também permite obter informações mais detalhadas sobre a segurança em curto prazo;
- Fase III: envolve estudos multicêntricos internacionais e o medicamento é dado a um grupo extenso de pacientes para avaliar novamente a eficácia e a segurança do produto. Geralmente, nos estudos desta fase os pacientes são divididos em dois grupos: o grupo controle (recebe o tratamento padrão ou placebo) e o grupo teste (recebe o novo fármaco);
- Fase IV: esta fase é posterior ao registro e ao lançamento do novo medicamento no mercado. As pesquisas dessa fase são estudos de vigilância pós-comercialização, ou farmacovigilância, para verificar o surgimento de novos efeitos terapêuticos ou reações adversas, bem como interações medicamentosas não observadas nas fases anteriores.

No processo de desenvolvimento de novos fármacos, é de suma importância o estudo da absorção e do metabolismo do fitocomposto para sua posterior utilização como candidato a fármaco anticâncer seguro e eficaz (PANDEY; KHAN, 2021). As informações sobre enzimas específicas envolvidas no metabolismo dessas drogas podem ajudar a revelar possíveis interações medicamentosas e variações interindividuais no metabolismo de drogas (VAVROVÁ et al., 2022).

1.4 Fase pré-clínica: metabolismo de fármacos

Uma tarefa integral da fase pré-clínica é avaliar e prever a toxicidade, a farmacocinética e o metabolismo de um dado composto. As reações adversas a medicamentos são a quarta principal causa de morte nos EUA, sendo a hepatotoxicidade a principal razão para falha do medicamento pós-comercialização (FAKUNLE; LORING, 2012).

O metabolismo é um processo fisiológico que converte fármacos em metabólitos polares e hidrofílicos, com a finalidade de facilitar a excreção dos mesmos pelo organismo (GIRENNAVAR; JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007). Esses metabólitos, ou produtos do metabolismo, podem apresentar maior potencial farmacológico ou toxicológico do que o fármaco. O metabolismo também pode diminuir a toxicidade ou o efeito terapêutico, dependendo do medicamento (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015).

O fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo de fármacos (FAKUNLE; LORING, 2012). Esse processo normalmente acontece em duas fases: Na fase I, as enzimas catalisam reações de oxidação, redução ou hidrólise (CHAGAS, MOSS, AND ALISARAIE, 2018; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015). Essas reações são realizadas, principalmente, pelo citocromo P450 (CYP), que é uma grande família multigênica de hemeoproteínas, mas também há outras enzimas envolvidas (TABELA 1) (IWATA et al., 2015; KORHONEN et al., 2007). Na fase II, as enzimas transferases são responsáveis pela conjugação dos produtos provenientes da Fase I com uma molécula maior (ácido glicurônico ou glutatona, por exemplo), a fim de facilitar a eliminação dos fármacos e inativar metabólitos tóxicos produzidos pela primeira fase (CHAGAS; MOSS; ALISARAIE, 2018; YIN et al., 2010).

Tabela 1 - Principais enzimas envolvidas no metabolismo dos fármacos

Reações de Fase I	Principais enzimas envolvidas
Oxidação	Enzimas do citocromo P450 (CYPs), monoxigenases contendo flavina (FMO)
Redução	Redutases
Hidrólise	Esterases, Epóxido-hidrolases (mEH, sEH)
Reações de Fase II	Principais enzimas envolvidas
Glicuronidação	UDP-glicuronosiltransferases (UGT)
Sulfatação	Sulfotransferases (SULT)
Acetilação	N-acetiltransferases (NAT)
Metilação	Metiltransferases (MT)
Glutathionização	Glutathiona-S-transferase (GST)

Fonte: Elaboração própria (2022).

Nota: Hilal-Dandan & Brunton (2015)

As enzimas CYPs são encontradas na superfície do retículo endoplasmático liso de células do trato gastrointestinal, principalmente no fígado e na parede do

intestino, mas também podem ser encontradas nos pulmões, rins e sistema nervoso central (DAHAN; ALTMAN, 2004; SPROUSE; BREEMEN, 2016). Elas apresentam várias isoformas com base na estrutura, especificidade de substrato, ou sensibilidade a agentes inibidores e indutores (NELSON et al., 1993). Há a identificação de vários tipos de CYP, contudo apenas um pequeno número é responsável por metabolizar a grande maioria dos medicamentos (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4) (OH et al., 2017).

A CYP3A4 é a forma mais abundante no fígado e no intestino, e responsável pelo metabolismo de mais de 50% dos fármacos disponíveis no mercado (KANE; LIPSKY, 2013; NITTAYANANTA et al., 2013). A CYP2D6 metaboliza 20% de todos os medicamentos, incluindo antidepressivos (por exemplo, imiprina), entre outros (FAKUNLE; LORING, 2012).

Embora o fígado seja o maior responsável pelo metabolismo de fármacos, o plasma também possui as enzimas esterases, que são capazes de biotransformar substâncias endógenas e fármacos. Elas catalisam a hidrólise da ligação éster e amida, inativando medicamentos, ou ativando pró-fármacos (ANAND et al., 2006; MAKHAEVA et al., 2016). Essas enzimas também estão presentes em diversos tecidos como fígado, testículos, intestino delgado, rim e pulmão (LAMEGO et al., 2013).

As carboxilesterases humanas (CESs) são uma família multigênica, na qual as isoenzimas são classificadas em cinco grupos principais (CES1-5) e vários subgrupos de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos. A maioria das CESs pertencem às famílias CES1 (duas principais isoformas CES1b e CES1c) e CES2 (MEYER; SCHÜTZ; MAURER, 2015).

Além das carboxilesterases, existem outras esterases inespecíficas encontradas no sangue humano, como butirilcolinesterase, paraoxonase, acetilcolinesterase e albumina, sendo essa última considerada com baixa atividade catalítica individualmente, mas com contribuição significativa pela elevada concentração plasmática. Não foi possível detectar carboxilesterase no plasma humano (LI et al., 2005). No entanto, outros pesquisadores observaram a presença de baixos níveis de ambas as isoformas no plasma (PORRO et al., 2019).

Agências reguladoras e diretrizes recomendam que estudos do metabolismo sejam realizados por ancoragem molecular, bem como *in vitro* e em animais antes de serem administrados nos seres humanos. Nesses estudos, é possível elucidar as vias

metabólicas, caracterizar e quantificar os metabólitos, e propor modelos a serem seguidos nas fases seguintes do desenvolvimento (MOHS; GREIG, 2017; PIÑERO; FURLONG; SANZ, 2018).

O rastreio do metabolismo é tipicamente conduzido por métodos *in vitro*, em que os mais utilizados são células do carcinoma hepático HepG2, microsomas do fígado, hepatócitos primários, entre outros (FAKUNLE; LORING, 2012; SINGH, 2017). Esses modelos, representantes do fígado *in vivo*, são úteis para gerar perfis de metabólitos de drogas, e também para avaliar o potencial para interações medicamentosas e inibição do citocromo P450 (SINGH, 2017). Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens. Os hepatócitos primários parecem reproduzir mais fielmente o fígado, no entanto, há pouco controle sobre a fonte e as condições dessas células, além disso, perdem as características quando expandidas em cultura. As células HepG2 são muito utilizadas, pois são imortais, mas também mudam ao longo do tempo em cultura e são geneticamente instáveis (FAKUNLE; LORING, 2012). Os microsomas são fragmentos de retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, ou seja, consiste numa fração subcelular contendo o citocromo P450. Eles são obtidos por meio de homogeneização e centrifugações diferenciais do fígado. Apesar de serem fragmentos e não a célula inteira e íntegra, os modelos microsossomais apresentam elevada concentração das enzimas CYP, além disso, são de fácil manuseio, estáveis a -80°C e mais econômicos que as outras técnicas (DI et al., 2012).

1.4.1 O metabolismo de fármacos antineoplásicos

A toxicidade é uma das principais preocupações no desenvolvimento de novos fármacos (CHAGAS; MOSS; ALISARAIE, 2018). Os fármacos antitumorais apresentam baixa especificidade, ou seja, não afetam apenas as células cancerígenas, mas também acometem as células normais. Os metabólitos formados pelo metabolismo desses fármacos podem induzir vários efeitos adversos, incluindo outros problemas graves e até a morte do paciente (CHAGAS; MOSS; ALISARAIE, 2018; SAINI; BAKSHI; SHARMA, 2018).

O metabolismo do paclitaxel foi primeiramente investigado utilizando hepatócitos de ratos *in vitro* (WALLE et al., 1993). Nesse estudo, foram identificados dois metabólitos formados a partir do paclitaxel. Ele é metabolizado pela CYP2C8 e

CYP3A4 em dois metabólitos principais e em outros sete metabólitos secundários. Todos os metabólitos são menos ativos e citotóxicos que o composto original, mas isso não descarta a presença de efeitos adversos ocasionados pelos mesmos (CHAGAS; MOSS; ALISARAIE, 2018).

Os agentes antineoplásicos análogos da Vinca são metabolizados pela CYP3A4, e assim como o paclitaxel, os metabólitos formados são menos tóxicos que o composto precursor. No entanto, os pacientes que já apresentarem função hepática comprometida podem desenvolver neurotoxicidade aguda e grave (MARTINO et al., 2018).

O irinotecano, outro agente antitumoral, tem a sua atividade associada a efeitos tóxicos clinicamente importantes, como neutropenia grave, lesão hepática e diarreia crônica. Além disso, estima-se que cerca de 4% dos pacientes que fazem o uso desse medicamento vai a óbito em decorrência de reações adversas associadas a interações medicamentosas (PRESTER et al., 2018). Ele é um pró-fármaco convertido na sua forma ativa por carboxilesterases humanas, e depois metabolizado por glicuronosiltransferases. Ele pode, ainda, ser desconjugado novamente e sofrer circulação entero-hepática, acumulando-se no sangue e intestino (MALLICK et al., 2018).

Várias estratégias já foram testadas a fim de diminuir os efeitos adversos, bem como a toxicidade, desses fármacos antineoplásicos, incluindo a inibição enzimática, adaptação de formulações, modificação de dose, modificação estrutural, entre outros (CHAGAS; MOSS; ALISARAIE, 2018; MALLICK et al., 2018; MARTINO et al., 2018).

Assim, diante do contexto, o desenvolvimento de metodologias analíticas para os estudos de identificação da via metabólica e de metabólitos formados de um novo fármaco, bem como o conhecimento das propriedades farmacológicas e tóxicas da molécula a partir desses estudos, é de extrema importância para fase inicial do desenvolvimento de um novo medicamento. Ressalta-se que a molécula CNFD foi recentemente estudada pelo mesmo grupo de pesquisa, apresentando atividade antineoplásica considerável, sendo um forte candidato a novo fármaco antitumoral. Portanto, o presente estudo visa investigar o metabolismo pela atividade das enzimas do citocromo P450 e esterases plasmáticas humanas sobre essa molécula derivada de lausona, buscando identificar a via metabólica e os metabólitos formados a partir dessa interação para, então, prosseguir com os estudos subsequentes.

2. REFERÊNCIAS

AGYARE, Christian; SPIEGLER, Verena; ASASE, Alex; SCHOLZ, Michael; HEMPEL, Georg; HENSEL, Andreas. An ethnopharmacological survey of medicinal plants traditionally used for cancer treatment in the Ashanti region, Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 212, n. October 2017, p. 137–152, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2017.10.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.10.019>.

ALMEIDA, Vera Lúcia De; LEITÃO, Andrei; REINA, Luisa del Carmen Barrett; MONTANARI, Carlos Alberto; DONNICI, Claudio Luis; LOPES, Míriam Teresa Paz. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005. DOI: 10.1590/s0100-40422005000100021.

AMMAR, Ouahab. In silico pharmacodynamics, toxicity profile and biological activities of the saharan medicinal plant *limoniastrum feei*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1590/s2175-97902017000300061.

ANAND, Sathanandam S.; BRUCKNER, James V.; HAINES, Wendy T.; MURALIDHARA, Srinivasa; FISHER, Jeffrey W.; PADILLA, Stephanie. Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 212, n. 2, p. 156–166, 2006. DOI: 10.1016/j.taap.2005.07.021.

ARÁNYI, Péter. Ethical aspects of drug development. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 136, p. 244–246, 2018. DOI: 10.1016/j.microc.2016.11.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.015>.

CHAGAS, Caroline Manto; MOSS, Sara; ALISARAIE, Laleh. Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski's Rule of Five. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 549, n. 1–2, p. 133–149, 2018. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.046. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.046>.

DA SILVA, Milton N.; FERREIRA, Vítor F.; DE SOUZA, Maria Cecília B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -Lapachona e derivados. **Química Nova**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003. DOI: 10.1590/s0100-40422003000300019.

DAHAN, A.; ALTMAN, H. Food-drug interaction: Grapefruit juice augments drug bioavailability - Mechanism, extent and relevance. **European Journal of Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 1–9, 2004. DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601736.

DE ALMEIDA, Patricia D. O. et al. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ROS-mediated apoptosis with activation of the JNK and p38 signaling pathways. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 343, n. September 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109444.

DI, Li et al. Mechanistic insights from comparing intrinsic clearance values between human liver microsomes and hepatocytes to guide drug design. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 57, p. 441–448, 2012. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.06.043.

DINGEMANSE, Jasper; KRAUSE, Andreas. Impact of pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling in early clinical drug development. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 109, n. May, p. S53–S58, 2017. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.05.042. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.042>.

FAKUNLE, Eyitayo S.; LORING, Jeanne F. Ethnically diverse pluripotent stem cells for drug development. **Trends in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 709–716, 2012. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.10.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2012.10.007>.

FIORITO, Serena; EPIFANO, Francesco; BRUYÈRE, Céline; MATHIEU, Véronique; KISS, Robert; GENOVESE, Salvatore. Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 454–457, 2014. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.12.049. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.049>.

FREIRE, Cristina Pessoa Veloso; FERREIRA, Sabrina Baptista; DE OLIVEIRA, Nivea Suely Melo; MATSUURA, Ani Beatriz Jackisch; GAMA, Ivson Lelis; DA SILVA, Fernando De C.; DE SOUZA, Maria Cecília B. V.; LIMA, Emerson Silva; FERREIRA, Vitor Francisco. Synthesis and biological evaluation of substituted α - And β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. **MedChemComm**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 229–232, 2010. a. DOI: 10.1039/c0md00074d.

GIRENNAVAR, B.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. Potent inhibition of human cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 isoenzymes by grapefruit juice and its furocoumarins. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 72, n. 8, p. 417–421, 2007. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00483.x.

HASSANPOUR, Seyed Hossein; DEHGHANI, Mohammadamin. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017. DOI: 10.1016/j.jcrpr.2017.07.001. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2311300617300125>.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. L. Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman. 2ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2015.

IJAZ, Shakeel; AKHTAR, Naveed; KHAN, Muhammad Shoaib; HAMEED, Abdul; IRFAN, Muhammad; ARSHAD, Muhammad Adeel; ALI, Sajid; ASRAR, Muhammad. Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 103, n. March, p. 1643–1651, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.04.113. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.113>.

IWATA, Hisato; YAMAGUCHI, Keisuke; TAKESHITA, Yoko; KUBOTA, Akira; HIRAKAWA, Shusaku; ISOBE, Tomohiko; HIRANO, Masashi; KIM, Eun Young. Enzymatic characterization of in vitro-expressed Baikal seal cytochrome P450 (CYP) 1A1, 1A2, and 1B1: Implication of low metabolic potential of CYP1A2 uniquely evolved in aquatic mammals. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 162, p. 138–151, 2015. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.03.010.

KANE, Garvan;; LIPSKY, James. Drug-grapefruit juice interactions. **BMJ (Online)**, [S. l.], v. 346, n. 7890, p. 933–942, 2013. DOI: 10.1136/bmj.f1.

KHAN, SULIMAN, ARIF HUSSAIN, FARNOOSH ATTAR, SAMIR HAJ BLOUKH, ZEHRA EDIS, MAJID SHARIFI, EBRAHIM BALALI, et al. “A Review of the Berberine Natural Polysaccharide Nanostructures as Potential Anticancer and Antibacterial Agents.” **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 146, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112531>.

KORHONEN, L. E.; TURPEINEN, M.; RAHNASTO, M.; WITTEKINDT, C.; POSO, A.; PELKONEN, O.; RAUNIO, H.; JUVONEN, R. O. New potent and selective cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) inhibitors based on three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 150, n. 7, p. 932–942, 2007. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707173.

KUTTIKRISHNAN, SHILPA, KIRTI S. PRABHU, AHMED H. AL SHARIE, YAZAN O. AL ZU'BI, FERAS Q. ALALI, NICHOLAS H. OBERLIES, AAMIR AHMAD, TAMAM EL-ELIMAT, AND SHAHAB UDDIN. “Natural Resorcylic Acid Lactones: A Chemical Biology Approach for Anticancer Activity.” **Drug Discovery Today**, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.10.001>.

LAMEGO, Joana; CUNHA, Bárbara; PEIXOTO, Cristina; SOUSA, Marcos F.; ALVES, Paula M.; SIMPLÍCIO, Ana L.; COROADINHA, Ana S. Carboxylesterase 2 production and characterization in human cells: New insights into enzyme oligomerization and activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 1161–1173, 2013. DOI: 10.1007/s00253-012-3994-3.

LI, Bin; SEDLACEK, Meghan; MANOHARAN, Indumathi; BOOPATHY, Rathnam; DUYSEN, Ellen G.; MASSON, Patrick; LOCKRIDGE, Oksana. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 70, n. 11, p. 1673–1684, 2005. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.09.002.

LI, CHEN, XIAOLONG WANG, TONG CHEN, WEI WANG, AND QIFENG YANG. “Trametes Robiniophila Murr in the Treatment of Breast Cancer.” **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 128, 2029. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110254>.

MAKHAEVA, Galina F.; RUDAKOVA, Elena V.; SEREBRYAKOVA, Olga G.; AKSINENKO, Alexey Yu; LUSHCHEKINA, Sofya V.; BACHURIN, Sergey O.; RICHARDSON, Rudy J. **Esterase profiles of organophosphorus compounds in vitro predict their behavior in vivo**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2016. v. 259 DOI: 10.1016/j.cbi.2016.05.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.002>.

MALLICK, Pankajini; SHAH, Pranav; ITTMANN, Michael M.; TRIVEDI, Meghna; HU, Ming; GAO, Song; GHOSE, Romi. Impact of diet on irinotecan toxicity in mice. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 291, n. June, p. 87–94, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.06.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.018>.

MARTINO, Emanuela; CASAMASSIMA, Giuseppe; CASTIGLIONE, Sonia; CELLUPICA, Edoardo; PANTALONE, Serena; PAPAGNI, Francesca; RUI, Marta; SICILIANO, Angela Marika; COLLINA, Simona. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 28, n. 17, p. 2816–2826, 2018. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.06.044. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.044>.

MEYER, Markus R.; SCHÜTZ, Aline; MAURER, Hans H. Contribution of human esterases to the metabolism of selected drugs of abuse. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 232, n. 1, p. 159–166, 2015. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.10.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.10.026>.

MOHS, Richard C.; GREIG, Nigel H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 651–657, 2017. DOI: 10.1016/j.trci.2017.10.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005>.

NAIR, Vijay; TREESA, P. M.; MALIAKAL, Davis; RATH, Nigam P. CAN Mediated oxidative addition of 2-hydroxynaphthoquinone to dienes: A facile synthesis of naphthofurandiones. **Tetrahedron**, [S. l.], v. 57, n. 36, p. 7705–7710, 2001. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)00700-1.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NITTAYANANTA, Wipawee; PANGSOMBOON, Kanokporn; PANICHAYUPAKARANANT, Pharkphoom; CHANOWANNA, Nilnara; CHELAE, Sureerat; VUDDHAKUL, Varaporn; SUKHUMUNGOON, Pharanai; PRUPHETKAEW, Nannapat. Effects of lawsone methyl ether mouthwash on oral Candida in HIV-infected subjects and subjects with denture stomatitis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, [S. l.], v. 42, n. 9, p. 698–704, 2013. DOI: 10.1111/jop.12060.

OH, Hyun A.; LEE, Hyunbeom; KIM, Donghak; JUNG, Byung Hwa. **Development of GC-MS based cytochrome P450 assay for the investigation of multi-herb interaction**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2017. v. 519 DOI: 10.1016/j.ab.2016.12.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.015>.

OTTONI, Flaviano M.; GOMES, Eliza R.; PÁDUA, Rodrigo M.; OLIVEIRA, Mônica C.; SILVA, Izabella T.; ALVES, Ricardo J. Synthesis and cytotoxicity evaluation of glycosidic derivatives of lawsone against breast cancer cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 126817, 2020. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.126817. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126817>.

PANDEY, PRATIBHA, AND FAHAD KHAN. “A Mechanistic Review of the Anticancer

Potential of Hesperidin, a Natural Flavonoid from Citrus Fruits.” **Nutrition Research**, 92, 21–31, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.05.011>.

PIÑERO, Janet; FURLONG, Laura I.; SANZ, Ferran. In silico models in drug development: where we are. **Current Opinion in Pharmacology**, [S. l.], v. 42, p. 111–121, 2018. DOI: 10.1016/j.coph.2018.08.007.

PORRO, Benedetta et al. Characterization of aspirin esterase activity in health and disease: In vitro and ex vivo studies. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 163, n. November 2018, p. 119–127, 2019. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.02.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.014>.

PRESTER, Ljerka; MIKOLIĆ, Anja; JURIČ, Andreja; FUCHS, Nino; NEUBERG, Marijana; LUCIĆ VRDOLJAK, Ana; BRČIĆ KARAČONJI, Irena. Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on irinotecan-induced clinical effects in rats. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 294, p. 128–134, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.08.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.009>.

REN, Chao; XU, Rui hua. The drug treatment research of gastrointestinal cancer in China. **European Journal of Surgical Oncology**, [S. l.], v. 46, n. 10, p. e3–e6, 2020. DOI: 10.1016/j.ejso.2020.06.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.06.004>.

SAINI, Neha; BAKSHI, Shikha; SHARMA, Sadhna. In-silico approach for drug induced liver injury prediction: Recent Advances. **Toxicology Letters**, [S. l.], v. 295, p. 288–295, 2018. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.06.1216. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.1216>.

SALUNKE-GAWALI, Sunita; PEREIRA, Eulália; DAR, Umar Ali; BHAND, Sujit. Metal complexes of hydroxynaphthoquinones: Lawsone, bis-lawsone, lapachol, plumbagin and juglone. **Journal of Molecular Structure**, [S. l.], v. 1148, p. 435–458, 2017. DOI: 10.1016/j.molstruc.2017.06.130.

SILVA, Ana Maria Pereira Da; PAIVA, Selma Ribeiro De; FIGUEIREDO, Maria Raquel; KAPLAN, Maria Auxiliadora Coelho. Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos**, [S. l.], v. 7, n. 04, p. 207–215, 2012. Disponível em: <http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/154/152>.

SINGH, Gursharan. **Preclinical Drug Development**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-802103-3.00004-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802103-3.00004-3>.

SMITH, ROBERT A., AND KEVIN C. OEFFINGER. “The Importance of Cancer Screening.” **Medical Clinics of North America**, 104, 6, 919–38, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.08.008>.

SOUSA, Eliane Teixeira; LOPES, Wilson A.; DE ANDRADE, Jailson B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016. DOI: 10.5935/0100-4042.20160034.

SPROUSE, A. A.; BREEMEN, R. B. Pharmacokinetic Interactions between drugs and botanical dietary supplements. **Drug Metabolism and Disposition**, 44, 162–171, 2016.

VAVROVÁ, KATARÍNA, RADEK INDRA, PETR POMPACH, ZBYNĚK HEGER, AND PETR HODEK. “The Impact of Individual Human Cytochrome P450 Enzymes on Oxidative Metabolism of Anticancer Drug Lenvatinib.” **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 145, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112391>.

WALLE, THOMAS; KUMAR, GONDIN N.; MCMILLAN, JOELLYN M.; THORNBURG, KELLY R.; WALLE, U. KRISTINA. Taxol metabolism in rat hepatocytes. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 1661–1664, 1993. DOI: 10.1034/j.1600-0536.2000.042002101.x.

YIN, Ophelia Q. P.; GALLAGHER, Neil; LI, Ai; WEI ZHOU; HARRELL, Robert; SCHRAN, Horst. Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of nilotinib in healthy participants. **Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 188–194, 2010. DOI: 10.1177/0091270009336137.

ZHANG, Zhoupeng; TANG, Wei. Drug metabolism in drug discovery and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 721–732, 2018. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.04.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2018.04.003>.

ZHU, Feng; LI, Xiao Xu; YANG, Sheng Yong; CHEN, Yu Zong. Clinical Success of Drug Targets Prospectively Predicted by In Silico Study. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 229–231, 2018. DOI: 10.1016/j.tips.2017.12.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2017.12.002>.

CAPÍTULO 2
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO
DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO
POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DE CNFD
EM PLASMA HUMANO

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO BIOANALÍTICO POR CLAE PARA DETERMINAÇÃO DE CNFD EM PLASMA HUMANO

1. INTRODUÇÃO

Na medicina tradicional, plantas contendo naftoquinonas bioativas são amplamente utilizadas para tratamento de câncer e outras doenças (RANI et al., 2022). Esses compostos fenólicos são metabólitos secundários oriundos de plantas, mas também de fungos, algas e animais e apresentam diversas atividades biológicas já descritas na literatura (SILVA et al., 2012). A estrutura molecular desses compostos fenólicos confere a propriedade de óxido-redução (RANI et al., 2022). Dentre as naftoquinonas, destaca-se o lapachol e a lausona, que apresentam várias atividades biológicas e farmacológicas (RANI et al., 2022). Devido a essas atividades biológicas, os derivados de naftoquinonas são atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Em 2010, pesquisadores realizaram a síntese do CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona) a partir da lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona). Inicialmente, foi relatado a atividade antifúngica dessa naftoquinona semissintética (FREIRE et al., 2010b). No entanto, num estudo envolvendo diferentes linhagens celulares, este derivado também apresentou potente atividade antitumoral, especialmente por induzir apoptose celular em células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. Além disso, o CNFD levou à regressão tumoral dos animais em modelo murino de melanoma (B16F10), tornando-se um candidato a um medicamento antineoplásico (DE ALMEIDA et al., 2021).

No desenvolvimento de um novo fármaco, uma das fases importantes é a pré-clínica, que avalia e prevê a toxicidade, a farmacocinética e o metabolismo de um dado composto. Embora o fígado seja o maior responsável pelo metabolismo de fármacos, o plasma também possui as enzimas esterases, que são capazes de biotransformar substâncias endógenas e fármacos (ANAND et al., 2006; MAKHAEVA et al., 2016). O plasma humano tem quatro esterases conhecidas: butirilcolinesterase (BChE), paraoxonase (PON1), albumina e vestígios de acetilcolinesterase (AChE) (LI et al., 2005).

Os estudos de metabolismo *in vitro* necessitam de metodologias analíticas adequadas e eficientes para determinação de parâmetros cinéticos e identificação dos metabólitos. O desenvolvimento do método bioanalítico pode empregar a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por absorção ultravioleta (CLAE-UV), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), utilizando analisadores do tipo triplo quadrupolo (QqQ), eletroforese capilar (EC), bem como outras técnicas analíticas. Para caracterização estrutural dos metabólitos, as técnicas mais utilizadas são a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) com analisador de massa do tipo tempo de voo (TOF,) com ionização por *eletrospray* (ESI), ou analisador de massas do tipo *ion trap* (IT), além de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Korfmacher, 2005).

Para a obtenção de resultados fidedignos, os métodos bioanalíticos devem ser validados previamente. A validação analítica deve garantir que parâmetros avaliados no método atendam aos critérios de aceitação da legislação vigente, ou seja, visa garantir um método confiável e adequado aos objetivos propostos. No entanto, ainda não há um guia específico para as metodologias de estudos de metabolismo *in vitro*. Sendo assim, como critério de aceitabilidade, pode-se utilizar guias de validação, como a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 (ANVISA, 2012).

O metabolismo do CNFD no plasma humano ainda não foi relatado, embora ele possua destacada atividade antitumoral. Assim, este estudo teve como objetivo desenvolver e validar um método bioanalítico, empregando cromatografia líquida de alta eficiência, para avaliar o metabolismo *in vitro* do CNFD pelas enzimas do plasma.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e solventes

O derivado de lausona, CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona) foi cedido pelo Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira (FREIRE et al., 2010). A solução estoque padrão de CNFD foi preparada a 4 mg mL^{-1} em metanol. O plasma humano foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Água ultrapura (18,2 M Ω cm) foi obtida de um Milli-Q Direct-Q3 UV (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os solventes de grau CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) metanol e acetato de etila foram obtidos da Panreac (Castellar Del Vallès, Barcelona, Espanha). Outros

reagentes de grau analítico usados foram tris (hidroximetil) aminometano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Cremophor® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), cloreto de potássio (Mallinckrodt Chemicals, Phillipsburg, NJ, EUA), clorofórmio, hexano, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (Synth, Diadema, SP, Brasil).

2.2 Análise do CNFD por espectrofotometria

O CNFD foi submetido a análises por espectrofotometria ultravioleta-visível, que é uma técnica amplamente utilizada para a análise quantitativa, baseando-se na atenuação de um feixe de radiações pelo analito na solução. Essa técnica permite identificar e determinar a concentração da substância que absorve energia em um solvente (WORSFOLD; ZAGATTO, 2017).

Visto a necessidade de desenvolver um método acessível em vários laboratórios analíticos, um ensaio com o detector ultravioleta foi planejado. Para isso, foi obtido um espectro de varredura do composto na faixa ultravioleta para a determinação do comprimento de onda de maior absorção.

2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para o desenvolvimento do método bioanalítico em plasma, foi empregada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector por absorção ultravioleta (CLAE-UV). O sistema de CLAE Shimadzu (Kyoto, Japão) compreendia um desgaseificador online DGU-20A5, uma unidade de bomba de solvente LC-20AT, um injetor automático SIL-10AF, um forno de coluna CTO-20A, um SPD-M20A (190-800 nm) detector de matriz de diodos e um controlador de sistema CBM-20A. A coluna analítica utilizada foi Zorbax C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula) da Agilent (Califórnia, EUA). Ajustes foram realizados para o alcance de um pico simétrico, separado dos interferentes endógenos e com um tempo de retenção adequado (< 10 min), com adequado processamento das amostras. A separação foi realizada com a fase móvel consistindo em metanol e água ultra pura filtrada (55:45, v/v), vazão de 0,8 mL min⁻¹, temperatura em torno de 25°C e volume de injeção de 10 µL (TABELA 1). A quantificação do CNFD foi executada pelo monitoramento no

comprimento de onda de 260 nm. Os dados foram analisados utilizando o software LC Solution versão 1.25 SP1 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

Tabela 1 - Condições cromatográficas estabelecidas

Parâmetro	Condição otimizada
Coluna	Octadecilsilano (150 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula)
Fase móvel	Metanol e água ultra pura filtrada (55:45, v/v)
Vazão	0,8 mL min ⁻¹
Temperatura de análise	25°C (temperatura ambiente)
Volume de injeção	10 µL
Detecção	260 nm

Fonte: Elaboração própria (2022).

2.4 Avaliação prévia da estabilidade

A estabilidade da CNFD foi avaliada previamente nas condições que seria submetida ao estudo, como incubação a 37°C, luz artificial e secagem por fluxo de ar comprimido. Para realização do ensaio, uma alíquota de 25µL de CNFD, na concentração de 100µg mL⁻¹, foi adicionada em tubos cônicos juntamente com 175µL de metanol, obtendo um volume final de 200µL. Os tubos protegidos da luz foram expostos à incubação a 37°C em banho-maria, sem agitação, por 30 minutos. As amostras devidamente tampadas também foram submetidas à luz artificial, permanecendo na bancada por um período de 6 horas. As amostras expostas à incubação e à luz artificial foram diretamente analisadas no equipamento. As amostras, protegidas da luz, também foram submetidas à condição de secagem por fluxo de ar comprimido, e solubilizadas em metanol (n = 3). Por fim, as amostras foram analisadas em CLAE-DAD e comparadas com um controle recém-preparado. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism, através do teste t Student (não-pareado), com nível de significância de 95% (p < 0,05).

2.5 Avaliação da solubilidade

O ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a solubilidade do CNFD e garantir que a concentração adicionada ao meio estava realmente disponível para as etapas subsequentes. A solubilidade do CNFD foi primeiramente avaliada em solução-tampão Tris-HCl 50mM pH 7,4, que é a solução utilizada no meio plasmático. As amostras de CNFD (25 μ L) e tampão (175 μ L) foram filtradas em membrana de 0,45 μ m de poro e diretamente analisadas por CLAE-DAD, juntamente com solução de CNFD solubilizada em metanol, considerando 100% de solubilidade nesse solvente. Observou-se, então, a porcentagem de CNFD insolúvel em tampão.

Sendo assim, na tentativa de melhorar a solubilidade do CNFD, adicionou-se um agente solubilizante. Para isso, diferentes concentrações de Cremophor® solubilizado em tampão, com concentração final de 0,1% (m/v) e 0,2% (m/v), foram adicionados às amostras filtradas, tendo como volume final 200 μ L (n = 3). As soluções foram analisadas diretamente (sem preparo de amostra) no CLAE-DAD e comparadas com soluções de CNFD na mesma concentração preparadas em metanol (controle). Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism, através do teste t Student (não-pareado), com nível de significância de 95% (p < 0,05).

2.6 Condições de incubação e extração

O meio reacional plasmático foi preparado em tubo cônico e constituído de CNFD em metanol (5 μ L), da solução tampão Tris-HCl pH 7,4 50mM (135 μ L), de solução Cremophor® 1% (m/v) (20 μ L), na concentração final de 0,1% (m/v), e plasma (40 μ L), na concentração final de 20%, completando um volume de 200 μ L. As amostras foram incubadas a 37°C, em banho-maria (Solidsteel, São Paulo, Brasil). Após a incubação, 1,0 mL de acetato de etila foram adicionados ao meio reacional. Em seguida, as amostras foram agitadas por 2 minutos a 1500 rpm em agitador Vibrax VXR® (IKA, Staufen, Alemanha) e centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos a 10°C em centrífuga Eppendorf, (modelo mini spin AG 22331, Hamburgo, Alemanha). A fase orgânica foi coletada (800 μ L) e evaporada sob fluxo de ar comprimido. Por fim, a amostra foi solubilizada em 200 μ L de metanol e submetida à agitação com o auxílio de um agitador de tubo vórtex (IKA, Staufen, Alemanha).

2.7 Recuperação da extração líquido-líquido (ELL)

Para garantir uma extração líquido-líquido eficiente do meio reacional plasmático e uma recuperação adequada do CNFD, foram avaliados alguns solventes orgânicos. Os solventes utilizados foram: acetato de etila, clorofórmio e hexano (n = 3). O cálculo da porcentagem de extração seguiu conforme a Equação 1.

Equação 1

$$\text{Extração (\%)} = \frac{\text{Área solvente}}{\text{Área controle}} \times 100$$

2.8 Validação da metodologia analítica em meio plasmático

O método desenvolvido foi validado tomando como base a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos. Para análise do CNFD no plasma, foram avaliados os parâmetros: linearidade, limite de quantificação, efeito residual, seletividade, recuperação, exatidão, precisão e estabilidade.

O meio plasmático avaliado foi constituído de CNFD em metanol (5 µL), da solução tampão Tris-HCl pH 7,4 50mM (135 µL), de solução Cremophor® 1% (m/v) (20 µL) e plasma (40 µL). As amostras foram submetidas ao procedimento de preparo de amostra e analisadas. As concentrações de CNFD, em meio plasmático, que foram utilizadas para validação da metodologia estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros analíticos da curva de calibração para determinação do CNFD em plasma humano

Concentrações da curva analítica	0,5; 1; 2; 5; 10; 50; 100 µg mL ⁻¹ (2,08; 4,16; 8,33; 20,83; 41,66; 208,3; 416,66 µmol L ⁻¹)
Limite inferior de quantificação (LIQ)	0,5 µg mL ⁻¹ (2,08 µmol L ⁻¹)
Controle de qualidade baixo (CQB)	1,5 µg mL ⁻¹ (6,24 µmol L ⁻¹)
Controle de qualidade médio (CQM)	30 µg mL ⁻¹ (124,98 µmol L ⁻¹)
Controle de qualidade alto (CQA)	80 µg mL ⁻¹ (333,32 µmol L ⁻¹)
Limite superior de quantificação (LSQ)	100 µg mL ⁻¹ (416,66 µmol L ⁻¹)

A linearidade corresponde à relação entre a resposta instrumental (área do pico cromatográfico) e a concentração do analito (CASSIANO et al., 2009). Esse parâmetro foi avaliado no intervalo de concentração do CNFD de 0,5 – 100 µg mL⁻¹ (n = 3) A correlação linear entre as concentrações nominais e a área do CNFD foi avaliada pelo coeficiente de determinação e a equação da reta determinada.

O limite inferior de quantificação (LIQ) é utilizado para demonstrar a capacidade do método em quantificar baixas concentrações de um analito (CASSIANO et al., 2009). Dessa forma, esse parâmetro foi determinado pela análise da menor concentração do CNFD (n = 5) com precisão (desvio padrão relativo percentual) e exatidão (erro relativo percentual) aceitáveis, ou seja, até 20%, de acordo com a Equação 2 e 3.

Equação 2

$$DPR (\%) = \frac{DP}{C_M} \times 100$$

DPR: desvio padrão relativo, DP: desvio padrão e C_M: concentração média.

Equação 3

$$ER (\%) = \frac{C_E - C_N}{C_N} \times 100$$

ER: erro relativo, C_E: concentração experimental e C_N: concentração nominal.

Para avaliação da seletividade do método, foi realizada a injeção de uma amostra branca do meio plasmático (ausência do CNFD) para avaliação da presença de interferentes da matriz no tempo de retenção do analito. Os resultados foram comparados com uma amostra processada com 0,5 µg mL⁻¹ (LIQ).

O efeito residual foi avaliado por meio de uma injeção da amostra branca (ausência CNFD), seguida de uma amostra processada com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LSQ), e por fim mais duas injeções da mesma amostra branca. Admitiu-se até 20% de interferentes no tempo de retenção do CNFD em comparação com as amostras processadas com $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LIQ).

A recuperação é definida como a eficiência de extração do método. Para avaliação da mesma, foram utilizadas três concentrações de CNFD: $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQB), $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQM) e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA). Os resultados das amostras extraídas foram comparados com aqueles obtidos em amostras preparadas em metanol, em que se encontram 100% solúvel.

Para avaliação da precisão e exatidão do método, as concentrações de CNFD de $0,5$ (LIQ), $1,5$ (CQB), 30 (CQM) e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA) foram avaliadas no meio plasmático ($n = 5$). Os ensaios de precisão e exatidão intradia foram realizados no mesmo dia, enquanto os ensaios de precisão e exatidão interdia foram realizados em três dias consecutivos. A quantificação do CNFD foi realizada por meio de curvas de calibração injetadas diariamente. Para avaliação dos resultados, admitiu-se o DPR (%) e o ER (%) em até 20% para o LIQ e até 15% para as outras concentrações.

A estabilidade foi avaliada nas concentrações de $1,5$ (CQB) e $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA) do CNFD em amostras plasmáticas. Para quantificação do CNFD, uma curva de calibração foi preparada no mesmo dia do ensaio. O resultado foi analisado pela comparação da média da concentração experimental com a concentração nominal, que não deve apresentar desvio superior a 15%. Foram avaliadas a estabilidade no (i) auto-injetor por 14 horas e no (ii) armazenamento em geladeira a 8°C por 14 horas.

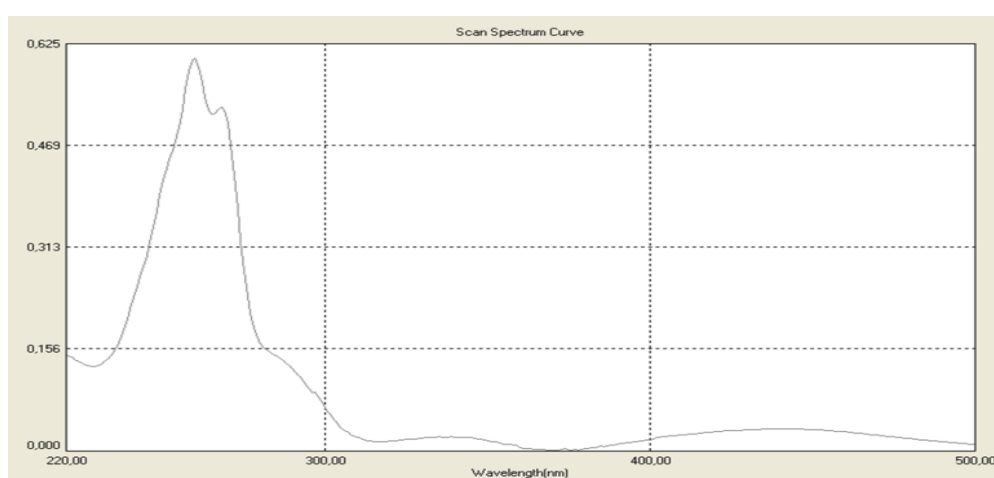
2.9 Estudo da estabilidade metabólica em plasma humano

Para o estudo da estabilidade metabólica do CNFD em plasma humano, foi avaliada a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ do CNFD no meio plasmático ($n = 4$). O meio de incubação seguiu conforme já descrito. No entanto, os tubos foram incubados por 30, 60 e 90 minutos a 37°C em banho-maria antes do procedimento de preparo de amostra. Os resultados foram comparados com um controle sem incubação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento de um método acessível, foi determinado o espectro de varredura na região ultravioleta do CNFD. De acordo com a Figura 1, o comprimento de absorção máximo da substância foi de 260 nm. Desta forma, este comprimento de onda foi selecionado nas etapas posteriores para obtenção de um método mais sensível.

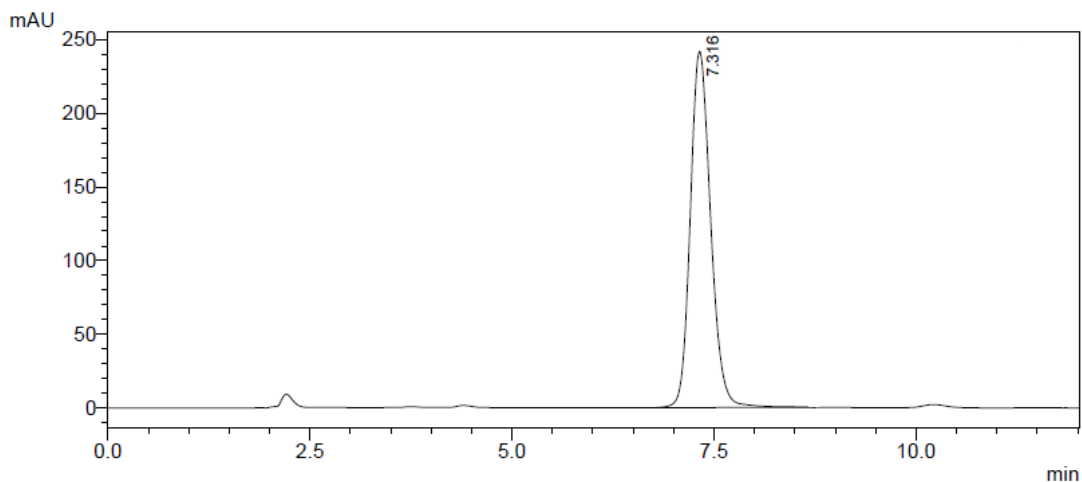
Figura 1 - Espectro de absorção ultravioleta de CNFD ($10\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol). Comprimento de onda máximo: 260nm



3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Foi desenvolvida uma metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) no modo fase reversa para separação e quantificação do CNFD. Como pode ser observado no cromatograma da Figura 2, o tempo de análise total foi de 12 minutos e o tempo de retenção do CNFD foi de 7,3 min.

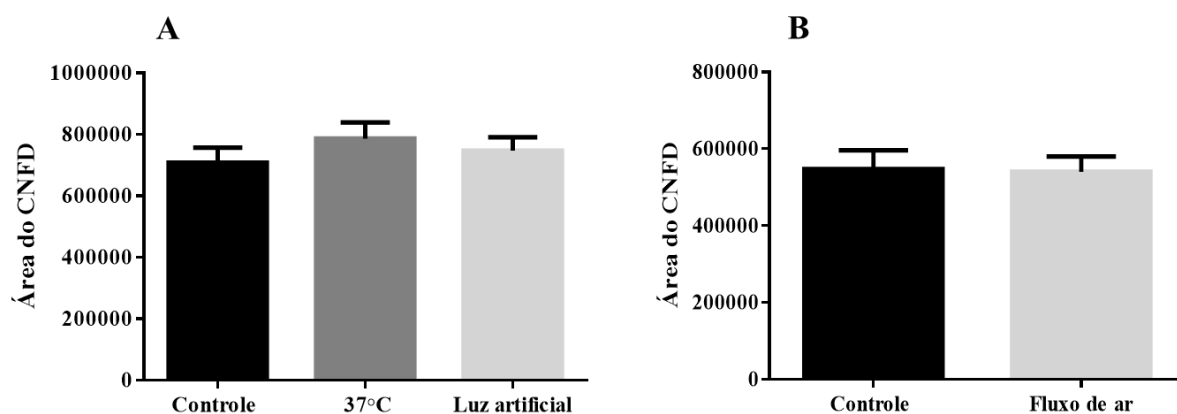
Figura 2 - Cromatograma da análise do CNFD. Condições cromatográficas (CLAE-DAD): coluna analítica Zorbax Agilent C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m, fase móvel metanol: água (55:45, v/v), taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 10 μ L e a temperatura foi de 25 °C. A detecção foi realizada a 260 (A) para CNFD.



3.2 Avaliação prévia da estabilidade

O estudo da estabilidade é importante para garantir que a substância estudada permanece estável nas condições do ensaio e que o decaimento da concentração do CNFD está sendo ocasionado pela atividade das enzimas. Dessa forma, a estabilidade foi avaliada na temperatura de incubação a 37 °C por 30 minutos, na presença de luz artificial a 25°C por 6 horas e no fluxo de ar comprimido. Os resultados podem ser observados na Figura 3.

Figura 3 - Avaliação da estabilidade do CNFD (12,5 μ g mL⁻¹) nas condições de temperatura de incubação a 37°C por 30 minutos, na presença de luz artificial a 25°C por 6 horas (A) e no fluxo de ar comprimido (B)



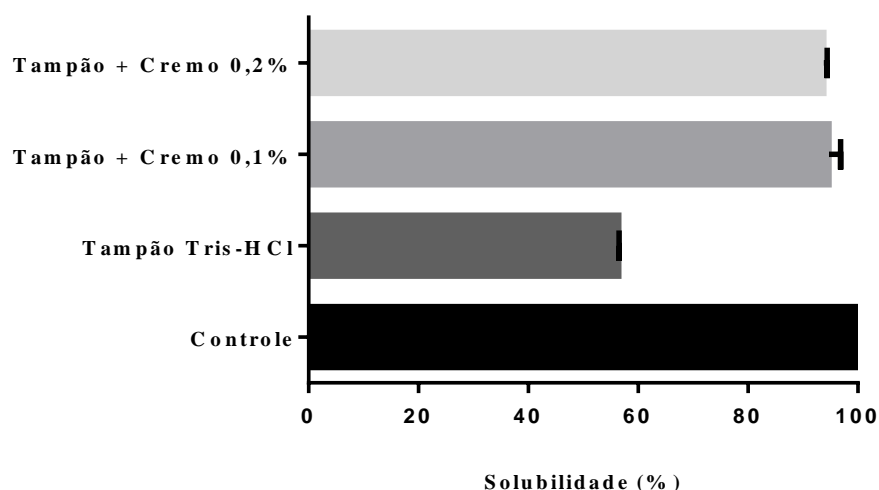
Como pode ser observado, não houve nenhuma variação estatisticamente significativa, pois o valor de $p > 0,05$. Dessa forma, o CNFD permaneceu estável nas condições do estudo.

3.3 Avaliação da solubilidade

A avaliação da solubilidade é um estudo necessário para o desenvolvimento do método, pois a baixa solubilização do composto pode comprometer os resultados. O composto estudado necessita estar disponível para ser metabolizado pelas enzimas.

No caso da CNFD, um ensaio prévio mostrou que a mesma não estava totalmente solúvel no tampão Tris-HCl (pH 7,4; 50mM), que é o tampão empregado no estudo da avaliação do metabolismo no plasma. Sendo assim, foi necessário adicionar o Cremophor® para melhorar a solubilidade do composto estudado. Os resultados do estudo estão apresentados na Figura 4. A solubilidade da CNFD na solução tampão foi de 56,4% em relação ao controle (metanol).

Figura 4 - Avaliação da solubilidade do CNFD (12,5 µg/mL) em solução tampão Tris-HCl (pH 7,4; 50mM), solução tampão Tris-HCl (pH 7,4; 50mM) + 0,1% (m/v) Cremophor® e solução tampão Tris-HCl (pH 7,4; 50mM) + 0,2% (m/v) Cremophor®



Liu e colaboradores (2016) relataram que a adição de Cremophor® auxilia na solubilização de compostos insolúveis em água na descoberta precoce de medicamentos, sem influenciar as características farmacocinéticas dos mesmos (LIU et al., 2016). No entanto, dependendo da concentração utilizada, esse agente solubilizante pode inativar algumas enzimas do metabolismo (CHRISTIANSEN et al., 2011). Segundo Carrão (2015), o Cremophor® até a concentração de 0,25% (m/v)

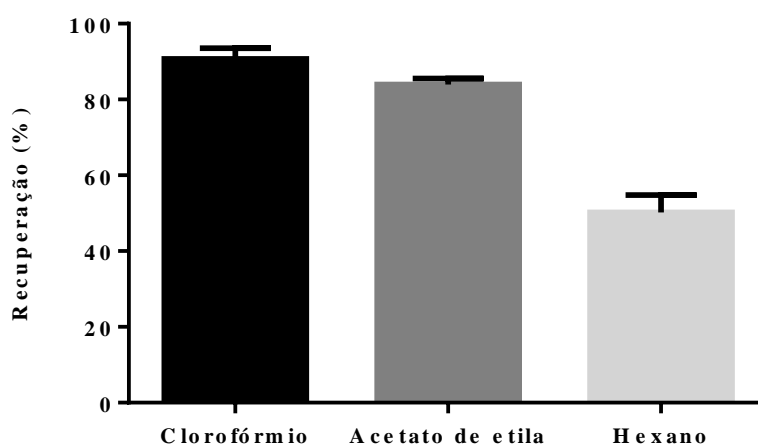
não causa prejuízo à atividade enzimática. Dessa forma, avaliou-se a adição de 0,1% (m/v) e 0,2% (m/v) de Cremophor® ao meio e os resultados obtidos foram satisfatórios, com o CNFD possuindo 94,75% de solubilidade com 0,1% (m/v) e 93,81% com 0,2% (m/v). A análise estatística comprovou que não existem diferenças significativas na relação entre 0,1% (m/v) e 0,2% (m/v) de Cremophor® ($p > 0,05$). Sendo assim, optou-se por utilizar o Cremophor® a 0,1% (m/v).

3.4 Recuperação da extração líquido-líquido (ELL)

A metodologia utilizada para extração do analito do meio plasmático, que é uma matriz complexa, foi a extração líquido-líquido (ELL). Segundo alguns autores, ela é uma técnica simples e de fácil execução, que consiste em separar um componente de uma mistura de líquidos, utilizando solvente de solubilidade diferente (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001; VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007).

Sendo assim, solventes com diferentes polaridades, como hexano, acetato de etila e clorofórmio foram avaliados para extração do CNFD do meio plasmático. Como pode ser visualizado na Figura 5, o clorofórmio apresentou a melhor porcentagem de extração (aproximadamente 90%), seguido do acetato de etila (78%) e, por último, do hexano (50%). Este resultado é compatível com os dados preliminares de polaridade da substância de interesse (média polaridade).

Figura 5 - Avaliação do solvente extrator na ELL do CNFD em plasma



Apesar de o clorofórmio apresentar a melhor taxa de extração, o extrato teve mais interferentes extraídos, o que pode dificultar a análise. Além disso, por ser um solvente halogenado de alto custo, de difícil descarte e recuperação, bem como de alta toxicidade para o ser humano (JOSE; RAMANUJAM; PHILIP, 2018), optou-se por utilizar o acetato de etila como solvente extrator.

3.5 Validação da metodologia analítica em plasma humano

A validação analítica é importante para assegurar a obtenção de dados respaldados, com rigor técnico e reprodutibilidade suficiente (ANVISA, 2012). Dessa forma, alguns parâmetros importantes foram avaliados para garantir uma metodologia que apresente resultados fidedignos.

As concentrações utilizadas para avaliação da linearidade da metodologia desenvolvida foram 0,5, 1, 2, 5, 10, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as concentrações apresentaram resultados de precisão (DPR%) e exatidão (ER%) inferior a 15% e coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99, conforme especificado pela legislação vigente (ANVISA, 2012). Dessa forma, a curva de calibração desenvolvida apresenta linearidade adequada para os estudos de avaliação do metabolismo do CNFD em plasma. O resultado da linearidade está exposto na Tabela 3.

Na metodologia desenvolvida, o limite inferior de quantificação do CNFD em meio plasmático foi de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o erro relativo percentual (ER %) foi de -7% e o desvio padrão relativo percentual (DPR %) foi de 7%. Sendo assim, os valores obtidos estiveram abaixo de 20%, estando, portanto, dentro dos limites de precisão e exatidão aceitáveis pela ANVISA (2012).

O parâmetro recuperação foi utilizado para avaliar a capacidade do método de tratamento da amostra, ou seja, da extração líquido-líquido. A amostra de 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CQB) apresentou extração de 78,57%, enquanto a de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CQM) e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA) apresentaram 82,01% e 86,86%, respectivamente (Tabela 3). Esses valores encontram-se desejáveis, com a recuperação consistente, precisa e reprodutiva. Dessa forma, a metodologia de tratamento da amostra desenvolvida está adequada ao método.

A estabilidade do CNFD foi avaliada utilizando condições em que o mesmo será submetido nos estudos de metabolismo *in vitro*. As amostras preparadas foram mantidas no auto-injetor por 14 horas e também em geladeira a 8 °C por 14 horas.

A estabilidade do CNFD apresentou valores de precisão adequados, porém não exibiu resultados satisfatórios para exatidão, apresentando erro relativo acima do permitido para legislação vigente ($\pm 15\%$). Sendo assim, é possível que as soluções-estoque de CQB e CQA tenham perdido a estabilidade pelo tempo de armazenamento.

A precisão de um método bioanalítico refere-se à proximidade dos resultados obtidos por repetidas análises da mesma amostra e pode ser expressa como desvio padrão relativo percentual (DPR %). O parâmetro exatidão está relacionado com a concordância entre o valor encontrado no ensaio e o valor verdadeiro da concentração do analito, sendo expresso como erro relativo percentual (ER %) (ANVISA, 2012; Cassiano et al. 2009). Para avaliação da precisão e exatidão da metodologia desenvolvida, foram utilizadas as concentrações $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LIQ), $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQB), $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQM), $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CQA) e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LSQ).

Os experimentos intradia e interdia apresentaram valores de precisão dentro dos valores especificados pela legislação, com exceção da precisão interdia na concentração de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, os resultados de exatidão foram superiores aos valores aceitáveis pela ANVISA (2012). Sendo assim, o método apresentou exatidão adequada. Isso pode ter acontecido pelo tempo de armazenamento das soluções estoque, sendo necessária a repetição do ensaio com soluções estoque recém-preparadas. No entanto, não foi possível a realização do ensaio.

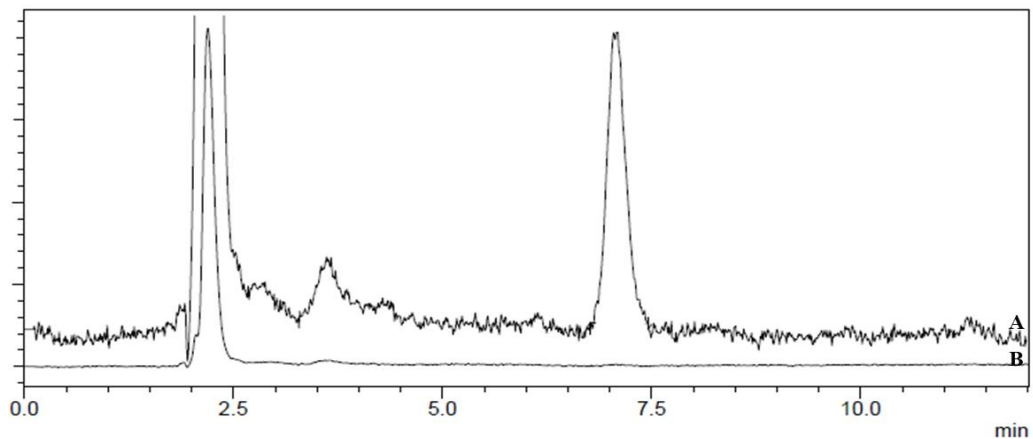
Tabela 3: Parâmetros de validação do método CNFD em meio plasmático

Linearidade (n=3)		
Equação linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$y = 46965x - 12545$	
Faixa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5 – 100	
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9999	
Limite de quantificação (n=5)		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5	
Precisão DPR (%)	7	
Exatidão RE (%)	-7	
Recuperação (n = 3)		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,5	
Recuperação (%)	78,57	
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	30	
Recuperação (%)	82,01	
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	80	
Recuperação (%)	86,86	
Estabilidade (n = 4)		
Incubação 8 °C por 14 horas		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,5	
Precisão DPR (%)	7	
Exatidão ER (%)	50	
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	80	
Precisão DPR (%)	7	
Exatidão ER (%)	-25	
Incubação auto-injetor por 14 horas		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,5	
Precisão DPR (%)	9	
Exatidão ER (%)	48	
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	80	
Precisão DPR (%)	9	
Exatidão ER (%)	-19	
Precisão DPR (%) (n=5)		
	Intradia	Interdia
0,5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1	20
1,5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3	17
30 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6	12
80 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	9	8
100 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6	7
Exatidão ER (%) (n=5)		
	Intradia	Interdia
0,5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	256	220
1,5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	52	38
30 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-25	-31
80 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-17	-16
100 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-0	0

DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

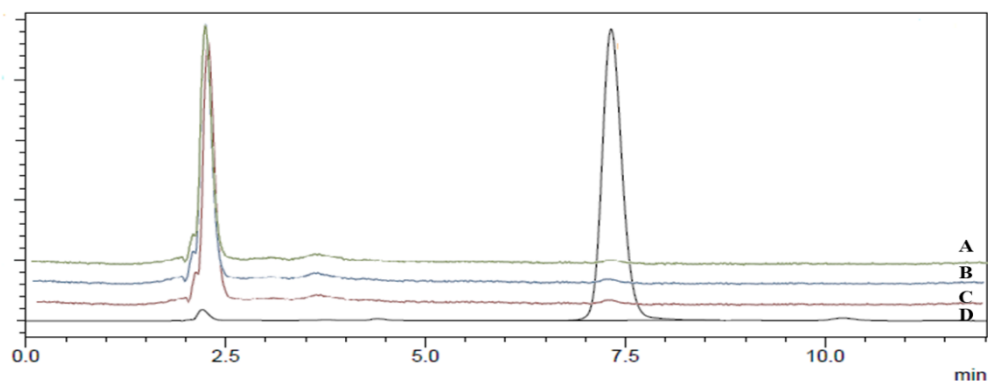
A seletividade é a capacidade de um método de identificar e avaliar a substância de interesse na presença de componentes que podem interferir na determinação da mesma, como outra substância ativa, excipientes, impurezas ou compostos endógenos (CASSIANO et al., 2009). Sendo assim, como pode ser observado na Figura 6, o método desenvolvido apresentou-se seletivo, pois não houve qualquer interferente no mesmo tempo de retenção do CNFD.

Figura 6 - Seletividade da metodologia analítica para o CNFD em plasma (A) CNFD ($0,5\mu\text{g mL}^{-1}$), (B) Branco



A metodologia desenvolvida deve garantir que as amostras analisadas não estão apresentando aparecimento ou aumento de sinal do analito por contaminação de amostras analisadas anteriormente (ANVISA, 2012). Como pode ser visualizado na Figura 7, o método desenvolvido neste estudo não apresentou efeito residual, pois as amostras brancas analisadas antes e depois da amostra de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ (LSQ) não apresentaram resíduo de CNFD. Portanto, pode-se garantir que análises com muitas amostras não sofrerão interferências das análises anteriores.

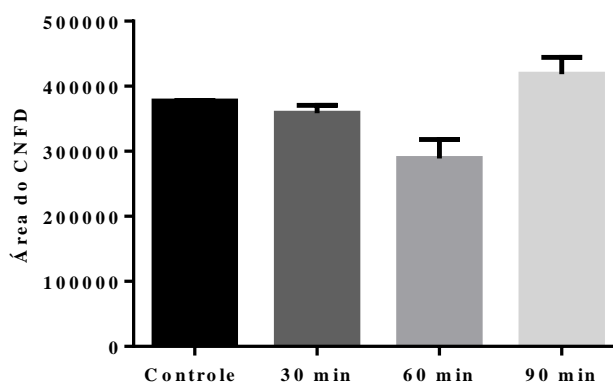
Figura 7 - Efeito residual da metodologia analítica do CNFD em plasma (A) Branco anterior à amostra, (B e C) Branco posterior à amostra, (D) CNFD ($100\mu\text{g mL}^{-1}$)



3.6 Estudo prévio da estabilidade metabólica em plasma humano

Após o desenvolvimento do método, um estudo prévio do metabolismo do CNFD em plasma foi realizado em três diferentes tempos de incubação. Como pode ser observado na Figura 8, nos tempos de 30 e 90 minutos não houve diferença estatística significativa em relação ao controle. No entanto, no tempo de 60 minutos, houve um decréscimo da área do sinal do CNFD em relação ao controle. O ensaio foi repetido comparando-se o controle com o metabolismo no tempo de 60 minutos e novamente houve um resultado semelhante, sendo estatisticamente diferente. Com essa informação, é provável que o CNFD sofra metabolismo por enzimas presentes no plasma humano ou sofra degradação.

Figura 8 - Estudo prévio do metabolismo do CNFD ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) em plasma humano nos tempos de 30, 60 e 90 minutos



Não foi possível dar continuidade à pesquisa e aprofundar os experimentos em relação ao metabolismo e validação de método, devido a uma série de dificuldades em relação aos equipamentos e à pandemia do Covid-19.

4. CONCLUSÃO

O método desenvolvido para determinação do metabolismo do candidato a fármaco CNFD no plasma humano apresentou linearidade, seletividade, precisão, efeito residual e recuperação adequadas. No entanto, o parâmetro exatidão não foi adequado para validação do método. No estudo prévio do metabolismo em meio plasmático, o CNFD teve um decréscimo do sinal comparando-se ao controle. Não foi

possível determinar se houve metabolismo ou degradação dele durante o tempo de incubação de 60 minutos. Apesar das dificuldades, esses resultados podem ser úteis para futuros estudos.

5. REFERÊNCIAS

ANAND, Sathanandam S.; BRUCKNER, James V.; HAINES, Wendy T.; MURALIDHARA, Srinivasa; FISHER, Jeffrey W.; PADILLA, Stephanie. Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], v. 212, n. 2, p. 156–166, 2006. DOI: 10.1016/j.taap.2005.07.021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria colegiada. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Resolução número 27, de 17 de maio de 2012.

CARRÃO, D. B. Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepelin C, empregando microssomas hepáticos. 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – São Paulo.

CASSIANO, Neila Maria; BARREIRO, Juliana Cristina; MARTINS, Lucia Regina Rocha; OLIVEIRA, Regina Vincenzi; CASS, Quezia Bezerra. Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices. **Quimica Nova**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000400033. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000400033&script=sci_arttext&tlng=es%5Cn%3CGo to ISI%3E://WOS:000267331400033%5Cn<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n4/v32n4a33.pdf>.

CHRISTIANSEN, Anne; BACKENSFELD, Thomas; DENNER, Karsten; WEITSCHIES, Werner. Effects of non-ionic surfactants on cytochrome P450-mediated metabolism in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 166–172, 2011. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.12.033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.033>.

DE ALMEIDA, Patricia D. O. et al. A new synthetic antitumor naphthoquinone induces ROS-mediated apoptosis with activation of the JNK and p38 signaling pathways. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 343, n. September 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109444.

FREIRE, Cristina Pessoa Veloso; FERREIRA, Sabrina Baptista; DE OLIVEIRA, Nivea Suely Melo; MATSUURA, Ani Beatriz Jackisch; GAMA, Ivson Lelis; DA SILVA, Fernando De C.; DE SOUZA, Maria Cecília B. V.; LIMA, Emerson Silva; FERREIRA, Vitor Francisco. Synthesis and biological evaluation of substituted α - And β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. **MedChemComm**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 229–232, 2010. a. DOI: 10.1039/c0md00074d.

JOSE, Jerin; RAMANUJAM, Sarathi; PHILIP, Ligy. Applicability of pulsed corona discharge treatment for the degradation of chloroform. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], 2018. DOI: 10.1016/j.cej.2018.10.199. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.199>.

KORFMACHER, W. A. 2005. Foundation review: principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, 10, 20, 1357-1367, 2005.

LIU, Bo; GORDON, William Perry; RICHMOND, Wendy; GROESSL, Todd; TUNTLAND, Tove. Use of solubilizers in preclinical formulations: Effect of Cremophor EL on the pharmacokinetic properties on early discovery compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 87, p. 52–57, 2016. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.10.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.015>.

MAKHAEVA, Galina F.; RUDAKOVA, Elena V.; SEREBRYAKOVA, Olga G.; AKSINENKO, Alexey Yu; LUSHCHEKINA, Sofya V.; BACHURIN, Sergey O.; RICHARDSON, Rudy J. **Esterase profiles of organophosphorus compounds in vitro predict their behavior in vivo**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2016. v. 259 DOI: 10.1016/j.cbi.2016.05.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.05.002>.

QUEIROZ, Sonia C. N.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001. DOI: 10.1590/S0100-40422001000100013.

RANI, Ruma; NARSIMAN, Balasubramanian; VARMA, Rajender S.; KUMAR, Rajender. Gum-based nanocapsules comprising naphthoquinones enhance the apoptotic and trypanocidal activity against *Trypanosoma evansi*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], p. 106118, 2022. DOI: 10.1016/j.ejps.2022.106118. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106118>.

SILVA, Ana Maria Pereira Da; PAIVA, Selma Ribeiro De; FIGUEIREDO, Maria Raquel; KAPLAN, Maria Auxiliadora Coelho. Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos**, [S. l.], v. 7, n. 04, p. 207–215, 2012. Disponível em: <http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/154/152>.

SINGH, Gursharan. **Preclinical Drug Development**. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-802103-3.00004-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802103-3.00004-3>.

SOUSA, Eliane Teixeira; LOPES, Wilson A.; DE ANDRADE, Jailson B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016. DOI: 10.5935/0100-4042.20160034.

VIEIRA, Heulla Pereira; NEVES, Antônio Augusto; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro De. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição

em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000300006.

WORSFOLD, Paul. J.; ZAGATTO, Elias. A. G. **Spectrophotometry: Overview** ☆. 3. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14265-9. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472142659>.

CAPÍTULO 3
METABOLISMO DO CYP450 DE UMA NAFTOQUINONA
SEMISSINTÉTICA, UM CANDIDATO A MEDICAMENTO
ANTICÂNCER, POR MICROSSOMAS HEPÁTICOS
HUMANOS

Este capítulo está formatado na forma de artigo e foi aceito para publicação na revista "Journal of the Brazilian Chemical Society" (ISSN 1678-4790)

CAPÍTULO 3

METABOLISMO DO CYP450 DE UMA NAFTOQUINONA SEMISSINTÉTICA, UM CANDIDATO A MEDICAMENTO ANTICÂNCER, POR MICROSSOMAS HEPÁTICOS HUMANOS

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. É a primeira ou a segunda causa de morte prematura em 134 países^{1,2}. Geralmente, o tratamento quimioterápico atualmente disponível para o câncer ainda é ineficiente, com alta toxicidade e baixa seletividade. Assim, torna-se necessária a busca por novos antineoplásicos mais eficazes, seletivos e de baixa toxicidade^{3,4}. Nesse contexto, moléculas derivadas de plantas, como as naftoquinonas, são candidatas promissoras para novos agentes anticâncer⁵.

As naftoquinonas são metabólitos secundários de plantas que apresentam atividades biológicas consideráveis, como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antimalárica e antitumoral⁵⁻⁸. Dentre as naftoquinonas naturais, a lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), encontrada nas folhas de *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae), uma planta conhecida como hena, destaca-se pelas folhas sendo amplamente utilizada como corante natural para pele e cabelo^{5,9}. Os derivados de lausona são atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos devido ao amplo espectro de suas atividades biológicas¹. Várias propriedades farmacológicas deles já foram relatadas, como antibacteriana¹⁰, antifúngica¹¹ e antitumoral¹².

O CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona) (Figura 1) é uma naftoquinona sintetizada a partir de lausona com notável atividade antifúngica¹³. Além disso, este derivado também demonstrou potencial como agente antineoplásico em diferentes linhagens celulares, especialmente em células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 com um CI 50 menor 1 µM. O CNFD tem a capacidade de induzir a apoptose celular. Em um estudo *in vivo* utilizando um modelo murino de melanoma (B16F10), o CNFD levou à regressão tumoral dos animais (inibição de 46, 50 e 52% nas doses de 10, 30 e 60 mg/ Kg/dia, respectivamente), tornando-se um candidato a um medicamento antineoplásico¹⁴. Uma patente, relacionada às propriedades antineoplásicas do CNFD, já foi depositada sob o número de registro BR10201700717.

Durante o desenvolvimento de novos medicamentos, os candidatos a medicamentos devem passar por estudos pré-clínicos para obter o maior conhecimento possível sobre as propriedades farmacológicas, farmacocinéticas e toxicidade¹⁵. Nesse contexto, a contribuição das enzimas do citocromo P450 (CYP450) para o metabolismo desse novo candidato é fundamental, uma vez que essas enzimas são responsáveis pelo metabolismo da maioria dos fármacos comercializados¹⁶. Estudos *in vitro* e *in silico* durante a descoberta de medicamentos podem ser úteis para prever questões relacionadas à segurança de medicamentos, como parâmetros farmacocinéticos e interações medicamentosas^{17,18}.

Os medicamentos antitumorais têm baixa especificidade, ou seja, não afetam apenas as células cancerígenas, mas também as células normais. Os metabólitos formados pelo metabolismo dessas drogas podem induzir diversos efeitos adversos, incluindo outros problemas graves e até a morte do paciente¹⁹.

Apesar da atividade antitumoral do CNFD, sua via metabólica no corpo humano não foi relatada. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o metabolismo *in vitro* do CNFD pelas enzimas CYP450, incluindo elucidação do perfil cinético enzimático, identificação das principais isoformas do CYP450 responsáveis pelo seu metabolismo e predição de parâmetros farmacocinéticos *in vivo*. Além disso, prevê os locais de metabolismo do CNFD pelas enzimas CYP e os possíveis metabólitos formados *in silico*.

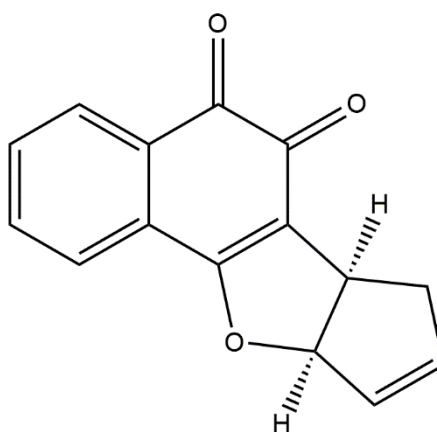


Figura 1: Estrutura química do CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e solventes

O derivado de lausona, CNFD (6b, 7-dihidro-5H-ciclopenta [b] nafto [2,1-d] furano-5,6 (9aH) -diona), foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Vitor Francisco Ferreira¹³. A solução estoque padrão de CNFD foi preparada a $4000 \mu\text{mol L}^{-1}$ em metanol. A fenacetina ($\geq 98,0\%$), usada como padrão interno (PI), foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A solução estoque padrão de fenacetina foi preparada a $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em metanol. O plasma humano foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e os microssomas de fígado humano (HLMs) (*pool* de 150 doadores) e isoformas CYP450 (rCYP450) recombinantes (Supersomes®) foram adquiridos da Corning Life Science (Phoenix, AZ, EUA). Água ultrapura ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) foi obtida de um Milli-Q Direct-Q3 UV (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os solventes de grau CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) metanol e acetato de etila foram obtidos da Panreac (Castellar Del Vallès, Barcelona, Espanha). O sal de sódio de glicose-6-fosfato, glicose-6-fosfato desidrogenase e fosfato de dinucleotídeo de β -nicotinamida e adenina (NADP^+), componentes do sistema de cofator NADPH (fosfato de dinucleotídeo de β -nicotinamida e adenina) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções foram preparadas em um tampão tris-KCl (tris (hidroximetil) aminometano $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e KCl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) nas seguintes concentrações: glicose-6-fosfato (50 mmol L^{-1}), e glicose-6-fosfato desidrogenase ($8,0 \text{ U mL}^{-1}$) e NADP^+ ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Outros reagentes de grau analítico usados foram tris (hidroximetil) aminometano (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), Cremophor® (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), cloreto de potássio (Mallinckrodt Chemicals, Phillipsburg, NJ, EUA), fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico (Synth, Diadema, SP, Brasil).

2.2 Condições de incubação microssomal

O meio de incubação microssomal consistiu no substrato (CNFD), sistema de cofator NADPH, HLMs ou rCYP450 e tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) com 0,1% (m/v) de Cremophor®, em um volume final de $200 \mu\text{L}$. As amostras foram pré-incubadas por 5 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, em banho-maria. O metabolismo foi iniciado pela

adição do sistema cofator NADPH. Após o tempo de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de acetato de etila e 50 µL de padrão interno (PI). Em seguida, as amostras foram agitadas por 15 min a 1500 rpm em um agitador Vibrax VXR® (IKA, Staufen, Alemanha) e centrifugadas a 1800 x g por 15 minutos a 4 ° C em uma centrífuga HIMAC CF15D2 (Hitachi, Tóquio, Japão) Em seguida, a fase orgânica foi coletada e evaporada empregando um concentrador de amostras à vácuo (modelo Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O resíduo final foi reconstituído na fase móvel e analisado por HPLC.

2.3 CLAE

O sistema de CLAE Shimadzu (Kyoto, Japão) compreendia um desgaseificador online DGU-20A5, uma unidade de bomba de solvente LC-20AT, um injetor automático SIL-10AF, um forno de coluna CTO-20A, um SPD-M20A (190-800 nm) detector de matriz de diodos e um controlador de sistema CBM-20A. A separação foi realizada usando uma coluna de guarda Ascentis Express C18 (3,0 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e uma coluna analítica Ascentis Express Fused Core C18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) e (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). A fase móvel consistia em metanol: água (55:45, v/v) com vazão de 0,8 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 30 µL e a temperatura de análise de 30 °C. A detecção foi realizada a 260 e 247 nm para CNFD e PI, respectivamente. Os dados foram coletados usando o software LC Solution 1.25 SP1 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

2.4 Validação de método

O método analítico foi validado de acordo com a diretriz da ANVISA sobre validação de método bioanalítico²⁰. Os parâmetros avaliados foram linearidade, limite de quantificação, efeito residual, seletividade, exatidão, precisão e estabilidade.

A linearidade foi avaliada para as seguintes concentrações de CNFD: 0,3 (limite inferior de quantificação - LIQ), 2,56 (controle de qualidade baixo - CQB), 10,07 (controle de qualidade - CQ), 20,14 (controle de qualidade médio - CQM), 80,59 (controle de qualidade alto - CQA) e 100,73 µmol L⁻¹ (limite superior de quantificação - LSQ). As curvas de calibração foram construídas plotando a área normalizada versus concentração de CNFD. A curva analítica foi ponderada (fator de peso 1/ X²) e o

coeficiente de correlação (r) e a equação de regressão linear foram calculados. Além disso, a linearidade foi avaliada por meio de uma análise da validade da regressão e o teste de falta de ajuste (ANOVA *lack of fit*), calculando os valores de F e p com o Minitab 16 Statistical Software (State College, PA, EUA). O limite de quantificação foi determinado analisando a menor concentração do CNFD com desvio padrão relativo (DPR) e erro relativo (ER) inferior a 20%. O efeito residual foi avaliado avaliando a presença de interferências no CNFD e no tempo de retenção do PI. A seletividade foi avaliada analisando uma amostra em branco do meio microssomal (sem CNFD e PI) para avaliar a presença de interferentes da matriz. A exatidão e precisão intradia ($n = 5$) e interdía ($n = 5$) foram avaliadas para os níveis LIQ, CQB, CQM, CQA e LSQ. Os resultados eram aceitáveis se DPR e ER fossem menores que 20% para o LIQ e menores que 15% para os outros níveis de concentração. A estabilidade foi avaliada em condições de incubação (37 ° C por 60 minutos) e autoinjeter por 24 horas, para as amostras CQB e LSQ.

2.5 Cinética enzimática

A cinética enzimática do metabolismo do CNFD pelas enzimas CYP450 ($n = 4$) foi determinada em condições de velocidade inicial (concentração de proteína microssomal de 0,20 mg mL⁻¹ e tempo de incubação de 60 min) para a seguinte faixa de concentração de CNFD: 0,15 - 80 µmol L⁻¹. Após o metabolismo, as amostras foram analisadas e quantificadas por CLAE, utilizando uma curva de calibração ($n = 3$), elaborada no mesmo dia do estudo. A taxa de reação enzimática, para cada concentração de CNFD, foi determinada pela normalização da concentração de CNFD encontrada pela concentração de proteína e tempo de incubação. Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico de taxa de reação enzimática versus concentração de CNFD e analisados por regressão não linear em modelos enzimáticos, utilizando o programa GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, EUA). Os parâmetros cinéticos enzimáticos da reação de metabolismo foram obtidos e a depuração intrínseca *in vitro* ($CL_{INT, in vitro}$) foi calculada pela Equação 1.²¹ Em seguida, o $CL_{INT, in vitro}$ foi extrapolado para a depuração intrínseca do fígado *in vivo* ($CL_{INT, in vivo}$), de acordo com a Equação 2.²²

Equação 1

$$CL_{INT, \text{ in vitro}} = \frac{V_{MAX}}{S_{50}} \times \frac{(h - 1)}{h (h - 1)^{1/h}}$$

$CL_{INT, \text{ in vitro}}$: clearance intrínseco *in vitro*; V_{MAX} : velocidade máxima da reação enzimática; S_{50} : concentração do substrato onde V corresponde à metade de V_{MAX} ; h: coeficiente de Hill.

Equação 2

$$CL_{INT, \text{ in vivo}} = CL_{INT, \text{ in vitro}} \times \frac{40 \text{ mg proteínas microssomais}}{\text{g fígado}} \times \frac{21,4 \text{ g fígado}}{\text{kg corporal}}$$

$CL_{INT, \text{ in vivo}}$: clearance intrínseco *in vivo* e $CL_{INT, \text{ in vitro}}$: clearance intrínseco *in vitro*.

2.6 Predição de parâmetros farmacocinéticos in vivo

Para a predição dos parâmetros farmacocinéticos *in vivo*, a porcentagem de ligação de CNFD às proteínas plasmáticas e microssomais foi determinada utilizando a concentração de substrato abaixo do valor S_{50} determinado na cinética enzimática. O meio microssomal foi preparado com o substrato, HLMS ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) e tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) com 0,1% (m/v) de Cremophor®. O meio plasmático consistia em substrato e plasma humano (concentração de proteína 42 mg mL^{-1}). Amostras controle (na ausência de plasma ou proteínas microssomais) foram preparadas com o substrato e tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) com 0,1% (m/v) de Cremophor®. Todas as amostras foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 min. Após incubação, as amostras foram submetidas à ultracentrifugação a $1.50060 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 h, em Beckman Optima XL-100K (Brea, CA, EUA). O sobrenadante foi coletado, submetido ao preparo da amostra e analisado por CLAE. A fração não ligada do substrato (f_u) foi determinada de acordo com a Equação 3.²³

Equação 3

$$f_u = \frac{C_A}{C_C}$$

f_u : fração não ligada do substrato, C_A : concentração da amostra e C_C : concentração do controle

Usando os resultados obtidos: fração não ligada do substrato em microssoma e plasma, $CL_{INT, \text{ in vivo}}$ e o fluxo sanguíneo hepático (Q) $20 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ²⁴, os parâmetros farmacocinéticos *in vivo*: depuração hepática (CLH) e a taxa de extração hepática (EH) foram calculadas usando a Equação 4 e a Equação 5, respectivamente.²²

Equação 4

$$CL_H = \frac{Q \frac{f_{u,p}}{f_{u,m}} CL_{INT, \text{ in vivo}}}{Q + \left(\frac{f_{u,p}}{f_{u,m}} CL_{INT, \text{ in vivo}} \right)}$$

CL_H: clearance hepático, Q: fluxo sanguíneo hepático, f_{u,p}: fração não ligada do substrato no plasma, f_{u,m}: fração não ligada do substrato em meio microsomal e CL_{INT, in vivo}: clearance intrínseco in vivo.

Equação 5

$$E_H = \frac{CL_H}{Q}$$

E_H: taxa de extração hepática, CL_H: clearance hepático e Q: fluxo sanguíneo hepático.

2.7 Fenotipagem CYP450

A determinação das principais isoformas do CYP450 humano responsáveis pelo metabolismo do CNFD foi realizada com o rCYP450. O substrato foi incubado com uma isoforma rCYP450 (50 pmol mL⁻¹) (rCYP1A2, rCYP2B6, rCYP2C8, rCYP2C9, rCYP2C19, rCYP2D6, rCYP2E1, rCYP3A4 ou rCYP5). Foram preparados controles contendo células de inseto em vez da isoforma rCYP450. A mistura foi incubada a 37 °C durante 60 min e a reação foi parada pela adição de acetato de etila. A preparação da amostra e a análise por CLAE foram realizadas conforme descrito anteriormente. As amostras foram quantificadas por meio de curvas analíticas preparadas no mesmo dia e as taxas de reação foram determinadas. Para obter a taxa normalizada (TN) (Equação 6), foi considerada a abundância de cada isoforma CYP450 em microsomas de fígado humano. A taxa normalizada total (TNT) para cada isoforma foi obtida pela razão de TN para a soma de TN de todas as isoformas do CYP450 (Equação 7) [24].

Equação 6

$$TN = v_{rCYP450} \times Abundância_{(CYP450)}$$

TN: taxa normalizada de cada isoforma do CYP450 e v_{rCYP450}: velocidade da reação enzimática para cada isoforma do CYP450.

Equação 7

$$\%TNT = \frac{TN \times 100}{\sum TN}$$

%TNT: porcentagem da taxa normalizada total e TN: taxa normalizada.

2.8 Predição do metabolismo usando o software SMARTCyp

A previsão dos sítios de metabolismo do CNFD pelas enzimas CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9 foi realizada usando o servidor online SMARTCyp (<http://smartcyp.sund.ku.dk/>). Quanto menor a energia de ativação, maior a probabilidade de um local ser metabolizado.²⁶

O CNFD foi submetido a um servidor online, o MetaTox (<http://www.way2drug.com/mg/>), por meio de um desenho bidimensional em um banco de dados para prever os possíveis locais de metabolismo, a partir das reações de fase 1 (oxidação, redução e hidroxilação) e fase 2 (conjugação).²⁷

3. RESULTADOS

3.1 Validação de método

O cromatograma da análise do CNFD pode ser visualizado na Figura 2. A curva de calibração desenvolvida apresentou linearidade adequada para estudos de avaliação do metabolismo do CNFD em meio microssomal. O teste de falta de ajuste mostrou que a curva analítica obedece a um modelo linear. O limite inferior de quantificação de CNFD em meio microssomal foi de $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. O método foi seletivo e não foi observado efeito residual. A precisão e exatidão intradia e interdia foram inferiores a 7% para todas as concentrações. Os resultados de estabilidade garantiram a estabilidade do CNFD nas condições de incubação e autoinjeter, uma vez que tanto o ER quanto o DPR foram inferiores a 8% (Tabela 1).

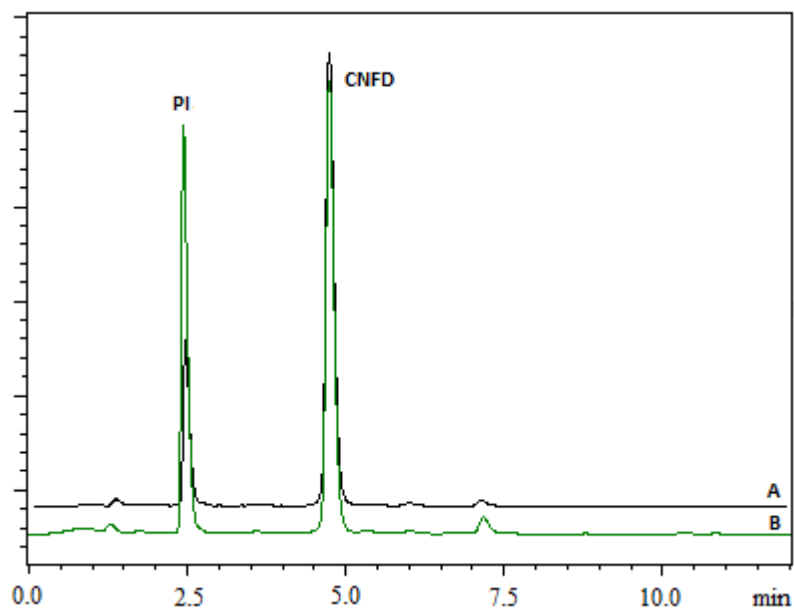


Figura 2: Cromatograma da análise do CNFD. Condições cromatográficas (HPLC-DAD): coluna de guarda Ascentis Express C18 (3,0 mm x 4,6 mm, 2,7 μ m) e uma coluna analítica Ascentis Express Fused Core C18 (100 mm x 4,6 mm, 2,7 μ m), fase móvel metanol: água (55:45, v/v), taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 30 μ L e a temperatura foi de 30 °C. A detecção foi realizada a 260 (A) para CNFD e 247 nm (B) para PI.

Tabela 1: Limites de confiança obtidos para a análise do método CNFD em meio microssomal.

Linearidade (n=5)		
Equação linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$y = 0,1027x + 0,0027$	
Faixa ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,3 – 100,73	
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9994	
<i>Lack of fit</i>	F = 1,73; p = 0.208	
Limite de quantificação (n=5)		
Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,3	
Precisão DPR (%)	7	
Exatidão RE (%)	7	
Estabilidade (n=3)		
Incubação 37 °C por 60 minutos		
Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,56 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
Precisão DPR (%)	0	
Exatidão ER (%)	-8	
Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	80,59 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
Precisão DPR (%)	2	
Exatidão ER (%)	1	
Incubação auto-injetor por 24 horas		
Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,56 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
Precisão DPR (%)	1	
Exatidão ER (%)	-3	
Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	80,59 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
Precisão DPR (%)	1	
Exatidão ER (%)	0	
Precisão DPR (%) (n=5)		
	Intradia	Interdia
0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$	7	6
2,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3	2
20,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3	3
80,59 $\mu\text{mol L}^{-1}$	5	3
100,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$	7	5
Exatidão ER (%) (n=5)		
	Intradia	Interdia
0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$	7	3
2,56 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0	0
20,14 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4	4
80,59 $\mu\text{mol L}^{-1}$	6	6
100,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0	-5

DPR: desvio padrão relativo; ER: erro relativo.

3.2 Cinética enzimática

A cinética enzimática do metabolismo CNFD por HLMs demonstrou um perfil cinético sigmoidal (Figura 3). Os parâmetros enzimáticos foram $V_{MAX} = 8,6 \pm 1,7 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$, $S50 = 137,1 \pm 36,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e um coeficiente de Hill de $1,23 \pm 0,05$. O gráfico de Eadie-Hofstee resultou em uma curva convexa.

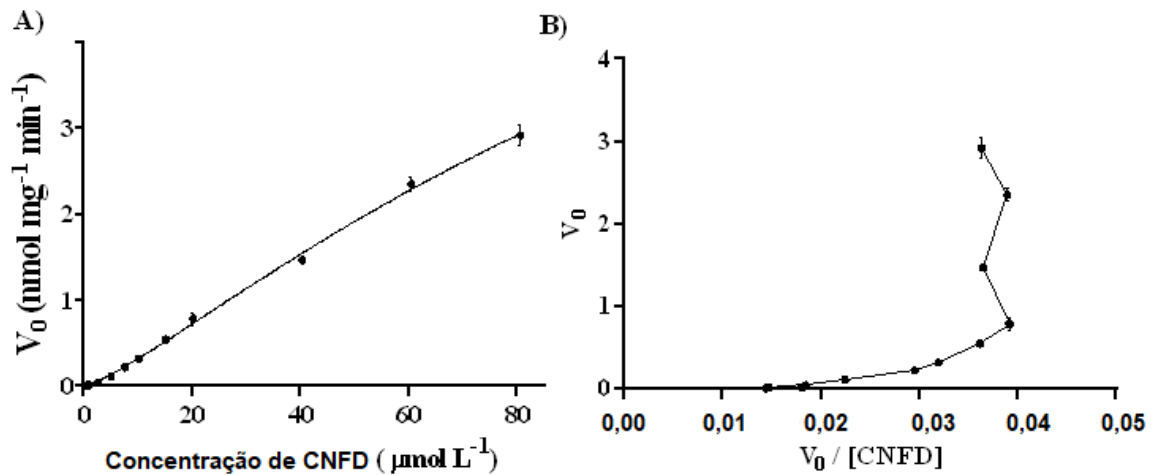


Figura 3: (A) Perfil cinético *in vitro* (gráfico sigmoidal) de CNFD catalisado por enzimas CYP. (B) Gráfico de Eadie-Hofstee.

3.3 Predição de parâmetros farmacocinéticos *in vivo*

A ligação do CNFD às proteínas microsossomais e plasmáticas foi de 4% e 37%, respectivamente. Os parâmetros previstos de depuração intrínseca *in vitro*, depuração intrínseca *in vivo*, depuração hepática e taxa de extração hepática foram expressos na Tabela 2.

Tabela 2: Determinação da fração livre não ligada às proteínas microsossomais e plasmáticas e aos parâmetros farmacocinéticos *in vivo*.

$f_{u,m}$ (%)	$f_{u,p}$ (%)	$CL_{INT, \text{ in vitro}}$ ($\mu\text{L mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	$CL_{INT, \text{ in vivo}}$ ($\text{mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$)	CL_H ($\text{mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$)	E_H (%)
96	63	38,5	32,98	10,39	51

fu, m: fração não ligada do substrato em meio microsossomal, fu, p: fração não ligada do substrato em meio plasmático, $CL_{INT, \text{ in vitro}}$: depuração intrínseca *in vitro*, $CL_{INT, \text{ in vivo}}$: depuração intrínseca *in vivo*, CL_H : depuração hepática, E_H : taxa de extração hepática.

3.4 Fenotipagem CYP450

O rCYP450 foi usado para determinar o papel de cada isoforma CYP450 envolvida no metabolismo do CNFD. Como mostrado na Figura 4, todas as isoformas de rCYP450 avaliadas contribuíram para o metabolismo de CNFD.

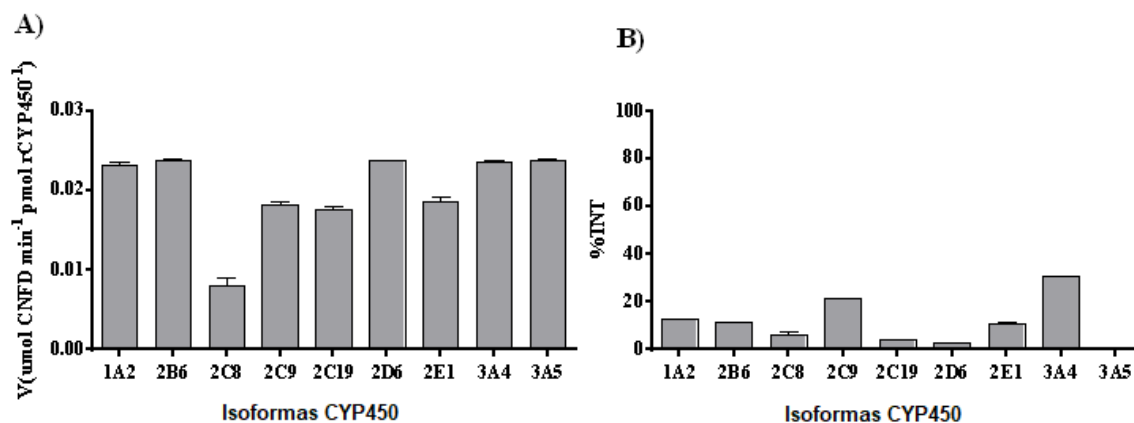


Figura 4: Determinação da isoforma CYP envolvendo o metabolismo de CNFD usando enzimas recombinantes. (A) Velocidade da reação enzimática. (B) Taxa normalizada total.

3.5 Previsão do metabolismo usando software SMARTCyp e Metatox

A previsão dos locais de metabolismo do CNFD pelas enzimas CYP foi avaliada pelo servidor SMARTCyp. A plataforma classificou a relevância do metabolismo da cor e o principal local do metabolismo por CYP3A4 e CYP2D6 foi o carbono 8. Para CYP2C9, o local do metabolismo detectado foi o carbono 12. Os resultados estão disponíveis na Figura 5 e na Tabela 3.

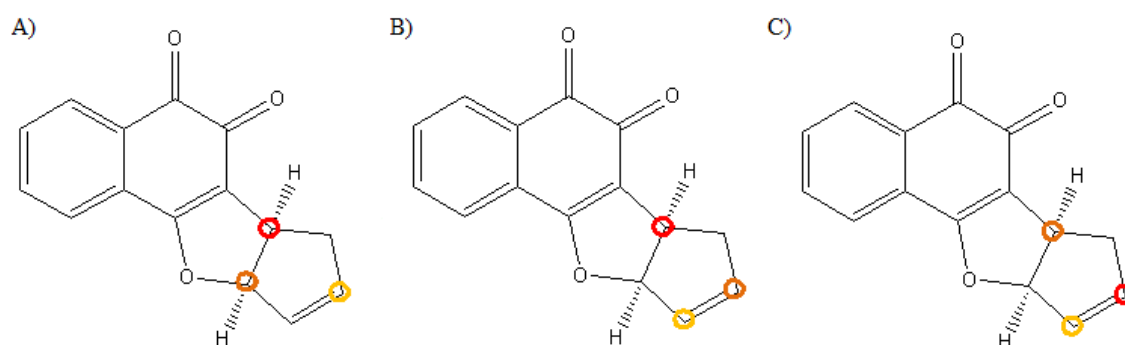


Figura 5: Local de metabolismo por CYP3A4 (A) CYP2D6 (B) CYP2C9 (C), de acordo com a plataforma online SMARTCyp. O código de cores pode ser encontrado na Tabela 3.

Tabela 3: Previsão do metabolismo CNFD usando a plataforma online (os valores foram calculados pelo servidor SMARTCyp).

Ranking (CYP3A4)	Átomo	Pontuação	Energia
1 (vermelho)	C8	39,8	46,2
2 (laranja)	C9	55,7	62,2
3 (amarelo)	C12	56,2	65,6
Ranking (CYP2D6)	Átomo	Pontuação	Energia
1 (vermelho)	C8	59,2	46,2
2 (laranja)	C12	64,2	65,6
3 (amarelo)	C11	71,1	65,6
Ranking (CYP2C9)	Átomo	Pontuação	Energia
1 (vermelho)	C12	81,9	65,6
2 (laranja)	C8	87,1	46,2
3 (amarelo)	C11	88	65,6

As reações químicas metabólicas previstas pela enzima CYP450 são reações de fase I, onde uma maior predição foi observada para reações de hidrogenação, epoxidação e oxidação. Dentre os metabólitos previstos, o metabólito M1 obtido pela reação de hidrogenação foi o que apresentou maior probabilidade de ocorrência. Os resultados estão disponíveis na Figura 6.

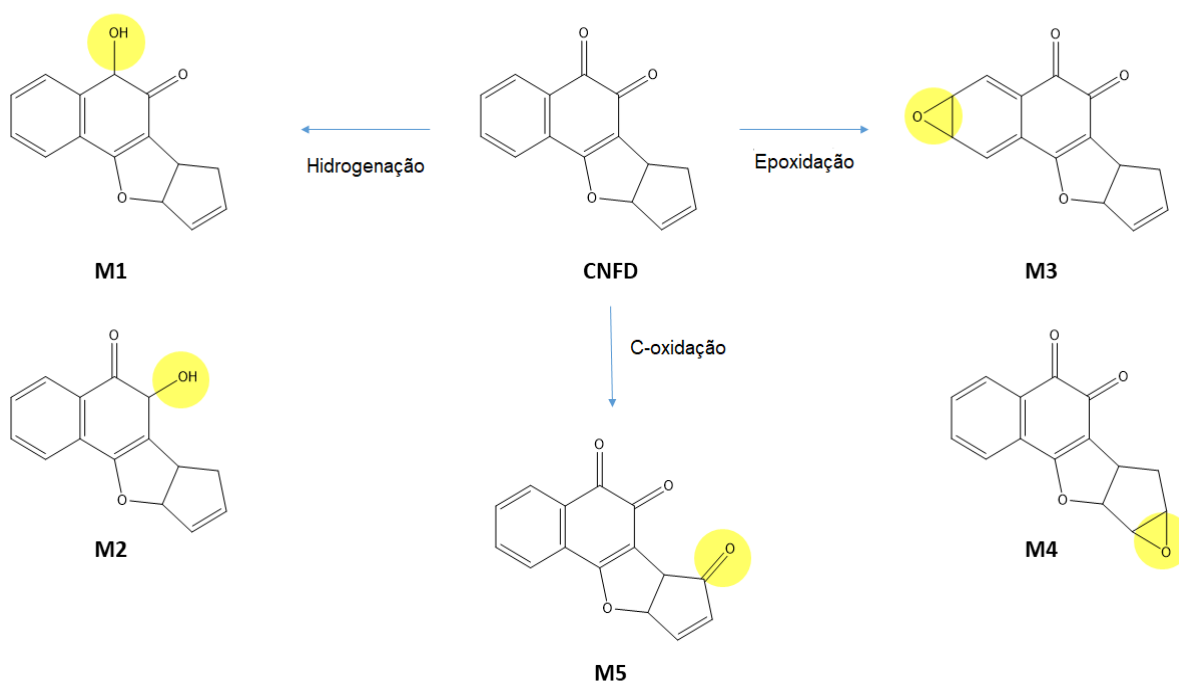


Figura 6: Previsão de metabólitos CNFD e suas respectivas reações químicas. Hidrogenação: M1 (93,93%) e M2 (88,42%); Epoidação: M3 (84,82%) e M4 (71,09%); C-Oxidação: M5 (67,39%).

4. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um novo fármaco passa por estudos pré-clínicos, incluindo a avaliação da contribuição das enzimas CYP450 no metabolismo deste novo candidato a fármaco.^{28,29} Por meio desses estudos, é possível prever as enzimas envolvidas no metabolismo e as interações medicamentosas.³⁰ Uma vez que o CNFD ainda está nos estágios iniciais do processo de desenvolvimento do medicamento, o presente estudo relata as primeiras evidências de seu metabolismo pelas enzimas CYP450.

A cinética enzimática obtida apresentou um perfil sigmoidal, com cooperatividade positiva por ter apresentado h acima de 1 ($h = 1,23$) [30] e o gráfico de Eadie-Hofstee resultou em uma curva convexa.³¹ Isso faz com que a ligação do substrato com a enzima ocorra em mais de um sítio ativo.³² Além disso, a velocidade da reação enzimática pode ser a soma da catálise de várias enzimas CYP, pois o estudo de fenotipagem mostrou a contribuição de todas as isoformas para o metabolismo do CNFD, exceto CYP3A5. Os parâmetros cinéticos obtidos foram utilizados para determinar a depuração intrínseca *in vitro*.

A partir dos dados obtidos na cinética enzimática, foi possível extrapolar esses resultados *in vitro* para *in vivo*, prevendo os parâmetros farmacocinéticos. A depuração hepática é extremamente importante durante o desenvolvimento de uma nova droga, pois está relacionada à exposição e meia-vida da droga.¹⁸ A taxa de extração hepática (EH = 51%) indica que parte da droga sofre metabolismo de primeira passagem.³³ Além disso, a depuração do fígado (CLH = 10,39 mL min⁻¹ kg⁻¹) indica que o CNFD é rapidamente metabolizado pelo fígado. O CNFD foi fracamente ligado às proteínas microssomais, minimizando assim a ligação não específica. Além disso, apenas 37% do CNFD estava ligado às proteínas plasmáticas. A baixa ligação da molécula com as proteínas plasmáticas é desejável, pois reduz o risco de interações competitivas.

Conforme mencionado anteriormente, o estudo de fenotipagem sugere a participação das isoformas de CYP avaliadas, principalmente CYP3A4 e CYP2C9. O metabolismo por múltiplas enzimas também é importante para uma droga ideal.³⁰ Se alguma via enzimática for prejudicada, outras enzimas podem realizar o metabolismo da droga, garantindo a eliminação do organismo. O metabolismo mediado por diferentes enzimas CYP é positivo, pois permite a biotransformação por meio de mais de uma via e reduz o risco de interações. Apesar das limitações, o uso de Supersomes® é uma das estratégias mais utilizadas em estudos de metabolismo *in vitro*.

O CNFD é um derivado da naftoquinona e as naftoquinonas são conhecidas por terem potencial inibitório em algumas isoformas humanas de CYP450, além das enzimas do citocromo P450 e P450 redutase poderem promover a ativação redutora de quinonas por uma ou duas reduções de elétrons, proporcionando a produção de semiquinona instável.^{34,35}

Abordagens *in silico* têm sido cada vez mais utilizadas para prever o metabolismo de novos candidatos a fármacos, permitindo economia de tempo e custo.¹⁷ As abordagens preditivas desenvolvidas não podem substituir completamente os protocolos padrão, mas podem fornecer um processo de tomada de decisão anterior até que os dados necessários estejam disponíveis. A predição dos sítios de metabolismo pela plataforma SMARTCyp para CYP3A4, CYP2D6 e CYP2C9 ocorreu por meio do uso de algoritmos que utilizam a energia de ativação do Citocromo P450 para reação com uma molécula.^{26,29} Os principais sítios do metabolismo têm sido sugeridos, fornecendo informações importantes para a identificação de metabólitos. A

análise com os três algoritmos SMARTCyp diferentes também foi usada no estudo *in silico* do metabolismo mediado por CYP de DA-Phen, um novo agente dopaminérgico.³⁶

O método bioanalítico desenvolvido e validado é simples e tem sido usado com sucesso para os fins pretendidos. Além disso, é totalmente compatível com a espectrometria de massa, sendo um ponto de partida para estudos futuros. Não foi possível detectar metabólitos de CNFD pelo método cromatográfico desenvolvido, sendo necessária a utilização de métodos mais sensíveis, como LC-MS, para determinar, isolar e elucidar esses metabólitos. Como o CNFD é um candidato a fármaco, avaliar a toxicidade desses metabólitos é de grande importância. Além disso, o estudo de inibição enzimática pode indicar as prováveis interações medicamentosas que podem ocorrer.

5. CONCLUSÃO

Em resumo, o metabolismo do candidato a fármaco CNFD foi caracterizado pela primeira vez. Os dados estabelecidos no estudo cinético foram usados para prever parâmetros farmacocinéticos importantes, determinando a depuração hepática. O CYP450 está envolvido no metabolismo do CNFD, com todas as enzimas apresentando papéis importantes, especialmente o CYP3A4 e o CYP2C9. Locais de metabolismo foram previstos. Esses resultados podem ser úteis para futuros estudos *in vitro*, bem como para estudos clínicos.

6. REFERÊNCIAS

1. Schepetkin, I. A.; Karpenko, A. S.; Khlebnikov, A. I.; Shibinska, M. O.; Levandovskiy, I. A.; Kirpotina, L. N.; Danilenko, N. V.; Quinn, M. T.; *Synthesis, anticancer activity, and molecular modeling of 1,4-naphthoquinones that inhibit MKK7 and Cdc25*; Elsevier Masson SAS, 2019; Vol. 183.
2. WHO; *Who Report on Cancer*; 2020.
3. Ottoni, F. M.; Gomes, E. R.; Pádua, R. M.; Oliveira, M. C.; Silva, I. T.; Alves, R. J.; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2020**, *30*, 126817.
4. Zhang, Y.; Luo, Y. H.; Piao, X. J.; Shen, G. N.; Wang, J. R.; Feng, Y. C.; Li, J. Q.; Xu, W. T.; Zhang, Y.; Zhang, T.; Wang, C. Y.; Jin, C. H.; *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2019**, *27*, 1577.

5. Darvin, S. S.; Esakkimuthu, S.; Toppo, E.; Balakrishna, K.; Paulraj, M. G.; Pandikumar, P.; Ignacimuthu, S.; Al-Dhabi, N. A.; *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2018**, *61*, 87.
6. Da Silva, M. N.; Ferreira, V. F.; De Souza, M. C. B. V.; *Quimica Nova* **2003**, *26*, 407.
7. Salunke-Gawali, S.; Pereira, E.; Dar, U. A.; Bhand, S.; *Journal of Molecular Structure* **2017**, *1148*, 435.
8. Silva, A. M. P. da; Paiva, S. R. de; Figueiredo, M. R.; Kaplan, M. A. C.; *Revista Fitos* **2012**, *7*, 207.
9. Rahmoun, N. M.; Boucherit-Otmani, Z.; Boucherit, K.; Benabdallah, M.; Villemin, D.; Choukchou-Braham, N.; *Medecine et Maladies Infectieuses* **2012**, *42*, 270.
10. Sharma, A.; Santos, I. O.; Gaur, P.; Ferreira, V. F.; Garcia, C. R. S.; Da Rocha, D. R.; *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *59*, 48.
11. Nittayananta, W.; Pangsomboon, K.; Panichayupakaranant, P.; Chanowanna, N.; Chelae, S.; Vuddhakul, V.; Sukhumungoon, P.; Pruphetkaew, N.; *Journal of Oral Pathology and Medicine* **2013**, *42*, 698.
12. Oramas-Royo, S.; Torrejón, C.; Cuadrado, I.; Hernández-Molina, R.; Hortelano, S.; Estévez-Braun, A.; De Las Heras, B.; *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 2471.
13. Freire, C. P. V.; Ferreira, S. B.; De Oliveira, N. S. M.; Matsuura, A. B. J.; Gama, I. L.; Da Silva, F. D. C.; De Souza, M. C. B. V.; Lima, E. S.; Ferreira, V. F.; *MedChemComm* **2010**, *1*, 229.
14. de Almeida, P. D. O.; dos Santos Barbosa Jobim, G.; dos Santos Ferreira, C. C.; Rocha Bernardes, L.; Dias, R. B.; Schlaepfer Sales, C. B.; Valverde, L. de F.; Rocha, C. A. G.; Soares, M. B. P.; Bezerra, D. P.; de Carvalho da Silva, F.; Cardoso, M. F. do C.; Ferreira, V. F.; Brito, L. F.; Pires de Sousa, L.; de Vasconcellos, M. C.; Lima, E. S.; *Chemico-Biological Interactions* **2021**, *343*.
15. Singh, G.; *Preclinical Drug Development*; Elsevier Inc., 2017.
16. Fakunle, E. S.; Loring, J. F.; *Trends in Molecular Medicine* **2012**, *18*, 709.
17. Kazmi, S. R.; Jun, R.; Yu, M. S.; Jung, C.; Na, D.; *Computers in Biology and Medicine* **2019**, *106*, 54.
18. Moreira, F. de L.; Habenschus, M. D.; Barth, T.; Marques, L. M. M.; Pilon, A. C.; Da Silva Bolzani, V.; Vessicchi, R.; Lopes, N. P.; De Oliveira, A. R. M.; *Scientific Reports* **2016**, *6*, 1.
19. Chagas, C. M.; Moss, S.; Alisaraie, L.; *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *549*, 133.

20. BRASIL, A. N. de V. S.; *DOU 22 de maio de 2012* **2012**.
21. Kramer, M. A.; Tracy, T. S.; In *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, ed Lyubimov, A. V.; 2012; Vol. 6.
22. Bowman, C. M.; Benet, L. Z.; *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, *123*, 502.
23. Giuliano, C.; Jairaj, M.; Zafiu, C. M.; Laufer, R.; *Drug Metabolism and Disposition* **2005**, *33*, 1319.
24. Damre, A. A.; Iyer, K. R.; *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, ed Lyubimov, A. V **2012**, *6*, 1.
25. Rodrigues, A. D.; *Biochemical Pharmacology* **1999**, *57*, 465.
26. Rydberg, P.; Gloriam, D. E.; Zaretski, J.; Breneman, C.; Olsen, L.; *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *1*, 96.
27. Rudik, A. V.; Bezhentsev, V. M.; Dmitriev, A. V.; Druzhilovskiy, D. S.; Lagunin, A. A.; Filimonov, D. A.; Poroikov, V. V.; *Journal of Chemical Information and Modeling* **2017**, *57*, 638.
28. Park, E.; Kim, H. K.; Jee, J. H.; Hahn, S.; Jeong, S.; Yoo, J.; *Toxicology and Applied Pharmacology* **2019**, *385*, 114790.
29. Tyzack, J. D.; Kirchmair, J.; *Chemical Biology and Drug Design* **2019**, *93*, 377.
30. Zhang, Z.; Tang, W.; *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, *8*, 721.
31. Subramanian, M.; Tracy, T. S.; Methods for determination of hirudin. *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, ed Lyubimov, A. V. **2012**, *6*, 99–102.
32. Seibert, E. and Tracy, T. S.; *Enzyme kinetics in drug metabolism: Fundamentals and applications*; Nagar, S.; Argikar, U. A.; Tweedie, D. J., Eds.; 2014.
33. Mehvar, R.; *Current Clinical Pharmacology* **2016**, *11*, 47.
34. Costa, M. C. A.; Carvalho, P. O. M.; Ferreira, M. M. C.; *Journal of Chemometrics* **2019**, *34*, 1.
35. Halicki, P. C. B.; Ferreira, L. A.; De Moura, K. C. G.; Carneiro, P. F.; Del Rio, K. P.; Carvalho, T. dos S. C.; Pinto, M. do C. F. R.; da Silva, P. E. A.; Ramos, D. F.; *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*, 1.
36. Sutura, F. M.; Giannola, L. I.; Murgia, D.; De Caro, V.; *Computational Biology and Chemistry* **2017**, *71*, 63.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO FINAL

- Foi desenvolvido um método bioanalítico utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação do CNFD no plasma. Os parâmetros exatidão e estabilidade da validação não foram adequados e apresentaram erro relativo percentual superior ao preconizado pela legislação em vigor.
- No estudo de metabolismo prévio do CNFD em meio plasmático foi observado o decréscimo do sinal do CNFD no tempo de incubação de 60 minutos, que pode ser um indicativo de metabolismo. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para avaliar a participação das enzimas plasmáticas no metabolismo.
- Um método bioanalítico utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação do CNFD em meio microssomal foi desenvolvido e validado.
- O CNFD sofre metabolismo pela via Citocromo P450 e todas as enzimas estudadas apresentaram papéis importantes, especialmente a CYP3A4 e a CYP2C9. A taxa de extração hepática indica que parte da droga sofre metabolismo de primeira passagem. Além disso, a depuração do fígado indica que o CNFD é rapidamente metabolizado pelo fígado.
- Não foi possível realizar o isolamento e identificação do metabólito experimentalmente. No entanto, alguns metabólitos foram propostos *in silico*.
- Este trabalho é o primeiro a descrever o metabolismo do CNFD e servirá como ponto de partida para continuidade de estudos de inibição enzimática e de farmacocinética *in vivo*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGYARE, C. et al. An ethnopharmacological survey of medicinal plants traditionally used for cancer treatment in the Ashanti region, Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 137–152, 2018.

BENARBA, B.; PANDIELLA, A. Colorectal cancer and medicinal plants: Principle findings from recent studies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. August, p. 408–423, 2018.

CHAGAS, C. M.; MOSS, S.; ALISARAIE, L. Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski's Rule of Five. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 549, n. 1–2, p. 133–149, 2018.

FAKUNLE, E. S.; LORING, J. F. Ethnically diverse pluripotent stem cells for drug development. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 709–716, 2012.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, E. G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.

IJAZ, S. et al. Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 103, n. March, p. 1643–1651, 2018.

MAKHAEVA, G. F. et al. Esterase profiles of organophosphorus compounds *in vitro* predict their behavior *in vivo*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 259, p. 332–342, 2016.

MOHS, R. C.; GREIG, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. **Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions**, v. 3, n. 4, p. 651–657, 2017.

OH, HYUN A. et al. Development of GC-MS based cytochrome P450 assay for the investigation of multi-herb interaction. **Analytical Biochemistry**, v. 519, p. 71–83, 2017.

PIÑERO, J.; FURLONG, L. I.; SANZ, F. In silico models in drug development: where we are. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 42, p. 111–121, 2018.

SAINI, N.; BAKSHI, S.; SHARMA, S. In-silico approach for drug induced liver injury prediction: Recent Advances. **Toxicology Letters**, v. 295, p. 288–295, 2018.

SALUNKE-GAWALI, S. et al. Metal complexes of hydroxynaphthoquinones: Lawsone, bis-lawsone, lapachol, plumbagin and juglone. **Journal of Molecular Structure**, v. 1148, p. 435–458, 2017.

SILVA, M. N. DA; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SILVA, A. M. P. DA et al. Atividade biológica de naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos**, v. 7, n.04, 2012.

SINGH, G. Preclinical Drug Development. **Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research**, p. 47-63, 2018.

ZANETTI, R. SACCHETTO, L; COEBERGH, J W; ROSSO, S. To accelerate cancer prevention in Europe: Challenges for cancer registries. **European Journal of Cancer**, v. 104, p. 151–159, 2018.

ANEXO**ACEITE DO JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY**

Fwd: Journal of the Brazilian Chemical Society - Decision on Manuscript ID JBCHS-2021-0382.R1

09-Jan-2022

Dear Dr. Magalhães:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "CYP450 metabolism of a semisynthetic naphthoquinone, an anticancer drug candidate, by human liver microsomes" in its current form for publication in the Journal of the Brazilian Chemical Society. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

You should receive shortly an e-mail from the JBCS Office (publication@jbcs.sbq.org.br) in order to proceed with the payment of the publication fee.

The proofing production will begin only after the JBCS Office verifies the payment was properly credited. The payment process should take no longer than 3 days (the corresponding author will receive a message).

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Journal of the Brazilian Chemical Society, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Teodoro Kaufman

Associate Editor, Journal of the Brazilian Chemical Society

kaufman@iquir-conicet.gov.ar, tkaufman@fbioyf.unr.edu.ar