



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de disposição cinética do ácido copálico e do ácido
caurenóico: permeabilidade intestinal, fração livre e
metabolismo in vitro em microsomas hepáticos**

Orientanda: Mariana Mauro

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Coorientador: Dr. Michel Leandro de Campos

Araraquara-SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de disposição cinética do ácido copálico e do ácido
caurenóico: permeabilidade intestinal, fração livre e
metabolismo in vitro em microsomas hepáticos**

Orientanda: Mariana Mauro

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes

Coorientador: Dr. Michel Leandro de Campos

Araraquara-SP

2020

M457e Mauro, Mariana.
Estudo de disposição cinética do ácido copálico e do ácido
caurenóico: permeabilidade intestinal, fração livre e metabolismo in
vitro em microssomas hepáticos / Mariana Mauro. – Araraquara:
[S.n.], 2020.
135 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de
Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de
Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Natália Valadares de Moraes.
Coorientador: Michel Leandro de Campos.

1. Ácido copálico. 2. Acido caurenóico. 3. Caco-2. 4. Metabolismo in
vitro. 5. Microssomas hepáticos. 6. Permeabilidade intestinal. I. Moraes,
Natália Valadares de, orient. II. Campos, Michel Leandro de, coorient.
III. Título.

ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **MARIANA MAURO**, RA nº: PCF160091, RG nº 42.389.549-7, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 21/02/2020, a tese intitulada **ESTUDO DE DISPOSIÇÃO CINÉTICA DO ÁCIDO COPÁLICO E DO ÁCIDO CAURENÓICO: PERMEABILIDADE INTESTINAL, FRAÇÃO LIVRE E METABOLISMO in vitro EM MICROSSOMAS HEPÁTICOS**, junto ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Curso de Doutorado, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Araraquara, 21 de fevereiro de 2020



Seção Técnica de Pós Graduação

ANIELE VILELLA
Supervisor Técnico de Pós-Graduação



Dedicatória

*Dedico este trabalho a todos aos quais me espelho,
em especial aos meus pais
Marisa Aparecida Dellalibera Mauro e José Mauro
e aos meus irmãos
Júnior, Renato e Fabiana
por todo o apoio, carinho, amor, confiança
e por estarem ao meu lado nesta conquista.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora **Prof. Dr. Natália Valadares de Moraes** por ter confiado no meu trabalho, pela orientação neste trabalho, pela dedicação e por todos os ensinamentos que foram fundamentais para minha formação.

Ao meu coorientador **Dr. Michel Leandro de Campos** por transmitir seu conhecimento e contribuição nesse trabalho.

Obrigada ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes** por fornecer os compostos e auxílio financeiro utilizados nesse trabalho.

Agradeço a **Prof. Dr. Rosângela Gonçalves Peccinini** por todo o apoio e ensinamentos.

Aos Professores **Dr. André Gonzaga dos Santos, Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, Dr. Leandro Augusto Calixto, Dr. Marlus Chorilli e Dr. Marcelo Tadeu Marin** pela contribuição durante o exame geral de qualificação e a defesa de tese.

Aos funcionários do laboratório de toxicologia **Maria, Marcos e Vinicius** por todo auxílio e amizade.

Aos **funcionários** da biblioteca e da seção técnica de pós-graduação pelo atendimento de cada solicitação.

A todos os **professores** que tive durante minha formação, pelos ensinamentos e pelo exemplo de docência.

Aos amigos do grupo e da vida **Jhohann e Priscila** pela dedicação e amizade. Ao meu namorado **Rafael** e minha amiga **Fabiane** por todo apoio. E a todos que participaram dessa conquista.

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela oportunidade e apoio financeiro – Código de Financiamento 001 e a FAPESP (Processo: 14/50265-3) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Agradeço à **Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP** e ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas** pela infraestrutura e suporte, fundamentais para a realização desse trabalho e a todos que participaram desta etapa da minha vida.

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós,
não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós.”*

*Antoine de Saint-Exupéry.
O Pequeno Príncipe*

*“A força não provém da capacidade física.
Provém de uma vontade indomável.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

Os ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) são diterpenos majoritários da oleorresina extraída do tronco de árvores do gênero *Copaifera* - as copaíbas. A utilização da oleorresina de copaíba na medicina popular é decorrente da sua atividade anti-inflamatória e antisséptica, sendo empregada principalmente no tratamento de bronquite, sífilis, doenças de pele e úlceras. Embora o potencial terapêutico do AC e AK tenha sido bem explorado, as propriedades farmacocinéticas desses diterpenos não foram bem descritas até o presente momento para dar suporte ao seu uso tradicional. Este estudo teve como objetivo caracterizar as propriedades cinéticas do AC e AK utilizando ensaios que minimizam o uso de animais em pesquisa. A estabilidade dos diterpenos foi avaliada em plasma humano e em sistemas que simulam o pH dos fluidos estomacal (1,2) e intestinal (7,4). O coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) do AC e AK foi determinado por método cromatográfico. A permeabilidade intestinal foi avaliada em células Caco-2 na presença e na ausência do inibidor de glicoproteína-P (P-gp) verapamil. Ensaios de cinética enzimática foram realizados para AC e AK usando microsossomas hepáticos de ratos (RLM) e humanos (HLM). Foram realizados ensaios para a identificação dos principais metabólitos dos diterpenos AC e AK. A fração de AC e AK livre no plasma em meio microsossomal hepático foi determinada por ultracentrifugação. Os dados observados in vitro para os ensaios de cinética foram usados para prever o clearance hepático in vivo usando o modelo do fígado com distribuição homogênea. Os métodos analíticos e bioanalíticos compatíveis com análise de AC e AK nos ensaios ADMET foram desenvolvidos e validados usando LC-MS. No pH estomacal (tampão Clark-Lubs 0,2 M, pH 1,2) foi observada rápida degradação do AC e AK e em pH intestinal (tampão fosfato 0,1M, pH 7,4), foi observada estabilidade por até 6 h e 24 h para o AK e AC, respectivamente. No plasma humano AC e AK foram estáveis por até 24 e 12 h, a 37 °C. O AC e AK apresentaram permeabilidade aparente (P_{app}) moderada de $4,67 (\pm 0,08) \times 10^{-6}$ cm/s e $4,66 (\pm 0,04) \times 10^{-6}$ cm/s em células Caco-2, respectivamente. A incubação com verapamil mostrou que a glicoproteína-P não desempenha um papel relevante na absorção oral de AC e AK. A análise das relações entre a velocidade inicial do metabolismo e a concentração do substrato revelou desvios da cinética michaeliana e sugeriu cooperatividade positiva, com coeficiente de Hill > 1 . A fração livre em plasma determinada por ultracentrifugação foi de 0,47 - 0,53 para o AC e de 0,82 - 0,98 para AK. A razão de extração hepática (E) do AC foi estimada em 0,97 e indica extenso metabolismo a cada passagem do fármaco pelo fígado e elevada eliminação pre-sistêmica. Para o AK, os parâmetros de cinética enzimática não foram caracterizados no intervalo de concentrações avaliado. Os resultados desta tese poderão ser amplamente utilizados em estudos de transposição qualitativos e quantitativos dos dados experimentais para prever os fenômenos in vivo inerentes ao uso terapêutico do AC, AK ou da oleorresina de copaíba.

Palavras-chave: ácido copálico, ácido caurenóico, Caco-2, metabolismo in vitro, microsossomas hepáticos, permeabilidade intestinal.

ABSTRACT

Copalic (CA) and caurenoic (KA) acids are the major diterpenes of oleoresin extracted from the trunk of trees of the *Copaifera* genus - the copaíbas. The use of copaíba oleoresin in folk medicine derives from its anti-inflammatory and antiseptic activity, being used mainly in the treatment of bronchitis, syphilis, skin diseases and ulcers. Although the therapeutic potential of CA and KA have been well explored, the pharmacokinetic properties of these diterpenes have not been well described to date to support their traditional use. This study aimed to characterize the kinetic properties of CA and KA using assays that minimize the use of animals in research. The stability of diterpenes was evaluated in human plasma and in systems that simulate the pH of stomachal (1.2) and intestinal (7.4) fluids. The octanol-water partition coefficient (Log P) of CA and KA was determined by the chromatographic method. Intestinal permeability was assessed in Caco-2 cells in the presence and absence of the P-glycoprotein (P-gp) inhibitor verapamil. Enzymatic kinetic assays were performed for CA and KA using rat (RLM) and human (HLM) liver microsomes. Assays were carried out to identify the main metabolites of CA and KA diterpenes. The unbound fraction of CA and KA in plasma and in liver microsomes media was determined by ultracentrifugation. Observed in vitro data from kinetics assays were used to predict the hepatic clearance in vivo using the well-stirred liver model. Analytical and bioanalytical methods compatible with CA and KA analysis in ADMET assays were developed and validated using LC-MS. At stomachal pH (0.2 M Clark-Lubs buffer, pH 1.2) rapid degradation of CA and KA was observed and at intestinal pH (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4), the stability was observed for up to 6 hours and 24 hours for KA and CA, respectively. In human plasma CA and KA were stable for up to 24 and 12 hours at 37 °C. The CA and KA showed moderate apparent permeability (P_{app}) of $4.67 (\pm 0.08) \times 10^{-6}$ cm/s and $4.66 (\pm 0.04) \times 10^{-6}$ cm/s in Caco-2 cells, respectively. Incubation with verapamil showed that P-glycoprotein does not play a relevant role in oral absorption of CA and KA. The analysis of the relationships between basal metabolism rate and substrate concentration revealed deviations from the Michaelian kinetics and suggested positive cooperativity, with Hill coefficient > 1. The unbound fraction in plasma determined by ultracentrifugation was 0.47 - 0.53 for CA and 0.82 - 0.98 for KA. The hepatic extraction ratio (E) of the CA was estimated at 0.97 and indicates extensive metabolism with each passage of the drug through the liver and high pre-systemic elimination. For KA, the parameters of enzymatic kinetics were not characterized in the range of concentrations evaluated. The results of this project can be widely used in qualitative and quantitative transposition studies of experimental data to predict the in vivo phenomena related to the therapeutic use of CA, KA or copaíba oleoresin.

Keywords: copalic acid, cauroenoic acid, Caco-2, metabolism in vitro, hepatic microsomes, intestinal permeability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais diterpenos encontrados em oleorresina extraída das espécies do gênero <i>Copaifera</i> sp. Fonte: Próprio autor	25
Figura 2. Gráfico representativo da reação enzimática segundo o modelo de Michaelis-Menten.	35
Figura 3. Gráfico representativo do plote de V_0 versus $[S]$ no modelo de Hill.	36
Figura 4. Gráficos de Eadie-Hofstee para uma cinética típica e cinética atípica.	38
Figura 5. Procedimento de extração líquido-líquido dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano.	47
Figura 6. Placa de 12 poços com inserto (ThinCert TM) utilizada para o cultivo de células Caco-2 por um período de 21 dias.	55
Figura 7. Cromatogramas de monitoramento de íon selecionado (SIM) referentes à análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) por LC-MS.....	65
Figura 8. Estudo da linearidade para o método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) por LC-MS.....	66
Figura 9. Estabilidade do ácido copálico (○) e do ácido caurenóico (■) em pH 1,2 (A) e 7,4 (B) a 37 °C. * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey).	68
Figura 10. Cromatogramas de monitoramento de íon selecionado (SIM) referentes à análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS.	70
Figura 11. Estudo da linearidade para o método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) por LC-MS.....	72
Figura 12. Estabilidade dos compostos ácido caurenóico (■) e ácido copálico (○) em plasma (1 μ M) a 37 °C. * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey).	75
Figura 13. Curva analítica do ensaio de determinação de Log P.	76
Figura 14. Viabilidade celular dos ácidos caurenóico (A) e copálico (B) em células Caco-2 após incubação a 37 °C por 24 horas, utilizando resazurina.	78
Figura 15. Fotomicrografia das células Caco-2 (BCRJ n°0059) utilizadas para avaliar a viabilidade celular.....	79

Figura 16. Monitoramento da integridade das membranas através dos valores de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos aos 10, 15 e 21 dias de cultivo das células Caco-2 nos insertos, em meio DMEM, pH 7,4.	79
Figura 17. Metabolismo dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK), ambos a 0,5 μ M em diferentes concentrações de proteína microsossomais de ratos a 37 °C, pH 7,4, na presença e na ausência de NADPH.....	85
Figura 18. Metabolismo in vitro utilizando microsossomas hepático de ratos do ácido copálico (AC), ácido caurenóico (AK) e do controle diclofenaco (dicl).	86
Figura 19. Representação gráfica das curvas de Michaelis-Menten para a cinética enzimática dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) utilizando microsossomas hepático de (A) ratos e (B) humanos (n=3).	88
Figura 20. Plote de Eadie-Hofstee para o metabolismo in vitro do ácido copálico (gráficos A e C) e ácido caurenóico (gráficos B e D) em microsossomas hepáticos de ratos (A e B) e em microsossomas hepáticos humano (C e D).	89
Figura 21. Plote do clearance ($V_0/[S]$) em função da concentração para o metabolismo in vitro do ácido copálico (gráficos A e C) e ácido caurenóico (gráficos B e D) em microsossomas hepáticos de ratos (A e B) e em microsossomas hepáticos humano (C e D).....	90
Figura 22. Cromatograma representativo do metabolismo in vitro do ácido caurenóico (AK) em microsossomas hepáticos de ratos (RLM).....	95
Figura 23. Espectro de massas do produto de metabolismo do ácido caurenóico (AK) em microsossomas de fígado de ratos.	96
Figura 24. Cromatograma representativo do metabolismo in vitro do ácido caurenóico (AK) em microsossomas hepáticos humano (HLM).....	96
Figura 25. Espectro de massas do produto de metabolismo do ácido caurenóico (AK) em microsossomas de fígado humano.	97
Figura 26. Proposta de metabolismo do ácido caurenóico com formação do produto de dihidroxilado 16,17-dihidroxi-caurenóico.	97
Figura 27. Cromatogramas superpostos referente às análises de uma amostra de metabolismo in vitro do AC com microsossomas hepáticos de rato, uma amostra controle e uma amostra branca, extraídas com acetato de etila.	99
Figura 28. Comparação dos espectros de massas de alta resolução obtidos por MS-ESI-Q-TOF no modo negativo dos produtos de metabolismo (Produto 2) do ácido	

copálico in vitro usando microsomas de fígado de ratos (A) e microsomas de fígado humano (B).....100

Figura 29. Espectro de massas (A) do metabólito do ácido copálico (AC) em 7,7 minutos, m/z 327 e sua fragmentação (B) por LC-ESI-IT-MS, no modo ion negativo.
.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das atividades biológicas do ácido copálico (AC), ácido caurenóico (AK) e do óleo de copaíba descritas na literatura.	26
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico.....	30
Tabela 3. Substâncias utilizadas para a determinação do log P do AC e AK.	51
Tabela 4. Figuras de mérito do método de análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em solução por LC-MS.	67
Tabela 5. Efeito matriz na análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS.....	71
Tabela 6. Figuras de mérito na validação do método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS.	73
Tabela 7. Estabilidade dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK)	74
Tabela 8. Estudo da permeabilidade do ácido copálico (AC) e caurenóico (AK) em células Caco-2 na presença e ausência do inibidor da glicoproteína-P, verapamil (50 μ M).	82
Tabela 9. Fração de AC e AK livre em plasma ($F_{u,p}$). Dados apresentados como média [coeficiente de variação (%), n=6]	84
Tabela 10. Parâmetros cinéticos do metabolismo in vitro do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) em microssomas hepáticos de rato (RLM) e humano (HLM) usando a equação de Hill. Dados apresentados como média (IC 95%), n=3.	92
Tabela 11. Fração de AC e AK livre em meio microssomal ($F_{u,mic}$). Dados apresentados como média [coeficiente de variação (%), n=6]	93
Tabela 12. Clearance hepático do ácido copálico (AC) obtido por extrapolação in vitro-in vivo e taxa de extração do fármaco pelo fígado em microssomas humano (HLM).	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido copálico
ACN	Acetonitrila
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte
AK	Ácido caurenóico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbonos
Caco-2	Adenocarcinoma de cólon humano
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	Cromatografia gasosa
CL _H	Clearance hepático
CL _{max}	Clearance intrínseco máximo
CL _{int}	Clearance intrínseco
C _{max}	Concentração plasmática máxima
CL _{u, int, H}	Clearance intrínseco escalonado a partir de dados in vitro
COX 2	Ciclooxigenase-2
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CV	Coeficiente de variação
CYP 450	Citocromo P450
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio padrão relativo
E	Razao de extração hepática
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPR	Erro padrão relativo
ER	Taxa de efluxo (do inglês: <i>efflux rate</i>)
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês: <i>electrospray ionization</i>)
F_b	Fração ligada as proteínas
FMN	Fator matriz normalizado
F_u	Fração livre
$F_{u,mic}$	Fração livre em meio microsomal
$F_{u,p}$	Fração livre no plasma
H	Coeficiente de Hill
HLM	Microsomas de fígado humano
HMMC-PM	Microsomas hepáticos humano
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
^1H -RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
IC_{50}	Concentração inibitória média (do inglês: <i>half maximal inhibitory concentration</i>)
<i>IVIVE</i>	<i>in vitro-in vivo extrapolation</i>
k	Fator de capacidade
K_M	Constante de Michaelis-Menten
K_{prime}	Parâmetro relacionado ao K_m , expresso em unidades de concentração, e calculado como S_{50}^h .
LADMET	Liberação, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte

LC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas tandem com ionização por <i>electrospray</i> (do inglês: <i>Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectroscopy</i>)
LC-ESI-MS-IT	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas com ionização por <i>electrospray</i> e analisador sequencial <i>ion trap</i>
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (do inglês: <i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>)
LIQ	Limite inferior de quantificação
Log k	Log do fator de capacidade
Log P	Coeficiente de partição
LSQ	Limite superior de quantificação
<i>m/z</i>	razão massa carga
MDCK	<i>Martin-Darby Canine Kidney</i>
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MRP2	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
MS	Espectrometria de Massas (do inglês: <i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Análise por espectrometria de massas em <i>tandem</i>
MS-ESI-Q-TOF	Espectrometria de Massas com ionização por <i>electrospray</i> e analisador do tipo quadrupolo - tempo de voo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina
Na-TFA	Ácido trifluoroacético sodiado
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.I.	Padrão interno
PAMPA	Permeação em membrana artificial paralela
<i>P_{app}</i>	Permeabilidade aparente
PBPK	<i>Physiologically-based pharmacokinetics</i>

PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
P-gp	glicoproteína-P
PK/PD	Farmacocinética/farmacodinâmica
Q_H	Fluxo sanguíneo hepático
r	Coeficiente de correlação
r^2	Coeficiente de determinação
RE	Relação de efluxo
RET	Resistividade elétrica transepitelial
RLM	Microsomas de fígado de rato
RTMC-PL	Microsomas hepáticos de rato
S_{50}	Concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima
[S]	Concentração de substrato
SFB	Soro fetal bovino
SIM	Monitoramento de íon seletivo (do inglês: <i>selective ion monitoring</i>)
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
t_0	Tempo morto
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
t_R	Tempo de retenção
TSI	Índice do transporte de substrato (do inglês: <i>transporter substrate index</i>)
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial
UV	Ultravioleta
V_0	Velocidade da reação
V_{max}	Velocidade máxima da reação enzimática
v	Velocidade da reação enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1. <i>COPAIFERA</i> SP., OLEORRESINA DE COPAÍBA E OS DITERPENOS ÁCIDO COPÁLICO E CAURENÓICO	22
2.2. ESTUDOS ADMET NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS.....	30
3. OBJETIVO GERAL	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO AC E DO AK.....	41
4.2. MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINAÇÃO DO AC E DO AK POR LC-MS	41
4.2.1. <i>Reagentes e solventes</i>	41
4.2.2. <i>Preparo das soluções padrão</i>	41
4.2.3. <i>Sistema cromatográfico</i>	42
4.2.4. <i>Validação</i>	43
4.2.4.1. Seletividade	43
4.2.4.2. Linearidade	43
4.2.4.3. Precisão e Exatidão	43
4.3. ENSAIO DE ESTABILIDADE QUÍMICA	44
4.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO AC E AK EM PLASMA HUMANO	45
4.4.1. <i>Reagentes e solventes</i>	45
4.4.2. <i>Preparo das soluções</i>	45
4.4.3. <i>Sistema cromatográfico</i>	45
4.4.4. <i>Preparo de amostra</i>	46
4.4.5. <i>Validação</i>	47
4.4.5.1. Seletividade	48
4.4.5.2. Efeito Residual	48
4.4.5.3. Efeito Matriz.....	48
4.4.5.4. Curva de calibração/linearidade	49
4.4.5.5. Precisão e Exatidão	49
4.4.5.6. Estabilidade	50

4.5. ENSAIO DE ESTABILIDADE EM PLASMA HUMANO POR LC-MS.....	50
4.6. DETERMINAÇÃO DO LOG P.....	51
4.7. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO AC E DO AK EM CÉLULAS CACO-2	52
4.7.1. <i>Cultivo celular</i>	52
4.7.2. <i>Ensaio de viabilidade celular pelo teste da resazurina</i>	53
4.7.3. <i>Avaliação da permeabilidade in vitro usando células Caco-2</i>	54
4.8. ESTUDO DA FRAÇÃO LIVRE EM PLASMA E EM MEIO MICROSSOMAL	57
4.9. METABOLISMO IN VITRO EM MICROSSOMAS HEPÁTICOS DE RATO (RLM) E HUMANO (HLM)	57
4.9.1. <i>Cinética enzimática</i>	58
4.9.1.1. Ensaios de depleção dos substratos AC e AK em RLM e HLM	58
4.9.1.2. Análise de AC e AK por LC-MS.....	59
4.9.1.3. Análise dos dados	60
4.9.2. <i>Extrapolação in vitro-in vivo (IVIVE)</i>	60
4.9.3. <i>Identificação dos metabólitos</i>	61
4.9.3.1 Análise por espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS) ..	62
4.9.3.2. Análise por espectrometria de massas de alta resolução (MS-ESI-Q-TOF)	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO AC E AK POR LC-MS.....	64
5.2. ENSAIO DE ESTABILIDADE EM PH 1,2 E 7,4.....	67
5.3. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO AC E AK EM PLASMA HUMANO	69
5.4. ENSAIO DE ESTABILIDADE EM PLASMA HUMANO POR LC-MS.....	74
5.5. ENSAIO DE LOG P POR MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	75
5.6. AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO AC E DO AK EM CÉLULAS CACO-2	76
5.7. LIGAÇÃO DE AC E AK AS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	83
5.8. ESTUDO DO METABOLISMO IN VITRO DO AC E AK EM MICROSSOMAS HEPÁTICOS.....	84
5.9. LIGAÇÃO DE AC E AK AS PROTEÍNAS MICROSSOMAS.....	93
5.10. EXTRAPOLAÇÃO IN VITRO-IN VIVO PARA CLEARANCE HEPÁTICO	94
5.11. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DE AC E AK.....	95
6. CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS.....	103

APÊNDICES124

ANEXOS131

1. INTRODUÇÃO

A resposta terapêutica e a toxicidade de candidatos a fármacos de origem sintética ou natural são dependentes fundamentalmente de sua disposição cinética no homem. Os estudos em farmacocinética podem ser categorizados principalmente nas seguintes abordagens: farmacocinética clássica por análise não compartimental ou compartimental, farmacocinética compartimental populacional, farmacocinética baseada em fisiologia (PBPK) e estudos de liberação, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte (LADMET) em modelos *in vitro*. Em qualquer dessas abordagens, o foco dos estudos de disposição cinética é a compreensão do movimento do fármaco no organismo vivo. Uma investigação realizada em 1988 envolvendo 319 candidatos a fármacos revelou que apenas 49 desses alcançaram a fase de comercialização, sendo que a principal causa de falha foi decorrente de propriedades farmacocinéticas indesejáveis no homem, correspondendo a 40% dos casos (PRENTIS; LIS; WALKER, 1988; BRODNIEWICZ; GRYNKIEWICZ, 2010).

Estudos em farmacometria buscam quantificar o comportamento dos fármacos ou medicamentos através de modelos matemáticos visando dar suporte ao desenvolvimento mais eficiente e/ou decisões regulatórias. Dentre as técnicas de modelagem e simulação, a Farmacocinética baseada em Fisiologia (PBPK, sigla em inglês para *Physiologically-based pharmacokinetics*) baseia-se em modelos farmacocinéticos que representam mecanismos fisiológicos independentes observados em estudos *in vitro* de absorção, transporte, ligação às proteínas plasmáticas e metabolismo (GÓMEZ-LECHÓN; CASTELL; DONATO, 2007; ROSTAMI-HODJEGAN, 2012). A utilização de modelos PBPK cresce em virtude da possibilidade de prever a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção em humanos através de técnicas de extrapolação *in vitro-in vivo* (IVIVE, sigla em inglês para *in vitro-in vivo extrapolation*) (ROSTAMI-HODJEGAN; TUCKER, 2007; ROSTAMI-HODJEGAN, 2012) e integração em modelos estruturais multicompartimentais.

O uso de técnicas *in vitro* para caracterização de parâmetros *in vitro* relacionados a absorção, distribuição, metabolismo ou eliminação oferece vantagens como resultados rápidos, de custo financeiro mais baixo além de permitir a comparação dos resultados obtidos a partir de sistemas celulares ou enzimáticos animais com os humanos (JIA; LIU, 2007). Estes resultados podem na sequência

ser usados na construção de modelos PBPK para predição e simulações em indivíduos ou em populações virtuais. Dessa forma, a farmacometria é considerada hoje uma ciência emergente que tem aplicações em diversas etapas do desenvolvimento de fármacos e na personalização de doses para populações especiais.

No intuito de obter novos fármacos e desenvolver novos medicamentos, o uso de produtos naturais representa uma importante estratégia, uma vez que o uso de plantas para curar doenças é uma prática antiga. A utilização de plantas medicinais é considerada milenar por diferentes culturas (MEHTA et al., 2015). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 65-80% da população utilizavam desse recurso como forma de manter a saúde na década de 1990 em países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). O consumo de produtos obtidos a partir de plantas é elevado em países desenvolvidos como Alemanha e Estados Unidos, sendo a Alemanha responsável por consumir metade dos extratos vegetais comercializados na Europa (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; GELMINI et al., 2013). Na indústria farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais podem ser usados para o isolamento de substâncias ativas, no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos ou ainda na obtenção de produtos utilizados na formulação de medicamentos (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). Os produtos naturais estão presentes em grandes descobertas de fármacos, como por exemplo a ivermectina e artemisinina que são baseadas em produtos naturais (CARY; PETERLIN, 2018).

O Brasil abriga uma das maiores biodiversidades do mundo, e, portanto, o território brasileiro representa uma imensa fonte de recursos naturais. Portanto, investimentos em pesquisa na área de produtos naturais e políticas públicas de preservação dos recursos naturais num país com tamanha biodiversidade são fundamentais para que o Brasil não se torne apenas um reprodutor de formulações fitoterápicas ou importador de matéria-prima de origem vegetal (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; BRASIL, 2012). Como exemplos de plantas medicinais importantes encontradas na biodiversidade brasileira destacamos a *Ilex paraguariensis* (mate), *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Tolu), *Paullinia cupana* (guaraná), *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) e a *Copaifera* sp. (copaíba) (GURIB-FAKIM, 2006), sendo esta última o foco desta tese de doutorado.

Por apresentarem propriedades terapêuticas importantes, os diterpenos ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) obtidos da oleorresina da *Copaifera langsdorffii*, foram utilizados neste trabalho que visou investigar a permeabilidade oral e o metabolismo hepático in vitro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Copaifera* sp., oleorresina de copaíba e os diterpenos ácido copálico e caurenóico

As copaíbas, árvores nativas da América Latina, são conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo. Pertencem ao gênero *Copaifera*, família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). As copaíbas são árvores encontradas principalmente nas regiões da América Central e América do Sul e na África (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). Sua altura pode variar de 25 a 40 metros e chegam a atingir 400 anos (TOBOUTI et al., 2017). A *Copaifera langsdorffii*, uma das espécies de copaíba mais estudada (ARRUDA et al., 2019), possui estruturas secretoras internas responsáveis por sintetizar e acumular a oleorresina, cujo valor comercial é elevado em função das suas diversas atividades biológicas (RODRIGUES; TEIXEIRA; MACHADO, 2011).

No Brasil ocorre a maior diversidade de espécies do gênero *Copaifera*. São encontradas cerca de 26 espécies do total das 70 espécies conhecidas do gênero (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018) sendo as principais: *C. officinalis* L. encontrada na região norte do Amazonas e Roraima; *C. reticulate* Ducke e *C. multijuga* Hayne abundante na região Amazônica, Pará e Rondônia; *C. confertiflora* Bth no Piauí; *C. langsdorffii* Desf. pode ser encontrada do norte ao sul do país; *C. guyanensis* Desf. encontrada na região amazônica; *C. majorina* Dwyer e *C. coriacea* Mart. na Bahia; *C. cearensis* Huber ex Ducke no Ceará, Bahia, Piauí e Rio de Janeiro; *C. elliptica* Mart. em Goiás e Mato Grosso; *C. Lucens* Dwyer na Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo e *C. paupera* (Herzog) Dwyer no Acre (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). As copaíferas podem ser encontradas em diversas regiões, pois se adaptam a diferentes tipos de solo, desde o solo fértil até solos mais pobres do Cerrado. Essa característica explica a ocorrência da *C. langsdorffii* por todo o país, podendo ser encontrada nos diferentes biomas como Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga e Floresta Amazônica (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018; ARRUDA et al., 2019).

A oleorresina das copaíbas é um líquido colorido composto por diterpenos e sesquiterpenos, podendo apresentar viscosidade variável. Conhecida também como óleo de copaíba, a oleorresina apresenta uso tradicional principalmente pela via tópica, devido às atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes. Seu perfil químico

varia quantitativamente de acordo com a espécie, com a sazonalidade, alterações climáticas, composição do solo (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018), diferença de idade das plantas e por lesões causadas por insetos e fungos. A variabilidade química da oleorresina somada à identificação incorreta de espécies, ou, no caso de óleos comerciais, problemas de falsificação/adulteração prejudicam o uso da oleorresina das copaíbas pelas indústrias (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; BARBOSA et al., 2012). A oleorresina é popularmente utilizada na região amazônica e é considerada fonte renovável de compostos ativos com potencial terapêutico (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018) e de grande importância econômica relacionados ao uso na produção de cosméticos, perfumaria e indústria farmacêutica (BARBOSA et al., 2012).

A Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) é composta por 71 plantas que apresentam potencial terapêutico, dentre as quais encontramos espécies de *Copaifera*. Esta lista selecionada tem a finalidade de orientar a cadeia produtiva e desenvolvimento de pesquisas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, instituído em dezembro de 2008, que busca inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS, assim como reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais (BRASIL, 2009).

A oleorresina é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e antisséptico no tratamento de bronquites, sífilis, doenças de pele, úlceras (TINCUSI et al., 2002; VARGAS et al., 2015), no tratamento de infecções de garganta, urinárias e pulmonares (COSTA-LOTUFO et al., 2002; ARRUDA et al., 2019), como laxativo, expectorante, cicatrizante, antiemorrágico e para leishmaniose (MACIEL et al., 2002). O efeito antiproliferativo da oleorresina de *C. multijuga* Hayne em mieloma foi observado em estudo in vitro e in vivo realizado por Lima e colaboradores. O tratamento de camundongos com tumores sólidos com a oleorresina na dose de 2 g/kg por via oral reduziu o crescimento tumoral em 58% e o peso do tumor em 76%. A oleorresina de *C. multijuga* Hayne também reduziu a viabilidade celular em linhagens celulares de melanoma (LIMA et al., 2003). Oleorresinas extraídas de *C. multijuga* Hayne, *C. cearenses* Huber ex Ducke e *C. reticulada* apresentaram atividade anti-inflamatória no modelo de pleurisia induzida por zimosan em camundongos. O tratamento com a oleorresina de *C. multijuga* Hayne na dose de 100 mg/kg inibiu 45% do acúmulo total de leucócitos e inibiu 73% do acúmulo de

neutrófilos (VEIGA JUNIOR et al., 2007). O óleo de copaíba é utilizado pela via tópica para curar feridas, em tumores, urticárias e infecções na garganta (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018). As atividades biológicas da oleorresina são atribuídas aos sesquiterpenos e diterpenos (IZUMI et al., 2012; TOBOUTI et al., 2017; ARRUDA et al., 2019) presentes em grandes quantidades na oleorresina (SOUZA et al., 2018). O óleo de copaíba pode ser encontrado em todo o país em feiras livres, mercados populares, ervanários e farmácias que comercializem produtos naturais (MACIEL et al., 2002).

Embora os diterpenos do tipo caurano, clerodano e labdano sejam encontrados em oleorresinas de diferentes espécies, o seu perfil químico pode apresentar grande variabilidade (ARRUDA et al., 2019). Os ácidos copálico, eperúico, caurenóico, hardwickiico (VEIGA JUNIOR et al., 2007), poliático, assim como seus derivados ácido *ent*-agático, ácido 3-hidroxi-copálico e ácido 3-acetoxi-copálico (Figura 1) são os principais diterpenos encontrados na oleorresina (LEANDRO et al., 2012). O AC é considerado o diterpeno majoritário (ALVES et al., 2017) e biomarcador da oleorresina (VEIGA JUNIOR et al., 2007). O diterpeno AC pertencente a subclasse labdano (LEANDRO et al., 2012) e o diterpeno AK, encontrado em grande quantidade na *C. langsdorffii* (TRINDADE; SILVA; SETZER, 2018), é pertencente a subclasse dos tetracíclicos, com esqueleto do tipo caurano (HANSON, 1998). Estudos mostram que AC e AK apresentam diversas atividades biológicas. A Tabela 1 mostra um resumo dos estudos de atividade utilizando os ácidos isolados ou a oleorresina e seus efeitos.

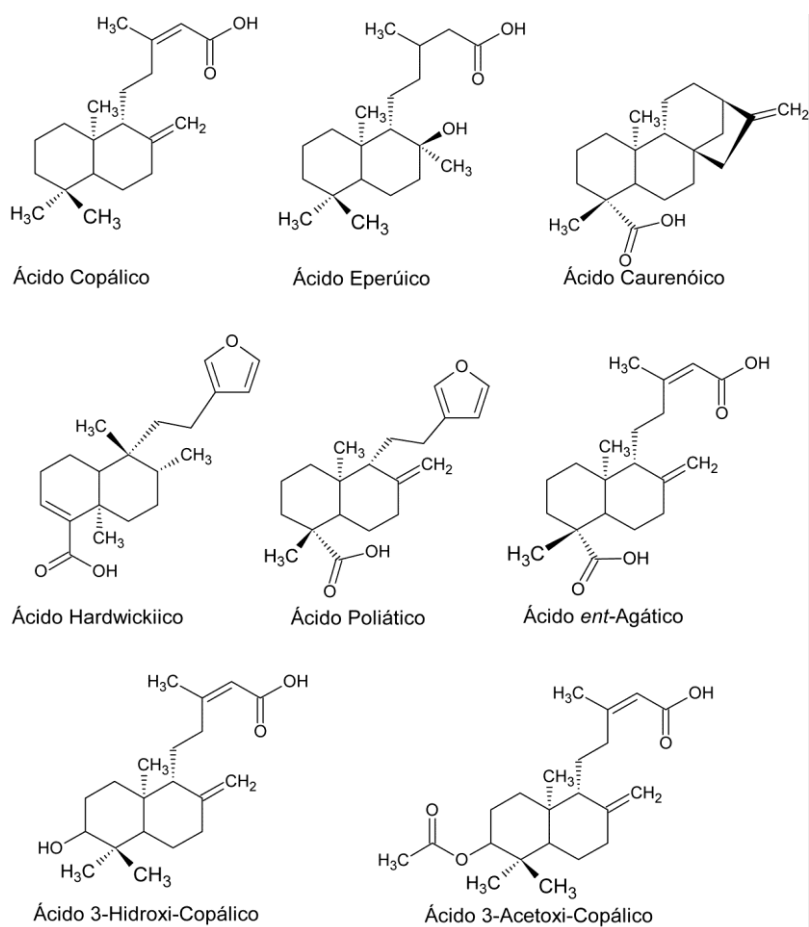


Figura 1. Principais diterpenos encontrados em oleorresina extraída das espécies do gênero *Copaifera* sp. **Fonte:** Próprio autor

Tabela 1. Resumo das atividades biológicas do ácido copálico (AC), ácido caurenóico (AK) e do óleo de copaíba descritas na literatura.

Amostra	Origem	Modelo	Dose	Tratamento	Efeito	Referência
AC	<i>Copaifera multijuga</i>	Ensaio cometa em hepatócitos de ratos	8; 16 e 32 mg/kg	15 dias/gavagem	Não apresentou genotoxicidade; Apresenta atividade quimiopreventiva	Alves et al., 2017
AC	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Microorganismos causadores da cárie	7; 14 e 21 µg/mL	Curva de tempo-morte	Apresenta atividade anticariogênica	Souza et al., 2011 ^a
AC	Óleo comercial de copaíba	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Microsporum gypseum</i>		Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC)	Atividade antifúngica	Nakamura et al., 2017
AC	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Microorganismos causadores de periodontite	3,1 µg/mL	Curva tempo-morte	Atividade bacteriostática	Souza et al., 2011 ^b
AC	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Bactérias da mastite bovina		Curva tempo-morte	Atividade antibacteriana	Fonseca et al., 2013
AK	Oleoresina de <i>Copaifera</i> sp.	Linhagem celular CHO-K1, ensaio cometa e teste de micronúcleo	25; 50; 100; 200 e 400 µM		Tratamentos com 200 e 400 µM de AK reduziram a proliferação celular; AK 100 e 200 µM reduziu a fração de sobrevivência; Não apresentou genotoxicidade quando testado em concentrações não citotóxicas	Cano et al., 2017
AK	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Rato	50 e 100 mg/kg	Oral/retal	Evita colite induzida por ácido acético	Paiva et al., 2003

AK	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Embriões de ouriço-marinho, crescimento de células tumorais; teste de microcultura tetrazólio (MTT) e em eritrócitos de rato e humanos	10-300 µM para 2 mL		Apresentou potencial citotóxico com destruição de embriões; Inibição do crescimento de células tumorais e hemólise dos eritrócitos	Costa -Lotufo et al., 2002
AK	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Fibroblasto pulmonares de hamster Chines, ensaio cometa, teste do micronúcleo	2,5; 5; 10; 30 e 60 µg/mL		Dano ao DNA nas doses 30 e 60 µg/mL	Cavalcanti et al., 2006
Oleorresina	<i>Copaifera multijuga</i>	<i>Streptococcus</i> sp		Teste de difusão em ágar	Atividade bacteriostática	Simões et al., 2016
Oleorresina	<i>Copaifera officinalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,156 - 20 mg/mL	Técnica de microdiluição em caldo (MIC)	Atividade bacteriostática	Guimarães et al., 2016
Oleorresina 10%	<i>Copaifera officinalis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>		Diluição em caldo (MIC)	Atividade bacteriostática	Pieri et al., 2012
Oleorresina	<i>Copaifera langsdorffii</i>	<i>S. mutans</i> <i>S. mitis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. sanguinis</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecalis</i> <i>L. casei</i> <i>C. albicans</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>M. luteus</i> <i>S. choleraesuis</i> <i>A.actinomycetemc</i> <i>omitans</i> <i>P. gingivalis</i> <i>A.naeslundii</i> <i>P. nigrescens</i>		Diluição em ágar (MIC)	Atividade bacteriostática	Dias et al., 2015

Oleorresina	<i>Copaifera langsdorffii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>		Técnica de microdiluição em caldo (MIC)	Atividade bacteriostática	Masson et al., 2013
Oleorresina	<i>Copaifera langsdorffii</i>	pré-incubação de monócitos humanos THP-1 estimulados por LPS			Atividade anti-inflamatória	Trindade; Silva; Setzer, 2018
Oleorresina	<i>C. cearensis</i> <i>Huber ex Ducke</i>	in vitro em macrófagos peritoneais de camundongos	50 µg / mL		Atividade anti-inflamatória	Veiga Junior et al., 2007
Oleorresina	<i>Copaifera langsdorffii</i>	<i>Microsporum spp</i> e <i>Trichophyton spp</i>	5,44 µg/ mL	Técnica de microdiluição em caldo (MIC)	Atividade antifúngica	Zimmerman- Franco et al., 2013

Cavalcanti e colaboradores relataram genotoxicidade nas doses de 30 e 60 µg/mL de AK em fibroblasto pulmonar de hamster através do ensaio cometa e teste do micronúcleo. Os autores relataram citotoxicidade nas doses avaliadas (CANO et al., 2017).

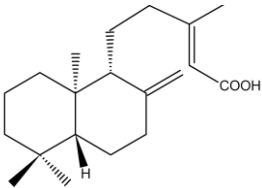
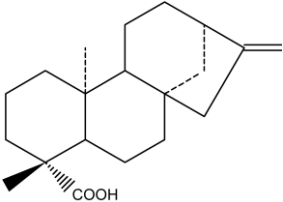
O AC possui atividade antimicrobiana (TINCUSI et al., 2002; SOUZA et al., 2011^a), anti-inflamatória com certa seletividade para COX-2 (LIU; NAIR, 2011), tripanocida com seletividade para as células de mamíferos (SARTORELLI et al., 2010) e antitumoral (LIU; NAIR, 2011). Abrão e colaboradores demonstraram a atividade anti-bacteriana do AC para diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas multirresistentes, bem como atividade antiproliferativa em linhagem de células tumorais HeLa ($IC_{50} = 44,03 \mu\text{g/mL}$) (ABRÃO et al., 2015).

Atividades vasorelaxante, anti-inflamatória, citotóxica e embriotóxica foram observadas para o AK extraído da *Copaifera langsdorfii* (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), assim como atividade anticonvulsivante (OKOYE et al., 2013), supressão de tumores (LIZARTE NETO et al., 2013), antimicrobiana (VELIKOVA et al., 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2002), antifúngica (COTORAS; FOLCH; MENDOZA, 2004), antiparasitária (COSTA-LOTUFO et al., 2002), ação tripanossomicida contra *T. cruzi*, larvicida contra *Aedes aegypti* (MACIEL et al., 2002) e anti-cariogênica (ANDRADE et al., 2011). O AK também pode ser encontrado na espécie *Aralia continentalis* e seu extrato em pó é utilizado na Coreia por via oral em casos de dor e convulsão (KANG, 1997). O AK apresenta diversos efeitos terapêuticos, mas também possui potencial efeito citotóxico observado como inibição no desenvolvimento embrionário de ouriços do mar, inibição do crescimento de células tumorais e hemólise dos eritrócitos humanos e de ratos. Portanto, a segurança no uso de AK deverá ser avaliada para cada indicação terapêutica (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

O AK isolado da oleorresina extraída da *Copaifera langsdorffii* apresentou efeito de relaxamento uterino (CUNHA et al., 2003). O diterpeno foi responsável pela indução na quebra de DNA e por ocasionar genotoxicidade em fibroblastos de pulmão de hamster Chinês (CAVALCANTI et al., 2006). Foram relatados efeitos genotóxicos em rins, fígado e baço de camundongos (CAVALCANTI et al., 2010). A administração do óleo de copaíba pela via oral na dose de 100 mg/Kg mostrou ser eficaz no tratamento da leishmaniose (SANTOS et al., 2011).

As principais propriedades físico-químicas dos diterpenos ácidos AC e AK estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos diterpenos ácido copálico e ácido caurenóico.

<i>Composto</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>Valor</i>	<i>Fonte</i>
Ácido copálico $C_{20}H_{32}O_2$ 	Log P	6,3	Pubchem
		5,31	ALOGPS
		5,48	ChemAxon
		5,43	ChemDraw
	Tipo de composto	Ácido mono-protico	
	pKa	4,82	ChemAxon
	Solubilidade em água	0,00093 g/L	ALOGPS
	Peso molecular	304,5 g/mol	Pubchem
Ácido caurenóico $C_{20}H_{30}O_2$ 	Log P	5,4	Pubchem
		4,13	ALOGPS
		4,81	ChemAxon
		5,04	ChemDraw
	Tipo de composto	Acido mono-protico	
	pKa	4,84	ChemAxon
	Solubilidade em água	0,00048 g/L	ALOGPS
	Peso molecular	302,455 g/mol	Chemidplus

2.2. Estudos ADMET no desenvolvimento de fármacos e medicamentos

Estudos em farmacometria permitem a compreensão dos processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte (ADMET) de novos candidatos a fármacos com o objetivo de prever o cenário clínico e/ou propor estratégias farmacológicas ou farmacotécnicas para alcançar concentrações no plasma associadas com eficácia e segurança. A seleção dos compostos ativos com base apenas na sua potência farmacológica não garante o sucesso no desenvolvimento de um medicamento. A triagem de compostos com base nas suas propriedades ADMET, principalmente aqueles realizados em sistemas in vitro de origem humana, contribuem na seleção dos ativos mais promissores (ANDRADE et al., 2016).

Questões éticas em relação ao uso de animais em pesquisa, os custos elevados e a segurança requerida para os estudos clínicos são fatores que impulsionaram a busca por modelos de investigação *in vitro* e *in silico*. Em 1985 foram analisadas sete indústrias farmacêuticas localizadas no Reino Unido que apresentaram um índice de 39% de falhas em seus novos candidatos a fármacos quando estes atingiam o estágio clínico devido suas propriedades farmacocinéticas. Portanto, conhecer as propriedades cinéticas desses compostos é de extrema relevância para prever seu comportamento em estágios clínicos os quais requerem altos investimentos (KERNS; DI, 2008; FAN; LANNOY, 2014; MALTAROLLO et al., 2015). Cerca de 90% do investimento total é perdido quando ocorre a descontinuação de um projeto que se encontra em fases finais. Estudos realizados na etapa pré-clínica diminuem o investimento e o tempo gasto no desenvolvimento de novos fármacos (LIN; LU, 1997; ANDRADE et al., 2016).

A solubilidade em água e o coeficiente de partição ($\log P$) são parâmetros que norteiam o Sistema de Classificação Biofarmacêutica que categoriza as substâncias de acordo com sua permeabilidade e solubilidade para prever a biodisponibilidade na administração oral (ANDRADE et al., 2016). Os fármacos pertencentes a classe 1 apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade; os pertencentes a classe 2 possuem baixa solubilidade e alta permeabilidade; aqueles da classe 3 apresentam alta solubilidade e baixa permeabilidade; e os da classe 4 apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade (WU; BENET, 2005). Coeficientes de partição octanol/água superiores a 5 são observados para compostos altamente lipofílicos, e, portanto, com alta permeabilidade através das membranas celulares. Entretanto, estes compostos podem apresentar baixa absorção por via oral devido a baixa solubilidade em água.

A permeabilidade de fármacos pelo epitélio intestinal pode ser usada para prever sua biodisponibilidade oral. A permeabilidade intestinal de uma substância pode ser determinada utilizando estudos em humanos, *in silico*, modelos com animais de experimentação, modelos em 3D (NEJDFORS et al., 2000; ROOS et al., 2017; PEREIRA; LECHANTEUR; SARMENTO, 2018) ou ainda *in vitro* através da utilização de tecidos intestinais ou monocamadas de células epiteliais (FDA, 2017). Estudos de absorção *in vitro* utilizando linhagens celulares humanas em cultura são superiores a outros modelos experimentais do ponto de vista ético e em termos da previsibilidade da biodisponibilidade no homem (HOFFMANN et al., 2018). Os

modelos *in vitro* incluem culturas celulares de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) e MDCK (do inglês *Martin-Darby Canine Kidney*) e ensaio de permeação em membrana artificial paralela (PAMPA). Devido ao seu processo de diferenciação em condições de cultura, as células Caco-2 apresentam grande semelhança com as células do epitélio intestinal humano quanto as características morfológicas e funcionais. As células Caco-2 se diferenciam formando uma monocamada que expressa enzimas de fase II e proteínas transportadoras de efluxo - sendo as principais glicoproteína-P (P-gp), proteína de resistência a múltiplos fármacos 2 (MRP2, sigla em inglês para *multidrug resistance-associated protein 2*) e proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP, sigla em inglês para *breast cancer resistance protein*). As células em cultura também apresentam características do movimento transcelular e paracelular do epitélio intestinal (BREEMEN; LI, 2005; ENGLUND et al., 2006). Portanto, a linhagem celular Caco-2 mimetiza o epitélio intestinal humano e é o modelo mais recomendado para prever a biodisponibilidade oral (BALIMANE; CHONG, 2005; FERNANDES et al., 2012; GOUVEA et al., 2014; ANDRADE, 2016).

Para obtenção de resultados confiáveis, ensaios de viabilidade celular nas células do ensaio devem ser realizados a fim de evitar resultados equivocados de altos valores de permeabilidade observados quando ocorre morte celular provocando perda da função da monocamada (FERNANDES et al., 2012). Métodos que utilizam a redução dos sais de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - MTT), redução de resazurina, marcadores de protease e detecção de ATP são utilizados para determinar a viabilidade celular que pode ser comprometida pelo composto utilizado ou pelos solventes presentes no ensaio de permeabilidade (RISS et al., 2016). A viabilidade celular determinada utilizando o ensaio com resazurina que é um composto de coloração azul e que não possui fluorescência é considerado um método simples, atóxico, de baixo custo, rápido e sensível. O corante resazurina é convertido em resorufina que apresenta coloração vermelha e é altamente fluorescente pelas células metabolicamente ativas. A medição da fluorescência é realizada por espectrofotometria (BONNIER et al., 2015; KUETE et al., 2017).

Como parte dos estudos pré-clínicos está a compreensão da biotransformação que poderá influenciar a resposta terapêutica ou a segurança do fármaco (BRANDON et al., 2003; FASINU; BOUIC; ROSENKRANZ, 2012). As

substâncias podem sofrer biotransformação através de reações de fase I (oxidação, redução e hidrólise), fase II (conjugação) ou por uma combinação destas. As enzimas do citocromo P450 (CYP 450), encontradas principalmente no fígado, são as principais responsáveis pelo metabolismo de fase I (FASINU; BOUIC; ROSENKRANZ, 2012; SEVIOR; PELKONEN; AHOKAS, 2012).

Os principais modelos *in vitro* empregados para avaliar o metabolismo hepático incluem enzimas recombinantes CYP e UDP-glicuronosiltransferases, microssomas, fração citosólica, fração S-9, cultura de hepatócitos, amostras de tecido hepático e fígado perfundido (FASINU; BOUIC; ROSENKRANZ, 2012). Os microssomas hepáticos são constituídos principalmente por enzimas CYP 450, glutathione-S-transferases e flavinas monooxigenases. Amplamente empregados nos ensaios de metabolismo *in vitro*, os microssomas hepáticos são obtidos através da homogeneização do fígado, seguida por etapas de ultracentrifugação (PELKONEN et al., 1974; TINGLE; HELSBY, 2006; SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). O uso de microssomas hepáticos tem como vantagens o fato de ser um modelo facilmente aplicável, acessível e bem estabelecido para pesquisa de biotransformação de fármacos (BRANDON et al., 2003). Estudos de metabolismos utilizando microssomas hepáticos de animais, como por exemplo, de rato, são realizados para otimizar as condições experimentais usando microssomas humanos, além de permitir a avaliação da variabilidade interespecífica (BRANDON et al., 2003).

O clearance é um parâmetro farmacocinético que estima a taxa de eliminação do fármaco no organismo (POULIN et al., 2012). A predição do clearance metabólico *in vivo* a partir de ensaios de metabolismo realizados *in vitro* representa uma ferramenta útil e relevante no desenvolvimento de fármacos uma vez que há uma relação linear entre o clearance hepático *in vivo* e o clearance hepático predito (MINERS et al., 2006). Entretanto, historicamente observou-se que o clearance metabólico humano foi subestimado a partir de dados de clearance intrínseco (CL_{int}) derivados de ensaios em hepatócitos humanos criopreservados ou microssomas hepáticos humanos. As principais razões para esse desvio são atribuídas à variabilidade interindividual, à qualidade dos dados *in vitro* usados, metabolismo extra-hepático, ligação microssomal não específica ou ao papel de transportadores de captação de fármacos (HALLIFAX et al., 2005; CHIBA et al., 2009). Em casos em que a relação entre a velocidade de metabolismo e a concentração do substrato apresenta um comportamento hiperbólico, o CL_{int} é determinado através da razão

$V_{\max}/K_m$ (AUSTIN et al., 2005). A incorporação da fração livre do fármaco no meio microssomal para o cálculo do clearance intrínseco resulta em resultados mais precisos (OBACH, 1999).

A taxa de extração do fármaco pelo fígado (E) pode ser calculada pela razão CL_H/Q , onde Q é o fluxo sanguíneo hepático e CL_H é o clearance hepático (MAKOID; UCHETICH; BANAKAR, 1996).

Fármacos de alto E são considerados de alta razão de extração hepática, o que significa que a cada passagem pelo fígado, uma grande fração da concentração arterial hepática será biotransformada. Para fármacos de alto E, o clearance hepático depende essencialmente do fluxo sanguíneo hepático (Q). Os fármacos de baixo E ($E < 0,3$), tem uma pequena fração da concentração arterial hepática biotransformada a cada passagem pelo fígado. Para esses casos, o clearance hepático depende principalmente de variações na fração livre plasmática (F_u) e no clearance intrínseco (CL_{int}), como por exemplo no caso de coadministração de fármacos inibidores. Para os fármacos com razão de extração hepática intermediária ($0,3 < E < 0,7$), diz-se que o clearance hepático é dependente de variações em todos os fatores supracitados (Q, F_u e CL_{int}) (TOZER; ROWLAND, 2006).

Enzimas são responsáveis pela catálise de reações químicas específicas. A atividade enzimática pode ser determinada pela velocidade inicial da reação em ensaios de depleção do substrato *versus* tempo, nos quais é determinada a variação na concentração do substrato em função do tempo. Devido à depleção do substrato, a velocidade da reação diminui progressivamente e finalmente é interrompida.

O modelo de Michaelis e Menten é uma representação matemática amplamente utilizada para determinar parâmetros da cinética enzimática. O modelo assume que as enzimas são saturáveis (GOLICNIK, 2011), ou seja, em altas concentrações do substrato a velocidade é independente da concentração para atingir a velocidade máxima (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012). A equação de Michaelis-Menten baseia-se no equilíbrio das reações enzimáticas envolvendo o substrato considerando que esta ocorre em duas etapas. Na primeira etapa o substrato (S) se liga à enzima (E) de forma reversível e instável, com a formação do complexo ES. Na segunda etapa a qual ocorre de forma irreversível, tem-se a formação do produto (P) após a dissociação do complexo ES (MARANGONI, 2003).

Nesse modelo a velocidade máxima da reação é observada no estado estacionário, de acordo com a equação 1 onde V_0 é a velocidade inicial da reação,

[S] é a concentração do substrato, $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reação e K_M é a constante de Michaelis-Menten. O parâmetro K_M equivale a concentração do substrato na qual V_0 é igual à metade de $V_{\max}$ e representa a afinidade aparente entre enzima e substrato (VENKATAKRISHNAN; VON MOLTKE; GREENBLATT, 2001).

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

No modelo de Michaelis-Menten, ao plotar diferentes concentrações do substrato *versus* a velocidade inicial da reação, a relação assume a forma de hipérbole (Figura 2).

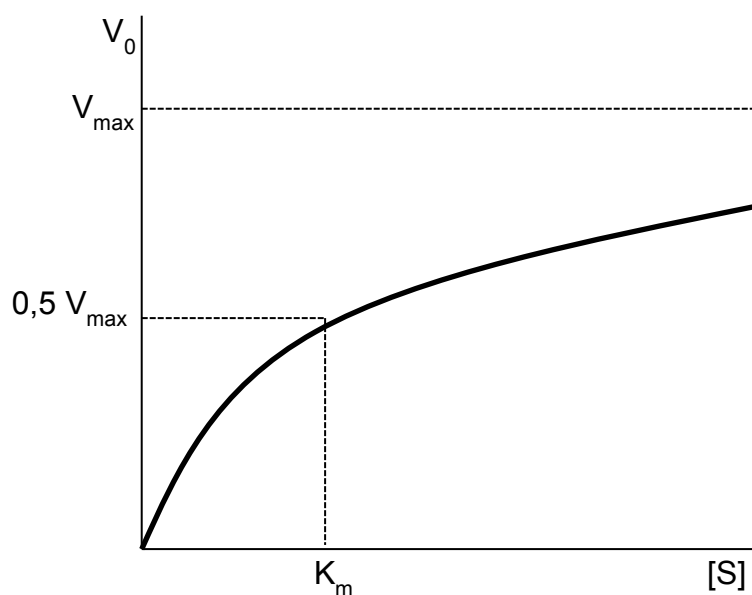


Figura 2. Gráfico representativo da reação enzimática segundo o modelo de Michaelis-Menten. $V_{\max}$, velocidade máxima; V_0 , velocidade inicial; $[S]$, concentração de substrato; K_M , constante de Michaelis-Menten.

Entretanto, nem sempre a cinética enzimática segue o modelo proposto por Michaelis-Menten e desvios podem ser encontrados. Quando a enzima possui múltiplos sítios catalíticos de alta e baixa afinidade pelo substrato com perfil de cooperatividade entre esses sítios, o plote de V_0 *versus* $[S]$ apresenta perfil sigmoide e o modelo mais adequado para avaliar a cinética enzimática é o de Hill. Esse

modelo leva em consideração que modificações na conformação da enzima podem ocorrer após sua ligação com o substrato, modificando a afinidade dos sítios ativos restantes pelo substrato (MARANGONI, 2003). No modelo de Hill as enzimas possuem várias subunidades de ligação, o que a difere do modelo de Michaelis-Menten que possui apenas um sítio de ligação.

A cooperatividade entre os sítios catalíticos pode ser positiva ou negativa. Quando positiva (coeficiente de Hill > 1), diz-se que ocorre autoativação, uma vez que as mudanças no sítio da enzima causada pelo ligante facilitam a ligação do substrato. Quanto maior o valor de n , maior o grau de cooperatividade e mais sigmoideal será a curva. Quando negativa (coeficiente de Hill < 1), o ligante dificulta ou inibe a interação com a enzima. Em casos onde o coeficiente de Hill é igual a 1, a reação não é cooperativa e os sítios ativos da enzima se comportam de forma independente, ou seja, a ligação de um substrato em um sítio não afeta a ligação em outro sítio (MARANGONI, 2003, OGILVIE et al., 2008). O gráfico a seguir representa o plote de V_0 versus $[S]$ no modelo de Hill (Figura 3).

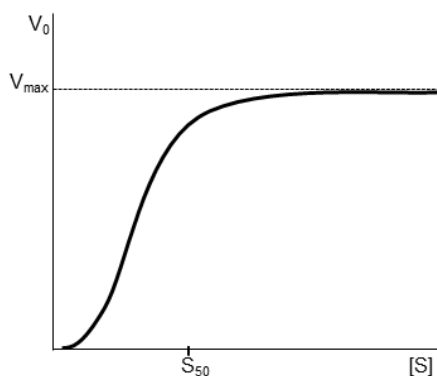


Figura 3. Gráfico representativo do plote de V_0 versus $[S]$ no modelo de Hill. V_0 é a velocidade inicial da reação; V_{max} é a velocidade máxima da reação; $[S]$ é a concentração do substrato; S_{50} é a constante que indica a concentração de substrato na qual a enzima atinge 50% de sua V_{max} .

A cinética sigmoideal pode ser representada pela equação de Hill (Equação 2):

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^h}{S_{50}^h + [S]^h} \quad (2)$$

onde, v é a velocidade da reação; $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reação; $[S]$ é a concentração do substrato; S_{50} é a constante que indica a concentração do substrato na qual a velocidade é a metade da velocidade máxima ($V_{\max}$), indicando a “afinidade aparente” da enzima pelo substrato; h é o coeficiente de Hill, que demonstra o grau de cooperatividade do substrato ligado à enzima (OGILVIE et al., 2008).

A representação gráfica de Eadie-Hofstee, ou plote de v versus $v/[S]$, pode ser utilizada como diagnóstico de desvios do modelo de Michaelis-Menten. Enquanto o perfil hiperbólico de Michaelis-Menten transforma-se em um plote linear na representação de Eadie-Hofstee, dados que seguem o modelo de cooperatividade de Hill assumem o formato de um gancho.

Outro perfil de cooperatividade que pode ser encontrado é o bifásico, onde a saturação não é alcançada. Ao avaliar baixas concentrações do substrato, o perfil assemelha-se a uma hipérbole, mas em altas concentrações é observado um aumento da velocidade de forma linear e sem a presença de saturação (KRAMER; TRACY, 2012). Esse perfil é característico de sistemas multienzimáticos, onde duas enzimas distintas que possuem alta e baixa afinidade produzem o mesmo metabólito, mas com velocidades diferentes, ou também pode ser encontrado em casos onde a enzima apresenta sítios de ligação com afinidade diferente. A reação bifásica é calculada utilizando a seguinte equação 3.

$$v = \frac{V_{\max1}[S] + \frac{V_{\max2}}{K_{m2}} \times [S]^2}{K_{m1} + [S]} \quad (3)$$

Onde, v é a velocidade inicial, $V_{\max1}$ é a velocidade máxima catalisada pela enzima ou sítio de ligação que possui alta afinidade pelo substrato, K_{m1} é a constante de Michaelis-Menten relacionada com a enzima ou sítio de ligação que possui alta afinidade pelo substrato, $[S]$ é a concentração do substrato, $V_{\max2}$ é a velocidade máxima catalisada pela enzima ou sítio de ligação que possui baixa afinidade pelo substrato, K_{m2} é a constante de Michaelis-Menten relacionada com a enzima ou sítio de ligação que possui baixa afinidade pelo substrato.

O perfil cinético de inibição pelo substrato também pode ser encontrado. Esse caracteriza-se pelo surgimento de um platô de formação de produto em um

determinado ponto, o qual apresenta diminuição da velocidade mesmo com o aumento da concentração do substrato. Isso pode ocorrer devido a ligações em outros sítios, ocasionando mudanças na conformação da enzima e diminuição na taxa de formação do produto (SEIBERT; TRACY, 2014).

A Figura 4 possui os diferentes modelos de gráficos que podem ser encontrados de acordo com o perfil cinético.

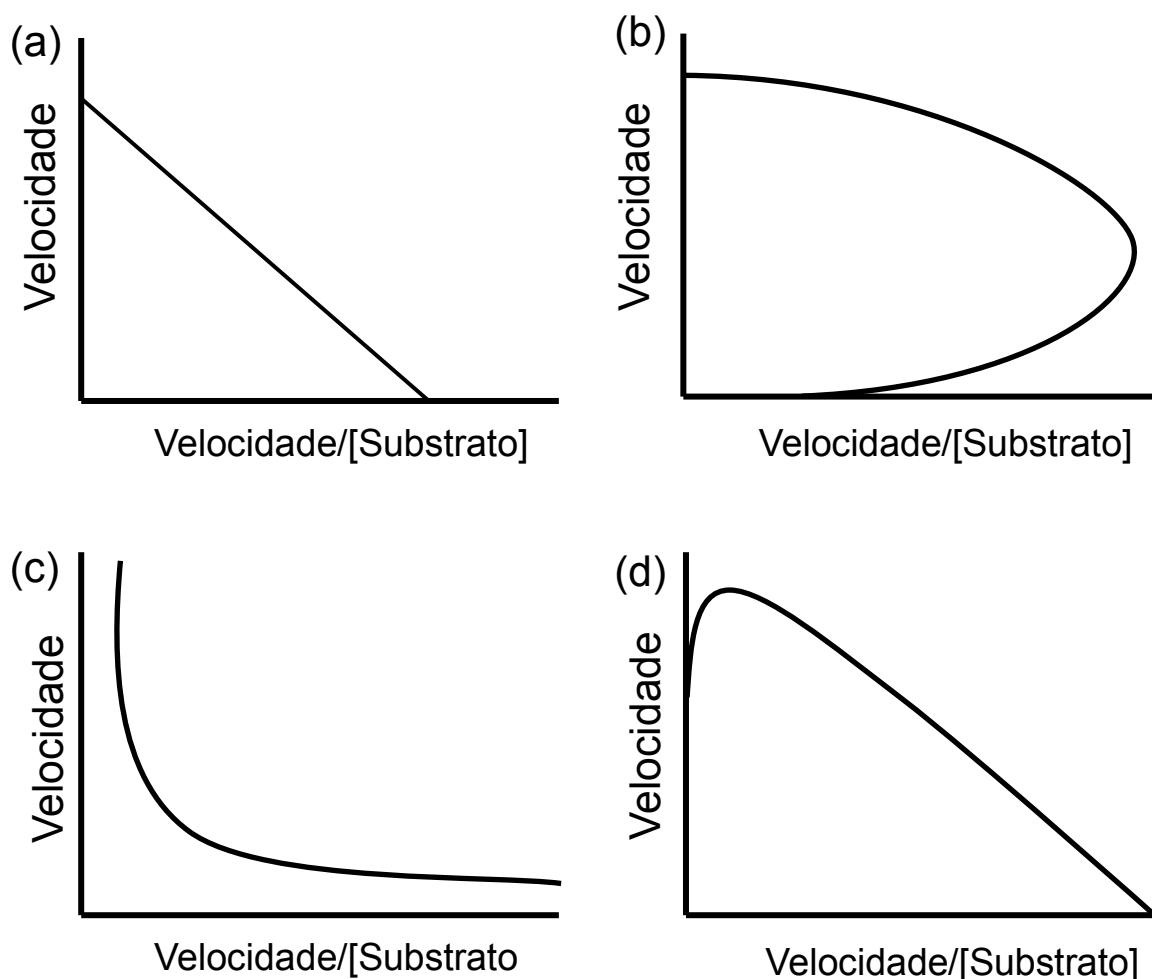


Figura 4. Gráficos de Eadie-Hofstee para uma cinética típica e cinética atípica. (a) Cinética Michaeliana, (b) cinética sigmoidal, (c) cinética bifásica e (d) cinética de inibição pelo substrato. Fonte: modificado de Kramer e Tracy, 2012.

Apesar de diversos estudos relatarem os promissores efeitos terapêuticos da oleorresina de *Copaifera* sp., bem como do AC e do AK isolados, até a presente data não há muitos dados na literatura referentes as propriedades farmacocinéticas desses diterpenos. Diante disso, o presente estudo buscou compreender a disposição cinética do AC e AK através de ensaios de caracterização da estabilidade em sistemas que mimetizam o pH estomacal e intestinal, a fração livre no plasma humano, permeabilidade intestinal e metabolismo em microsomas hepáticos.

3. OBJETIVO GERAL

Este estudo buscou investigar a disposição cinética através da determinação da permeabilidade oral, fração livre em plasma, estabilidade e metabolismo hepático dos diterpenos de *Copaifera* sp. AC e AK através de metodologias que minimizam o uso de animais em pesquisa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento e caracterização do AC e do AK

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (Cadastro nº A6113C6, ANEXO 1) em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos. Os diterpenos AC e AK foram extraídos da oleorresina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), obtidos de um centro cooperativo (Rio Branco, AC, Brasil) como descrito anteriormente (NAKAMURA et al., 2017). O isolamento e a purificação do AC e AK foram realizados no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da FCFRP-USP, sob coordenação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Após a purificação, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (CG). A identidade do AK foi confirmada pela biblioteca do CG e a confirmação da estrutura do AC foi realizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e (^1H -RMN) e de carbonos (^{13}C -RMN). (APÊNDICE 1; OHSAKI et al., 1994).

4.2. Método analítico de determinação do AC e do AK por LC-MS

Foi desenvolvido método analítico para a determinação do AC e AK em solução usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). O método analítico foi desenvolvido com a finalidade de determinar o AC e o AK nos diferentes ensaios ADMET propostos neste projeto.

4.2.1. Reagentes e solventes

Foi utilizado o solvente acetonitrila (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA), grau HPLC. Os reagentes formiato de amônio (Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) e dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, Diadema, Brasil) utilizados foram grau analítico. Toda a água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q[®] Plus (Millipore, Belford, MA, EUA).

4.2.2. Preparo das soluções padrão

As soluções padrão estoque AC e AK foram preparadas na concentração de 2.500 μM em DMSO. A partir da solução estoque foi preparada uma solução

intermediária na concentração de 500 µM em metanol. Diluições foram realizadas para a obtenção dos padrões de calibração nas seguintes concentrações 0,125; 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 25 e 50 µM em metanol. Para a construção da curva analítica, os padrões de calibração foram diluídos para a obtenção das seguintes concentrações finais de AC ou AK: 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5 e 5 µM.

4.2.3. Sistema cromatográfico

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). O sistema cromatográfico consistiu de cromatógrafo Perkin Elmer (Shelton, EUA), composto de sistema binário de bombas (Flexar LC Pump), degaseificador (Flexar solvent manager), forno (Flexar LC column oven), injetor automático (Flexar LC Autosampler) e espectrômetro de massas quadrupolo simples (Perkin Elmer, Flexar SQ 300 MS). Os dados foram adquiridos e a quantificação das amostras realizadas através do programa Chromera, versão 3.4.0.5712 (Perkin Elmer, Shelton, EUA).

A análise por espectrometria de massas foi realizada no modo *electrospray* negativo. A voltagem do capilar na ionização por *electrospray* foi de 6,0 kV. A temperatura de dessolvatação foi mantida a 350 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 12 L/min. A voltagem do cone utilizada foi calibrada com relação ao autotune realizado para as substâncias de interesse. As condições de otimização do MS foram obtidas através de infusão direta da solução padrão de AC e AK (1,6 µM) preparadas em acetonitrila e introduzidas com bomba de infusão na vazão de 10 µL/min. A análise para otimização da voltagem do CAPEX foi executada através da variação da voltagem pelo tempo (-350 V a -50 V com variação de 2 V) e pela observação dos íons moleculares desprotonados de razão massa carga (m/z) 303 para AC e 301 para AK resultando em um valor ótimo de -90 V. As razões m/z 303 e 301 foram utilizadas para monitorização do AC e AK respectivamente.

Os analitos foram resolvidos em coluna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 mm (2,7 µm), coluna de guarda Poroshell 120 EC-C18 4,6×5 mm (2,7 µm), (Agilent Technologies, Santa Clara, United States) mantida a 22 °C e fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 5 mM (pH = 4) e ACN (10/90, v/v), com vazão de 0,5 mL/min, em modo isocrático. O volume da injeção foi de 20 µL. O

efluente da coluna cromatográfica foi dirigido para o espectrômetro de massas (MS) quadrupolo simples Flexar SQ 300 MS Perkin Elmer (Shelton, EUA).

4.2.4. Validação

O método foi validado seguindo como base as normas do Guia para Validação de Métodos Analíticos da ANVISA, resolução 166, de 24 de julho de 2017. Foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão e exatidão.

4.2.4.1. Seletividade

Para avaliar a seletividade do método foram comparadas amostras contendo apenas o solvente utilizado como veículo, onde os analitos foram solubilizados, com amostras contendo AC e AK 0,0125 μM , com o intuito de garantir a pureza dos picos cromatográficos.

4.2.4.2. Linearidade

A linearidade foi determinada após a construção em triplicata de uma curva analítica para o AC e para o AK, plotando a área do pico dos compostos *versus* a sua concentração nominal. Foram utilizadas oito concentrações diferentes para cada composto, 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 2,5 e 5 μM . O critério de aceitação é um valor mínimo do coeficiente de correlação de 0,99.

4.2.4.3. Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão foram avaliadas intra-ensaio (mesma corrida) e interensaios (corridas diferentes) utilizando a triplicata dos controles de qualidade de baixa (CQB=0,025 μM), média (CQM=0,5 μM) e alta (CQA=4,5 μM) concentração para AC e AK, que contemplaram o intervalo linear do método. A precisão foi expressa como desvio padrão relativo (DPR%) que foi calculado segundo a equação 4.

$$DPR = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{concentração média determinada}} \times 100 \quad (4)$$

A exatidão foi determinada pela relação entre a concentração média experimental e a concentração teórica, conforme a equação 5.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (5)$$

Como critério de aceitação da precisão, o coeficiente de variação deve ser inferior a 5%, e para a exatidão o valor obtido deve estar na faixa de 80 a 120% da concentração teórica do teste.

4.3. Ensaio de estabilidade química

A estabilidade química do AC e AK em pH ácido e básico foi realizada no intuito de avaliar o comportamento dos analitos em condições que mimetizam o ambiente estomacal e plasmático. A partir da solução estoque de AC e AK, preparada na concentração de 5 µM em metanol, foram preparadas soluções de AC e AK na concentração de 0,05 µM, em solução tampão de Clark-Lubs (pH 1,2) e tampão fosfato de potássio-hidróxido de sódio (pH 7,4). O tampão Clark-Lubs foi preparado a partir de 100 mL de solução de cloreto de potássio (Neon Comercial, São Paulo, Brasil) 0,2 M acrescida de solução de ácido clorídrico (Neon Comercial, São Paulo, Brasil) na concentração de 0,2 M até atingir o pH de 1,2. O tampão fosfato monopotássico-hidróxido de sódio foi preparado utilizando 100 mL de solução de fosfato monopotássico (Neon Comercial; São Paulo, SP, Brasil) 0,1 M adicionada de solução de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 M até atingir o pH de 7,4.

O ensaio de estabilidade química foi realizado em pH 1,2 (tampão Clark-Lubs) e em pH 7,4 (tampão fosfato monopotássico-hidróxido de sódio), em triplicata. As soluções foram mantidas durante todo o tempo do experimento em incubadora sob agitação (70 rpm) e temperatura (37 °C) constantes (Ethik Technology modelo 430 – RDB T5, São Paulo, Brasil). Foram coletadas amostras das soluções (100 µL) nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 12 e 24 horas. As amostras foram analisadas utilizando o

método analítico desenvolvido e validado em LC-MS, descrito no item 4.2. A concentração das amostras coletadas em diferentes tempos foi comparada com a concentração basal usando a análise de variância (ANOVA com o pós-teste de Tukey ($p < 0,05$) (DE CAMPOS et al., 2017).

4.4. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para determinação do AC e AK em plasma humano

4.4.1. Reagentes e solventes

Os solventes acetonitrila (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA) e éter metil-*terc* butílico (Panreac, Darmstadt, Germany) foram grau HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Os reagentes acetato de amônio (Dinâmica, São Paulo, Brasil), ácido clorídrico (Neon, São Paulo, Brasil) e dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, Diadema, Brasil) foram grau analítico. Toda a água utilizada durante o experimento foi obtida em sistema de purificação Milli-Q[®] Plus (Millipore, Belford, MA, EUA). O padrão fluvastatina foi adquirido da Sigma Aldrich (pureza $\geq 98\%$, St. Louis, MO, EUA).

4.4.2. Preparo das soluções

As soluções padrão estoque dos AC e AK foram preparadas nas concentrações 2000 μM e 2500 μM respectivamente em DMSO. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição da solução estoque em metanol para alcançar as seguintes concentrações 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 4,0; 12,85 e 16 μM para AC e 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 16 e 20 μM para AK. O padrão interno fluvastatina foi preparado na concentração de 1 μM em ACN. Todas as soluções foram armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise.

4.4.3. Sistema cromatográfico

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) conforme item 4.2.3. As razões m/z 303 e 301 foram utilizadas para monitorização do AC e AK respectivamente, e o íon molecular desprotonado $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ de razão m/z 410 para o padrão interno fluvastatina.

4.4.4. Preparo de amostra

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Parecer CAAE 65707517.6.0000.5426, ANEXO 2). O plasma de seis voluntários sadios foi obtido após doação de sangue no Hemonúcleo Regional de Araraquara “Professora Doutora Clara Pechmann Mendonça (HN). Os voluntários sadios que aceitaram doar o seu plasma para esta pesquisa realizaram o protocolo convencional da doação de sangue após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, APÊNDICE 2). Os critérios de inclusão foram: indivíduos saudáveis, com idade entre 18 e 60 anos e peso acima de 50 Kg. Os critérios de exclusão foram os seguintes: gestantes, lactantes e/ou voluntários em uso crônico de qualquer medicamento. Após fracionamento do sangue, a bolsa de plasma foi destinada a pesquisa e demais componentes do sangue foram doados ao Hemonúcleo.

Alíquotas de 100 μL de plasma foram enriquecidas com 20 μL de solução contendo AC, 20 μL de solução contendo AK, 20 μL da solução contendo padrão interno (fluvastatina), 20 μL da solução de ácido clorídrico 1 M e 300 μL do solvente extrator éter metil-*terc*-butílico. As amostras foram agitadas por 20 minutos em mesa agitadora reciprocante horizontal (TE-240 Tecnal, 130 ± 10 ciclos/min), centrifugadas por 10 min ($15.000 \times g$, 5 °C). A fase orgânica (270 μL) de cada amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL e evaporada à secura a 40 °C utilizando um concentrador de amostras a vácuo (GenevacTM Centrifugal Duo, Ipswich Reino Unido). O resíduo foi reconstituído em 90 μL de fase móvel, agitado em vórtex por 1 minuto, transferido para o vial e 20 μL foram injetados na coluna cromatográfica (Figura 5).

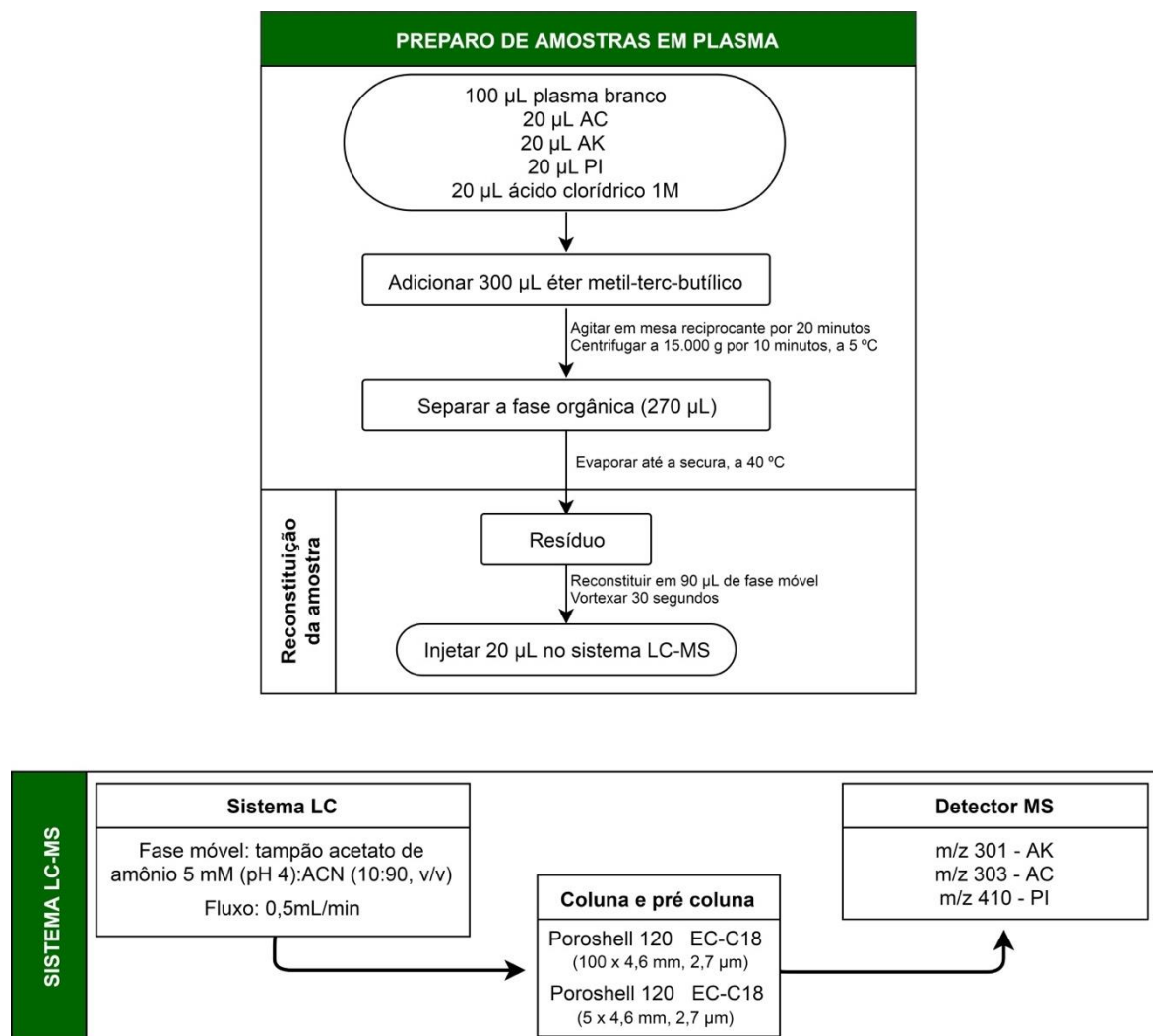


Figura 5. Procedimento de extração líquido-líquido dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano. [AC: ácido copálico; AK: ácido caurenóico; P.I.: padrão interno; LC-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas; ACN: acetonitrila].

4.4.5. Validação

O método desenvolvido para análise dos diterpenos em plasma humano foi validado de acordo com as recomendações da ANVISA para a validação de métodos bioanalíticos (Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012; BRASIL, 2012). Os seguintes parâmetros foram avaliados: curva de calibração/linearidade, precisão e exatidão intra e interensaios, seletividade, limite de quantificação, efeito residual, efeito matriz e estabilidade em temperatura ambiente (curta duração), após ciclos de congelamento e descongelamento e pós-processamento.

4.4.5.1. Seletividade

A seletividade foi avaliada utilizando amostras de plasma branco obtidas de 6 fontes distintas, sendo 4 normais, 1 hemolisada e 1 lipêmica. Para que um método seja considerado seletivo, respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito e respostas de picos interferentes no tempo de retenção do P.I. inferiores a 5% da resposta do P.I. quando amostras branco são comparadas as amostras do limite inferior de quantificação (LIQ).

4.4.5.2. Efeito Residual

O efeito residual foi avaliado através de três injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada do limite superior de quantificação (LSQ). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% e as respostas de picos interferentes no tempo de retenção do P.I. inferiores a 5% quando comparados à amostra processada do LIQ.

4.4.5.3. Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação entre as áreas dos picos dos ácidos e do padrão interno em solução com as áreas dos picos resultantes do plasma processado conforme protocolo de preparo de amostra e posteriormente enriquecido com o analito e o padrão interno. Para avaliação do efeito matriz foram utilizados plasmas de 8 fontes distintas, sendo 6 amostras normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada. As amostras analisadas devem apresentar as mesmas concentrações dos controles de qualidade de baixa concentração (CQB, 0,08 µM para AC e 0,10 µM para AK) e do controle de qualidade de alta concentração (CQA, 2,57 µM para AC e 3,20 µM para AK).

A equação 6 foi utilizada para obter o fator matriz normalizado por P.I. (FMN) para cada amostra:

$$FMN = \frac{\text{resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{resposta do analito em solução/resposta do PI em solução}} \quad (6)$$

O efeito matriz é definido pelo coeficiente de variação (CV %) dos FMN relativos a todas as amostras e deve ser inferior a 15%.

4.4.5.4. Curva de calibração/linearidade

Para a construção da curva de calibração, alíquotas de 100 µL de plasma branco enriquecidas com 20 µL das soluções padrão e padrão interno, foram utilizados. As amostras foram extraídas e analisadas como descrito anteriormente. A curva de calibração foi construída a partir de amostras preparadas nas concentrações finais de 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 1,00; 3,20 e 4,00 µM para o AK e 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,80; 2,57 e 3,20 µM para o AC em plasma.

Considerando que a variância do erro não foi constante em toda a faixa de quantificação, foi utilizada a ponderação $1/x^2$.

4.4.5.5. Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão devem ser determinadas em uma mesma corrida (intra-ensaio) e em três corridas diferentes (interensaios). Os controles de qualidade limite inferior de quantificação (LIQ = 0,04 µM para AC e 0,05 µM para AK), controle de qualidade de baixa concentração (CQB = 0,08 µM para AC e 0,10 µM para AK), controle de qualidade de média concentração (CQM = 0,32 µM para AC e 0,40 µM para AK) e controle de qualidade de alta concentração (CQA = 2,57 µM para AC e 3,20 µM para AK) foram analisados em quintuplicata. A precisão intra-ensaio e interensaios é adequada quando o coeficiente de variação (CV) não for superior a 15%, exceto para a menor concentração, para a qual é aceitável o CV de até 20%. O CV foi determinado conforme a equação 7.

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (7)$$

A exatidão intra-ensaio e interensaios foi determinada através do cálculo do erro padrão relativo (EPR) o qual deve apresentar valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores inferiores a $\pm 20\%$ do valor nominal. O EPR foi calculado conforme a equação 8.

$$EPR = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal})}{\text{Valor nominal}} \times 100 \quad (8)$$

4.4.5.6. Estabilidade

A estabilidade dos analitos foi avaliada utilizando amostras de plasma enriquecidas nas concentrações de CQB (0,08 µM para AC e 0,10 µM para AK) e CQA (2,57 µM para AC e 3,20 µM para AK) em triplicada. A concentração das amostras foi determinada utilizando curva de calibração recém-preparada. A estabilidade é demonstrada quando a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentar desvio superior a 15%. A estabilidade do analito na matriz biológica foi demonstrada por meio dos estudos de estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade de curta duração e estabilidade pós-processamento.

Amostras CQB e CQA foram utilizadas para avaliar a estabilidade após ciclo de congelamento e descongelamento. As amostras foram congeladas à -20 °C por 24 horas, descongeladas e então foram processadas e analisadas por LC-MS.

A estabilidade de curta duração das amostras foi determinada após a permanência a temperatura ambiente (23 ± 2 °C) por 1 hora. Na sequência as amostras foram processadas e analisadas por LC-MS.

Para a estabilidade pós-processamento, antes de realizar a análise, as amostras dos controles de qualidade de baixa e alta concentração foram processadas e mantidas no autoinjeter por um período de 7 horas à temperatura de 18 °C, período superior à duração da corrida analítica utilizada no estudo.

4.5. Ensaio de estabilidade em plasma humano por LC-MS

A determinação da estabilidade em plasma humano foi realizada em triplicata, adicionando ao plasma solução do AC e de AK em concentrações finais de 0,8 e 1 µM em plasma, respectivamente. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por um minuto e na sequência foram mantidas durante todo o tempo do experimento sob agitação (70 rpm) e temperatura (37 °C) constantes através da utilização de incubadora (Ethik Technology modelo 430 – RDB T5, São Paulo, Brasil). Nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 12 e 24 horas foram realizadas coletas das amostras (100 µL), as quais foram analisadas por LC-MS. Para a realização deste ensaio, foi desenvolvido e validado o método cromatográfico para determinação de AC e AK em

plasma humano descrito no item 4.4. O teste ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para determinar a estabilidade do AC e AK em plasma humano.

4.6. Determinação do Log P

Inicialmente, o Log P teórico do AC e AK foi estimado usando o *software ChemDraw Ultra 12.0* – Cambridge. Em seguida, foi realizada a determinação experimental do Log P utilizando método cromatográfico conforme as recomendações do *Guideline 117 da Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2004). Esse método consiste na construção de uma curva de Log P *versus* Log K (log do fator de capacidade) para substâncias de referência (Tabela 3), sendo que para este estudo foram utilizadas acetanilida, benzeno, clorobenzeno, timol, fenantreno, trifenilamina e diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States). As substâncias referência foram selecionadas a partir do Log P teórico dos AC e AK, de forma a apresentarem valores inferiores e superiores a estes.

Tabela 3. Substâncias utilizadas para a determinação do log P do AC e AK.

Substância	Log P
Acetanilida	1
Benzeno	2,1
Clorobenzeno	2,8
Timol	3,3
Fenantreno	4,5
Trifenilamina	5,7
diclorodifeniltricloroetano (DDT)	6,5

Os fatores de capacidade (k) foram determinados pela diferença entre o tempo de retenção do analito (t_R) e o tempo morto do sistema (t_0), dividida pelo t_0 (Equação 9).

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (9)$$

O tempo morto (t_0) foi calculado a partir das dimensões da coluna cromatográfica de acordo com a equação 10, onde r é o raio interno da coluna (em mm), C é o comprimento da coluna somado ao comprimento da coluna de guarda (em mm) e v é a vazão do sistema (em $\mu\text{L/mL}$).

$$t_0 = \frac{0,5 \times \pi \times r^2 \times C}{v} \quad (10)$$

A regressão linear obtida do plote do Log k para cada substância da Tabela 3 *versus* seu respectivo Log P foi utilizada para o cálculo dos coeficientes de partição (Log P) do AC e do AK.

O sistema cromatográfico consistiu de um cromatógrafo Perkin Elmer (Shelton, EUA) com detecção UV (Flexar UV/VIS). A separação foi feita por uma coluna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 mm, 2,7 μm com pré-coluna Poroshell 120 EC-C18 4,6×5mm, 2,7 μm . A fase móvel foi constituída por metanol:ácido fórmico 0,1% (80:20) pH 4 e vazão de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μL .

A aquisição de dados e a quantificação das amostras foram realizadas utilizando o programa Chromera, versão 3.4.4.5945 (Perkin Elmer, Shelton, EUA).

4.7. Avaliação da permeabilidade do AC e do AK em células Caco-2

4.7.1. Cultivo celular

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ nº 0059) e cultivada em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium*) (Gibco, Paisley, Reino Unido) contendo alta concentração de glicose (4,5 g/L), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Paisley, Reino Unido) e 1% da mistura de antibióticos em solução contendo 5 mg de penicilina, 5 mg de estreptomicina e 10 mg de neomicina por mL, (Gibco, Paisley, Reino Unido). As células Caco-2 foram cultivadas a 37 °C, 5% de CO_2 e 95% de umidade relativa. O cultivo foi realizado inicialmente em garrafas de 25 cm^2 e ao atingirem confluência eram transferidas para garrafas de 75 cm^2 a partir da adição de tripsina 0,25%/EDTA 2,4 mM (Gibco, Paisley, Reino Unido). O meio foi substituído a cada dois dias. Ao atingir em torno de 80% de confluência, o subcultivo foi realizado.

4.7.2. Ensaio de viabilidade celular pelo teste da resazurina

Para realizar o teste de viabilidade celular, as células Caco-2 foram incubadas com diferentes concentrações das substâncias de interesse (MCMILLIAN et al., 2002).

As células foram inicialmente cultivadas em garrafas de 25 cm². Ao atingir confluência as células foram transferidas para garrafas de 75 cm², e mantidas sempre a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SFB. Após a cultura celular atingir confluência, o preparo da microplaca foi iniciado. O meio de cultivo foi retirado da garrafa e a lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) realizada para a retirada de células mortas. As células foram recolhidas das garrafas após adição de 3 mL de tripsina 0,25% (Gibco, Paisley, Reino Unido) e incubadas pelo tempo de 5 minutos para que as células se desprendessem da garrafa. Em seguida a tripsina foi inativada pela adição de 3 mL de DMEM e então as células foram recolhidas e centrifugadas a $200 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células foram reconstituídas em meio de cultura DMEM para a contagem celular utilizando câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para $7,5 \times 10^4$ células/mL e as células foram semeadas em placas de 96 poços com concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço. As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa por 24 horas para permitir aderência celular. Após esse período, foram preparadas soluções de AC e AK na concentração de 50.000 µM em DMSO, as quais foram diluídas 50 vezes em meio de cultura DMEM para obtenção da concentração de 1000 µM. Para isso foi utilizada uma placa de 96 poços sem a presença de células, denominada placa espelho, onde foram adicionados 5 µL da solução de 50.000 µM do composto de interesse e 245 µL de meio de cultura no primeiro poço de cada coluna para obter a concentração de 1000 µM. Foram realizadas diluições seriadas para obter as concentrações de 500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62 e 7,81 µM de AC e AK.

A partir dessas soluções, foram realizadas diluições na microplaca contendo as células, onde o meio foi retirado e substituído por 100 µL de meio de cultura DMEM fresco suplementado com 20% de SFB, em seguida 100 µL das concentrações obtidas na placa espelho foram adicionadas nos poços correspondentes para obtenção das concentrações finais de 500; 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,91 µM contendo no máximo DMSO a 1%.

Para o controle do solvente, as células foram incubadas com DMEM contendo DMSO na mesma concentração do ensaio para assegurar a viabilidade celular ao utilizar esse solvente. Para o controle negativo, as células foram incubadas com o meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SFB para avaliar o crescimento celular sem a interferência do DMSO. Para o controle positivo, as células foram incubadas com DMSO 15% em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SFB. O ensaio foi realizado em sextuplicata para cada concentração avaliada. As células foram incubadas com as substâncias teste ou controle por 24 horas sob as mesmas condições do cultivo.

Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e adicionou-se 50 µL da solução de cloridrato de resazurina 0,01% a cada poço. As placas foram incubadas por 2 horas, período no qual ocorreu a mudança de coloração da resazurina o que indica que houve metabolização e após o final da incubação, a intensidade da fluorescência foi determinada utilizando leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek®) nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 530 e 590 nm, respectivamente. A viabilidade celular foi calculada pela seguinte equação 11:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{A_S}{A_C} \times 100 \quad (11)$$

onde A_S : intensidade de fluorescência da amostra, A_C : intensidade de fluorescência no controle do solvente.

4.7.3. Avaliação da permeabilidade in vitro usando células Caco-2

As células Caco-2 foram semeadas em placas de doze poços com inserto (ThinCert™, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) de 0,4 µm de poro e área de 1,13 cm², em concentração de 5×10^4 células/cm² e incubadas por 21 dias para atingir confluência e diferenciação a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade (Figura 6). O meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SFB e 1% da solução contendo 5 mg de penicilina, 5 mg de estreptomicina e 10 mg de neomicina por mL foi trocado a cada 48 horas. A integridade da monocamada de células Caco-2 formada foi monitorada utilizando um minivoltímetro Millicell ERS® (Millipore Corporation, Bedford, MA) pela avaliação da resistividade elétrica transepitelial (RET). Esse monitoramento foi realizado após 10, 15 e 21 dias de cultivo. Apenas as

membranas que apresentaram valor de RET maior que $200 \Omega \times \text{cm}^2$ no dia do ensaio foram consideradas aptas (FERNANDES et al., 2014). Além do valor de RET, as soluções de verapamil $44 \mu\text{M}$ ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e fluoresceína $45 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram utilizadas como controles de alta e baixa permeabilidade, respectivamente, para avaliar a integridade da monocamada (KRATZ et al., 2011). Para avaliar se AC e AK são substratos da P-gp, o transporte através da monocamada de Caco-2 foi investigado usando verapamil como inibidor da P-gp (JIN et al., 2013).

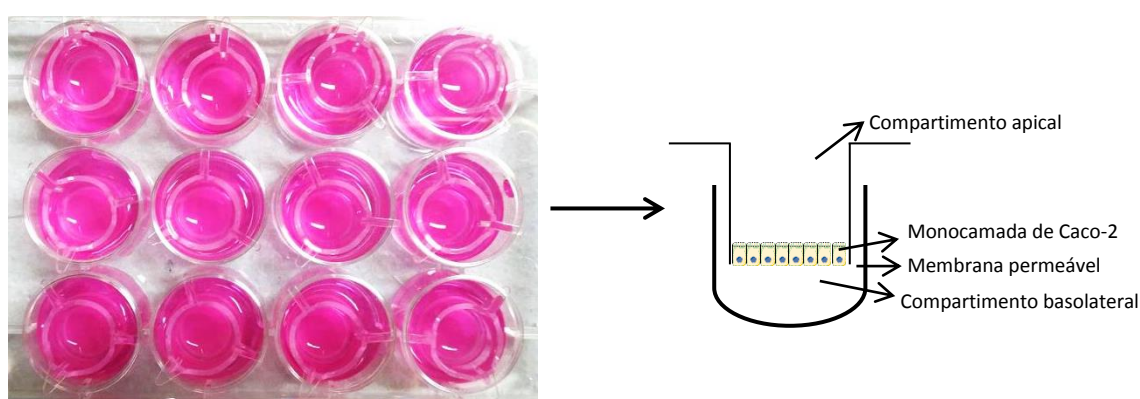


Figura 6. Placa de 12 poços com inserto (ThinCert TM) utilizada para o cultivo de células Caco-2 por um período de 21 dias.

Fonte: próprio autor. Adaptado de Hubatsch; Ragnarsson; Artursson, 2007.

No dia do experimento as células foram lavadas com tampão de permeabilidade constituído por tampão Hank's (Gibco, Paisley, Reino Unido) contendo 200 mM de sais de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-etanosulfônico (HEPES, Sigma-Aldrich; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com pH 7,4 por 20 minutos para que ocorresse o equilíbrio. As soluções estoque de AC e AK a $390 \mu\text{M}$ em DMSO foram diluídas usando o tampão de permeabilidade para soluções de concentração $3,9 \mu\text{M}$, contendo no máximo 1% de DMSO. Os experimentos foram conduzidos com volume total de 500 μL do tampão de permeabilidade no compartimento apical (doador) das placas e 1500 μL no compartimento basolateral (receptor). O transporte através da monocamada de Caco-2 foi determinado no sentido apical - basolateral e basolateral - apical, adicionando soluções de AC ou AK nos compartimentos apical e basolateral, respectivamente. A permeabilidade do fármaco também foi avaliada com verapamil, inibidor da P-gp, ao incubar as células com $50 \mu\text{M}$ de verapamil por 30

minutos antes da incubação com os substratos (LIN et al., 2007, LIN et al., 2011; JIN et al., 2013).

As placas foram mantidas durante todo o tempo do experimento sob agitação (25 rpm) e temperatura (37 °C) constantes em incubadora (Ethik Technology modelo 430 – RDB T5, São Paulo, Brasil). Foram coletadas amostras de 200 µL do compartimento basolateral (sentido apical-basolateral) ou do compartimento apical (sentido basolateral-apical) nos tempos 0, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Após cada amostragem, foi realizada a reposição do volume usando o tampão de permeabilidade mantido a 37 °C.

A concentração do AC e AK foi determinada por LC-MS utilizando o método analítico desenvolvido e validado neste estudo. As amostras do controle verapamil e fluoresceína foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência, UPLC H-Class®, Waters, utilizando coluna do tipo CSH C18 2,1 × 100 mm (1,8 µm), com coluna de guarda CSH C18 2,1 × 5 mm (1,8 µm) mantidas a 35 °C, fase móvel constituída por acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (70/30, v/v) em modo isocrático, vazão de 0,4 mL/min e volume de injeção de 2 µL, com detecção por fluorescência com λ_{ex} 204 nm, λ_{em} 314 nm para o verapamil e λ_{ex} 494 nm e λ_{em} 521 nm para fluoresceína. A permeabilidade aparente (P_{app}) foi o parâmetro utilizado para descrever o transporte dos compostos e foi calculada utilizando a equação 12:

$$P_{\text{app}} = \frac{V_R}{(A \times C_0)} \times \frac{dC}{dT} \quad (12)$$

Onde dC/dT representa a variação da concentração em relação ao tempo do experimento (s); V_R é o volume do compartimento receptor (basolateral) em cm^3 ; A é a área do suporte permeável de cultivo celular (cm^2) e C_0 é a concentração inicial no compartimento doador (μM). A taxa de efluxo (ER) foi definida como $P_{\text{app}} (B-A) / P_{\text{app}} (A-B)$. A $P_{\text{app}} (A-B)$ do verapamil e da fluoresceína foram usados como indicadores da integridade referente a função da monocamada de Caco-2 (PARK et al., 2015; HOFFMANN et al., 2018). O índice do transporte de substrato (TSI_{A-B}) foi calculado para a glicoproteína-P, de acordo com a equação 13:

$$TSI_{\text{app} (A-B)} = \frac{P_{\text{app}}^i (A-B) - P_{\text{app}} (A-B)}{P_{\text{app}} (A-B)} \times 100 \quad (13)$$

Onde $P_{app}^i(A - B)$ é determinado na presença do inibidor de P-gp, verapamil (LIN et al., 2011).

4.8. Estudo da fração livre em plasma e em meio microssomal

A técnica de ultracentrifugação foi empregada para a determinação da fração livre em plasma (SRIKANTH et al., 2013) e em meio microssomal (SILVA et al., 2018). O plasma humano (10 mL) ou meio microssomal (10 mL) foram enriquecidos nas concentrações de 2, 50 e 100 μ M de AC ou AK e incubados por 30 minutos a 37 °C, em triplicata.

As amostras foram transferidas para tubos apropriados (Beckman Coulter Ultra-Clear) e submetidas a ultracentrifugação (Beckman Coulter Optima L 90K Ultracentrifuge) por 24 horas a 37 °C e 100.000 $\times g$. Foram coletadas amostras do plasma (100 μ L) ou do meio microssomal (100 μ L) antes da ultracentrifugação para a determinação da concentração total. Após a ultracentrifugação, foram coletadas amostras de 100 μ L da camada média do plasma para determinar a concentração do fármaco livre no plasma ou amostras de 100 μ L do sobrenatante do meio microssomal para analisar a concentração livre nesse meio. As amostras foram processadas e analisadas utilizando o método descrito 4.4.

A fração livre no plasma ($F_{u,p}$) e a fração livre em meio microssomal ($F_{u,mic}$) do AC e AK foram determinadas usando as Equações 14 e 15:

$$F_{u,p} = \frac{\text{Concentração livre no plasma}}{\text{Concentração total no plasma}} \quad (14)$$

$$F_{u,mic} = \frac{\text{Concentração livre no meio microssomal}}{\text{Concentração total no meio microssomal}} \quad (15)$$

4.9. Metabolismo in vitro em microssomas hepáticos de rato (RLM) e humano (HLM)

O *pool* de RLM (RTMC-PL) e o *pool* de HLM (HMMC-PM) foram obtidos comercialmente (Life Technologies, Itapevi, São Paulo, Brasil) na concentração de 20 mg de proteínas/mL e mantidos -80 °C até o dia do experimento (JIA; LIU, 2007).

Os microsossomas hepáticos foram descongelados apenas no momento do experimento, diluídos em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e mantidos a 37 °C. Os experimentos foram realizados inicialmente com RTMC-PL. Os ensaios usando HLM foram delineados com base nos resultados encontrados para RLM.

4.9.1. Cinética enzimática

4.9.1.1. Ensaios de depleção dos substratos AC e AK em RLM e HLM

Os ensaios foram realizados em placas de 12 poços (Greiner bio-one, cat. nº 665 180 Kremsmünster, Áustria). A mistura de incubação apresentou volume total de 1 mL. Para a reação, foram adicionados 10 µL da solução de AC ou AK, 490 µL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 contendo NADPH a 4 mM (fosfato de dinucleotídeo de β-nicotinamida e adenina) (Sigma-Aldrich; São Paulo, SP, Brasil), cloreto de magnésio (MgCl₂) a 6 mM (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 500 µL da solução microsossomal de rato ou humano em concentrações variadas. Para a avaliação da cinética enzimática, os seguintes parâmetros de incubação foram otimizados: a) a concentração de proteína microsossomal foi avaliada nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,5 mg de proteínas/mL de meio de incubação em triplicatas; b) presença ou ausência do cofator NADPH a 2 mM; c) tempos de incubação de 0; 5; 10; 15; 30; 45; 60 e 90 minutos.

Após a determinação das condições, as soluções de AC ou AK em tampão fosfato 0,1 M contendo NADPH 2 mM e MgCl₂ a 3 mM foram mantidas a 37 °C com agitação a 100 rpm (Ethik Technology model 430 - RDB T5, São Paulo, Brazil) por 5 minutos. A reação foi iniciada pela adição dos microsossomas de rato ou humano, na concentração de 0,05 mg de proteína/mL para os ensaios com AK e 0,1 mg de proteína/mL para AC. Os ensaios foram conduzidos com concentrações dos substratos de 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 20 e 100 µM para AC e 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50 e 100 µM para AK em microsossomas de ratos e 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 150 e 300 µM para AC e 0,1; 0,5; 1; 10; 50; 100 e 150 para AK em microsossomas humanos. Alíquotas de 100 µL foram coletadas nos tempos de 0; 2; 5; 7,5; 10; 15; 20 e 30 minutos para microsossomas de rato e 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 5; 7,5 e 10 minutos para microsossomas humano. Todo o ensaio foi realizado em triplicatas independentes para cada uma das concentrações. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 1 mL do solvente éter metil-*terc*-butílico contendo 50 µL do padrão interno fluvastatina

2,4 μM (pureza: $\geq 98\%$; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A solução de diclofenaco a 0,4 μM (pureza: $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi utilizada como controle positivo uma vez que seu metabolismo em microssomas já foi bem descrito na literatura (OBACH, 1999; KUMAR et al., 2002).

4.9.1.2. Análise de AC e AK por LC-MS

A análise de AC e AK em amostras de meio microssomal foram preparadas e analisadas por LC-MS conforme o método descrito no item 4.4 com pequenas modificações. O preparo da amostra foi feito por extração líquido-líquido, antes da análise por LC-MS. Foi adicionado a amostra, 1mL do solvente extrator éter metil-*terc*-butílico, utilizado também para interromper a reação enzimática. As amostras foram agitadas por 15 minutos em mesa agitadora recíprocante horizontal (TE-240 Tecnal, 130 ± 10 ciclos/min) e centrifugadas por 10 min ($15.000 \times g$, 5°C). Uma alíquota de 900 μL da fase orgânica foi transferida para microtubos de 1,5 mL e evaporada à secura a 40°C utilizando um concentrador de amostras a vácuo (GenevacTM Centrifugal Duo, Ipswich Reino Unido). O resíduo foi reconstituído em 90 μL de fase móvel, agitado em vórtex por 30 segundos, transferido para o vial e 20 μL foram injetados no sistema cromatográfico.

O diclofenaco, usado como controle da reação enzimática devido ao seu metabolismo dependente de NADPH, foi analisado nas amostras com conteúdo microssomal por LC-MS (KUMAR et al., 2002). Para o diclofenaco a fase móvel utilizada foi constituída por ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (40:60, v/v), com vazão de 0,5 mL/min, em modo isocrático. A análise por espectrometria de massas foi realizada no modo *electrospray* positivo com monitoramento da relação massa/carga (m/z) 296 (KUMAR et al., 2002; SPARIDANS et al., 2008). Foi utilizada a coluna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 $4,6 \times 100$ mm ($2,7 \mu\text{m}$) e coluna de guarda Poroshell 120 EC-C18 $4,6 \times 5$ mm ($2,7 \mu\text{m}$) (Agilent Technologies, Santa Clara, United States), mantida a 22°C . A voltagem do capilar na ionização por *electrospray* foi de 6,0 kV, com temperatura de dessolvatação mantida a 350°C . O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 12 L/min. Os dados foram adquiridos e a quantificação das amostras realizadas através do programa Chromera, versão 3.4.0.5712 (Perkin Elmer, Shelton, EUA). O intervalo de concentrações utilizado na análise de diclofenado em amostras do meio microssomal foi de 0,1 a 3,4 μM .

4.9.1.3. Análise dos dados

Os dados de concentração de AC e AK em condições de velocidade inicial da reação foram usados para determinar os parâmetros de cinética enzimática. Foi considerada a depleção até o limite de 10% para AC e AK como substratos das enzimas microsossomais em relação a concentração inicial (NATH; ATKINS, 2006). O modelo de Michaelis-Menten e desvios da hipérbole clássica foram testados (equações 1 e 2), utilizando o programa *GraphPad Prism 5* (versão 8.3.0, San Diego, CA, EUA). O plote de Eadie-Hofstee (V_0/S no eixo x e V_0 no eixo y) foi utilizado como diagnóstico de desvios da cinética michaeliana.

Quando a cinética não segue o perfil michaeliano mas apresenta perfil de cooperatividade positiva segundo o modelo de Hill, sugere-se a substituição do CL_{int} pelo uso do clearance intrínseco máximo (CL_{max}), que representa a depuração máxima resultante da autoativação. O CL_{max} foi calculado como demonstrado por Houston and Kenworthy (1999) (Equação 16).

$$CL_{max} = \frac{V_{max}}{S_{50}} \times \frac{(h-1)}{h(h-1)^{1/h}} \quad (16)$$

Na equação, CL_{max} é o clearance intrínseco máximo; V_{max} é a velocidade máxima da reação enzimática; S_{50} : é a concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima e h é o coeficiente de Hill.

4.9.2. Extrapolação in vitro-in vivo (IVIVE)

O clearance hepático do AC e AK foi escalonado por IVIVE usando a equação 17 que leva em consideração o conteúdo de proteína microsossomal (em mg) em relação ao peso do fígado (em g) e o peso do fígado (em g) em relação ao peso corporal (em kg). Considerando que o CL_{int} em cinética que segue a equação de Hill é definido como o CL_{max} , a IVIVE foi realizada a partir dos valores de CL_{max} .

$$CL'_{int} = CL_{int} \times \frac{\text{mg de proteína microsossomal}}{\text{g de peso do fígado}} \times \frac{\text{g de peso do fígado}}{\text{kg de peso corporal}} \quad (17)$$

Foi utilizado o valor de 45,0 mg de conteúdo de proteína microsossomal por grama de fígado humano (OBACH et al., 1997; NAKAMORI et al., 2011). O valor de

20,0 g de peso do fígado/kg de peso corpóreo foi usado para humanos (OBACH et al., 1997; NAKAMORI et al., 2011).

O modelo de fígado bem agitado (*well-stirred model*) foi usado para estimar o clearance plasmático hepático (YANG et al., 2007; WAN et al., 2010) (Equação 18). Este modelo pressupõe que a distribuição do fármaco no fígado é limitada pela perfusão e ocorre instantânea e homogeneamente (YANG et al., 2007).

$$CL_H = \frac{Q_{H,B} \times fu \times CLu_{int,H}}{Q_{H,B} + fu \times CLu_{int,H}} \quad (18)$$

Onde $Q_{H,B}$ é o fluxo sanguíneo hepático; F_u é a fração livre no plasma; $CLu_{int,H}$ é o clearance intrínseco escalonado a partir dos dados in vitro (Equação 17) e corrigido pela fração livre em sistema microssomal ($F_{u,mic}$), conforme a equação 19:

$$CLu_{int,H} = CL_{int,H} / fu_{mic} \quad (19)$$

A razão CL_H/Q , onde Q é o fluxo sanguíneo hepático ($20 \text{ mL min}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$) e CL_H é o clearance hepático foi calculada para obtenção da taxa de extração do fármaco pelo fígado (E) (MAKOID; UCHETICH; BANAKAR, 1996). Fármacos com taxa de extração inferior a 0,3 são considerados com baixa taxa de extração e fármacos com valores acima de 0,7 indicam uma alta taxa de extração através do fígado (TOZER; ROWLAND, 2006).

4.9.3. Identificação dos metabólitos

A identificação dos metabólitos foi realizada em estudo de colaboração com o Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da FCFRP-USP, sob coordenação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes. Em resumo, foi realizado ensaio de metabolismo in vitro usando os substratos AC e AK em elevada concentração ($300 \mu\text{M}$). As soluções dos substratos AC e AK foram pré incubadas por 5 minutos a 37°C sob agitação de 100 rpm. As reações foram iniciadas com a adição do conteúdo microssomal e encerradas nos tempos testados com a adição do solvente extrator. O ensaio baseou-se em condições empregadas nos ensaios anteriores, com microssomas de rato e humano na concentração de proteína microssomal de

0,05 mg/mL para AK e 0,1 mg/mL para AC. As amostras foram coletadas após 10 e 20 minutos para microsomas humano e após 20 e 30 minutos de incubação para microsomas de rato, para AK e AC, respectivamente. Foram realizados testes de extração usando acetato de etila (Caledon Laboratories, Ontário, Canadá) e éter metil-*terc*-butílico. Foram combinadas as fases orgânicas provenientes de 5 replicatas em um único *pool*. Amostra controle (contendo apenas AC ou AK) e amostra branco (contendo apenas os microsomas hepáticos de rato ou humano), ambas em solução tampão fosfato salina (PBS) 0,1 M, foram submetidas as mesmas condições e analisadas da mesma forma.

Todas as amostras foram preparadas por extração líquido-líquido com agitação em mesa recíprocante por 20 minutos, seguida de centrifugação a $15.000 \times g$ por 10 minutos a 5 °C. A fase orgânica foi evaporada a *secura* a 40 °C e reconstituída na fase móvel acetonitrila: água (10:90, v/v) acidificadas com ácido fórmico 0,1%.

4.9.3.1 Análise por espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS)

As análises foram realizadas em sistema de cromatografia líquida Shimadzu modelo LC-20AD (Kyoto, Japão), degaseificador DGU-20A, auto-injetor SIL-20AHT, detector arranjo de diodo SPD-M20A (200–600 nm), forno de coluna CTO-20A e módulo de comunicação CBM-20A, acoplado a um espectrômetro de massas AmaZon SL ion trap, Bruker Daltonics (Massachusetts, EUA). Foi utilizada coluna cromatográfica C18 Luna (Phenomenex, 5 µm, 250 × 4,6 mm). A fase móvel foi constituída por acetonitrila e água acidificadas com ácido fórmico 0,1% (10:90, v/v), vazão de 0,5 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL.

Os espectros foram adquiridos em modo negativo empregando ionização por *electrospray* (ESI – *electrospray ionization*), com voltagem no capilar de 3,5 kV. O gás de nebulização utilizado foi o nitrogênio (N₂), com temperatura de secagem de 300 °C, vazão de 9 L/min e pressão de 40 psi. A aquisição e análise dos dados foi utilizando o *software Bruker Compass Data Analysis 4.3*.

As condições foram otimizadas a partir das análises iniciais e para o AC os ensaios foram repetidos utilizando os tempos de 5, 15 e 30 minutos para parar a reação, com aumento da concentração de proteína microsomal para 0,2 mg/mL,

utilizando como solvente extrator o acetato de etila que apresentou melhores resultados para AC e AK.

4.9.3.2. Análise por espectrometria de massas de alta resolução (MS-ESI-Q-TOF)

Foi empregado o espectrômetro de massas equipado com analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo microTOF II-ESI-Q-TOF Bruker Daltonics® (Massachusetts, EUA). A voltagem do capilar e do end plate na fonte *electrospray* foram -3500 V e -500 V, respectivamente, em modo negativo de ionização, com temperatura do gás de secagem (N₂) de 180 °C, vazão de 4 L/min e pressão de 0,4 bar. Para calibração interna foi utilizado solução de ácido trifluoroacético sodiado (Na-TFA), na concentração de 10 mg/mL. Para a aquisição e análise de dados foi empregado o *software Bruker Compass Data Analysis 4.1* (Bremen, Alemanha).

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Método analítico para determinação do AC e AK por LC-MS

Os estudos de estabilidade em solução e permeabilidade em células Caco-2 exigiram o desenvolvimento de método analítico para a determinação de AC e AK em diferentes meios. O método cromatográfico usando LC-MS capaz de quantificar baixas concentrações dos analitos de interesse em solução foi desenvolvido e validado.

A seletividade do método foi avaliada comparando amostras do limite inferior de quantificação com o solvente utilizado nas amostras para verificar a presença de possíveis componentes da matriz. Os cromatogramas (Figura 7) obtidos demonstram que não ocorreu interferência no tempo de retenção dos analitos.

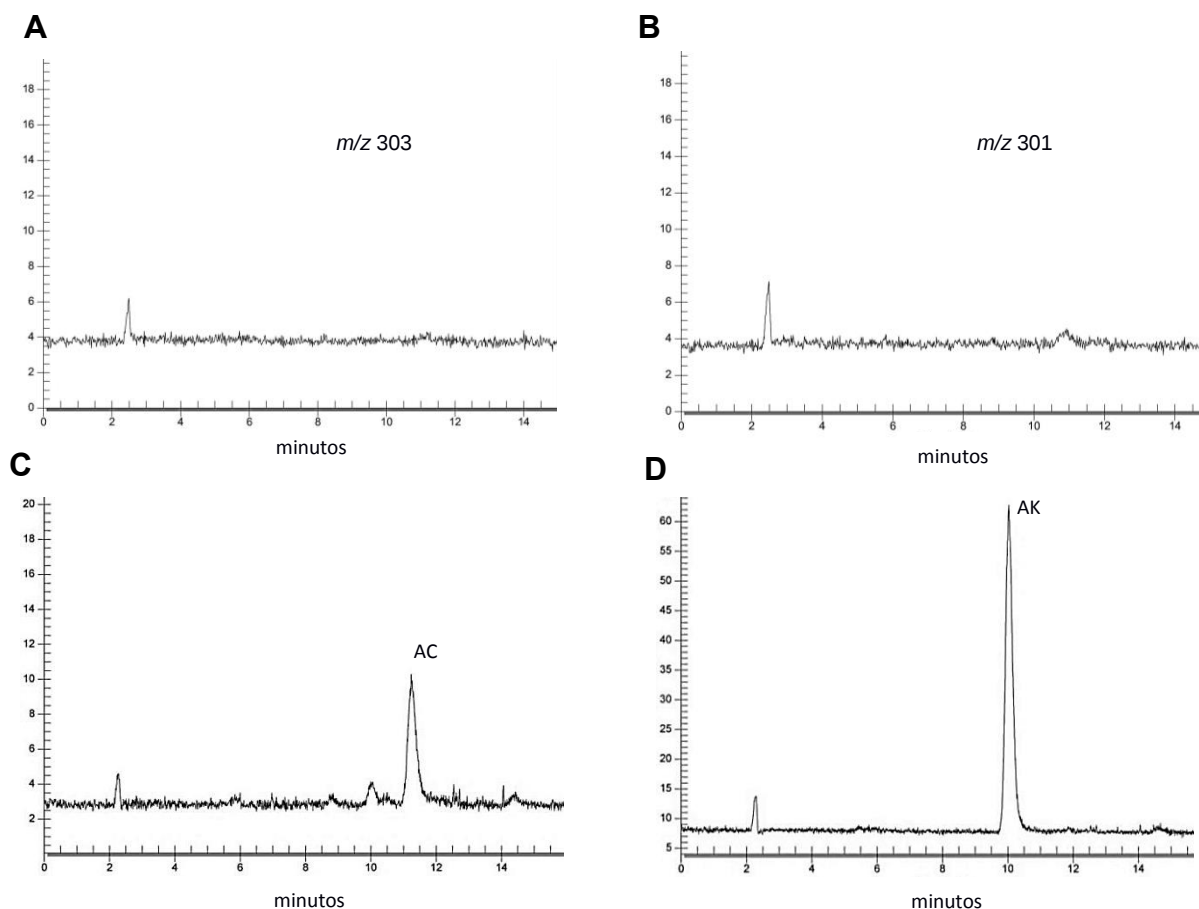


Figura 7. Cromatogramas de monitoramento de íon selecionado (SIM) referentes à análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) por LC-MS. Os cromatogramas (A) e (B) referem-se à análise das amostras não contaminadas. Os cromatogramas (C) e (D) referem-se à análise de amostra enriquecida com AC e AK no limite inferior de quantificação (LIQ). A razão m/z de 303 foi monitorada para o ácido copálico nos cromatogramas (A) e (C) e a razão m/z de 301 foi monitorada para o ácido caurenóico nos cromatogramas (B) e (D). Condições cromatográficas: coluna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 mm (2,7 μ m) com coluna de guarda Poroshell 120 EC-C18 4,6×5 mm (2,7 μ m) e fase móvel constituída por água/acetonitrila (10/90, v/v) ambas contendo formiato de amônio 5 mM, com vazão de 0,5 mL/min.

A linearidade foi avaliada através da triplicata da curva de calibração que foi construída no intervalo de 0,0125 a 5 μ M para o AC e AK. A equação da reta obtida após ponderação $1/x^2$ foi $y=8307306x + 20478$ com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9969 para o AC; e $y=70143994x - 153045$ com coeficiente de correlação (r) igual a 0,9926 para o AK. O método mostrou-se linear no intervalo de concentrações

de 0,0125 a 5 μM para o AC e AK, com observação de erros em relação ao valor nominal inferiores a 15% como mostra a Figura 8.

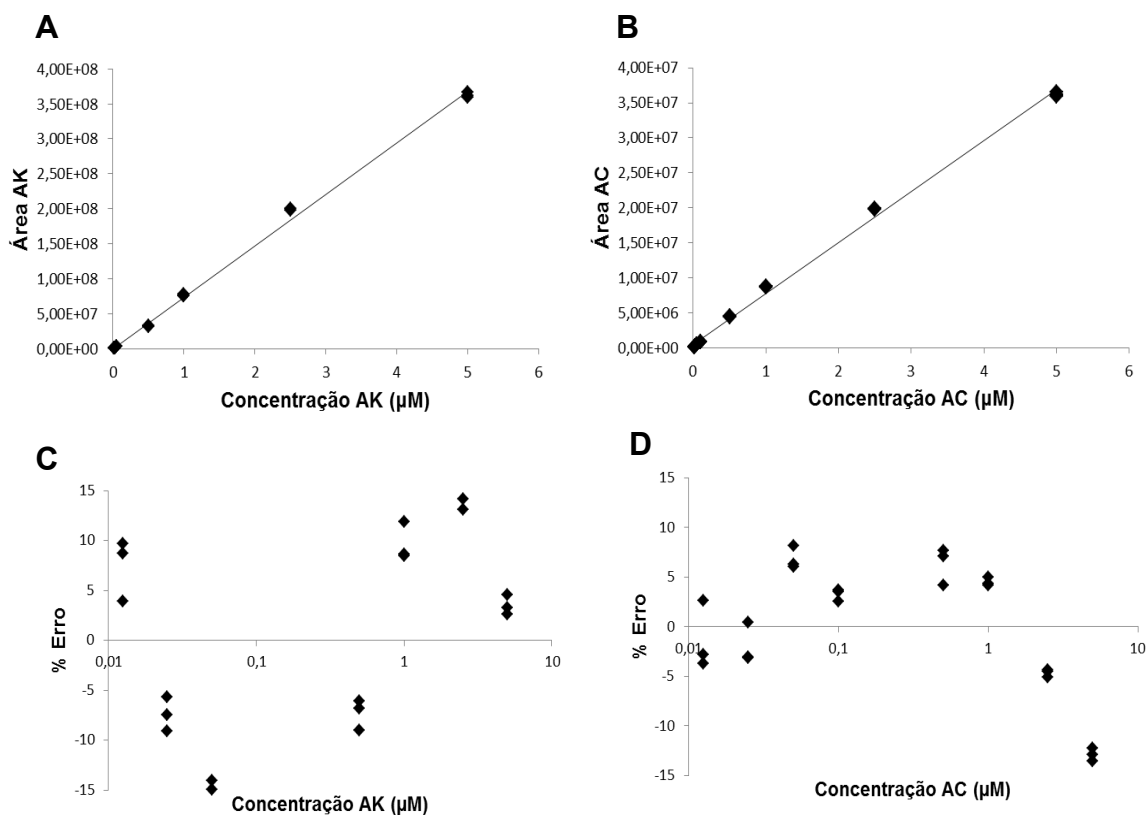


Figura 8. Estudo da linearidade para o método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) por LC-MS. Os plots A e B representam a regressão linear ordinária entre a área *versus* concentração do ácido caurenóico (AK) e copálico (AC) respectivamente. Os plots C e D representam % erro *versus* a concentração do AK e AC respectivamente, utilizando a ponderação $1/x^2$ para AK e AC.

A precisão e a exatidão foram avaliadas utilizando a triplicata dos seguintes controles de qualidade, CQB=0,025 μM ; CQM=0,5 μM e CQA=4,5 μM para o AC e AK, na mesma corrida e em corridas diferentes. Foi observada precisão e exatidão do método (intra e interensaios) com coeficientes de variação de inferiores a 5% e exatidão entre 80 e 120%, conforme recomendação da resolução vigente (Tabela 4).

Tabela 4. Figuras de mérito do método de análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em solução por LC-MS.

	Ácido copálico			Ácido caurenóico		
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Precisão Intra-ensaio (DPR %, n=3)	2,1	0,4	0,4	1,1	0,6	0,9
Precisão Interensaios (DPR %, n=6)	2,5	1,6	2,6	1,3	1,6	2,1
Exatidão Intra-ensaio (%, n=3)	113,9	115,2	91,8	90,7	101,5	100,4
Exatidão Interensaios (%, n=6)	116,6	115,6	88,4	90,1	99,4	102,1

DPR: desvio padrão relativo $[(\text{desvio padrão}/\text{média}) \times 100]$; Exatidão % = $[\text{concentração experimental}/\text{concentração nominal} \times 100]$; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração.

5.2. Ensaio de estabilidade em pH 1,2 e 7,4

Os ácidos AC e AK foram submetidos ao teste de estabilidade química a temperatura de 37 °C em pH 1,2 (Tampão Clark-Lubs) e pH 7,4 (tampão fosfato de potássio/ácido clorídrico, ambos a 0,1 M). Os compostos foram quantificados a partir de alíquotas coletadas em triplicatas independentes em diferentes tempos. As amostras foram analisadas pelo método analítico que foi desenvolvido e validado neste trabalho. Os resultados obtidos foram comparados por ANOVA, seguidos por teste de Tukey. Em pH 1,2, houve diferença estatística significativa em relação ao tempo zero para as amostras de AC e AK ($p < 0,05$) após 0,5 h. Após o período de 1 hora de incubação, as concentrações estavam abaixo do LIQ do método. Estes resultados mostram que o AC e AK foram rapidamente degradados no pH ácido similar ao estomacal (pH 1,2, 37 °C) demonstrando instabilidade dos compostos em pH ácido. Em pH 7,4, o AC foi estável por até 24 horas e o AK apresentou estabilidade por até 6 horas, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) apenas a partir do tempo de 12 horas (Figura 9).

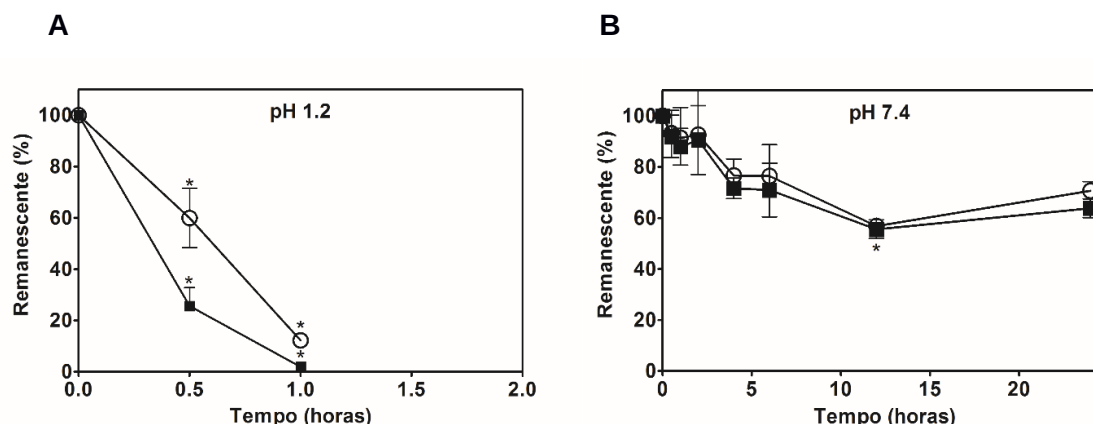


Figura 9. Estabilidade do ácido copálico (○) e do ácido caurenóico (■) em pH 1,2 (A) e 7,4 (B) a 37 °C. * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey).

Os resultados encontrados estão de acordo com as recentes descobertas em relação a farmacocinética do AK após administração oral em ratos. Após administração de dose única oral de AK a 50 mg/kg não foi possível detectar seus níveis plasmáticos (DE MATOS et al., 2018). As concentrações plasmáticas máximas (C_{max}) de 12,6, 44,7 e 48,0 ng/mL foram observadas após administração de doses orais únicas de 10, 20 ou 40 mg/kg em ratos (JIANG et al., 2019). Os baixos níveis das concentrações encontrados podem ser pelo menos parcialmente explicadas pela instabilidade do AK no pH ácido do estômago. No entanto, é necessário entender se o AK é convertido no estômago para compostos bioativos, uma vez que a atividade anti-inflamatória e antilipoperoxidativa foi comprovada ao administrar oralmente AK ou a oleorresina em ratos (PAIVA et al., 2003; LIMA SILVA et al., 2009).

A via oral é a via de escolha para a administração de fármacos em pacientes conscientes. Entretanto, nem todos os fármacos apresentam propriedades físico-químicas e/ou farmacocinéticas adequadas para uso oral. Sistemas específicos de liberação de fármacos podem ser usados para a administração oral de compostos não estáveis no pH ácido estomacal. Essa estratégia permite melhorar a biodisponibilidade oral de fármacos uma vez que utiliza polímeros de revestimento entérico que sofrem degradação e a liberação do ativo ocorre dentro de uma faixa ótima de pH (FASINU et al., 2011). Com base nos resultados encontrados, sugere-se que para a observação das atividades do AK in vivo, as doses administradas devem ser entericamente revestidas.

5.3. Desenvolvimento e validação de método bioanalítico para determinação do AC e AK em plasma humano

Foi desenvolvido método de determinação do AC e AK em plasma humano usando coluna de fase reversa C18 e fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 5 mM/acetonitrila (10/90, v/v). A adição de acetato de amônio 5 mM na fase móvel apresentou melhores resultados no formato e intensidade do pico e ausência de interferentes quando comparado ao uso de água e soluções ácidas como o ácido fórmico e acético. O método foi validado com base nas recomendações da Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foram avaliadas as figuras de mérito seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão intra e interensaios e estabilidade.

O preparo das amostras de plasma foi avaliado usando precipitação de proteínas (com metanol ou acetonitrila) ou extração líquido-líquido com os seguintes solventes: clorofórmio, acetato de etila, diclorometano, éter metil-*terc*-butílico, hexano, butanol e dietileter. O protocolo de preparo da amostra que mostrou os melhores resultados, em termos de eficiência da extração, ausência de efeito matriz e seletividade, foi a extração líquido-líquido usando éter metil-*terc*-butílico.

A seletividade do método foi avaliada para garantir a ausência de picos interferentes no tempo de retenção dos compostos de interesse. Para isso foram utilizadas amostras de plasma obtidas de 6 fontes distintas, sendo 4 normais, 1 lipêmica e 1 hemolisada. O método foi considerado seletivo, pois no tempo de retenção dos AC e AK e do padrão interno não foram encontrados picos interferentes com área superior a 20% e 5%, respectivamente, quando comparados ao LIQ. Os cromatogramas a seguir mostram a eluição dos compostos sem interferentes do plasma (Figura 10).

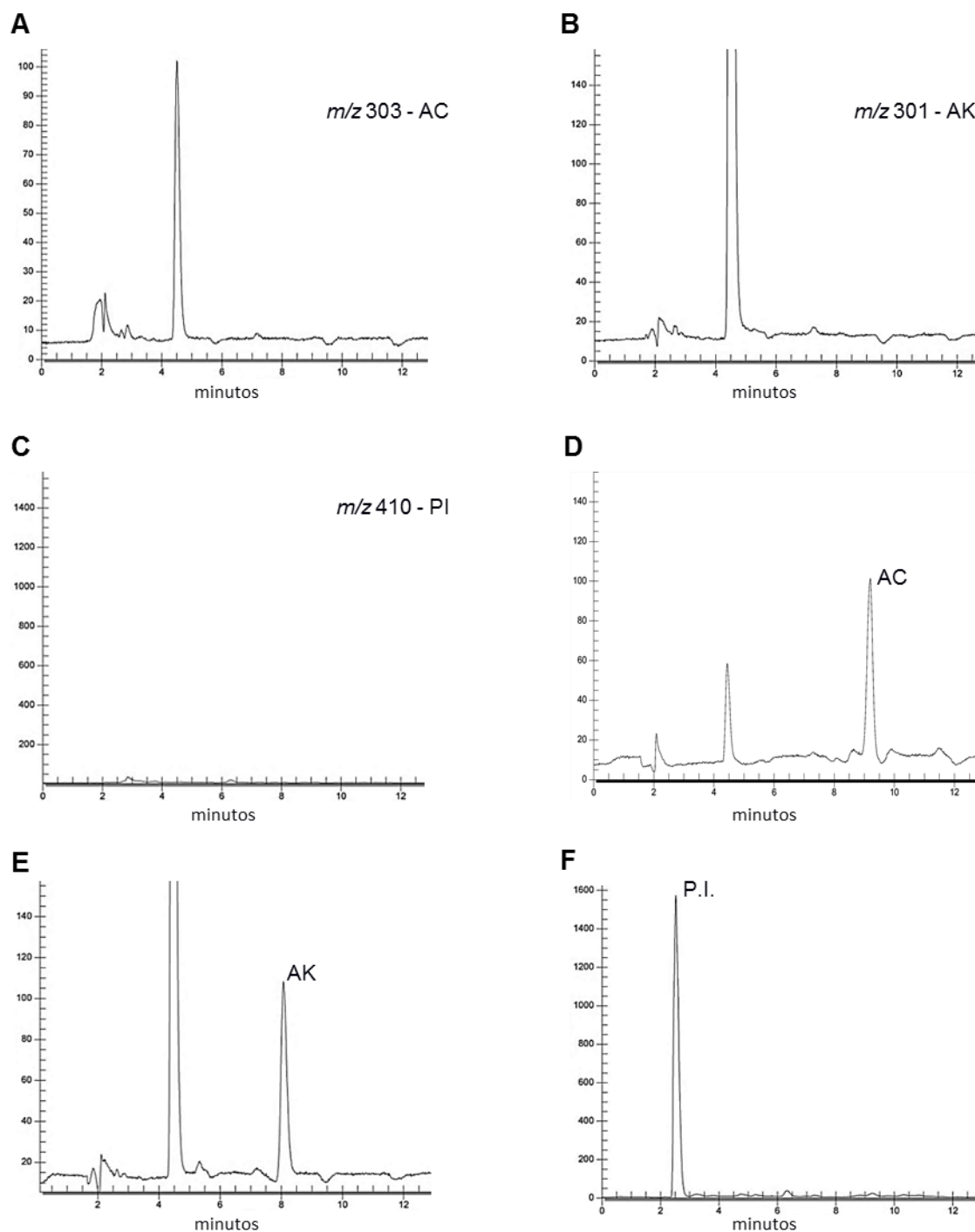


Figura 10. Cromatogramas de monitoramento de íon selecionado (SIM) referentes à análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS. Os cromatogramas (A), (B) e (C) referem-se à análise de plasma branco. Os cromatogramas (D), (E) e (F) referem-se à análise de amostra de plasma enriquecida com ácido copálico no limite inferior de quantificação (LIQ), ácido caurenóico no limite inferior de quantificação (LIQ) e padrão interno (P.I.) 1 μ M, respectivamente. A razão m/z de 303 foi monitorada para o ácido copálico nos cromatogramas (A) e (D), a razão m/z de 301 foi monitorada para o ácido caurenóico nos cromatogramas (B) e (E) e a razão m/z de 410 foi monitorada para o padrão interno fluvastatina nos cromatogramas (C) e (F). Condições cromatográficas: coluna

de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 4,6×100 mm (2,7 µm), pré coluna Poroshell 120 EC-C18 4,6×5 mm (2,7 µm) e fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 5 mM/acetonitrila (10/90, v/v), com vazão de 0,5 mL/min, modo isocrático.

O efeito residual foi avaliado por injeções de uma mesma amostra branco, realizadas antes e após a amostra processada no LSQ. Os resultados foram comparados com os resultados obtidos de amostras processadas do LIQ e não foi observado efeito residual nos tempos de retenção do AC, AK e do padrão interno.

Amostras processadas do CQB e do CQA preparadas usando oito fontes diferentes de plasma, sendo 6 normais, 1 hemolisada e 1 lipêmica, foram analisadas e comparadas com soluções preparadas nas mesmas concentrações. O fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN) foi calculado para cada amostra e o coeficiente de variação dos FMN obtido mostrou-se inferior a 15% (Tabela 5). Logo, o efeito matriz que poderia interferir na resposta dos analitos causado por componentes da matriz biológica, não interferiu nas análises.

Tabela 5. Efeito matriz na análise dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS.

Concentração	CQB (0,08 µM) AC	CQB (0,1 µM) AK	CQA (2,57 µM) AC	CQA (3,2 µM) AK
CV (%)	12,49	14,79	5,69	11,56

CV = coeficiente de variação [(desvio padrão/média) × 100]; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração; AC: ácido copálico; AK: ácido caurenóico.

O método apresentou linearidade no intervalo de concentrações de 0,05 a 4,0 µM de plasma para AK e 0,04 a 3,2 µM para AC. A ponderação $1/x^2$ foi utilizada para a obtenção de % de erro *versus* concentração inferior a 15% (Figura 11). A equação da reta obtida foi $y=0,66x + 0,0018$ com coeficiente de correlação (r) igual a 0,996 para o AC e $y=1,18x - 0,0072$ com coeficiente de correlação (r) igual a 0,993 para o AK.

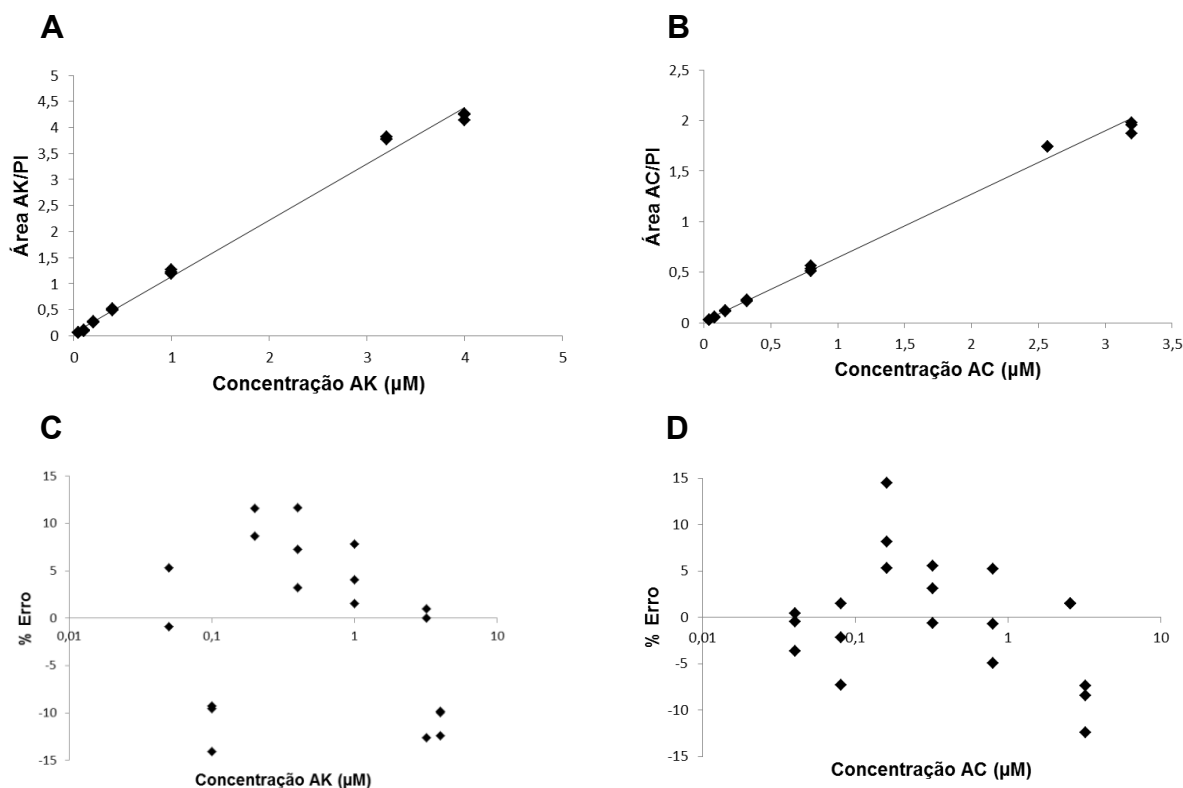


Figura 11. Estudo da linearidade para o método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) por LC-MS. Os plotes A e B representam a regressão linear ordinária entre a área *versus* concentração do ácido caurenóico (AK) e copálico (AC) respectivamente. Os plotes C e D representam a % Erro *versus* a concentração do AK e AC respectivamente, utilizando a ponderação $1/x^2$ para AK e AC.

A precisão e exatidão foram determinadas em uma mesma corrida (intra-ensaio) e em três corridas diferentes (interensaios) através da análise em quintuplicata dos controles de qualidade de baixa, média e alta concentração e do limite inferior de quantificação. A precisão intra-ensaio e interensaios foi avaliada através do coeficiente de variação com base em todos os valores obtidos, o qual não apresentou valor superior a 15% exceto para o LIQ, para o qual é aceitável CV de até 20%. A exatidão intra-ensaio e interensaios foi determinada através do erro padrão relativo (EPR) o qual apresentou valores inferiores a $\pm 15\%$ do valor nominal para todas as concentrações analisadas. Os resultados obtidos mostram que o método é preciso e exato (Tabela 6).

Tabela 6. Figuras de mérito na validação do método de análise do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) em plasma humano por LC-MS.

	AC		AK
Precisão Interensaios		Precisão Interensaios	
(DPR%, n=3)		(DPR%, n=3)	
LIQ (0,04 µM)	18,0	LIQ (0,05 µM)	13,3
CQB (0,08 µM)	6,6	CQB (0,10 µM)	9,9
CQM (0,32 µM)	14,0	CQM (0,40 µM)	9,9
CQA (2,57 µM)	6,7	CQA (3,2µM)	8,6
Precisão Intra-ensaio		Precisão Intra-ensaio	
(DPR%, n=5)		(DPR%, n=5)	
LIQ (0,04 µM)	6,6	LIQ (0,05 µM)	9,9
CQB (0,08 µM)	2,6	CQB (0,10 µM)	5,8
CQM (0,32 µM)	2,3	CQM (0,40 µM)	7,9
CQA (2,57 µM)	2,9	CQA (3,2 µM)	3,8
Exatidão Interensaios		Exatidão Interensaios	
(EPR%, n=3)		(EPR%, n=3)	
LIQ (0,04 µM)	-8,5	LIQ (0,05 µM)	-7,2
CQB (0,08 µM)	-3,0	CQB (0,10 µM)	14,9
CQM (0,32 µM)	-7,5	CQM (0,40 µM)	9,1
CQA (2,57 µM)	-13,2	CQA (3,2µM)	-4,8
Exatidão Intra-ensaio		Exatidão Intra-ensaio	
(EPR%, n=5)		(EPR%, n=5)	
LIQ (0,04 µM)	0,4	LIQ (0,05 µM)	9,9
CQB (0,08 µM)	1,9	CQB (0,10 µM)	5,8
CQM (0,32 µM)	3,9	CQM (0,40 µM)	7,9
CQA (2,57 µM)	-7,4	CQA (3,2 µM)	1,9

DPR = desvio padrão relativo; r = coeficiente de correlação linear, EPR = erro padrão relativo [(concentração obtida – concentração real)/concentração real] x 100; LIQ: limite de quantificação; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQM: controle de qualidade de média concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração.

A estabilidade foi demonstrada após ciclos de congelamento e descongelamento, estudo de curta duração e pós-processamento. Amostras de CQB e CQA foram preparadas e analisadas em triplicata e uma curva de calibração recém preparada foi utilizada para determinar a concentração das amostras. A estabilidade foi demonstrada, pois a média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal não apresentou desvio superior a 15% (Tabela 7).

Tabela 7. Estabilidade dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK)

	AC		AK
Estabilidade (EPR%, n=3)		Estabilidade (EPR%, n=3)	
<i>Curta Duração</i> (1 hora à 23 °C)		<i>Curta Duração</i> (1 hora à 23 °C)	
CQB (0,08 µM)	-12,3	CQB (0,10 µM)	-15,6
CQA (2,57 µM)	-14,9	CQA (3,2µM)	-15,5
<i>Pós-processamento</i> (7 horas à 16 °C)		<i>Pós-processamento</i> (7 horas à 16 °C)	
CQB (0,08 µM)	-10,3	CQB (0,10 µM)	-12,1
CQA (2,57 µM)	-13,1	CQA (3,2µM)	-13,7
<i>Congelamento/descongelação</i> (1 ciclo)		<i>Congelamento/descongelação</i> (1 ciclo)	
CQB (0,08 µM)	-5,8	CQB (0,10 µM)	9,7
CQA (2,57 µM)	-13,6	CQA (3,2µM)	-12,1

EPR: erro padrão relativo; CQB: controle de qualidade de baixa concentração; CQA: controle de qualidade de alta concentração.

Na literatura são encontrados métodos para análise de AC e AK em matriz biológica ou em material vegetal que utilizam cromatografia líquida com detecção por ultravioleta (UV) (COSTA et al., 2015; DE MATOS et al., 2018), cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (MS) (GASPARETTO et al., 2015; BARDAJÍ et al., 2016; JIANG et al., 2019), cromatografia gasosa (CG) com detecção por ionização de chama (TAPPIN et al., 2004) ou detecção por MS (GELMINI et al., 2013; MIYAZAKI et al., 2015; XAVIER JUNIOR et al., 2017).

Neste estudo, o LIQ foi de 0,05 µM para AK e 0,04 µM para AC, ao utilizar 100 µL de plasma humano e detecção por espectrometria de massas (LC-MS), além de ser o primeiro método bioanalítico desenvolvido e validado para determinar AC e AK em plasma na mesma corrida cromatográfica. Considerando que esses compostos são os principais diterpenos bioativos encontrados na oleorresina da copaíba, este método pode ser aplicado em futuros estudos, reduzindo os gastos com solventes e outros consumíveis, além da diminuição do tempo empregado nas análises ao avaliar os dois compostos juntos. AK e AC também apresentaram tempo de retenção curto, 8 e 9 minutos respectivamente, resultando em baixo consumo de solvente.

5.4. Ensaio de estabilidade em plasma humano por LC-MS

A estabilidade plasmática de AC e AK realizada sob agitação e temperatura a 37 °C está representada na Figura 12.

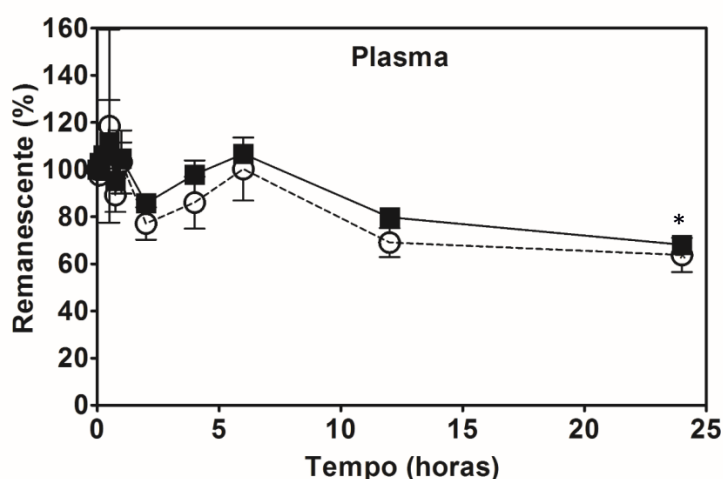


Figura 12. Estabilidade dos compostos ácido caurenóico (■) e ácido copálico (○) em plasma (1 μ M) a 37 °C. * $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 (ANOVA para medidas repetidas, seguido de Tukey).

Não houve diferença estatística significativa em nenhum dos tempos para o AC, podendo este ser considerado estável em plasma humano por um período de 24 horas. AK foi considerado estável por 12 horas a 37 °C, mostrando diferença estatística após 24 horas de incubação.

5.5. Ensaio de Log P por método cromatográfico

A determinação do coeficiente de partição (Log P) teórico do AC e do AK foi realizada por meio do *software ChemDraw Ultra 12.0* – Cambridge Soft Corporation; (versão 12.0, Cambridge, Estados Unidos) e resultou em valores de 5,43 e 5,04 respectivamente.

A curva de linearidade (Figura 13) dos padrões em duplicata permitiu a construção da equação $y = 0,2685x - 0,3638$ e coeficiente de determinação, $r^2 = 0,953$. O Log k do AC e do AK foi determinado a partir de seu tempo de retenção. Entretanto, ambos AC e AK apresentaram tempo de retenção superior a todos os padrões selecionados. Apesar de inserir padrões de elevado Log P no ensaio, os fatores de retenção observados foram inferiores aos fatores de retenção do AC e AK. Os resultados obtidos permitem afirmar que o Log P do AC e do AK são maiores ou iguais a 6,5, demonstrando que os compostos possuem afinidade por meios lipofílicos como as membranas.

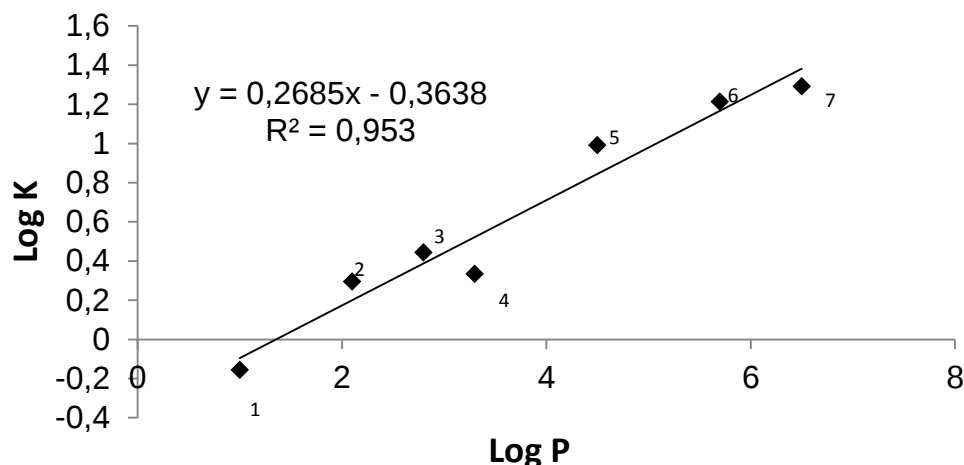


Figura 13. Curva analítica do ensaio de determinação de Log P para os padrões utilizados: acetanilida (1), benzeno (2), clorobenzeno (3), timol (4), fenantreno (5), trifenilamina (6) e DDT (7).

5.6. Avaliação da permeabilidade do AC e do AK em células Caco-2

Os resultados da avaliação da permeabilidade foram recentemente publicados pelo nosso grupo de pesquisa (MAURO et al., 2019). A via de administração oral apresenta vantagens como conveniência, segurança e custo para pacientes, profissionais de saúde e sistema público de saúde (SKOLNIK et al., 2010; BENJAMIN et al., 2012; EEK et al., 2016). Ensaios in vitro para avaliar a absorção oral e a biodisponibilidade de candidatos a fármacos demonstraram uma redução nos custos em estágios de descoberta e desenvolvimento de candidatos a fármacos (WANG; URBAN; BOJANIC, 2007).

O ensaio de viabilidade celular das células Caco-2 foi realizado pelo método redox da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) (Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), substância reveladora que apresenta mudança colorimétrica em função do metabolismo celular (GRANDIS et al., 2017). A resazurina é um corante solúvel em água, estável, não apresenta toxicidade para as células, e portanto, pode ser usada como indicador da viabilidade celular, mesmo quando a exposição por longos períodos é necessária (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994; AL-NASIRY et al., 2007). A resazurina (azul) é convertida a resasorfina (rosa) através de sua oxido-redução em resposta ao metabolismo celular. Quando há concentrações tóxicas às células, ocorre diminuição do número de células e diminuição da bioconversão da resazurina é observada. O ensaio permitiu selecionar a concentração dos compostos

de interesse (AC e AK) a ser utilizada no experimento de permeabilidade sem que ocorresse morte celular.

É importante a realização deste teste, pois os resultados do ensaio de permeabilidade podem ser afetados pela citotoxicidade do composto estudado e também pelo uso de co-solventes (FERNANDES et al., 2012). Foram utilizadas várias concentrações para definir em quais concentrações o AC e o AK poderiam ser utilizados sem que a monocamada de células Caco-2 fosse danificada. As seguintes concentrações foram avaliadas para os compostos de interesse: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,91 μM em sextuplicata, e também controles do solvente, controle positivo e negativo foram realizados. A utilização do DMSO como co-solvente em concentrações de no máximo 10% (v/v) não ocasionou dano a monocamada de Caco-2 em experimentos de permeabilidade segundo Da Violante e colaboradores (DA VIOLANTE et al., 2002). No presente estudo, todas as soluções dos analitos de interesse foram preparadas em DMEM contendo no máximo 1% de DMSO. Após o período de revelação, o controle negativo (células e meio de cultivo) e o controle do solvente apresentaram coloração rosa, demonstrando viabilidade das células, enquanto o controle positivo para o qual é esperado morte celular, a coloração ficou azul, devido a ausência de metabolismo.

A determinação da viabilidade das células Caco-2 foi avaliada após 24 horas de incubação, tempo superior ao necessário para a realização do ensaio de permeabilidade celular. Os resultados mostram baixa viabilidade celular na concentração de 500 μM para o AC e AK e para as demais concentrações testadas, a viabilidade atinge cerca de 70% para o AC e cerca de 80% para o AK (Figura 14).

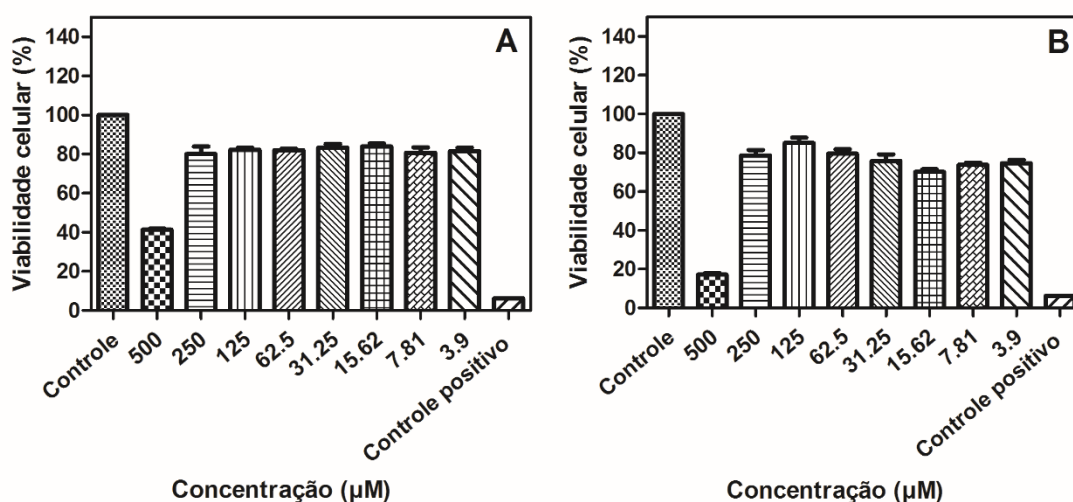


Figura 14. Viabilidade celular dos ácidos caurenóico (A) e copálico (B) em células Caco-2 após incubação a 37 °C por 24 horas, utilizando resazurina. O controle do solvente contendo no máximo 1 % de DMSO em DMEM foi utilizado para determinar a viabilidade relativa.

Segundo Fernandes e colaboradores, viabilidade celular de cerca de 70% é aceita para ser utilizada no teste de permeabilidade (FERNANDES et al., 2012). O guia ISO 10993-5 de 2009 considera como efeito citotóxico, a redução de mais de 30% na viabilidade celular (ISO, 2009). Com base no resultado do ensaio, a menor concentração (3,9 µM) foi escolhida para ser utilizada no teste de permeabilidade para ambos os compostos, pois apresentou resultados de viabilidade celular próximos de 80% para AC e AK por um período superior ao utilizado no ensaio de permeabilidade.

As células que no início do cultivo se encontravam isoladas, formam a monocamada após o processo de diferenciação em enterócitos, após seu cultivo (Figura 15). Com a finalidade de garantir a confiabilidade do ensaio de permeabilidade e como parte complementar ao teste de viabilidade celular, foi realizado o monitoramento da integridade das membranas formadas pelas células Caco-2 cultivadas em placas de 12 poços contendo insertos (Figura 16).

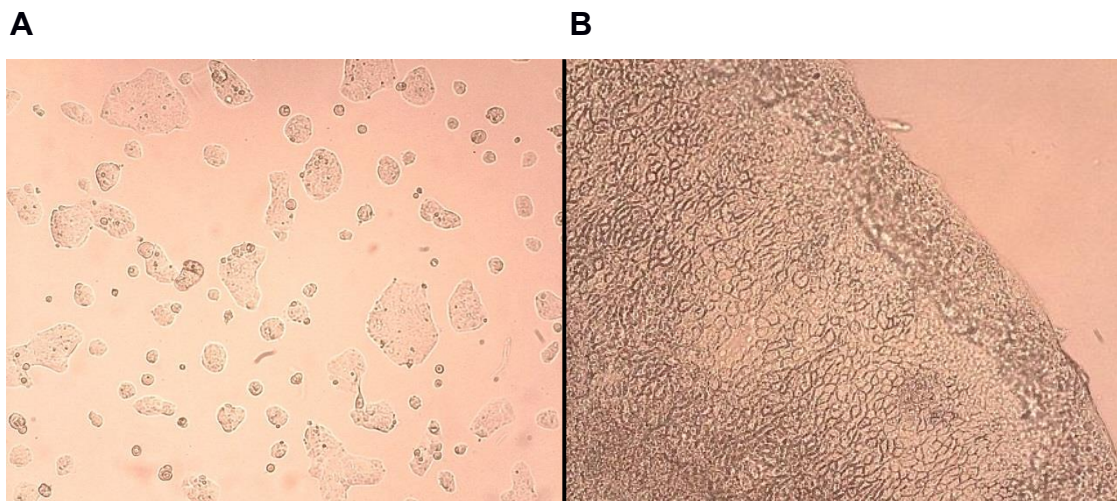


Figura 15. Fotomicrografia das células Caco-2 (BCRJ n°0059) utilizadas para avaliar a viabilidade celular. Microscópio invertido em aumento de 20x, sem corantes. Imagem a esquerda é referente ao início do cultivo celular (A), enquanto que a imagem da direita mostra a formação da monocamada (B).

Fonte: próprio autor

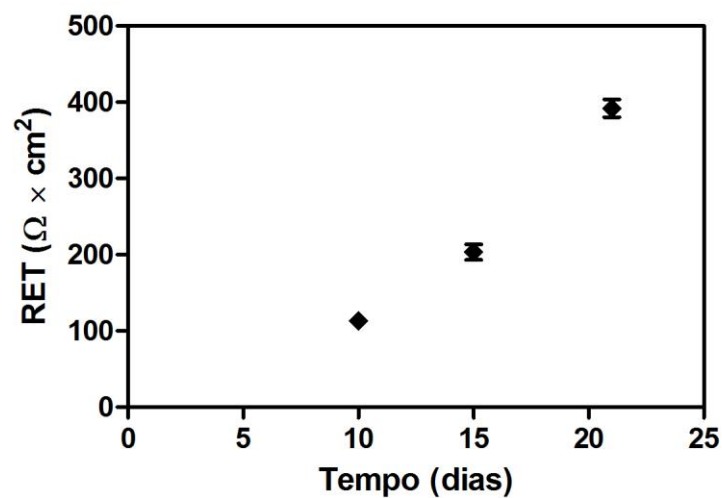


Figura 16. Monitoramento da integridade das membranas através dos valores de resistência elétrica transepitelial (RET) obtidos aos 10, 15 e 21 dias de cultivo das células Caco-2 nos insertos, em meio DMEM, pH 7,4. Média e desvio padrão e seis determinações.

Os valores obtidos da avaliação do RET mostram um aumento na média entre os dias monitorados. Foram considerados adequados para o ensaio de

permeabilidade valores superiores a $200 \, \Omega \times \text{cm}^2$, garantindo a viabilidade celular (HIDALGO, 1996).

A permeabilidade aparente foi determinada a partir da quantidade permeada através da monocamada de células Caco-2 no sentido apical – basolateral (A-B) e basolateral – apical (B-A). Foram obtidos os valores da P_{app} para AC, AK e para os controles de alta e baixa permeabilidade. O valor de P_{app} do verapamil foi de $115 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ e para a fluoresceína não foi possível a quantificação uma vez que as concentrações em todos os tempos estavam abaixo do limite de quantificação. Esses valores demonstram a integridade da monocamada das células Caco-2, uma vez que o verapamil apresenta alta permeabilidade e a fluoresceína possui baixa permeabilidade (AUGUSTIJNS; MOLS, 2004; KRATZ et al., 2011; FERNANDES et al., 2014; PARK et al., 2015; CHEN et al., 2016; BONETTI et al., 2018; HOFFMANN et al., 2018;).

No sentido A-B, AC apresentou P_{app} igual a $4,67 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ e AK igual a $4,66 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, sendo considerados de moderada absorção segundo Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2014; Tabela 8). Os compostos que apresentam P_{app} inferiores a $2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ são considerados pouco absorvidos; moderadamente absorvidos quando P_{app} encontra-se entre 2 e $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ e de alta permeabilidade in vivo quando P_{app} é superior a $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (FLYNN; VOHRA, 2018). Portanto, AC e AK são promissores candidatos a fármacos administrado por via oral, requerendo, no entanto, proteção contra os fluídos gástricos devido sua instabilidade em pH ácido.

A avaliação no sentido B-A também foi realizada para verificar se as substâncias sofrem efluxo ativo. O AC apresentou P_{app} igual a $1,68 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ e AK mostrou P_{app} igual a $2,82 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ no sentido B-A. A relação de efluxo (RE) foi utilizada para avaliar o impacto do efluxo na permeabilidade oral. Valores de $\text{RE} \geq 3$ indicam alta taxa de efluxo, $\text{RE} < 2$ caracterizam transporte passivo e RE entre 2 e 3 indicada efluxo moderado (SKOLNIK et al., 2010). AC e AK apresentaram $\text{RE} < 2$, sugerindo que o transporte passivo é o principal mecanismo envolvido na sua absorção oral. A permeabilidade através das células Caco-2 no sentido A-B também foi avaliada utilizando verapamil como inibidor da P-gp (Tabela 8). Os resultados mostram que a absorção oral de AC e AK não sofre interferência desse transportador. AC e AK apresentaram TSI_{app} inferior a 25%, mostrando que ambos não são substratos da P-gp (LIN et al., 2011). Foi utilizado o gráfico de quatro-zonas

proposto por Lin e colaboradores (2011) para estimar o impacto dos transportadores de efluxo na absorção intestinal. Nesta proposta, a zona 1 refere-se as substâncias com alta absorção intestinal para as quais o efluxo não é fator limitante devido a elevada permeabilidade passiva ($P_{app} (A-B) \geq 5 \times 10^{-6}$ cm/s e $RE < 2$); a zona 2 com $P_{app} (A-B) < 5 \times 10^{-6}$ cm/s e $RE < 2$ refere-se as substâncias cuja fração absorvida e permeabilidade passiva são variáveis e o efluxo não é fator limitante; a zona 3 inclui as substâncias com fração absorvida compatível com a administração oral em função da permeabilidade passiva ser suficientemente alta para superar o efluxo ($P_{app} (A-B) \geq 1,8 \times 10^{-6}$ cm/s e $RE \geq 2$); e a zona 4 inclui as substâncias de baixa fração absorvida uma vez que os processos concorrentes de permeabilidade passiva e efluxo são comparáveis ($P_{app} (A-B) < 1,8 \times 10^{-6}$ cm/s e $RE \geq 2$). Usando esta classificação, podemos concluir que a difusão passiva é o principal mecanismo de transporte para o AC e AK e o efluxo mediado por P-gp não é limitante da permeabilidade em células Caco-2 (LIN et al., 2011). Cho e colaboradores encontraram P_{app} no sentido A-B para o AK valor semelhante a esse estudo (CHO et al., 2018).

Tabela 8. Estudo da permeabilidade do ácido copálico (AC) e caurenóico (AK) em células Caco-2 na presença e ausência do inibidor da glicoproteína-P, verapamil (50 µM).

Composto	$P_{app} (A-B) (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$	$P_{app} (B-A) (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$	$RE = \frac{P_{app} (B - A)}{P_{app} (A - B)}$	$P_{app}^i (A - B)^a$	$TSI_{app (A-B)} = \frac{P_{app}^i (A - B) - P_{app} (A - B)}{P_{app} (A - B)} \times 100$
AC	4,67 ± 0,08	1,68 ± 0,50	0,36	4,48 ± 0,26	- 4,07
AK	4,66 ± 0,04	2,82 ± 0,20	0,60	5,37 ± 0,72	15,24
Verapamil	115				
Fluoresceína	N.D.				

Valores apresentados como média ± desvio padrão das triplicatas; N.D.: não determinado (as concentrações no compartimento basolateral estavam abaixo do LIQ). ⁱ indica que os experimentos foram realizados na presença de verapamil (50 µM). RE: relação de efluxo; P_{app} : permeabilidade aparente; TSI: índice do transporte de substrato.

5.7. Ligação de AC e AK as proteínas plasmáticas

O parâmetro farmacocinético $F_{u,p}$ é considerado essencial em farmacometria, como por exemplo para estudos de modelagem e simulação em farmacocinética baseado em fisiologia (PBPK). O parâmetro $F_{u,p}$ influencia os processos de distribuição, transporte mediado por carreadores, eliminação e a própria ação farmacológica (HUANG et al., 2013). Portanto alterações na ligação às proteínas irão influenciar a disposição cinética e eficácia dos fármacos (DEITCHMAN; SINGH; DERENDORF, 2018). $F_{u,p}$ pode ser utilizado em aplicações diversas, como na interpretação das concentrações no plasma que efetivamente estão associadas com o efeito farmacológico, na extrapolação de parâmetros farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) observados in vitro para o cenário clínico; na extrapolação in vitro-in vivo (IVIVE) de estudos de metabolismo e/ou transporte entre outras (HEUBERGER; SCHMIDT; DERENDORF, 2013).

Inicialmente, o ensaio de ligação às proteínas plasmáticas foi realizado pela técnica de ultrafiltração empregando o dispositivo Centrifree 30K, (Massachusetts, EUA). Entretanto, os resultados sugeriram alta ligação não específica com o dispositivo, provavelmente em função da elevada lipofilicidade do AC e AK. O tratamento das membranas com Tween 80 a 5% (Synth, Diadema, Brasil) por 5 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos a $3.000 \times g$ e lavagem com tampão fosfato (LEE et al., 2003), não foi suficiente para evitar a ligação não específica.

Em seguida, a técnica da ultracentrifugação foi utilizada na avaliação da ligação de AC e AK às proteínas plasmáticas. Esta técnica apresenta vantagens em relação a ultrafiltração como a ausência do efeito de adsorção não específica na membrana (SRIKANTH et al., 2013). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9. O ensaio de ligação às proteínas plasmáticas foi realizado utilizando diferentes concentrações de AC e AK para avaliar se a ligação às proteínas plasmáticas é linear (DEITCHMAN; SINGH; DERENDORF, 2018).

Clinicamente a saturação na ligação às proteínas do plasma ou teciduais pode não ocorrer devido à grande capacidade de ligação ou por sua baixa afinidade de ligação. Neste caso, a ligação às proteínas é considerada linear e, portanto, independente da concentração total do fármaco. Para alguns fármacos, pode ser observado o fenômeno de saturação na ligação às proteínas. A ligação às proteínas

é dependente da concentração e considerada, nesses casos, como não linear (DEITCHMAN; SINGH; DERENDORF, 2018).

Tabela 9. Fração de AC e AK livre em plasma ($F_{u,p}$). Dados apresentados como média [coeficiente de variação (%), n=6]

	$F_{u,p}$
Ácido copálico	
2 μM	0,47 (14,8%)
50 μM	0,53 (19,2%)
100 μM	0,53 (19,8%)
Ácido caurenóico	
2 μM	0,82 (11,5%)
50 μM	0,97 (8,72%)
100 μM	0,98 (5,6%)

A fração livre estimada para o AC e AK em plasma foi apresentada na Tabela 9. O AK liga-se mais fracamente as proteínas plasmáticas se comparado ao AC. A $F_{u,p}$ variou de 0,82 - 0,98 para o AK e de 0,47 – 0,53 para o AC. O cálculo da fração livre do AK apresentado na Tabela 9 foi corrigido por um fator de instabilidade para o AK, uma vez que o mesmo foi considerado instável em plasma após 24 horas de incubação.

5.8. Estudo do metabolismo in vitro do AC e AK em microsomas hepáticos

O estudo do metabolismo do AC e AK foi iniciado usando diferentes concentrações de proteína microsomal de ratos: 0,5; 0,1 e 0,05 mg/mL (n=3). Para esses testes, a concentração de AC e AK no meio de incubação foi de 0,5 μM (Figura 17). A concentração de proteína microsomal equivalente a 0,1 mg/mL foi selecionada para determinar o perfil cinético do AC, pois observou-se decaimento da concentração do substrato nessa condição. Para o AK a concentração utilizada foi de 0,05 mg/mL de proteína microsomal devido sua rápida metabolização.

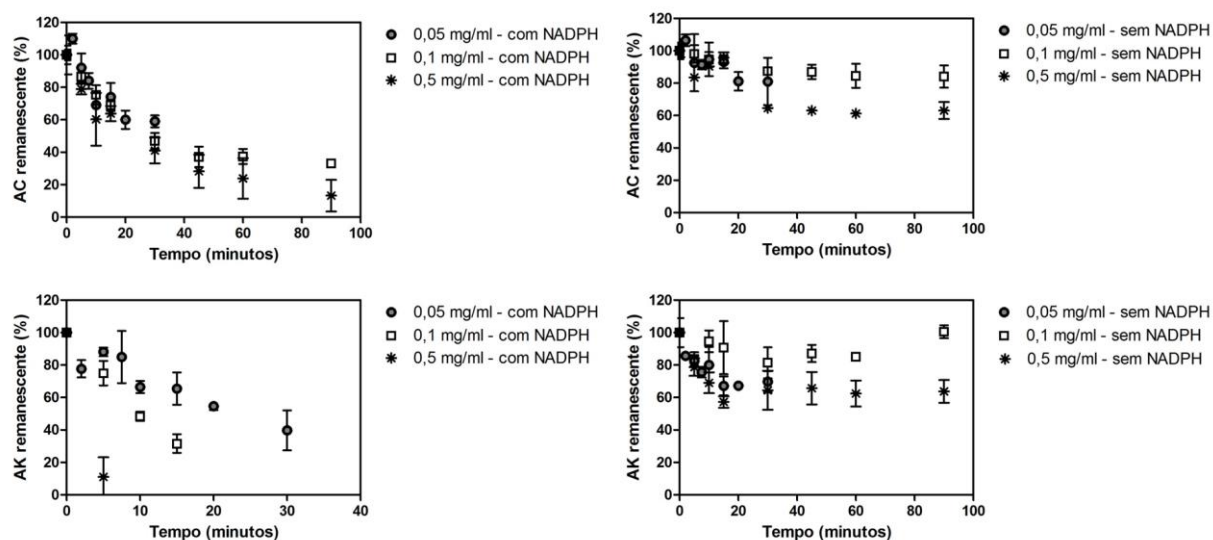


Figura 17. Metabolismo dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK), ambos a 0,5 μ M em diferentes concentrações de proteína microsossomais de ratos a 37 °C, pH 7,4, na presença e na ausência de NADPH.

Para a avaliação do metabolismo oxidativo utilizando microsossomas hepáticos é necessária a presença de cofatores, como o NADPH, para que sua atividade seja mantida durante todo o período do experimento. O NADPH é responsável pela transferência de elétrons usados no processo de oxidação pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) (ASHA; VIDYAVATHI, 2010; SILVA et al., 2018). Os resultados sugerem que o metabolismo do AC e AK são mediados por sistema dependente de NADPH, ou seja, mediado por CYP (Figuras 17 e 18), da mesma forma que para o diclofenado que foi usado como controle positivo.

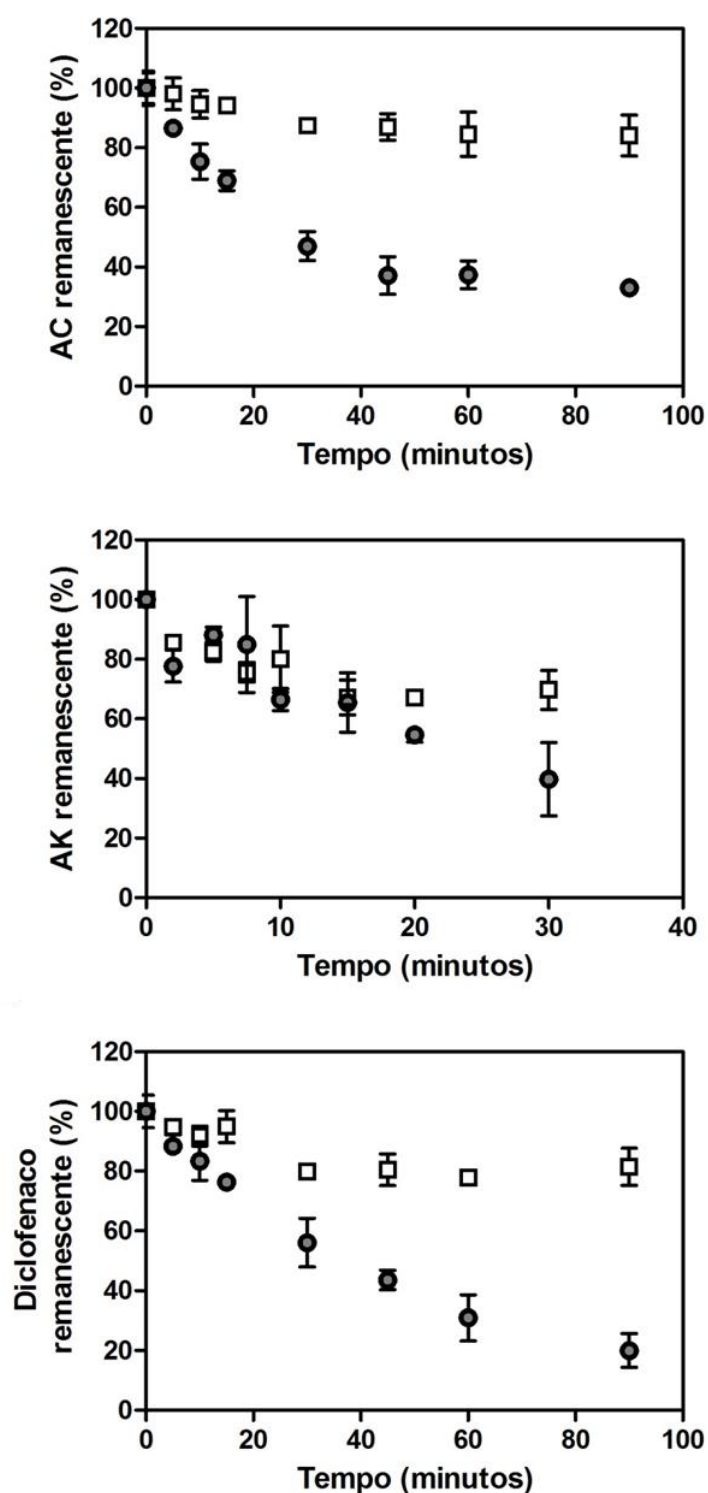


Figura 18. Metabolismo in vitro utilizando microsomas hepático de ratos do ácido copálico (AC), ácido caurenóico (AK) e do controle diclofenaco (dicl) nas concentrações de 0,5 μ M para AC e AK e 1,69 μ M para o diclofenaco. Concentração de proteína microsomal de 0,1 mg/mL para AC e 0,05 mg/mL para AK. Os ensaios foram realizados na presença e na ausência de NADPH. ♦ presença de NADPH, □ ausência NADPH.

A análise das relações entre a velocidade do metabolismo e a concentração do substrato revelou uma relação não hiperbólica, que sugere desvio do modelo enzimático de Michaelis-Menten (Figuras 19 e 20). O plote de Eadie-Hofstee (V_0 versus a razão V_0/S) foi usado como diagnóstico de desvios da cinética de Michaelis-Menten, uma vez que essa análise permite distinguir com maior facilidade a cinética de Michaelis-Menten de cinética enzimática atípica. Quando a cinética enzimática segue o modelo de Michaelis-Menten, observa-se uma reta no plote de Eadie-Hofstee. O resultado aqui observado sugere que o modelo clássico de Michaelis-Menten não é o mais adequado para descrever o metabolismo do AC e AK em microssomas hepáticos. Modelos enzimáticos de múltiplos complexos enzima-substrato mostrando cooperatividade para descrever a cinética de perfil sigmoidal foram avaliados para descrever a cinética enzimática do AC e AK em microssomas hepáticos. A análise do plote de Eadie-Hofstee para AC e AK em microssomas hepáticos de ratos ou humanos sugere autoativação (Figuras 19, 20 e 21).

Em termos da avaliação do clearance em função da concentração do substrato, o fenômeno da autoativação mostra um aumento gradual do clearance conforme a concentração do substrato aumenta até alcançar um valor máximo. A partir desse valor, observa-se perfil semelhante com a cinética de Michaelis-Menten, com redução no clearance decorrente do aumento da concentração do substrato decorrente da saturação (Figura 21) (HOUSTON; KENWORTHY, 1999).

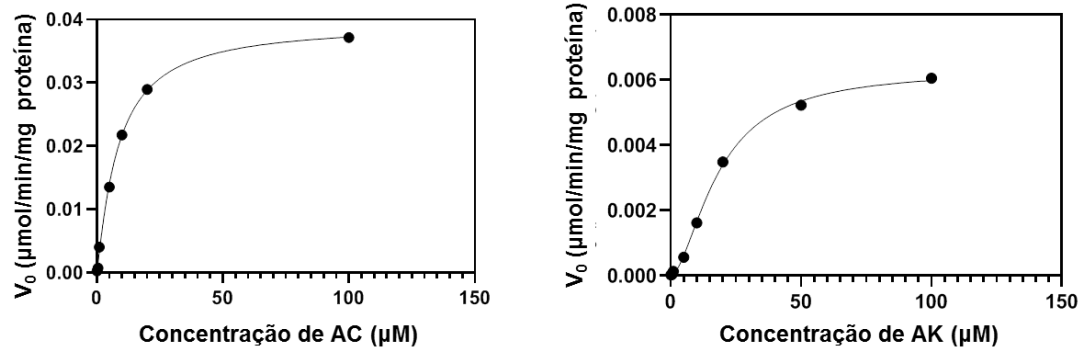
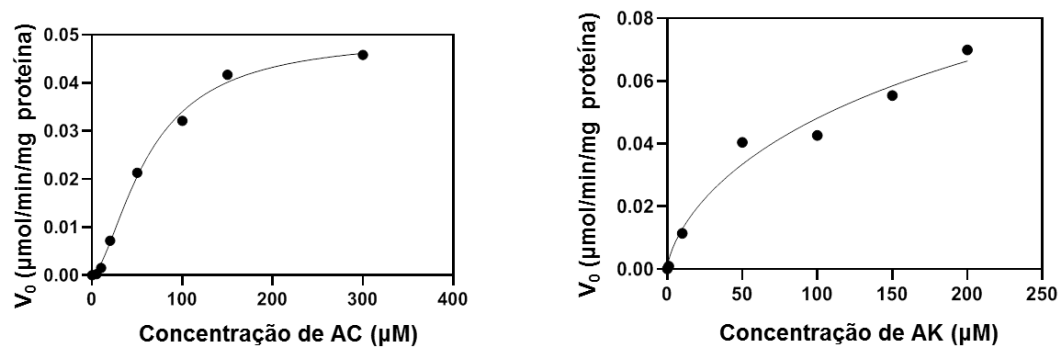
A**B**

Figura 19. Representação gráfica das curvas de Michaelis-Menten para a cinética enzimática dos ácidos copálico (AC) e caurenóico (AK) utilizando microsomas hepático de (A) ratos e (B) humanos (n=3).

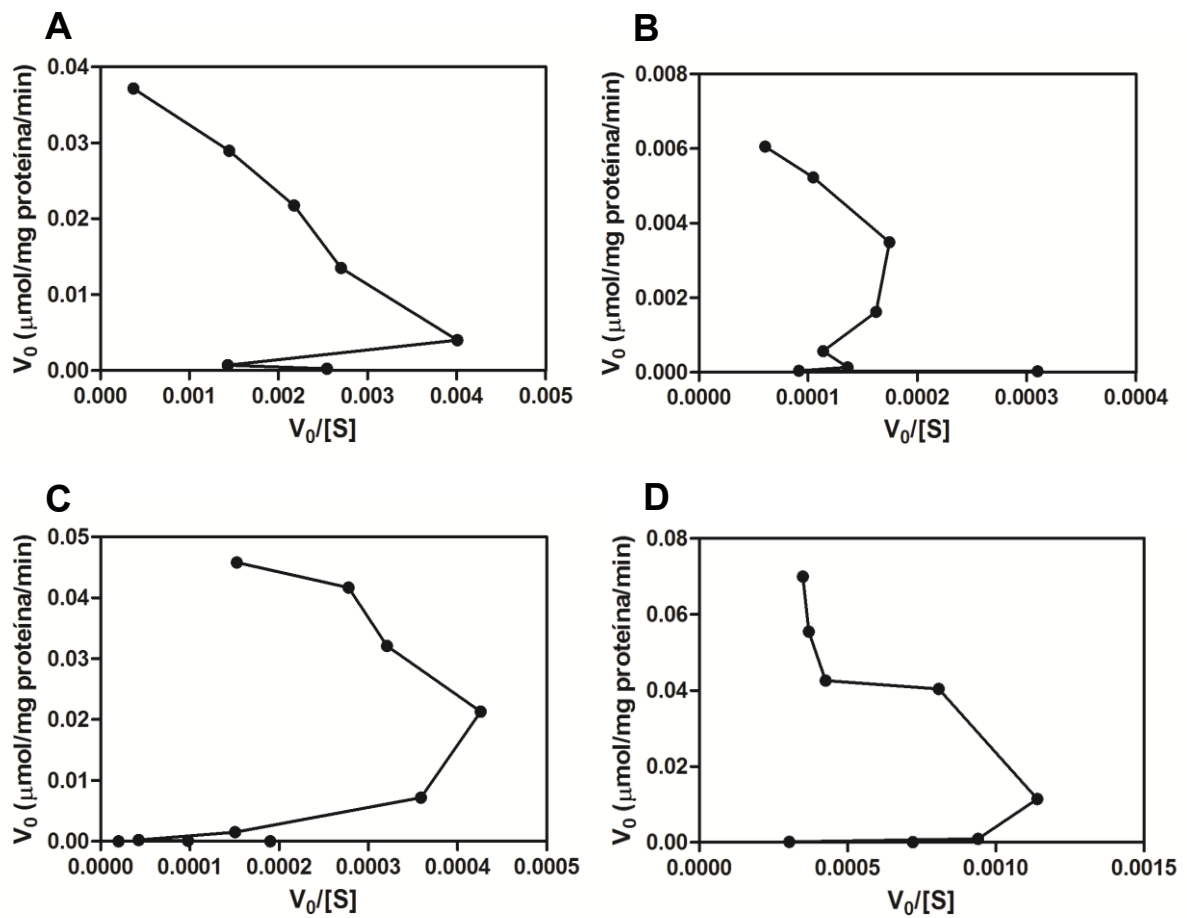


Figura 20. Plote de Eadie-Hofstee para o metabolismo in vitro do ácido copálico (gráficos A e C) e ácido caurenóico (gráficos B e D) em microsomas hepáticos de ratos (A e B) e em microsomas hepáticos humano (C e D).

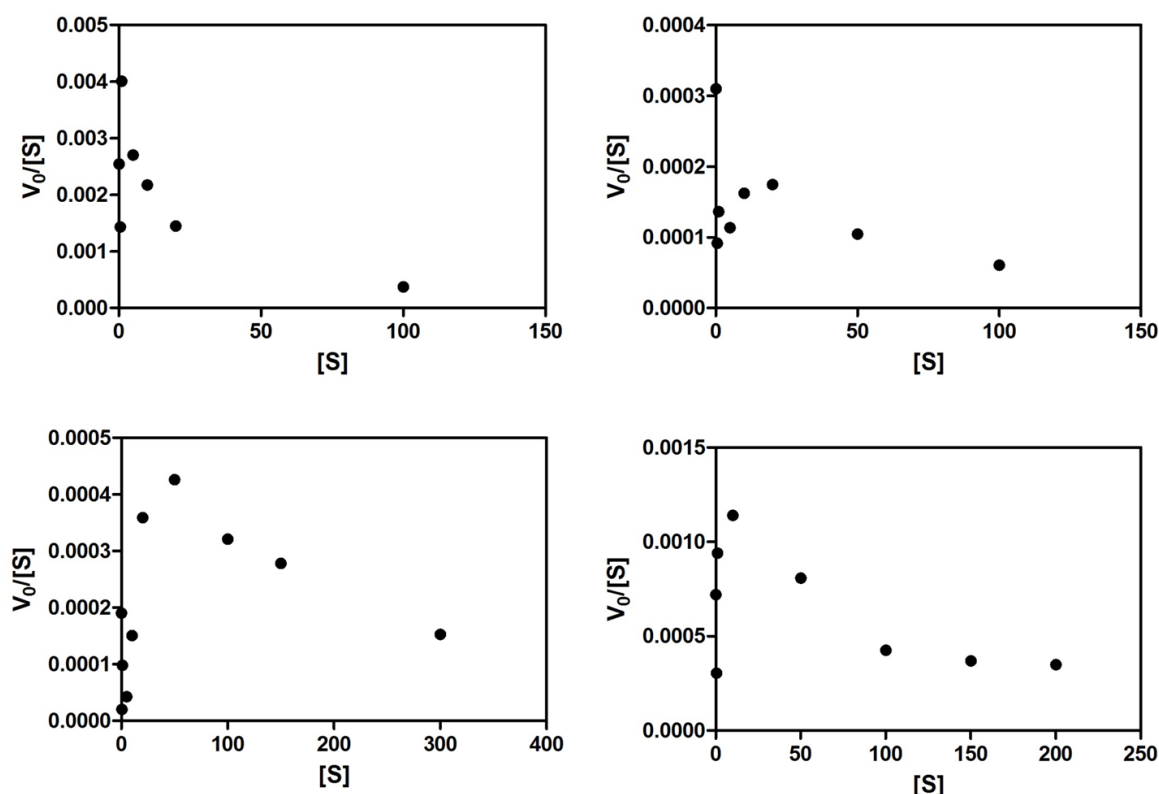


Figura 21. Plote do clearance ($V_0/[S]$) em função da concentração para o metabolismo in vitro do ácido copálico (gráficos A e C) e ácido caurenóico (gráficos B e D) em microsossomas hepáticos de ratos (A e B) e em microsossomas hepáticos humano (C e D).

Devido à observação do perfil de cooperatividade enzimática, a equação de Hill foi utilizada para estimar os parâmetros da cinética enzimática (Tabela 10). Os parâmetros estimados para AC e AK foram apresentados na Tabela 10 e mostram que a $V_{\max}$ do metabolismo in vitro do AC com microsossomas hepáticos humanos e ratos apresentaram valores da mesma ordem de grandeza. Para o AK, não foi observada saturação na velocidade inicial da reação usando HLM (Figura 19B), mesmo em elevadas concentrações do substrato. Portanto, a estimativa dos parâmetros de cinética enzimática não foi precisa e os dados não foram apresentados. O $V_{\max}$ para o AK foi inferior ao do AC, ao comparar os dados observados em RLM (Tabela 10).

O parâmetro S_{50} representa a concentração de substrato para a qual a enzima está hemisaturada. O S_{50} do AC foi de 8,4 (7,13 – 10,20) e de 62,21 (52,97 – 75,55) para RLM e HLM, respectivamente. Para o AK, o S_{50} foi de 18,29 (16,34 –

21,12) em RLM. O coeficiente de Hill foi maior que 1 tanto para AC quanto para AK nos ensaios de metabolismo *in vitro* em microsomas hepáticos. Este resultado define a cooperatividade positiva, ou seja, a ligação do substrato em um sítio enzimática irá aumentar a afinidade da enzima para a ligação de outra molécula de substrato. Coeficientes de Hill superiores a 1 são comuns para substratos do CYP3A4, uma isoforma que é abundante no fígado e intestino e metaboliza uma grande diversidade de fármacos (ZANGER; SCHWAB, 2013).

As enzimas do CYP apresentam sítio catalítico flexível e metabolizam substratos que possuem estruturas químicas variadas (SEIBERT; TRACY, 2014; WIENKERS; ROCK, 2014). Cinética enzimática atípica já fora observada para substratos de CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6, CYP1A2 e CYP1A1 (SINZ, 2012; DENISOV et al.; 2007). O CYP3A4 pode apresentar características cinéticas as quais não condizem com o modelo de Michaelis-Menten, mas que pode ser explicado pelo modelo de cooperatividade (HOUSTON; KENWORTHY, 1999; DENISOV et al.; 2007). Essa isoforma é amplamente encontrada no fígado humano, metaboliza compostos com características químicas diversas, e responsável pelo metabolismo de um número vasto de fármacos usados na prática clínica e xenobióticos (DENISOV et al.; 2007; ZANGER; SCHWAB, 2013).

Devido ao desvio do comportamento Michaeliano, o clearance intrínseco máximo (CL_{max}) foi determinado em substituição ao CL_{int} , conforme demonstrado por Houston and Kenworthy (1999), (Equação 16). O CL_{max} é uma estimativa do clearance quando a enzima está totalmente ativada e a saturação não ocorreu (HUANG et al., 2004). O CL_{max} calculado para AC usando RLM foi aproximadamente 7,6 vezes maior do que o valor encontrado para HLM. Este poderá ser usado para prever a capacidade metabólica no modelo experimental rato e em humanos.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos do metabolismo in vitro do ácido copálico (AC) e ácido caurenóico (AK) em microsomas hepáticos de rato (RLM) e humano (HLM) usando a equação de Hill. Dados apresentados como média (IC 95%), n=3.

	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol/mg proteínas/min}$)		H		S_{50} (μM)		K_{prime}	$CL_{\max}$ ($\text{mL/min/mg proteina}$)
	Valor estimado	IC 95%	Valor estimado	IC 95%	Valor estimado	IC 95%		
<i>Ácido copálico</i>								
RLM	0,039	0,037-0,042	1,16	0,98-1,38	8,41	7,13-10,20	11,8	3,14
HLM	0,050	0,046-0,055	1,62	1,35-1,96	62,21	52,97-75,55	814,3	0,41
<i>Ácido caurenóico</i>								
RLM	0,006	(0,006-0,007)	1,71	1,45-2,01	18,29	16,34-21,12	144,8	0,18
HLM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Equação de Hill: $V = V_{\max} \times S^h / (S_{50}^h + S^h)$, onde: $V_{\max}$ = velocidade máxima da reação enzimática. $V_{\max}$ é a velocidade da enzima extrapolada a concentrações muito elevadas do substrato, e, portanto, é quase sempre maior que qualquer velocidade avaliada no experimento; S_{50} : é a concentração do substrato que produz metade da velocidade máxima, também conhecida como EC_{50} ; h = coeficiente de Hill. Quando $h=1$, a equação é idêntica a equação de Michaelis-Menten. Quando $h > 1,0$, a curva é sigmoideal devido a cooperação positiva. A variável h nem sempre é igual ao número de sítios de interação; K_{prime} = parâmetro relacionado ao K_m . O K_{prime} é calculado como S_{50}^h e expresso em unidades de concentração.

5.9. Ligação de AC e AK as proteínas microsossomais

A técnica da ultracentrifugação foi utilizada na avaliação da ligação de AC e AK às proteínas microsossomais. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11. O ensaio de ligação às proteínas microsossomais foi realizado utilizando diferentes concentrações de AC e AK (DEITCHMAN; SINGH; DERENDORF, 2018).

Tabela 11. Fração de AC e AK livre em meio microsossomal ($F_{u,mic}$). Dados apresentados como média [coeficiente de variação (%), n=6]

	$F_{u,mic}$
Ácido copálico	
2 μM	0,27 (10,3%)
50 μM	0,21 (8,6%)
100 μM	0,26 (12,8%)
Ácido caurenóico	
2 μM	0,59 (17,3%)
50 μM	0,31 (22,3%)
100 μM	0,21 (30,0%)

A fração livre em sistema microsossomal ($F_{u,mic}$) é um parâmetro relevante para melhorar as predições de clearance in vivo por extrapolação in vitro in vivo (IVIVE). A $F_{u,mic}$ pode ser experimentalmente determinada por diálise de equilíbrio, ultrafiltração e ultracentrifugação. Entretanto, para as duas primeiras técnicas é provável a adsorção a membrana e dispositivos, principalmente para os compostos altamente lipossolúveis.

Os modelos de relação quantitativa estrutura/atividade (QSAR) para predições de fração livre em incubações microsossomais apresentam exatidão baixa para compostos de alta lipofilicidade (GERTZ et al., 2008), como o AC e o AK. Neste estudo, a $F_{u,mic}$ média do AC foi de aproximadamente 0,25 no intervalo de concentrações de 2 a 100 μM (Tabela 11), com coeficientes de variação inferiores a 20% o que sugerem precisão da determinação. Para o AK, observou-se que a ligação às proteínas do meio microsossomal reduziu com o aumento da concentração do fármaco, o que define ligação a proteínas não linear atípica. Tal comportamento fora discutido recentemente na revisão de Deitchman, Singh e Derendorf (2018). As

tetraciclina representam uma classe de fármacos com ligação não-linear atípica as proteínas plasmáticas, uma vez que a fração livre reduz com o aumento das concentrações. Para a tigeciclina fora observado curva em formato de U, representando um misto do perfil típico e atípico na ligação as proteínas plasmáticas (DEITCHMAN; SINGH; DERENDORF, 2018).

5.10. Extrapolação in vitro-in vivo para clearance hepático

A capacidade de prever o clearance hepático humano representa um avanço importante da ciência, uma vez que auxilia na predição de doses terapêuticas e da exposição sistêmica de forma a alcançar o efeito desejado e minimizar sinais de toxicidade. Com o auxílio de modelos, como o modelo comumente empregado de fígado bem agitado (*“well-stirred liver model”*) (ZHANG; KAMINSKY, 2008), os dados cinéticos das reações enzimáticas observados em sistemas in vitro podem ser usados para prever o *clearance* in vivo (HOUSTON, 1994). Para prever o CL_H in vivo do AC e AK, foi realizado o escalonamento ou redimensionamento dos valores observados de clearance intrínseco considerando o conteúdo de proteínas microsossomais e a massa do fígado (Equação 17). Uma vez que os experimentos de metabolismo in vitro do AK não permitiram o cálculo dos parâmetros de cinética enzimática, foi realizada a IVIVE apenas para o AC. A taxa de extração do fármaco pelo fígado (E) observada apresentou valores próximos da unidade o que permite classificar o AC como de alta razão de extração hepática. Esse dado mostra que a cada passagem pelo fígado, o fármaco é quase completamente depurado do sangue e que está sujeito a elevado metabolismo pré-sistêmico. Os parâmetros farmacocinéticos preditos estão descritos na Tabela 12. Altos valores de CL_H foram observados para AC e AK em microsossomas humanos.

Tabela 12. Clearance hepático do ácido copálico (AC) obtido por extrapolação in vitro-in vivo e taxa de extração do fármaco pelo fígado em microsomas humano (HLM).

	CL_H (mL/min/Kg)	E
Ácido copálico		
HLM	19,4	0,97

CL_H : clearance hepático; E: taxa de extração do fármaco pelo fígado.

5.11. Identificação dos metabólitos de AC e AK

Na investigação do metabolismo in vitro do AK usando RLM por LC-ESI-MS-IT, foi observado um pico com tempo de retenção em 3,2 minutos no cromatograma como potencial metabólito. Neste mesmo tempo de retenção, não foram encontrados picos na amostra branco (contendo RLM) e nem na amostra controle (contendo o AK, Figura 22). O espectro de massas referente a este pico em 3,2 minutos apresentou um íon de maior intensidade com m/z 335 (Figura 23).

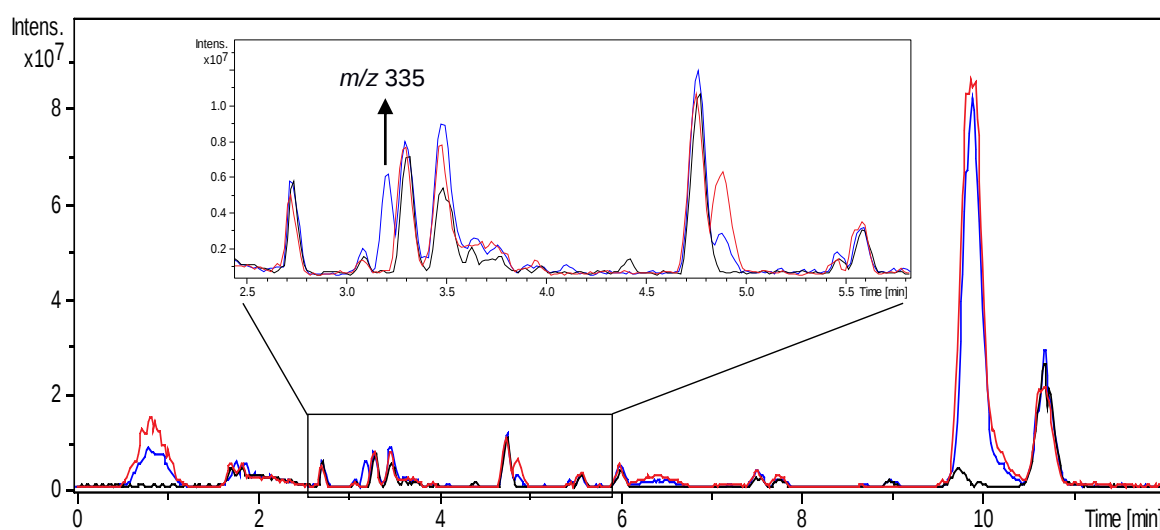


Figura 22. Cromatograma representativo do metabolismo in vitro do ácido caurenóico (AK) em microsomas hepáticos de ratos (RLM). Produto do metabolismo in vitro do AK em RLM (em azul); AK (controle, em vermelho); amostra branco em RLM (em preto). Todas as amostras foram preparadas por extração líquido-líquido usando acetato de etila e analisadas por LC-ESI-MS.

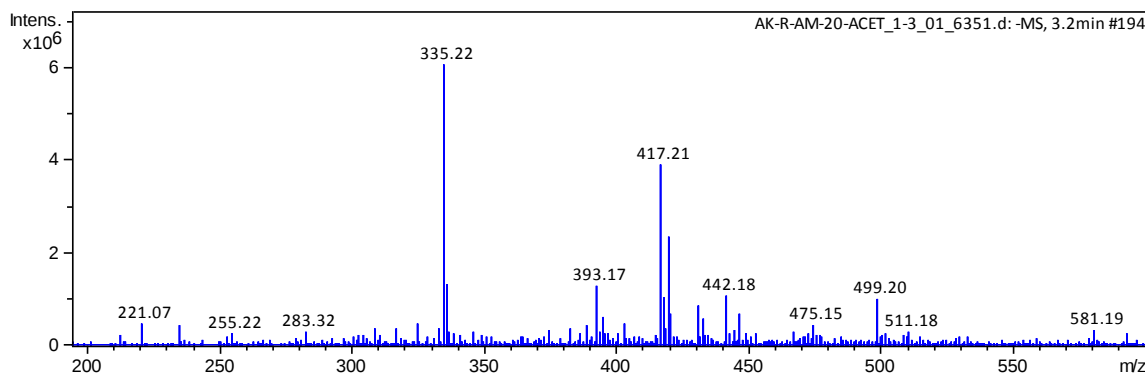


Figura 23. Espectro de massas do produto de metabolismo do ácido caurenóico (AK) em microsomas de fígado de ratos (tempo de retenção = 3,2; cromatogramas da Figura 22), obtido na ionização por *electrospray* e analisador *ion trap* (LC-ESI-MS-IT).

De maneira similar ao observado para RLM, a investigação da formação do metabólito do AK em HLM por LC-ESI-MS-IT resultou na observação de potencial produto do metabolismo com pico no tempo de retenção em 3,2 minutos que não foi observado na amostra branco (contendo HLM) e nem no controle (contendo AK, Figura 24). O espectro de massas referente a este metabólito apresentou íon de maior intensidade com m/z 335 (Figura 25).

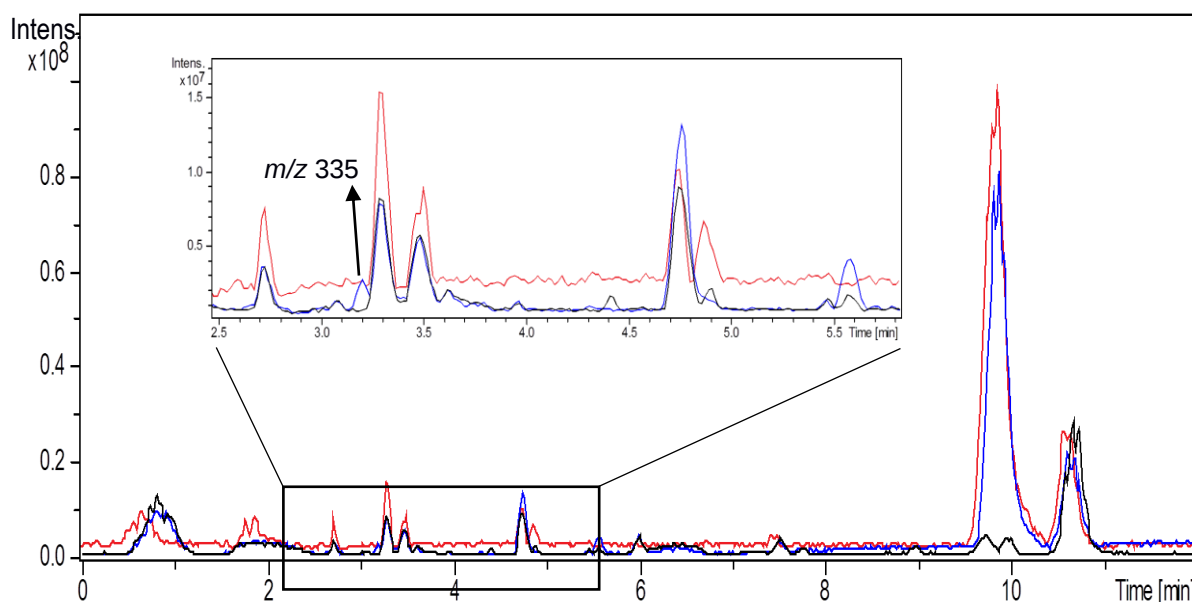


Figura 24. Cromatograma representativo do metabolismo *in vitro* do ácido caurenóico (AK) em microsomas hepáticos humano (HLM). Produto do metabolismo *in vitro* do AK em HLM (em azul); AK (controle, em vermelho); amostra branco em HLM (em preto). Todas as amostras foram preparadas por extração líquido-líquido usando acetato de etila e analisadas por LC-ESI-MS.

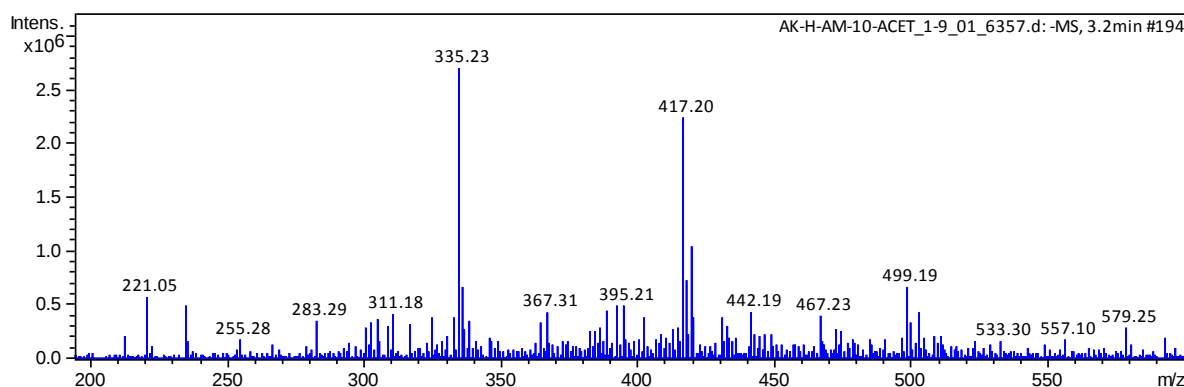


Figura 25. Espectro de massas do produto de metabolismo do ácido caurenóico (AK) em microsomas de fígado humano (tempo de retenção = 3,2; cromatogramas da Figura 24), obtido na ionização por *electrospray* e analisador *ion trap* (LC-ESI-MS-IT).

O metabolismo do AK foi investigado previamente em modelo biomimético utilizando metaloporfirinas e reagentes de salen como catalisadores. Usando os modelos biomiméticos foram identificados três produtos de oxidação sendo um derivado epoxidado, um mono- e um di-hidroxilado (FERNANDES, 2013). No presente estudo, a identificação de metabólitos de AK não foi conclusiva. Entretanto, o íon com m/z 335 (Produto 1) sugere a fórmula molecular $C_{20}H_{31}O_4$, que pode corresponder ao produto de metabolismo dihidroxilado 16,17-dihidroxi-caurenóico (Figura 26), previamente identificado no estudo de metabolismo usando metaloporfirinas (FERNANDES, 2013).

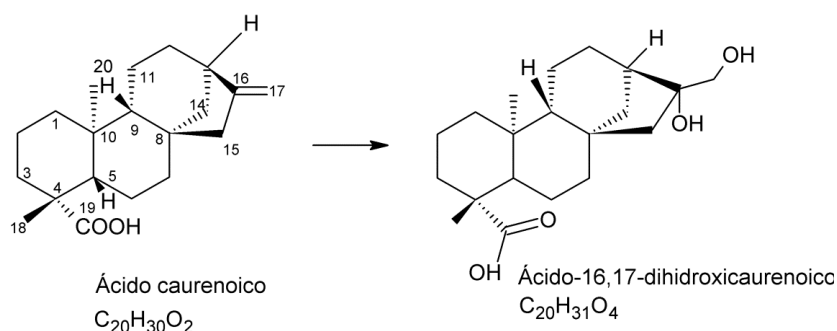


Figura 26. Proposta de metabolismo do ácido caurenóico com formação do produto de dihidroxilado 16,17-dihidroxi-caurenóico.

Para o AC, o estudo do metabolismo *in vitro* em microsomas hepáticos de rato por LC-ESI-MS-IT resultou na observação de cromatogramas com picos nos tempos de retenção de 7,7 e 8,7 minutos que não foram observados na amostra

branco e nem no controle (Figura 27). O espectro de massas do sinal referente ao pico que eluiu em 7,7 minutos apresentou no modo negativo $[M-H]^-$ um íon de maior intensidade com m/z 327 (Produto 2, Figura 28) e para o pico com tempo de retenção em 8,7 minutos foi observado íon com m/z 303, que apresenta a mesma massa que o ácido copálico no modo negativo $[M-H]^-$ de m/z 303. Não é possível descartar a hipótese de este potencial metabólito com m/z 303 ser oriundo de outro composto presente na amostra (AC isolado), uma vez que este não encontrava-se puro, e em geral, microssomas não realizam metabolismo formando isômeros de posição.

O produto do metabolismo do AC foi analisado por espectrometria de massas de alta-resolução por infusão direta. O Produto 2 gerou massa de 327,2346 para o metabólito produzido em microssomas de rato e 327,2317 para o metabólito produzido em microssomas humanos (Figura 28 A e B). Em ambos os casos, a fórmula molecular correspondente à massa de m/z 327 é $C_{22}H_{31}O_2$. O estudo da fragmentação do Produto 2 resultou em perda de 44 unidades (m/z 283,13), sugerindo reação de descarboxilação (Figura 29 A e B). A diferença de massas entre o AC e o Produto 2 foi de 24 unidades, correspondente a dois átomos de carbono. Como não existe introdução de dois átomos de carbono por metabolismo oxidativo, o potencial “metabólito” observado de massa m/z 327 não parece ter originado do AC cuja pureza era de 88%.

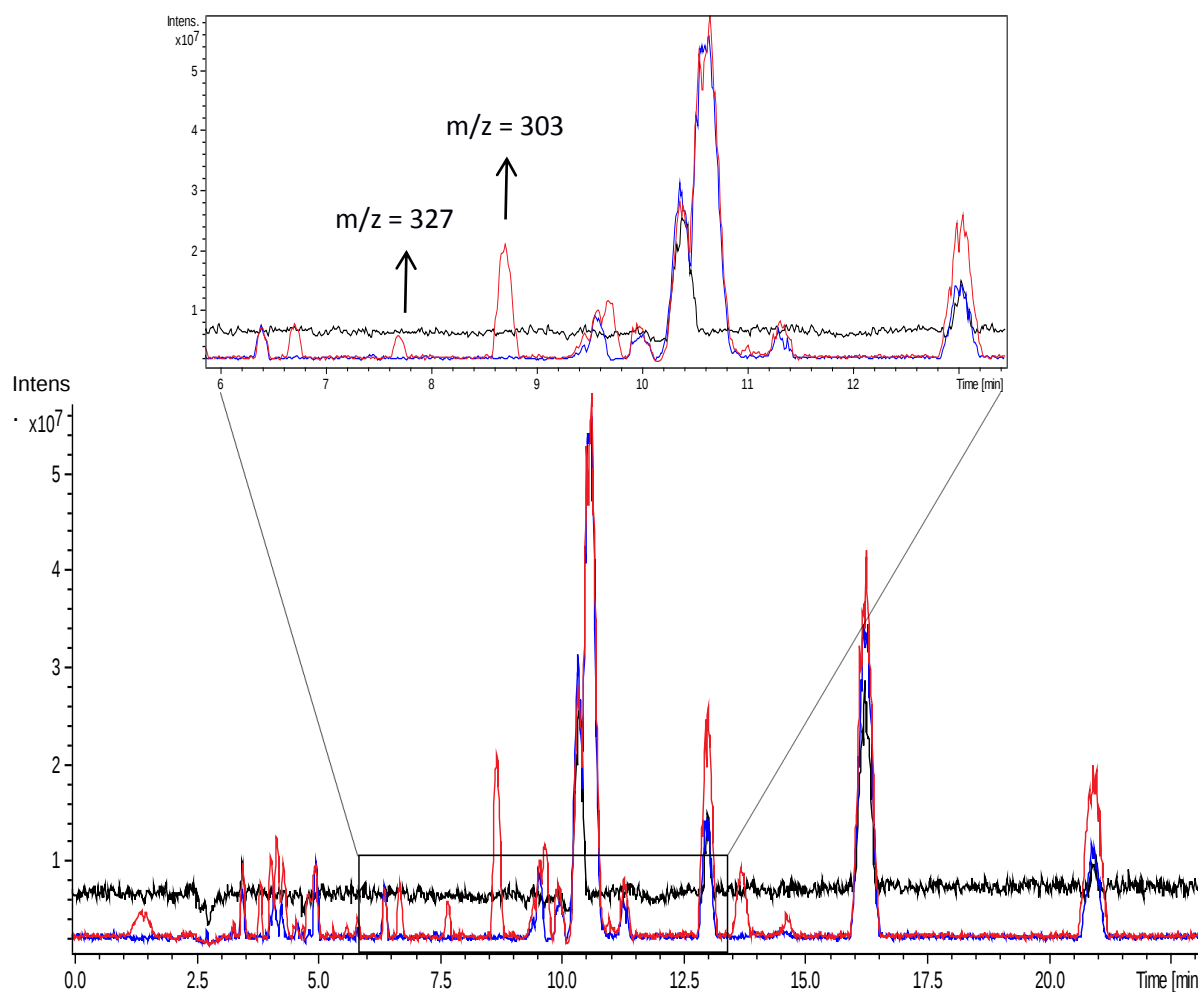


Figura 27. Cromatogramas superpostos referente às análises de uma amostra de metabolismo in vitro do AC com microsossomas hepáticos de rato, uma amostra controle e uma amostra branca, extraídas com acetato de etila. Vermelho: metabolismo (amostra); Azul: controle; Preto: branco.

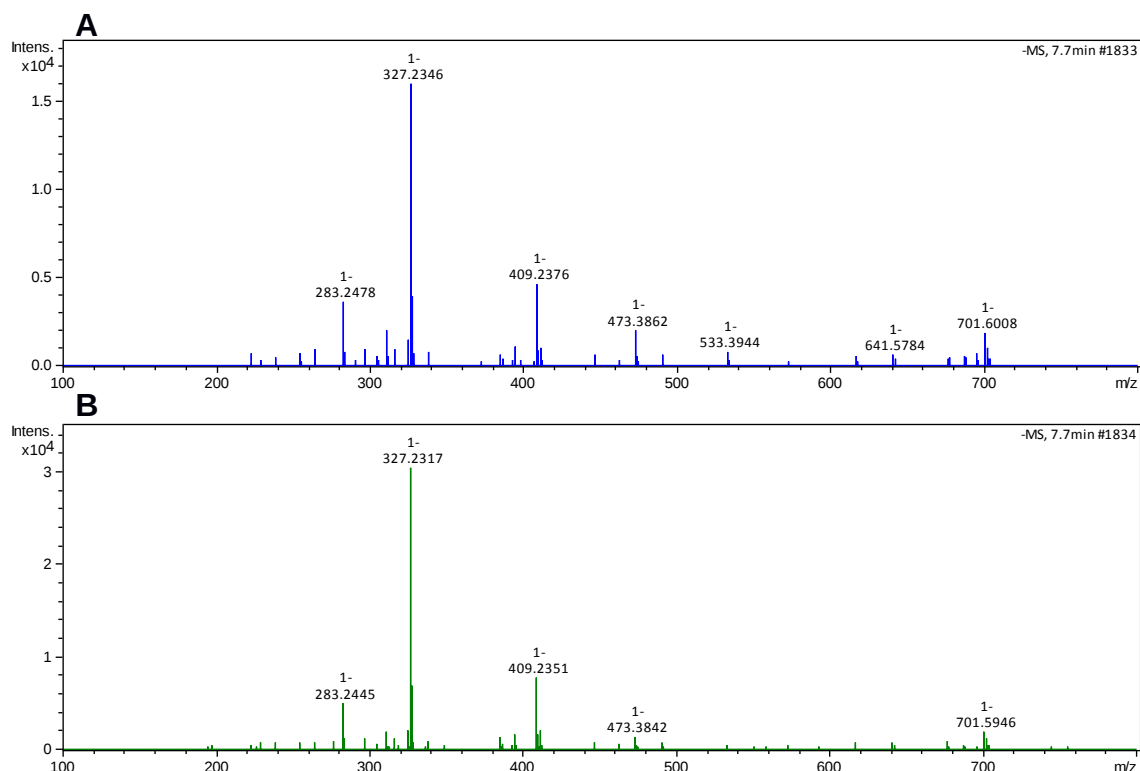


Figura 28. Comparação dos espectros de massas de alta resolução obtidos por MS-ESI-Q-TOF no modo negativo dos produtos de metabolismo (Produto 2) do ácido copálico in vitro usando microssomas de fígado de ratos (A) e microssomas de fígado humano (B).

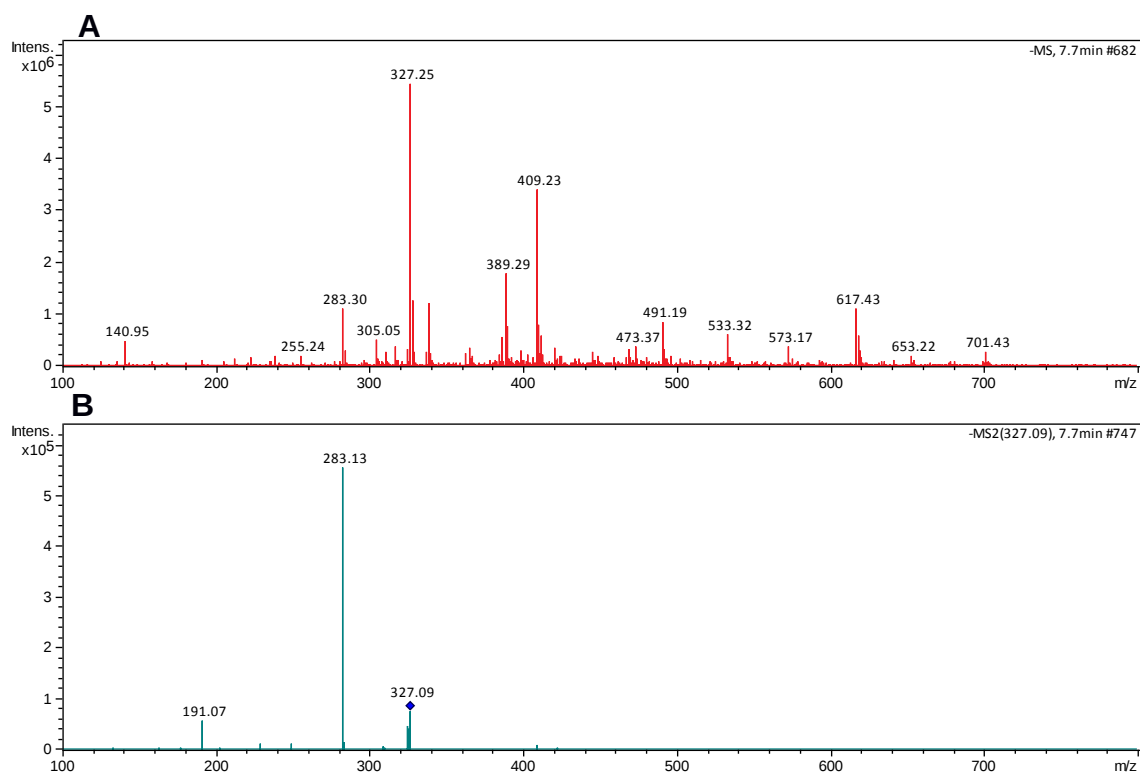


Figura 29. Espectro de massas (A) do metabólito do ácido copálico (AC) em 7,7 minutos, m/z 327 e sua fragmentação (B) por LC-ESI-IT-MS, no modo ion negativo.

Em resumo, neste estudo foram determinadas algumas das propriedades cinéticas dos diterpenos ácidos AC e AK obtidos da oleorresina de Copaíba. A estabilidade do AC e AK avaliada em pH 7,4 mostrou que ambos são estáveis em pH fisiológico. Em pH 1,2, AC e AK sofreram rápida degradação indicando que a administração por via oral requer formulação de revestimento para liberação entérica para garantir a estabilidade de AC e AK no trato-gastrointestinal. A alta lipofilicidade ($\log P$ maior que 6,5) apresentada por AC e AK favorece a permeabilidade do AC e AK através das membranas, mas é um fator limitante para a sua solubilidade em meios aquosos. Os diterpenos AC e AK apresentaram moderada permeabilidade intestinal indicando que são promissores candidatos a fármacos por administração oral, desde que observada a instabilidade em pH ácido. Apesar de observar que a permeabilidade intestinal de AC e AK não é regulada pela P-gp, outros transportadores não estudados nesse trabalho podem influenciar no seu transporte. Portanto, uma das limitações deste estudo se deve a ausência de avaliação do efeito de outros transportadores diferentes da glicoproteína-P que poderiam regular a permeabilidade oral dos diterpenos AC e AK.

A análise das relações entre velocidade de metabolismo e concentração do substrato mostrou perfil de cooperatividade enzimática (modelo de Hill) para AC em RLM e HLM e para AK em RLM, característica frequentemente observada para os substratos de CYP3A4. A IVIVE dos dados observados para o metabolismo *in vitro* sugerem que o AC é um fármaco de alta razão de extração hepática. Diferenças entre o clearance estimado neste estudo e o clearance *in vivo* poderão ser atribuídas a distribuição hepatocelular limitada pela permeabilidade, uma vez que transportadores de fármacos podem limitar esse transporte. Neste estudo, os ensaios de metabolismo foram realizados usando microssomos hepáticos e não cultura de hepatócitos humanos, e essa pode ser considerada também uma limitação. Outra limitação deste estudo se deve ao padrão isolado de ácido copálico a partir da oleorresina de Copaíba que não apresentava alta pureza. Portanto, a identificação dos metabólitos requer interpretação cuidadosa.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foram desenvolvidos e validados métodos analítico e bioanalítico com detectabilidade, linearidade, precisão, exatidão e seletividade compatíveis com os estudos ADMET aqui realizados. O ensaio de estabilidade química mostrou que em pH estomacal (1,2) os diterpenos AC e AK sofrem rápida degradação. Portanto, a administração por via oral requer o uso de formulações de revestimento para liberação entérica. O AC e AK apresentaram estabilidade em plasma humano por 24 horas e 12 horas, respectivamente. O coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) foi determinado pelo método cromatográfico como $> 6,5$ para AC e AK, valor compatível com fármacos de elevada permeabilidade intestinal. Os diterpenos AC e AK apresentam permeabilidade intestinal moderada decorrente da difusão passiva como mecanismo principal de transporte. A atividade de glicoproteína-p, avaliada pelo uso do verapamil como fármaco inibidor, não regula a biodisponibilidade oral do AC e AK.

A cinética enzimática apresentou um comportamento sigmoidal com coeficiente de Hill maior que 1 sugerindo metabolismo por múltiplos sítios ativos e cooperatividade positiva para AC em RLM ou HLM e para AK em RLM. No intervalo de concentração do substrato avaliado, não foi possível caracterizar a cinética enzimática do AK em HLM. A extrapolação dos dados da cinética enzimática sugere que o AC é um fármaco de alta razão de extração hepática ($E = 0,97$). Esse resultado indica que a cada passagem pelo fígado uma grande fração da concentração arterial (97%) é metabolizada, e, portanto, trata-se de um fármaco de elevada eliminação pré-sistêmica.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, F.; COSTA, L. D. A.; ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; CASTRO, P. T.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G. Copaifera langsdorffii oleoresin and its isolated compounds: antibacterial effect and antiproliferative activity in cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 443, 21 dez. 2015.

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.

AL-NASIRY, S.; GEUSENS, N.; HANSSENS, M.; LUYTEN, C.; PIJNENBORG, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human Reproduction**, v.22, n.5, p. 1304–1309, 2007.

ALVES, J. M.; SENEDESE, J. M.; LEANDRO, L. F.; CASTRO, P. T.; PEREIRA, D. E.; CARNEIRO, L. J.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Copaifera multijuga oleoresin and its constituent diterpene (–)-copalic acid: Genotoxicity and chemoprevention study. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 819, n. April, p. 26–30, 2017.

ANDRADE, B. B.; MOREIRA, M. R.; AMBROSIO, S. R.; FURTADO, N.; CUNHA, W. R.; HELENO, V.; SILVA, A. N.; SIMAO, M. R.; DA ROCHA, E.; MARTINS, C. Evaluation of ent-kaurenoic acid derivatives for their anticariogenic activity. **Nat Prod Commun.**, v. 6, p. 777–780, 2011.

ANDRADE, E. L.; BENTO, A. F.; CAVALLI, J.; OLIVEIRA, S. K.; SCHWANKE, R. C.; SIQUEIRA, J. M.; FREITAS, C. S.; MARCON, R.; CALIXTO, J. B. Non-clinical studies in the process of new drug development – Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 12, p. 1-19, 2016.

ANVISA. Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE 27, de 17 de maio de 2012**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em 10 de Junho de 2017.

ANVISA. Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Guia para validação de métodos analíticos. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401.

ARRUDA, C.; ALDANA MEJÍA, J. A.; RIBEIRO, V. P.; GAMBETA BORGES, C. H.; MARTINS, C. H. G.; SOLA VENEZIANI, R. C.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus-A review. **Biomed Pharmacother.**, v. 109, p. 1-20, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.030.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review. **Appl Biochem Biotechnol.**, v.160, p. 1699–1722, 2010.

AUGUSTIJNS, P.; MOLS, R. HPLC with programmed wavelength fluorescence detection for the simultaneous determination of marker compounds of integrity and P-gp functionality in the Caco-2 intestinal absorption model. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 971-978, 2004.

AUSTIN, R. P.; BARTON, P.; MOHMED, S.; RILEY, R. J. The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physicochemical properties. **Drug Metab Dispos.**, v. 33, p. 419-25, 2005.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005.

BARBOSA, P. C. S.; MEDEIROS, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; VIEIRA, G.; WIEDEMANN, L. S. M.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): Soil composition, seasonality and diameter at breast height. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, p. 1823–1833,

2012.

BARDAJÍ, D. K. R.; DA SILVA, J. J. M.; BIANCHI, T. C.; EUGÊNIO, D. S.; DE OLIVEIRA, P. F.; LEANDRO, L. F.; ROGEZ, H. L. G.; VENEZIANNI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G. Copaifera reticulata oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18-27, 2016.

BENJAMIN, L.; COTTE´, F. E.; PHILIPPE, C.; MERCIER, F.; BACHELOT, T.; VIDAL-TRECAN, G. Physicians' preferences for prescribing oral and intravenous anticancer drugs: A Discrete Choice Experiment. **European Journal of Cancer**, v. 48, p. 912–920, 2012.

BONETTI, J.; ZHOU, Y.; PARENT, M.; CLAROT, I.; YU, H.; FRIES-RAETH, I.; LEROY, P.; LARTAUD, I.; GAUCHER, C. Intestinal absorption of S-nitrosothiols: Permeability and transport mechanisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 155, p. 21–31, 2018.

BONNIER, F.; KEATING, M.E.; WRÓBEL, T.P.; MAJZNER, K.; BARANSKA, M.; GARCIA-MUNOZ, A.; BLANCO, A.; BYRNE, H.J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 124–131, 2015.

BRANDON, E. F. A.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENSA, J. H. M. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 189, p. 233–246, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS – RENISUS 06/03/2009. Agência Saúde, 2009. Disponível:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf> Acesso em 04 ago. 2019.

BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.** v. 1, n. 2, p. 175-185, 2005.

BRODNIEWICZ, T.; GRYNKIEWICZ, G. Preclinical Drug Development. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 67, n. 6, p. 579-586, 2010.

CANO, B. L.; MOREIRA, M. R.; GOULART, M. O.; DOS SANTOS, N. G.; VENEZIANI, R. C.; BASTOS, J. K.; AMBRÓSIO, S. R.; DOS SANTOS, R. A. Comparative study of the cytotoxicity and genotoxicity of kaurenoic acid and its semi-synthetic derivatives methoxy kaurenoic acid and kaurenol in CHO-K1 cells. **Food Chem Toxicol.**, v. 102, p. 102-108, 2017.

CARY, D. C.; PETERLIN, B. M. Natural Products and HIV/AIDS. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**. v. 34, p. 31-38, 2018.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K. M. A.; RAO, V. S. N.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 388–392, 2006.

CAVALCANTI, B. C.; FERREIRA, J. R. O.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; FURTADO, G. V.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CAMARA, C. A. G.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; RAO, V. S. N.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research**, v. 701, p. 153–163, 2010.

CHEN, L.; LU, X.; LIANG,X.; HONG, D.; GUAN, Z.; GUAN, Y.; ZHU, W. Mechanistic studies of the transport of peimine in the Caco-2 cell model. **Acta Pharmaceutica Sinica B.**, v. 6, n. 2, p. 125–131, 2016.

CHIBA, M.; ISHII, Y.; SUGIYAMA, Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. **AAPS J.**, v. 11, p. 262-76, 2009.

CHO, I. E. J.; CHOI, G. W.; YANG, S. J.; LEE, Y. B.; CHO, H. Y. Pharmacokinetic Profile of Kaurenoic Acid after Oral Administration of *Araliae Continentalis Radix* Extract Powder to Humans. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 1-16, 2018.

COSTA, A. R. M.; FREITAS, L. A. P.; MENDIOLA, J.; IBÁÑEZ, E. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays. **J. of Supercritical Fluids**, v. 100, p. 86–96, 2015.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231–1234, 2002.

COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on *botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β -hydroxy-kaurenoic acid. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2821–2826, 2004.

CUNHA, K. M. A.; PAIVA, L. A. F.; SANTOS, F. A.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Smooth Muscle Relaxant Effect of Kaurenoic Acid, a Diterpene from *Copaifera langsdorffii* on Rat Uterus in vitro. **Phytother Res.**, v. 17, n. 4, p. 320-4, 2003.

DA VIOLANTE, G.; ZERROUK, N.; RICHARD, I.; PROVOT, G.; CHAUMEIL, J. C.; ARNAUD, P. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 12, p. 1600-1603, 2002.

DE CAMPOS, M. L.; OLIVEIRA, I. J.; DAVANÇO, M. G.; SANTOS, J. L.; PECCININI, R. G. UHPLC Quantitation Method and In vitro Studies of Two New Phthalimide Derivatives Planned to Treat Sickle Cell Disease. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 13, n. 4, p. 361-366, 2017.

DEITCHMAN, A. N.; SINGH, R. S. P.; DERENDORF, H. Nonlinear Protein Binding: Not What You Think. **J Pharm Sci.**, v. 107, n. 7, p. 754-1760, 2018.

DE MATOS, D. M.; VIANA, M. R.; ALVIM, M. C. O.; CARVALHO, L. S. A.; LEITE, L. H. R.; DA SILVA, A. A. F.; NASCIMENTO, J. W. L. Pharmacokinetic profile and oral bioavailability of Kaurenoic acid from *Copaifera* spp. in rats. **Fitoterapia**, v. 128, p. 142–147, 2018.

DENISOV, I. G.; BAAS, B. J.; GRINKOVA, Y. V.; SLIGAR, S. G. Cooperativity in cytochrome P450 3A4: linkages in substrate binding, spin state, uncoupling, and product formation. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 10, p. 7066-76, 2007.

DIAS, F. G. G.; CASEMIRO, L. A.; MARTINS, C. H. G.; DIAS, L. G. G.; PEREIRA, L. F.; NISHIMURA, L. T.; SOUZA, F. F.; HONSHO, C. S. Endodontics pastes formulated with copaiba oil: action on oral microbiota and dentin bridge formation in dogs. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 6, p. 1073-1078, jun, 2015.

EEK, D.; KROHE, M.; MAZAR, I.; HORSFIELD, A.; POMPILUS, F.; FRIEBE, R.; SHIELDS, A. L. Patient-reported preferences for oral versus intravenous administration for the treatment of cancer: a review of the literature. **Patient Preference and Adherence**, v. 10, p. 1609–1621, 2016.

ENGLUND, G.; RORSMAN, F.; RONNBLOM, A.; KARLBOM, U.; LAZOROVA, L.; GRASJO, J.; KINDMARK, A.; ARTURSSON, P. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 269–277, 2006.

FAN, J.; LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, n. 87, p. 93–120, 2014.

FASINU, P.; PILLAY, V.; NDESENDO, V. M.; DU TOIT, L. C.; CHOONARA, Y. E. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. *Biopharm Drug Dispos.* v. 32, n. 4, p.185-209, 2011.

FASINU, P.; BOUIC, P. J.; ROSENKRANZ, B. Liver-Based In Vitro Technologies for Drug Biotransformation Studies – A Review. **Current Drug Metabolism**, v. 13, p. 215-224, 2012.

FERNANDES, M. B.; GONÇALVES, J. E.; SCOTTI, M. T.; OLIVEIRA, A. A.; TAVARES, L. C.; STORPIRTIS, S. Caco-2 cells cytotoxicity of nifuroxazide derivatives with potential activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 535–540, 2012.

FERNANDES, E. F. A. Estudo do metabolismo in vitro do diterpeno ácido caurenóico. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2013.

FERNANDES, M. B.; GONÇALVES, J. E.; TAVARES, L. C.; STORPIRTIS, S. Caco-2 cells permeability evaluation of nifuroxazide derivatives with potential activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). **Drug Dev Ind Pharm.**, v. 41, n. 7, p. 1066-72, 2014.

FLYNN, T. J.; VOHRA, S. N. Simultaneous determination of intestinal permeability and potential drug interactions of complex mixtures using Caco-2 cells and high-resolution mass spectrometry: Studies with Rauwolfia serpentina extract. **Chem Biol Interact.**, v. 25, n. 290, p. 37-43, 2018.

FONSECA, A. P.; ESTRELA, F. T.; MORAES, T. S.; CARNEIRO, L. J.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS, R. A.; AMBRÓSIO, S. R.; MARTINS, C. H.; VENEZIANI, R. C. In vitro antimicrobial activity of plant-derived diterpenes against bovine mastitis bacteria. **Molecules**. v. 18, n. 7, p. 7865-72, 2013.

GASPARETTO, J. C.; PECCININI, R. G.; DE FRANCISCO, T. M.; CERQUEIRA, L. B.; CAMPOS, F. R.; PONTAROLO, R. A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. 1-22, 2015.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 440, p. 170-178, 2013.

GERTZ, M.; KILFORD, P. J.; HOUSTON, J. B.; GALETIN, A. Drug lipophilicity and microsomal protein concentration as determinants in the prediction of the fraction unbound in microsomal incubations. **Drug Metab Dispos.**, v. 36, p. 535-42, 2008.

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

GÓMEZ-LECHÓN, M. J.; CASTELL, J. V.; DONATO, M. T. Hepatocytes—the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: In vitro variability as a reflection of in vivo. **Chemico-Biological Interactions**, v. 168, p. 30–50, 2007.

GOUVEA, D. R.; RIBEIRO, A. B. B.; THORMANN U.; LOPES, N. P.; BUTTERWECK, V. Evaluation of intestinal permeability of vicenin-2 and lychnopholic acid from *Lychnophora salicifolia* (Brazilian arnicão) using Caco-2 cells. **J Nat Prod.**, v. 77, n. 3, p. 464-71, 2014.

GRANDIS, R. A.; CAMARGO, M. S.; SILVA, M. M.; LOPES, E. O.; PADILHA, E. C.; RESENDE, F. A.; PECCININI, R. G.; PAVAN, F. R.; DESIDERI, A.; BATISTA, A. A.; VARANDA, E. A. Human topoisomerase inhibition and DNA/BSA binding of Ru(II)–SCAR complexes as potential anticancer candidates for oral application. **Biometals**, v. 30, p. 321–334, 2017.

GUIDANCE for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. FDA. 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/waiver-vivo-bioavailability-and-bioequivalence-studies-immediate-release-solid-oral-dosage-forms>. Acesso em 28

jan. 2018.

GUIMARÃES, A. L.; CUNHA, E. A.; MATIAS, F. O.; GARCIA, P. G.; DANOPOULOS, P.; SWIKIDISA, R.; PINHEIRO, V. A.; NOGUEIRA, R. J. Antimicrobial Activity of Copaiba (*Copaifera officinalis*) and Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) Oils against *Staphylococcus Aureus*: Importance in Compounding for Wound Care. **Int J Pharm Compd.**, v. 20, n. 1, p. 58-62, 2016.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.

HALLIFAX, D.; RAWDEN, H. C.; HAKOOZ, N.; HOUSTON, J. B. Prediction of metabolic clearance using cryopreserved human hepatocytes: kinetic characteristics for five benzodiazepines. **Drug Metab Dispos.** v. 33, n. 12, p. 1852-8, 2005.

HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Products Reports**, v.1, p. 93-106, 1998.

HEUBERGER, J.; SCHMIDT, S.; DERENDORF, H. When is protein binding important? **J Pharm Sci.**, v. 102, n. 9, p. 3458-67, 2013.

HIDALGO, I. J. Cultured intestinal epithelial cell models. In *Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism*; Borchardt, R. T., Smith, P. L., Wilson, G., Eds.; Plenum: New York, p. 35-50, 1996.

HOFFMANN, W.; GRADINARU, J.; FARCAL, L.; CAUL-FUTY, M.; HUANG, S.; WISZNIEWSKI, L.; PARISSIS, N.; MORATH, S.; FORTANER, S.; COLE, T.; REGINATO, E.; CARRUPT, P.; CONSTANT, S.; COECKE, S. Establishment of a Human 3D Tissue-Based Assay for Upper Respiratory Tract Absorption. **Applied in vitro Toxicology**, v. 20, n. 20, p. 1-10, 2018.

HOUSTON J. B. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. **Biochem Pharmacol.** v. 47, n. 9, p. 1469-79, 1994.

HOUSTON, J. B.; KENWORTHY, K. E. In vitro-in vivo Scaling of CYP Kinetic Data

Not Consistent with the Classical Michaelis-Menten Model. **Drug metabolism and disposition**, v. 28, n. 3, p. 246-254, 1999.

HUANG, W.; LIN, Y. S.; MCCONN, D. J.; CALAMIA, J. C.; TOTAH, R. A.; ISOHERRANEN, N.; GLODOWSKI, M.; THUMMEL, K. E. Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism. **Drug Metab Dispos.**, v. 32, p. 1434-45, 2004.

HUANG, Y.; CHEN, H.; HE, F.; ZHANG, Z-R.; ZHENG, L.; LIU, Y.; LAN, Y-Y.; LIAO, S-G.; LI, Y-J.; WANG, Y-L. Simultaneous determination of human plasma protein binding of bioactive flavonoids in *Polygonum orientale* by equilibrium dialysis combined with UPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 3, n. 5, p. 376-381, 2013.

HUBATSCH, I.; RAGNARSSON, E. G.; ARTURSSON, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nat Protoc.**, v. 2, n. 9, p. 2111-9, 2007.

ISO – International Organization for Standardization. ISO 10993-5 – Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Testes for in vitro cytotoxicity, 3^a Ed, ISO, 2009.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F. JR.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **J Med Chem.**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.

JIA, L.; LIU, X. The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments. **Curr Drug Metab.**, v. 8, n. 8, p. 822–829, 2007.

JIANG, X.; SHEN, Y.; WANG, H.; WANG, C.; YE, X.; XIANG, Z. Determination of kaurenoic acid in rat plasma using UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 27–31, 2019.

JIN, H.; SONG, B.; KIM, S.; SHIM, W.; KIM, D.; CHONG, S.; CHUNG, S.; SHIM, C. Transport of gemifloxacin, a 4th generation quinolone antibiotic, in the Caco-2 and engineered MDCKII cells, and potential involvement of efflux transporters in the intestinal absorption of the drug. **Xenobiotica**, v. 43, n. 4, p. 355–367, 2013.

KANG, S. Chemistry and biological activity of the constituents from aralia species. **Ann. Rep. Nat. Prod.** v. 5, p. 1–26, 1997.

KERNS, E. H.; DI, L. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization, p. 56–167, 2008.

KRAMER, M. A.; TRACY, T. S. Enzyme Kinetics of Drug-Metabolizing Reactions and Drug–Drug Interactions. In: LYUBIMOV., A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. New York: Wiley, v.1, 2012. cap 3.

KRATZ, J. M.; TEIXEIRA, M. R.; KOESTER, L. S.; SIMÕES, C. M. O. An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. **Braz J Med Biol Res.**, v. 44, n. 6, p. 531-537, 2011.

KUETE, V.; MBAVENG, A. T.; SANDJO, L. P.; ZEINO, M. Efferth, T. Cytotoxicity and mode of action of a naturally occurring naphthoquinone, 2- acetyl-7-methoxynaphtho[2,3-b]furan-4,9-quinone towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v. 33, p. 62–68, 2017.

KUMAR, S.; SAMUEL, K.; SUBRAMANIAN, R.; BRAUN, M. P.; STEARNS, R. A.; CHIU, S. L.; EVANS, D. C.; BAILLIE, T. A. Extrapolation of Diclofenac Clearance from in Vitro Microsomal Metabolism Data: Role of Acyl Glucuronidation and Sequential Oxidative Metabolism of the Acyl Glucuronide. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 303, n. 3, p. 969-78, 2002.

LEANDRO, L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA, P. C. S.; NEVES, J. K.O.; SILVA, J. A.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-3889, 2012.

LEE, K.J.; MOWER, R.; HOLLENBECK, T.; CASTELO, J.; JOHNSON, N.; GORDON, P.; SINKO, P. J.; HOLME, K.; LEE, Y. H. Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies. **Pharm Res.**, v. 20, n. 7, p. 1015-21, 2003.

LIMA, S. R. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. In vivo and in vitro Studies on the Anticancer Activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its Fractions. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 1048–1053, 2003.

LIMA SILVA, J. J.; GUIMARÃES, S. B.; SILVEIRA, E. R.; VASCONCELOS, P. R. L.; LIMA, G. G.; TORRES, S. M.; VASCONCELOS, R. C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. **Aesth Plast Surg.**, v. 33, p. 104–109, 2009.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacol. Rev.**, n. 49, p. 403–449, 1997.

LIN, H.; LI, H.; CHO, H. J.; BIAN, S.; ROH, H. J.; LEE, M. K.; KIM, J. S.; CHUNG, S. J.; SHIM, C. K.; KIM, D. D. Air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cell monolayers as an in vitro model for airway drug transport studies. **J Pharm Sci.**, v. 96, n. 2, p. 341-50, 2007.

LIN, X.; SKOLNIK, S.; CHEN, X.; WANG, J. Attenuation of Intestinal Absorption by Major Efflux Transporters: Quantitative Tools and Strategies Using a Caco-2 Model. **Drug Metab Dispos.**, v. 39, n. 2, p. 265-74, 2011.

LIU, Y.; NAIR, M. G. Labdane diterpenes in *Curcuma mangga* rhizomes inhibit lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumour cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 124, p. 527–532, 2011.

LIZARTE NETO, F. S.; TIRAPELLI, D. P. C.; AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; OLIVEIRA, F. M.; NOVAIS, P. C.; PERIA, F. M.; OLIVEIRA, H. F.; CARLOTTI JUNIOR, C. G.; TIRAPELLI, L. F. Kaurene diterpene induces apoptosis in u87

human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 46, p. 71–80, 2013.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAKOID, M. C.; VUCHETICH, P. J.; BANAKAR, U. V. Clearance. In: MAKOID, M. C.; VUCHETICH, P. J., et al (Ed). **Basic Pharmacokinetics**. 1ª ed. Indianapolis: Virtual University Pres, 1996. Cap. 9, p. 1-71.

MALTAROLLO, V. G.; GERTRUDES, J. C.; OLIVEIRA, P. R.; HONORIO, K. M. Applying machine learning techniques for ADME-Tox prediction: a review. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**, v. 11, n. 2, p. 259-71, 2015.

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

MASSON, D. S.; SALVADOR, S. L.; POLIZELLO, A. C. M.; FRADE, M. A. C. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 4, p. 664-669, 2013.

MAURO, M.; DE GRANDIS, R. A.; CAMPOS, M. L.; BAUERMEISTER, A.; PECCININI, R. G.; PAVAN, F. R.; LOPES, N. P.; DE MORAES, N. V. Acid diterpenes from Copaiba oleoresin (*Copaifera langsdorffii*): Chemical and plasma stability and intestinal permeability using Caco-2 cells. **J Ethnopharmacol.**, v. 235, p. 183-189, 2019.

MCMILLIAN, M. K.; LI, L.; PARKER, J. B.; PATEL, L.; ZHONG, Z.; GUNNETT, J. W.; POWERS, W. J.; JOHNSON, M. D. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell Biol Toxicol.**, v. 18, n. 3, p. 157-73, 2002.

MEHTA, P.; SHAH, R.; LOHIDASANCK, S.; MAHADIKC, K. R. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants - A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. v. 5, n. 4, p. 207-227, 2015.

MINERS, J. O.; KNIGHTS, K. M.; HOUSTON, J. B.; MACKENZIE, P. I. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. **Biochem Pharmacol.**, v. 71, p. 1531-9, 2006.

MIYAZAKI, S.; KIMURA, H.; NATSUME, M.; ASAMI, T.; HAYASHI, K.; KAWAIDE, H.; NAKAJIMA, M. Analysis of ent-kaurenoic acid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 2, p. 103–107, 2015.

NAKAMORI, F.; NARITOMI, Y.; FURUTANI, M.; TAKAMURA, F.; MIURA, H.; MURAI, H.; TERASHITA, S.; TERAMURA, T. Correlation of intrinsic in vitro and in vivo clearance for drugs metabolized by hepatic UDP-glucuronosyltransferases in rats. **Drug Metab Pharmacokinet**. v. 26, p. 465– 473, 2011.

NAKAMURA, M. T.; ENDO, E. H.; DE SOUSA, J. P. B.; CALLEJON, D. R.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; DE FREITAS, O.; NAKAMURA, C. V.; LOPES, N. P. Copaiba Oil and Its Constituent Copalic Acid as Chemotherapeutic Agents against Dermatophytes. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 28, n. 8, p. 1377-1383, 2017.

NATH, A.; ATKINS, W. M. A theoretical validation of the substrate depletion approach to determining kinetic parameters. **Drug Metab Dispos**. v. 34, n. 9, p.1433-5, 2006.

NEJDFORS, P.; EKELUND, M.; JEPPSSON, B.; WESTRÖM, B. R. Mucosal in vitro permeability in the intestinal tract of the pig, the rat, and man: species- and region-related differences. **Scand J Gastroenterol.**, v. 35, n. 5, p. 501-7, 2000.

OBACH, R. S.; BAXTER, J. G.; LISTON, T. E.; SILBER, B. M.; JONES, B. C.; MACINTYRE, F.; RANCE, D. J.; WASTALL, P. The prediction of human

pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 283, n. 1, p. 46-58, 1997.

OBACH, R. S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. **Drug Metab Dispos.**, v. 27, n. 11, p. 1350-9, 1999.

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

OHSAKI, A.; YAN, L. T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorfi* desfon. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

OKOYE, T. C.; AKAH, P. A.; OMEJE, E. O.; OKOYE, F. B.; NWORU, C. S. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 109, p. 38-43, 2013.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test N° 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1: Physical-Chemical properties. France: OECD Publishing, 1 online resource. p. 2004.

PAIVA, L. A.; GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; TOMÉ, A. R.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascul Pharmacol.**, v. 39, n. 6, p. 303-7, 2003.

PARK, H. Y.; KUNITAKE, Y.; HIRASAKI, N.; TANAKA, M.; MATSUI, T. Theaflavins enhance intestinal barrier of Caco-2 Cell monolayers through the expression of AMP-activated protein kinase-mediated Occludin, Claudin-1, and ZO-1. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 79, n. 1, p. 130-7, 2015.

PELKONEN, O.; KALTIALA, E. H.; LARMI, T. K.; KÄRKI, N. T. Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes. **Chem Biol Interact.**, v. 9, n. 3, p. 205-16, 1974.

PEREIRA, I.; LECHANTEUR, A.; SARMENTO, B. 3D Model Replicating the Intestinal Function to Evaluate Drug Permeability. **Methods Mol Biol.**, v. 1817, p. 107-113, 2018.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; FIORINI, J. E.; MOREIRA, M. A.; Schneedorf, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. **Braz Dent J.**, v. 23, n. 1, p. 36-8, 2012.

POULIN, P.; KENNY, J. R.; HOP, C. E.; HADDAD, S. In vitro-in vivo extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. **J Pharm Sci.**, v. 101, n. 2, p. 838-51, 2012.

PRENTIS, R. A.; LIS, Y.; WALKER, S. R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). **Br J Clin Pharmacol.**, v. 25, n. 3, p. 387-96, 1988.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K et al. (eds) Assay guidance manual [online], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>. Bethesda, 2004. Atualizada em 2016.

RODRIGUES, T. M.; TEIXEIRA, S. P.; MACHADO, S. R. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–Caesalpinioideae). **Flora.** v. 206, n. 6, p. 585-594, 2011.

ROOS, C.; DAHLGREN, D.; SJÖGREN, E.; TANNERGREN, C.; ABRAHAMSSON, B.; LENNERNÄS, H. Regional Intestinal Permeability in Rats: A Comparison of Methods. **Mol Pharm.**, v. 14, n. 12, p. 4252-4261, 2017.

ROSTAMI-HODJEGAN, A.; TUCKER, G. T. Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. **Nature**, v. 6, p. 140-148, 2007.

ROSTAMI-HODJEGAN, A. Physiologically based pharmacokinetics joined with in vitro-in vivo extrapolation of ADME: a marriage under the arch of systems pharmacology. **Clin Pharmacol Ther.**, v. 92, n. 1, p. 50-61, 2012.

SANTOS, A. O.; COSTA, M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; DA VEIGA-JÚNIOR, V. F.; DE SOUZA LIMA, M. M.; NAKAMURA, C. V. Leishmania amazonensis: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Exp. Parasitol.** v. 129, n. 2, p. 145-51, 2011.

SARTORELLI, P.; CARVALHO, C. S.; REIMÃO, J. Q.; LORENZI, H.; TEMPONE, A. G. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from Aristolochia cymbifera. **Planta Med.**, v. 76, n. 13, p. 1454-6, 2010.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Fundamentals of Enzyme Kinetics In: NAGAR, S., ARGIKAR, U., TWEEDIE, D. (Ed.). **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism**. New York: Springer, 2014. p.9-22.

SEVIOR, D. K.; PELKONEN, O.; AHOKAS, J. T. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 44, n. 2, p. 257-61, 2012.

SILVA, R. M.; DE GAITANI, C. M.; MARQUES, L. M. M.; FRAIGE BARACO, K.; CAVALHEIRO, A. J.; DE MORAES L. A. B.; LOPES, N. P.; DE OLIVEIRA, A. R. M. Characterization of Casearin X Metabolism by Rat and Human Liver Microsomes. **Planta Med.**, v. 85, n. 4, p. 282-291, 2018.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria

com a academia. **Revista NEXUS Ciência e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 24-27, 2002.

SIMÕES, C. A.; CONDE, N. C.; VENÂNCIO, G. N.; MILÉRIO, P. S.; BANDEIRA, M. F.; DA VEIGA JÚNIOR, V. F. Antibacterial Activity of Copaiba Oil Gel on Dental Biofilm. **Open Dent J.**, v. 11, n. 10, p. 188-95, 2016.

SINZ, M. A. In vitro and in vivo models of drug metabolism. In: Lyubimov, A. V. (Ed.). **Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions**. 1^a ed. New York: John Wiley & sons, 2012. P. 1-31.

SKOLNIK, S.; LIN, X.; WANG, J.; CHEN, X. H.; HE, T.; ZHANG, B. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. **J Pharm Sci.**, v. 99, n. 7, p. 3246-65, 2010.

SOUZA, A. B.; MARTINS, C. H. G.; SOUZA, M. G. S.; FURTADO, N. A. J. C.; HELENO, V. C. G.; DE SOUSA, J. P. B.; ROCHA, E. M. P.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO S. R. Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. Against Cariogenic Bacteria. **Phytother. Res.**, v. 25, p. 215–220, 2011a.

SOUZA, A. B.; DE SOUZA, M. G.; MOREIRA, M. A.; MOREIRA, M. R.; FURTADO, N. A.; MARTINS, C. H.; BASTOS, J. K.; DOS SANTOS, R. A.; HELENO, V. C.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9611-9, 2011b.

SOUZA, M. G. M.; LEANDRO, L. F.; MORAES, T. D. S.; ABRÃO, F.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBROSIO, S. R.; MARTINS, C. H. G. ent-Copalic acid antibacterial and anti-biofilm properties against *Actinomyces naeslundii* and *Peptostreptococcus anaerobius*. **Anaerobe**. V. 52, p. 43-49, 2018.

SPARIDANS, R. W.; LAGAS, J. S.; SCHINKEL, A. H.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for diclofenac and three primary metabolites in mouse plasma. **J Chromatogr B Analyt Technol**

Biomed Life Sci., v. 872, n. 1-2, p. 77-82, 2008.

SRIKANTH, C. H.; CHAIRA, T.; SAMPATHI, S. V. B. S.; BAMBAL, R. B. Correlation of in vitro and in vivo plasma protein binding using ultracentrifugation and UPLC-tandem mass spectrometry. **Analyst.**, v.138, n. 20, p. 6106-16, 2013.

SUBRAMANIAN, M.; TRACY, T. Methods for Determination of Enzyme Kinetics and Metabolic Rates. in: A.V. Lyubimov (Ed.), *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*, first ed., John Wiley & Sons, New York, p. 1–22, 2012.

TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Análise Química Quantitativa para a Padronização do Óleo de Copaíba por Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução. **Quimica Nova**, v. 27, p. 236–240, 2004.

TINCUSI, B. M.; JIMENEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P.; RAVELO, A. G.; HERNANDEZ, B. V. Antimicrobial Terpenoids from the Oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera paupera*. **Planta Med.**, v. 68, p. 808-812, 2002.

TINGLE, M. D.; HELSBY, N. A. Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies? **Environ Toxicol Pharmacol.**, v. 21, n.2, p. 184-90, 2006.

TOBOUTI, P. L.; DE ANDRADE MARTINS, T. C.; PEREIRA, T. J.; MUSSI, M. C. M. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomed Pharmacother.**, v. 94, p. 93-99, 2017.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. Input-Exposure Relationships. In: TOZER, T. N. e ROWLAND, M. (Ed.). **Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics : the quantitative basis of drug therapy**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. P. 15-26.

TRINDADE, R.; DA SILVA, J. K.; SETZER, W. N. *Copaifera* of the Neotropics: A

Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **Int J Mol Sci.**, v. 19, p. 1-33, 2018.

VARGAS, F. S.; DE ALMEIDA, P. D. O.; ARANHA, E. S. P.; BOLETI, A. P. A.; NEWTON, P.; DE VASCONCELLOS, M. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194-210, 2015.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA?. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. **J Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 2, p. 248-54, 2007.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial ent-kaurene from brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, p. 693-696, 2000.

VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Human drug metabolism and cytochromes P450: Application and relevance of in vitro models. *The Journal of Clinical Pharmacology*, v. 41, p. 1149-1179, 2001.

WAN, H.; BOLD, P.; LARSSON, L. O.; ULANDER, J.; PETERS, S.; LÖFBERG, B.; UNGELL, A. L.; NÅGÅRD, M.; LLINÀS, A. Impact of input parameters on the prediction of hepatic plasma clearance using the well-stirred model. **Curr Drug Metab.** v. 11, n. 7, p. 583-94, 2010.

WANG, J.; URBAN, L.; BOJANIC, D. Maximising use of in vitro ADMET tools to predict in vivo bioavailability and safety. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.**, v. 3, n. 5, p. 641-65, 2007.

WIENKERS, L. C.; ROCK, B. Multienzyme kinetics and sequential metabolism. **Methods Mol Biol.**, v. 1113, p. 93-118, 2014.

WU, C. Y.; BENET, L. Z. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 1, p. 11-23, 2005.

XAVIER-JUNIOR, F. H.; MACIUK, A.; MORAIS, A. R. V.; ALENCAR, E. D. N.; GARCIA, V. L.; DO EGITO, E. S. T.; VAUTHIER, C. Development of a Gas Chromatography Method for the Analysis of Copaiba Oil. **J Chromatogr Sci.**, v. 55, n. 10, p. 969-978, 2017.

YANG, J.; JAMEI, M.; YEO, K. R.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; TUCKER, G. T. Misuse of the well-stirred model of hepatic drug clearance. **Drug Metab Dispos.**, v. 35, p. 501-2, 2007.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacol Ther.**, v. 138, n.1, p. 103-41, 2013.

ZHANG, Z.; KAMINSKY, L. S. Determination of metabolic rates and enzyme kinetics, in *Drug Metabolism in Drug Design and Development* (Zhang D, Zhu M, and Humphreys WG eds), John Wiley & Sons, Hoboken, p. 413–441, 2008.

ZIMMERMAN-FRANCO, D. C.; BOLUTARI, E. B.; POLONINI, H. C.; DO CARMO, A. M. R.; CHAVES, M. G. A. M.; RAPOSO, N. R. B. Antifungal activity of *Copaifera langsdorffii* Desf oleoresin against dermatophytes. **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12561-70, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Confirmação da identidade de AC e AK.

Ácido copálico

Tabela S1. Deslocamento químico (δ) e multiplicidade (Hz) em RMN de ^1H e ^{13}C para o ácido copálico isolado (CDCl_3 , 500MHz). Os dados experimentais estão de acordo com a literatura (Ohsaki et al., 1994).

Carbono	Dados da Literatura		Dados Experimentais		
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) J (Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) J (Hz)	HMBC
1	42,07	1,18td (13,2;4,0)	39,0	1,03m	H2; H5; H20
		1,39brd (13,2)		1,76m	H2; H3; H10; H20
2	19,02	1,48m	19,3	1,51m	H1; H3; H4; H10
		1,58m		1,59m	H1; H3; H10
3	39,02	1,01td (12,8;4,0)	42,0	1,19td (13,4;3,7)	H2; H4; H5; H19
		1,73m		1,40dt (13,2;3,6)	H1; H2; H4; H19
4	33,55	-	33,0	-	-
5	55,46	1,09dd (12,8;2,7)	55,3	1,10dd (12,6;2,5)	H4; H6; H9; H10; H19
6	24,41	1,32qd (12,8;4,3)	24,3	1,33dd (13,3;3,9)	H5; H7; H8
		1,73m		1,74m	H5; H7; H8
7	38,26	1,96m	38,2	1,98m	H6; H8; H9; H17
		2,39ddd (13,0;4,3;2,4)		2,40ddd (12,9;4,5;2,3)	H6; H8; H9; H17
8	148,20	-	148,0	-	-
9	56,11	1,58m	56,1	1,59m	H5; H7; H8; H10; H11; H12; H14; H17
10	39,66	-	39,0	-	-
11	21,47	1,51m	21,5	1,53m	H8; H9; H12; H13
		1,68m		1,70m	H8; H9; H12; H13
12	40,06	1,98m	39,9	2,0m	H9; H11; H13; H14; H16

	2,32ddd (14,0;10;4,0)		2,32ddd (14,4;9,7;4,4)		H9; H11; H13; H14; H16
13	164,00	-	163,6	-	-
14	114,92	5,67q (1,2)	114,7	5,68q (1,1)	H12; H13; H15; H16
15	172,43	-	171,8	-	-
16	19,19	2,17d (1,2)	19,13	2,18s	H12; H13; H14; H15
17	106,34	4,49brs	106,2	4,50brs	H6; H7; H8; H9
		4,85d (1,2)		4,85d (1,2)	H6; H7; H8; H9; H11
18	33,54	0,87s	33,5	0,88s	H2; H3; H4; H5; H10; H19
19	21,68	0,80s	21,7	0,81s	H3; H4; H5
20	14,44	0,68s	14,3	0,69s	H1; H9; H10

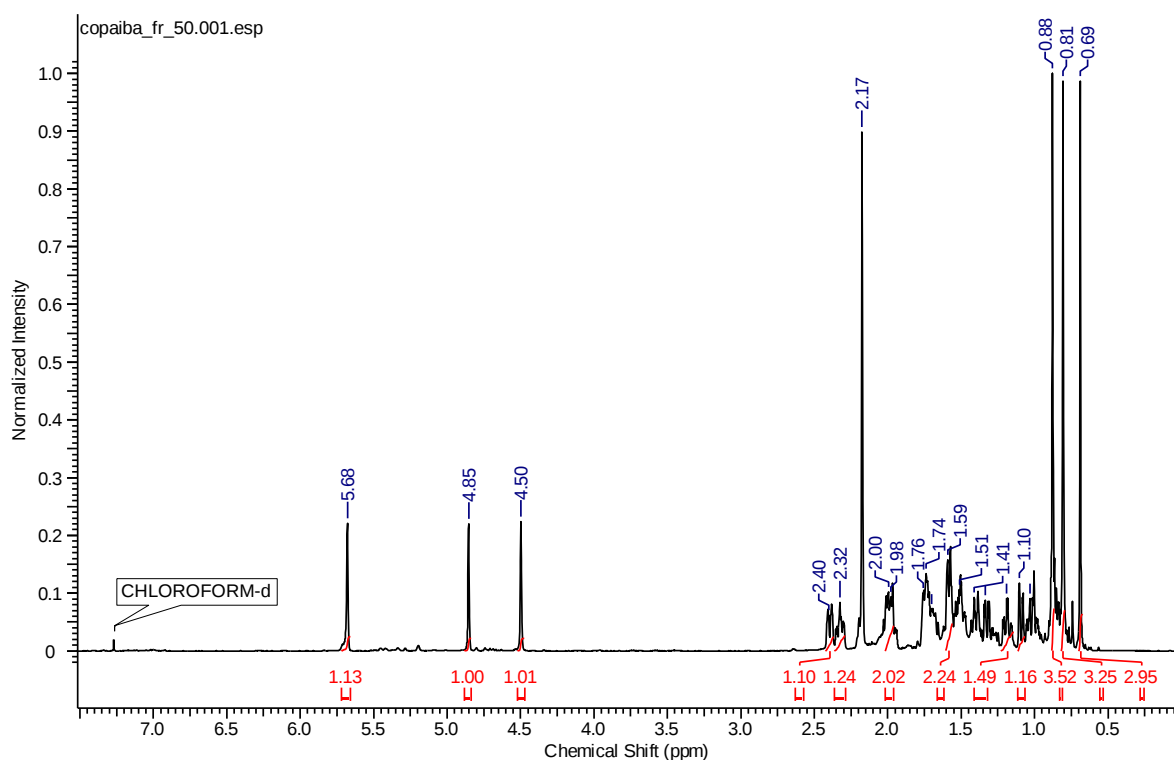


Figura S1. Espectro RMN ^1H NMR para ácido copálico (CDCl_3 , 500MHz).

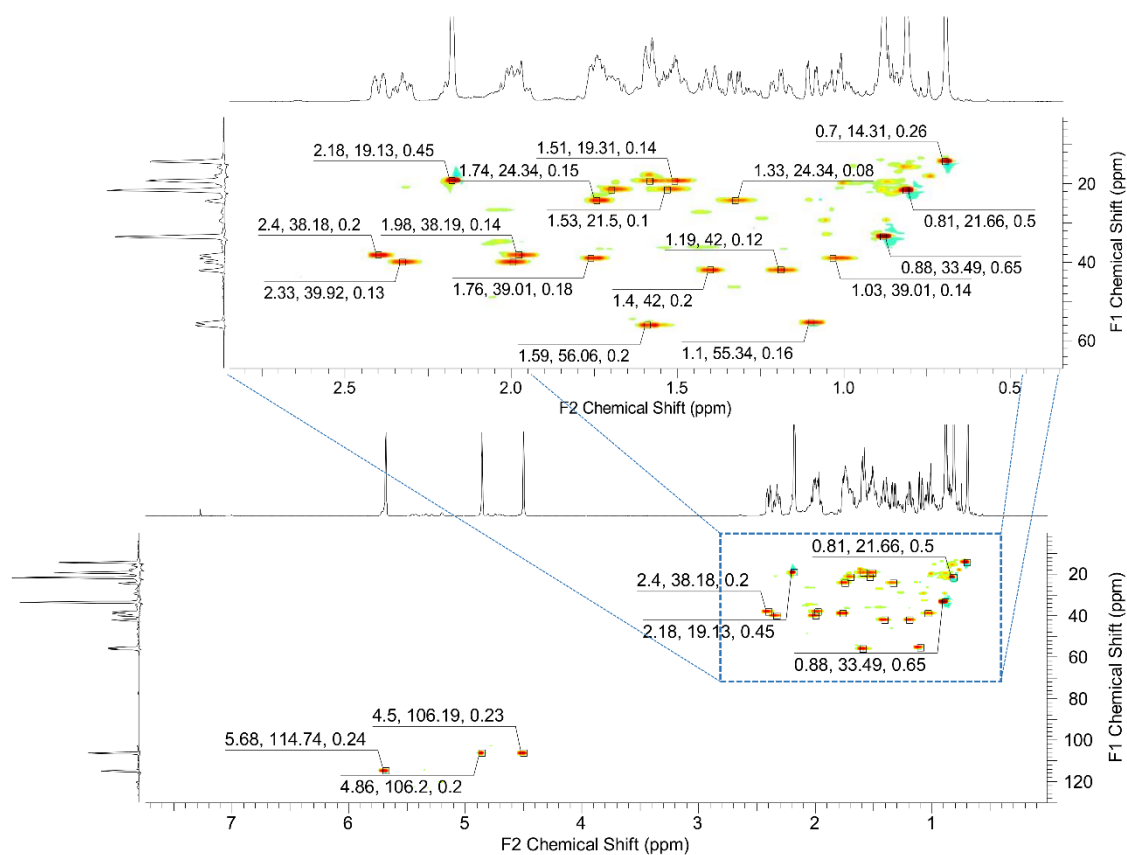


Figura S2. Espectro de RMN HMQC para ácido copálico (CDCl_3 , 500MHz).

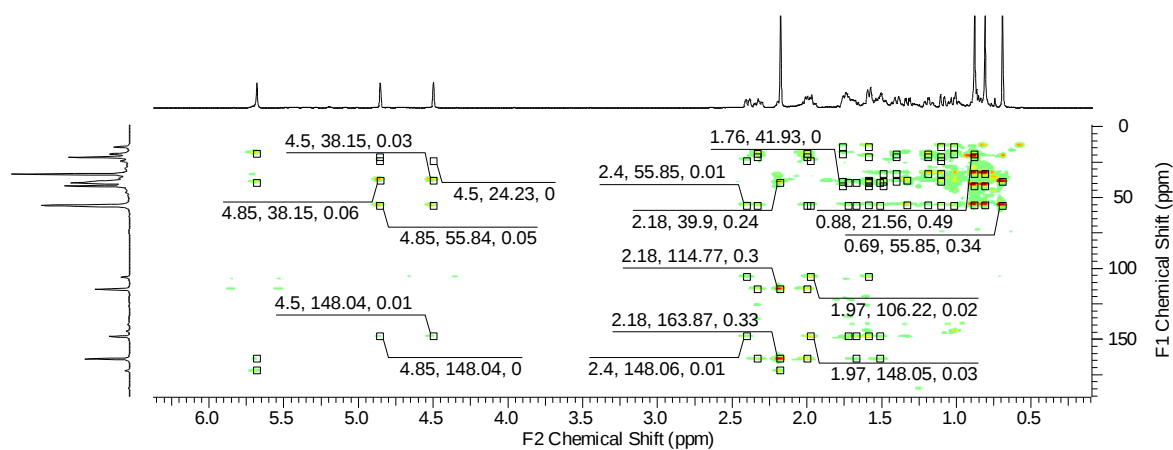


Figura S3. Espectro de RMN HMBC para ácido copálico (CDCl_3 , 500MHz).

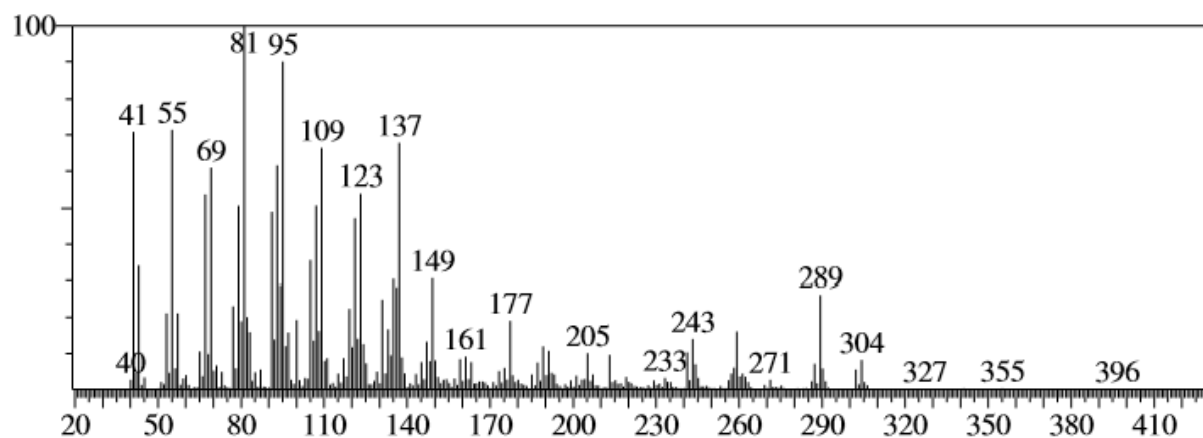


Figura S4. Espectro de CG-EM obtido para o ácido copálico.

Ácido caurenóico

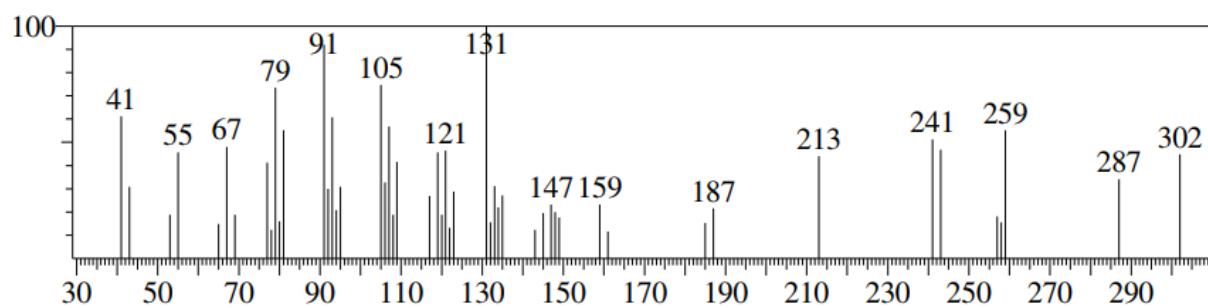


Figura 1. Espectro de CG-EM para o ácido caurenóico isolado.

APÊNDICE 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para doação de sangue.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente na _____, nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estudar o que acontece com os medicamentos no nosso organismo, estudando o movimento e como os remédios são transformados no organismo de pessoas saudáveis ou na presença de doenças;
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para os pesquisadores entenderem o movimento e a transformação do remédio em humanos, assim como para estudar a interação destes medicamentos no organismo.
3. Os benefícios para os integrantes desta pesquisa serão indiretos, não apresentando benefícios direto aos voluntários.
4. Para a realização dessa pesquisa, realizarei uma doação de sangue convencional no Hemonúcleo Regional de Araraquara "Professora Doutora Clara Pechmann Mendonça (HN).
5. Estou ciente de que o intervalo e frequência de doações são: para homens intervalo de 2 meses, com frequência máxima de 4 doações anuais; para mulheres intervalo de 3 meses, com frequência máxima de 3 doações anuais.
6. A minha participação como voluntário deverá ter a duração de aproximadamente 1 hora.
7. No dia da coleta o voluntário da pesquisa deve:
 - a) trazer documento oficial de identidade com foto (identidade, carteira nacional de habilitação, certificado de reservista ou carteira do conselho profissional);
 - b) estar bem de saúde
 - c) ter entre 18 e 65 anos e pesar mais de 50 kg;
 - d) Não estar em jejum; evitar alimentos gordurosos nas três horas que antecedem a doação.
8. A coleta de sangue poderá ser levemente desconfortável; a picada causa leve dor, de curta duração, e o local da picada pode ficar com a cor arroxeadada. No dia da coleta, podem acontecer efeitos não desejados como tontura, cansaço, fadiga. Para evitar esses efeitos, devo me hidratar bem, através do consumo de água e/ou sucos de frutas. No dia da coleta, não devo realizar esforços físicos exagerados. Não devo fumar por cerca de 2 horas após a coleta e evitar bebidas alcoólicas por 12 horas. Devo manter o curativo no local da punção por pelo menos quatro horas. No dia da coleta, não devo dirigir veículos de grande porte, trabalhar em andaimes, praticar paraquedismo ou mergulho.
9. Os materiais empregados na coleta serão descartáveis;
10. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
11. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho ou das Instituições (FCF/UNESP);
12. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
13. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização;

14. Fui informado que não terei nenhum tipo de despesa, nem receberei nenhuma gratificação ou pagamento pela minha participação nesta pesquisa. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo.
15. Para solicitar esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica pelos telefones:
 Pesquisador Responsável: Mariana Mauro
 Telefone para contato: (19) 981621202
 Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes
 Telefone para contato: (0XX16) 3301 4689 ou (0XX16) 98211 8363
16. Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP (CEP-FCF), pelo telefone (0XX16) 3301 6897.
17. Este documento é emitido em duas vias, sendo que uma dessas vias ficará com o participante da pesquisa e a outra com o pesquisador.
18. Em caso de qualquer dano sofrido pelo participante, o mesmo fará jus à reparação.
 Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar do estudo **“Estudo de disposição cinética do ácido copálico: permeabilidade intestinal, hepática, fração livre e metabolismo in vitro”**, na qualidade de voluntário sadio.

Araraquara,dede 20.....

Mariana Mauro
 Pesquisador Responsável
 CPF: 313.285.348-80

Dr^a. Natália Valadares de Moraes
 Pesquisador Responsável
 CPF: 318.183.798-99

Voluntário ou responsável legal
 Identificação: _____

TESTEMUNHAS NÃO LIGADAS À PESQUISA:

1- _____
 Assinatura

 Identificação

2- _____
 Assinatura

 Identificação

ANEXOS

ANEXO 1. Comprovante de Cadastro de Acesso no SisGen.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A6113C6

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A6113C6**
 Usuário: **UNESP**
 CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie**Copaifera langsdorffii****Copaifera langsdorffii****Fonte do CTA****CTA de origem não identificável**

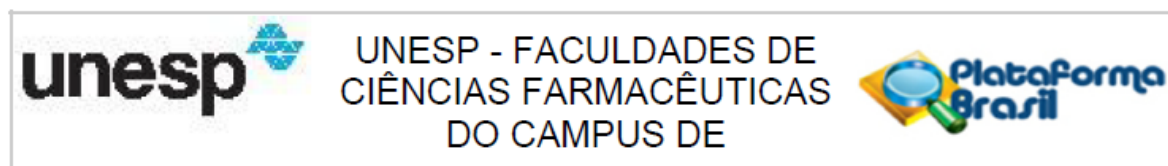
Título da Atividade: **Estudo de disposição cinética do ácido copálico e ácido caurenóico:
 permeabilidade intestinal, hepática, fração livre e metabolismo in vitro**

Equipe**Mariana Mauro****UNESP****Norberto Peporine Lopes****Universidade de São Paulo**Data do Cadastro: **02/11/2018 12:33:12**Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:35 de 09/11/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo de disposição cinética do ácido copálico: permeabilidade intestinal, hepática, fração livre e metabolismo in vitro

Pesquisador: Mariana Mauro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65707517.6.0000.5426

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.079.239

Apresentação do Projeto:

O projeto trata de estudo de disposição cinética do ácido copálico: permeabilidade intestinal, hepática, fração livre e metabolismo in vitro, que envolve a utilização de plasma humano.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do trabalho busca extrair o ácido copálico da oleorresina de copaíba e estudar a estabilidade, permeabilidades intestinal e hepática bem como seu metabolismo em microsossomos plasmáticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são muito baixos com benefícios altos. Espera-se que o estudo possa ser extrapolado na predição de fenômenos in vivo inerentes ao uso terapêutico do ácido copálico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa utilizará o plasma humano para ensaios in vitro, não oferecendo riscos ou implicações ao doador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados e estão de acordo com as exigências estabelecidas.

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1
 Bairro: Campus Universitário CEP: 14.801-902
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: (16)3301-4657 E-mail: sta@fcar.unesp.br



UNESP - FACULDADES DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE



Continuação do Parecer: 2.079.239

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovo, Ad referendum, o referido projeto de pesquisa, estruturado dentro dos padrões ético.

Os relatórios parciais devem ser entregues em: 1) NOVEMBRO de 2017; 2) MAIO de 2018 e 3) NOVEMBRO de 2018. E o relatório final e os Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em SETEMBRO de 2019.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_826955.pdf	11/05/2017 22:50:56		Aceito
Outros	Projeto_Doutorado.docx	11/05/2017 22:48:58	Mariana Mauro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado.pdf	11/05/2017 22:48:34	Mariana Mauro	Aceito
Outros	Informacao_solicitada_atendida.pdf	02/03/2017 16:00:07	Mariana Mauro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Doacao_de_Plasma.pdf	02/03/2017 15:58:22	Mariana Mauro	Aceito
Outros	Termo_de_doacao.pdf	19/01/2017 09:43:22	Mariana Mauro	Aceito
Outros	Curriculo_lattes.pdf	19/01/2017 09:42:47	Mariana Mauro	Aceito
Outros	autorizacao_para_realizar_pesquisa.pdf	19/01/2017 09:41:20	Mariana Mauro	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	19/01/2017 09:30:17	Mariana Mauro	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisadores.pdf	19/01/2017 09:26:58	Mariana Mauro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declar_infraestrutura_NAC.pdf	19/01/2017 09:26:16	Mariana Mauro	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	19/01/2017 09:25:49	Mariana Mauro	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	19/01/2017 09:19:26	Mariana Mauro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

CEP: 14.801-902

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-4657

E-mail: sta@fcar.unesp.br



UNESP - FACULDADES DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DO CAMPUS DE



Continuação do Parecer: 2.079.239

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 24 de Maio de 2017

Assinado por:
Adriano Mondini
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

CEP: 14.801-902

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-4657

E-mail: sta@fcar.unesp.br