

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação farmacocinética e do metabolismo *in vivo* e *in vitro*
do candidato a antitumoral AC04**

MAIARA CÁSSIA PIGATTO

PORTO ALEGRE, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação farmacocinética e do metabolismo *in vivo* e *in vitro*
do candidato a antitumoral AC04**

Dissertação apresentada por **Maiara
Cássia Pigatto** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

PORTO ALEGRE, 2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Bibiana Verlindo Araújo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Vera Lucia Lanchote
Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto

P628a Pigatto, Maiara Cássia

Avaliação farmacocinética e do metabolismo in vivo e in vitro do candidato a antitumoral AC04 / Maiara Cássia Pigatto – Porto Alegre: UFRGS, 2011. – xviii, 123 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. AC04. 2. Farmacocinética. 3. Antitumorais. 4. Metabolismo in vitro. 5. Modelos animais de doença. I. Dalla Costa, Teresa Cristina Tavares. II. Lopes, Norberto Peporine. III. Título.

CDU: 615.2.015.4

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos e nos Laboratórios 405 e de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFRGS, bem como no Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, com financiamento do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-*if*). A autora recebeu bolsa de estudos do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Félix e Nadir, pelo carinho, paciência, confiança e amor dedicados, pelo esforço para proporcionar a realização dos meus sonhos e pelo incentivo para correr atrás dos meus objetivos.

Ao Eidy, por estar ao meu lado, por toda paciência e amor e a sua família pelo suporte e acolhimento sempre.

À professora e orientadora Dra. Teresa Dalla Costa, primeiramente pela oportunidade em trabalhar com pesquisa, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e pela paciência, amizade e confiança construídos ao longo deste caminho.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes por ter me recebido de portas abertas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela co-orientação e essencial colaboração na condução deste trabalho.

À Dra. Flávia De Toni Uchôa pela sua colaboração constante, pela dedicação incondicional, pelo grande aprendizado e divertimento proporcionado e por me fazer me apaixonar pela pesquisa.

Ao Prof. Martin Steppe por disponibilizar o Laboratório de Controle de Qualidade para realização de parte do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores e funcionários da UFGRS pela colaboração direta ou indireta.

Aos colegas do Laboratório 405 e Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) pelo companheirismo, auxílio e amizade.

Aos queridos colegas e amigos farmacocinéticos que fizeram parte desta caminhada, em especial Bruna Torres, Sandra Haas, Cristiane de Andrade, Bibiana Araújo, Francine Johansson, Liberato Brum, Felipe Hurtado, Moacir

Kaiser, Fernanda Galves, Ticiana Bessegato e Pedro Sansone pelas discussões científicas, pelos conselhos, ajuda nos experimentos, pela parceria e amizade.

Às amigas e colegas de profissão Amanda Piccoli Frasson, Thatiana Terroso, Amanda Thomas Barden, Marcella Oliveira e Andrea Pereira pelos conselhos, parcerias, momentos de desconstrução e, sobretudo, pela grande amizade desde a graduação.

A todos os amigos que contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que indiretamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante todo o desenvolvimento do projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC04	3-(4-metil-benzil)-5-(acridina-9-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona
1-oxo-AC04	3-(4-metil-benzil)-5-(acridina-9-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona 1-óxido
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
AUC _{0-t}	Area under the plasma concentration versus time curve
AUMC _{0-∞}	Area under the first moment versus time curve
ASC _{0-∞}	Área sob a curva de 0 a infinito
BBB	Blood–brain barrier
LC-MS/MS	Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry
LC-MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
CYPs	Enzimas do citocromo P450
CYP450	Citocromo P450
DACA	Acridina carboxamida
CL _{tot}	Total clearance
EC-EM	Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas
FDA	Food and Drug Administration
GB	gas-phase basicities
¹ H RMN	Espectrometria de ressonância magnética nuclear
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IES	Ionização por eletrospray
IES-EM	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray
IES-EM/EM	Espectrometria de massas em tandem com ionização por eletrospray
IS	Internal standard
i.v.	Administração intravenosa
k _e	Elimination rate constant
<i>m</i> -AMSA	<i>m</i> -amsacrina
<i>m</i> -CPBA	Ácido 3-cloroperoxibenzóico
MDR	Multidrug resistance
MEP	Potential electrostatic map

Mn(salen)	Catalisador de Jacobsen
MRT	Mean residence time
MSC	Model selection criterion
<i>m/z</i>	Razão massa carga
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NCE	new chemical entity
PA	Proton affinities
PEG 4000	Polyetileneglycol 4000
P-gp	Glicoproteína-P
PhIO	Iodosilbenzeno
PZA	Pirazoloacridina
$t_{1/2}$	Half-life
<i>t</i> -BuOOH	<i>terc</i> -butilhidroperóxido
TLC	Thin layer chromatography
UGT	Uridina-difosfato-glucoronil transferase
$V_{d_{ss}}$	Volume of distribution at steady state

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Cronologia do desenvolvimento de alguns fármacos antitumorais citotóxicos.....	16
Figura 2. Estruturas químicas dos agentes antitumorais: acridina carboxamida (DACA), pirazoloacridina (PZA) e amsacrina (<i>m</i> -AMSA).....	19
Figura 3. Deformação do DNA provocada por agente intercalante.....	20
Figura 4. Esquema de síntese do 3-(4-metil-benzil)-5-(acridina-9-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona (AC04).....	21
Figura 5. Ferroprotoporfirina IX na matriz protéica.....	26
Figura 6. Ciclo catalítico do CYP450.....	27
Figura 7. Correlação entre modelos biomiméticos, métodos <i>in vitro</i> utilizando tecidos que contêm CYPs e sistemas <i>in vivo</i> para investigação da metabolização de fármacos.....	30
Figura 8. Estrutura química da metaloporfirina e do complexo de salen.....	37
Figura 9. Estrutura química do catalisador de Jacobsen (Cloreto de N,N'-bis(3,5-di- <i>t</i> -butilsalicilideno)-1,2-diaminocicloexil manganês (III)).....	38

CAPÍTULO 1

Figure. 1 Chemical structure of amsacrine and antitumor candidate AC04.....	45
Figure 2. MK atomic charges (in u.e.) and molecular electrostatic potential map plotted from electron density (0.05) for AC04, molecular electrostatic potential map plotted from electron density (0.05) for 1-oxo-AC04. All results were obtained at B3LYP/6-31+G(d,p) level.....	49
Figure 3. MS/MS spectra of the AC-04 and 1-oxo-AC04.....	51
Figure 4. Fragmentation mechanisms for <i>m/z</i> 411 and <i>m/z</i> 427.....	52

Figure 5. Time dependence profiles of AC04 oxidation by Jacobsen catalyst. Reaction conditions: AC04, $8,55 \times 10^{-6}$ mol; Jacobsen, $2,85 \times 10^{-7}$ mol; <i>m</i> -CPBA, $4,275 \times 10^{-5}$ mol; ethyl acetate, 1.5 ml, at room temperature, in air. Reaction followed for 24 h.....	54
Figure 6. Chemical structure of antitumor candidate AC04 and its metabolite 1-oxo-AC04.....	54
Figure 7. LC–MS/MS MRM chromatogram of AC04 oxidation product obtained via the reaction catalyzed by Jacobsen catalyst, from AC04 <i>in vitro</i> metabolism using rat liver microsomes and from AC04 <i>in vivo</i> metabolism.....	55

CAPÍTULO 2

Figure 1. Chemical structure of acridine carboximide (DACA), pyrazoloacridine (PZA), <i>m</i> -amsacrine (<i>m</i> -AMSA), antitumoral candidate 5-acridin-9-ylmethylene-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (AC04) and 1-oxo-AC04 metabolite.....	72
Figure 2. Mean plasma profile of AC04 and its 1-oxo-AC04 metabolite after a single 1.5 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dose (n = 7).....	78
Figure 3. Mean tissue concentration/time profiles of AC04.....	82

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Relação de fármacos antineoplásicos comumente utilizados.....	17
Tabela 2. Percentual de Inibição do crescimento tumoral observado para o derivado acridínico AC04 no modelo murino de Sarcoma 180.....	22
Tabela 3. IC ₅₀ observada para o AC-04 frente às linhagens de células HL-60, MDA-MB435 e HCT-8.....	24

CAPÍTULO 2

Table 1. Pharmacokinetic parameters of AC04 following intravenous dosing of 1.5 mg/kg to Wistar rats estimated by compartmental and non-compartmental approaches.....	79
Table 2. Pharmacokinetic parameters of 1-oxo-AC04 metabolite determined by non-compartmental approach following i.v. <i>bolus</i> dosing of AC04 (1.5 mg/kg) to Wistar rats.....	80
Table 3. Pharmacokinetic parameters estimated for different tissues after 1.5mg/kg i.v. <i>bolus</i> dose of AC04.....	81

RESUMO

Objetivo: AC04 é um derivado acridínico com elevada atividade contra tumores sólidos em camundongos. O objetivo deste trabalho foi investigar a farmacocinética no plasma e a distribuição tecidual em ratos Wistar após administração i.v. *bolus* bem como o metabolismo *in vitro* e *in vivo* do AC04.

Metodologia: AC04 foi submetido à oxidação *in vitro* com catalisador de Jacobsen, modelo que biomimetiza o CYP450. O produto obtido na reação foi caracterizado por ^1H RMN e analisado por CLAE-EM/EM. O AC04 também foi incubado em meio microsomal de ratos para confirmar a formação do produto observado *in vitro* com catalisador. Para a avaliação farmacocinética, uma dose única de 1,5 mg/kg foi administrada a ratos Wistar por i.v. *bolus* (n = 7) e amostras de sangue foram coletadas da veia lateral da cauda até 120 h após administração. AC04 e o 1-oxo-AC04 foram separados do plasma por desproteinização com acetonitrila e analisados por método de CLAE-EM/EM previamente validado. A fração ligada a proteínas foi determinada por ultrafiltração e a distribuição tecidual foi avaliada após administração de 1,5 mg/kg i.v. *bolus* (n = 3 animais/tempo). **Resultados:** A oxidação do AC04 pelo catalisador de Jacobsen resultou na formação de um metabólito, 1-oxo-AC04, o mesmo formado pela incubação da fração microsomal e *in vivo* após administração da droga a roedores. O modelo aberto de dois compartimentos descreveu adequadamente o perfil de concentração plasmática do AC04, possibilitando a determinação de CL de $3,4 \pm 3,4$ L/h/kg, $V_{d_{ss}}$ de $137,9 \pm 91,4$ L/kg, $t_{1/2}$ de $45,5 \pm 31,5$ h e $ASC_{0-\infty}$ de 788 ± 483 ng·h/mL. A ligação a proteínas plasmáticas foi de $98,1 \pm 1,6\%$. A penetração no pulmão, fígado e baço foi de 1077, 410 e 355 respectivamente, enquanto no cérebro foi de 0,54. O AC04 se acumula no tecido adiposo com um fator de penetração de 30. O $t_{1/2}$ do 1-oxo-AC04 foi de $23,2 \pm 10,4$ h. **Conclusões:** O conjunto de resultados sugere que, apesar da pequena fração livre no plasma livre, AC04 é capaz de se acumular em diferentes tecidos, o que pode ser um componente importante para sua ação em tumores sólidos, além de ter uma meia-vida longa. A reação de oxidação de Jacobsen e o metabolismo *in vitro* com fração microsomal possibilitaram a identificação do mesmo metabólito obtido *in vivo*.

Palavras-chave: AC04, candidato antitumoral, farmacocinética, metabolismo *in vitro*, catalisador de Jacobsen, 1-oxo-AC04

ABSTRACT

Antitumor Candidate AC04 Pharmacokinetics and *In Vitro-In Vivo* Metabolism Evaluation

Purpose: AC04 is an acridine derivative with high activity against solid tumors in mice. The goal of this work was to investigate the plasma pharmacokinetics and tissue distribution of the drug in Wistar rats after bolus i.v. administration as well as the its *in vitro* and *in vivo* metabolism. **Methodology:** AC04 was submitted *in vitro* oxidation by Jacobsen catalyst, a biomimetic CYP450 model. The product obtained in the reaction was characterized by (¹H NMR) and analyzed by LC-MS/MS. AC04 was also incubated with rats microsomal fraction to confirm the formation of the product observed *in vitro* with the catalyst. A single 1.5 mg/kg i.v. bolus dose of AC04 was given to Wistar rats (n = 7) and blood samples were harvested from the lateral tail vein up to 120 h after dosing. AC04 and 1-oxo-AC04 were separated from plasma by deproteinization with acetonitrile and analyzed by LC-MS/MS with a previously validated method. Protein binding fraction was performed by ultrafiltration and AC04 tissue disposition was evaluated after 1.5 mg/kg i.v. bolus (n = 3 animals/point) **Results:** The Jacobsen-catalyzed oxidation of AC04 resulted in the formation of one metabolite, 1-oxo-AC04. The same metabolite was observed with microsomal incubation and *in vivo*, after AC04 dosing to Wistar rats. A two-compartment open model adequately fitted the individuals plasma profiles of AC04 resulting in a CL of 3.4 ± 3.4 L/h/kg, a $V_{d_{ss}}$ of 137.9 ± 91.4 L/kg, a $t_{1/2}$ of 45.5 ± 31.5 h and a $ASC_{0-\infty}$ of 788 ± 483 ng·h/mL. AC04 plasma protein binding was $98.1 \pm 1.6\%$. Lung, liver and spleen showed a penetration of 1077, 410 e 355 respectively, while brain penetration was of 0.54. The AC04 accumulates in the adipose tissue with a penetration factor of 30. The 1-oxo-AC04 metabolite showed a $t_{1/2}$ of 23.2 ± 10.4 h. **Conclusions:** The Jacobsen oxidation reaction and the *in vitro* metabolism by microsomes allowed the identification of the same metabolite observed *in vivo*. The results suggest that despite the small free plasma fraction, AC04 is capable to accumulate in different tissues, which may contribute to its activity in solid tumor, besides its long half-life.

Keywords: AC04, antitumor candidate, pharmacokinetics, *in vitro* metabolism, Jacobsen catalyst, 1-oxo-AC04

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
REVISÃO DA LITERATURA	11
1. Câncer.....	13
2. Tratamento do câncer.....	14
3. Fármacos antitumorais.....	15
4. Derivados acridínicos.....	17
5. 3-(4-metil-benzil)-5-(acridina-9-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona (AC04).....	20
6. A importância do metabolismo durante o desenvolvimento de um novo fármaco.....	24
6.1. Citocromo P450.....	26
6.2. Enzimas do CYP450.....	28
7. Modelos para o estudo de metabolismo.....	29
7.1. Sistemas biológicos.....	30
7.1.1. Hepatócitos.....	31
7.1.2. Cortes de fígado.....	31
7.1.3. Fração citosólica.....	32
7.1.4. Fração S9.....	32
7.1.5. Microsomas.....	33
7.2. Sistemas biomiméticos de metabolismo oxidativo.....	34
7.2.1. Modelos biomiméticos do citocromo P450: metaloporfirinas sintéticas e complexos salen.....	35
CAPÍTULO 1. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes	41
Abstract.....	44
1. Introduction.....	45
2. Results and Discussion.....	48
2.1. <i>Characterization of AC04 and oxo-AC04 by ESI-MS/MS and NMR</i>	48
2.2. <i>Oxidation reaction results</i>	52
2.3. <i>In vivo and in vitro metabolism</i>	54
3. Conclusions.....	55
4. Experimental part.....	56
4.1. <i>Chemicals</i>	56
4.2. <i>Theoretical Calculations</i>	56
4.3. <i>Mn(salen) oxidation procedure</i>	57
4.4. <i>LC-MS/MS and mass spectrometry conditions</i>	57
4.5. <i>In vitro metabolism study using rat liver microsomes</i>	58
4.5.1. <i>Animals and microsomal preparation</i>	58
4.5.2. <i>Microsomal incubation conditions</i>	58
4.6. <i>Metabolite isolation and structure elucidation</i>	59

4.7. AC04 in vivo metabolism.....	59
5. References.....	60
CAPÍTULO 2: Pre-Clinical Pharmacokinetic and Metabolism Investigation of the Acridine Antitumor Candidate AC04.....	67
Abstract.....	70
Introduction.....	71
Materials and Methods.....	72
Chemicals.....	72
Animals.....	73
AC04 preparation.....	73
AC04 plasma.....	73
Pharmacokinetics data analysis.....	74
Tissue distribution.....	75
Plasma Protein Binding.....	75
LC-MS/MS analysis.....	76
Statistical analysis.....	77
Results.....	77
Plasma Pharmacokinetics.....	77
Tissue Disposition and Protein Binding.....	80
Discussion.....	83
References.....	86
DISCUSSÃO GERAL.....	91
CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXOS.....	115

INTRODUÇÃO

O câncer é um distúrbio celular caracterizado por alterações no processo de duplicação do DNA, resultando em proliferação celular desordenada (GARÓFOLO et al., 2004). Depois das doenças cardíacas, o câncer é a principal causa de morte no Brasil, representando quase 17 % dos óbitos de causa conhecida (BRASIL, 2009).

A terapia oncológica consiste no tratamento dos pacientes portadores de câncer através de intervenção cirúrgica, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia, que podem ser aplicadas sozinhas ou em associação. Atualmente o recurso mais empregado é a quimioterapia, a qual utiliza os medicamentos antitumorais, que agem inibindo o crescimento celular, atuando sobre o controle da divisão celular e do desenvolvimento das células. O efeito antitumoral é dependente da ação citotóxica, afetando indistintamente as células normais e as alteradas, o que leva ao surgimento de inúmeros efeitos adversos relacionados à terapia (ALMEIDA et al., 2005).

Novos agentes antitumorais vêm sendo desenvolvidos, em especial agentes citotóxicos, como aqueles que utilizam como sítio de ação a tubulina e as DNA-topoisomerasas I e II (KUFÉ et al., 2003; HSIAO et al., 2008; HAJBI et al., 2010). Nesse contexto, a química medicinal tem desempenhado um papel importante na investigação de novos fármacos antitumorais.

Dentre os compostos obtidos por síntese orgânica destacam-se os derivados 9-arilacridínicos, como a *m*-amsacrina (*m*-AMSA), a acridina carboxamida (DACA) e a pirazoloacridina (PZA), que agem interferindo no funcionamento normal das enzimas topoisomerasas inibindo, conseqüentemente, a replicação celular (BERG et al., 1991; HICKS et al., 2001; TWELVES et al., 2002).

No Brasil, derivados acridínicos foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (MOURÃO et al., 2005). Dentre a série de compostos obtidos, o derivado acridinilideno-tiazolidinônico denominado AC04, que mostrou a melhor atividade em estudos preliminares com modelos de câncer, vem sendo estudado por diversos grupos de pesquisa no País visando sua avaliação como um antitumoral na tentativa de elucidar seu potencial terapêutico e toxicidade, e pelo nosso grupo de pesquisa, buscando determinar sua farmacocinética.

O AC04 demonstrou interessante atividade *in vivo* contra o modelo de Sarcoma-180 e *in vitro* frente às linhagens de células cancerígenas MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon) e SF-295 (sistema nervoso central) (PITTA et al., 2007). Esses resultados farmacológicos preliminares justificam a avaliação farmacocinética pré-clínica do AC04, visando obter informações necessárias para o estabelecimento de protocolos para os estudos clínicos de Fase 1, primeira administração em humanos.

Os estudos farmacocinéticos visam determinar os parâmetros que caracterizam a absorção e a disposição de drogas e fármacos no organismo, a relação entre as concentrações e as doses administradas, a distribuição e o acúmulo tecidual desses, assim como a biotransformação do composto sob investigação. Apesar de a avaliação farmacocinética ser conduzida de forma mais abrangente em humanos, estudos preliminares em animais, iniciando pelos roedores, são fundamentais para possibilitar o escalonamento de doses mais seguro para as investigações em humanos, principalmente para candidatos a antitumorais, cujos estudos clínicos são conduzidos em pacientes e não em voluntários sadios, como ocorre com outras classes terapêuticas.

A biotransformação é o processo pelo qual compostos endógenos e xenobióticos são convertidos no organismo em compostos mais hidrofílicos (hidrossolúveis), possibilitando sua eliminação mais rápida. Em geral, os metabólitos são farmacologicamente menos ativos e menos tóxicos que os fármacos. No entanto, não é incomum que as reações de biotransformação tenham conseqüências indesejáveis, tais como formação de metabólitos farmacologicamente ativos, interações com outros fármacos, através da inibição ou indução do metabolismo e/ou formação de metabólitos tóxicos. Essas situações indesejadas são muitas vezes responsáveis pelo insucesso de parte das drogas investigadas em estudos pré-clínicos. Portanto, a determinação dos metabólitos formados é de grande relevância no estudo de um novo candidato a fármaco. A investigação de metabólitos pode ser realizada em estudos *in vitro* ou *in vivo* e objetivam prever o comportamento que o candidato a fármaco terá em humanos, buscando garantir maior segurança aos voluntários dos estudos clínicos de Fase 1.

Como mencionado, o desenvolvimento de fármacos antitumorais difere do desenvolvimento de outros agentes terapêuticos, pois, por serem agentes

extremamente tóxicos, as fases clínicas não são realizadas em voluntários saudáveis, sendo seu primeiro uso em humanos realizado em pacientes que não são responsivos a outros tratamentos com agentes antitumorais tóxicos (TOMASZEWSKI et al., 2002). Dessa forma, os candidatos a agentes antitumorais devem ter dados pré-clínicos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos consistentes, que permitam a previsão dos efeitos esperados em humanos com a máxima precisão. Nesse contexto se insere a proposta de investigação do candidato a antitumoral AC04 apresentada neste trabalho.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Contribuir no desenvolvimento do candidato a fármaco antitumoral AC04 através da avaliação farmacocinética e da investigação do metabolismo da droga em modelos *in vitro* e *in vivo*.

1.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer os parâmetros farmacocinéticos plasmáticos do AC04 após administração intravenosa *bolus* de dose única de 1,5 mg/kg a ratos Wistar;
- Avaliar a penetração tecidual do AC04 (pulmão, rim, fígado, coração, cérebro, baço, tecido adiposo) após dose i.v. *bolus* de 1,5 mg/kg a ratos Wistar e determinar sua ligação a proteínas plasmáticas;
- Submeter o AC04 a análises por IES-EM e IES-EM/EM e propor as vias de fragmentação visando auxiliar na identificação dos metabólitos obtidos nas próximas etapas;
- Submeter o AC04 a oxidação com catalisador de Jacobsen, visando biomimetizar as reações enzimáticas do sistema citocromo P450, e identificar os produtos formados;
- Submeter o AC04 à reação de metabolismo *in vitro* utilizando fração microsomal de tecido hepático de ratos Wistar e confirmar os metabólitos formados na oxidação química;
- Avaliar o perfil plasmático do metabólito 1-oxo-AC04 após dose única i.v. *bolus* de 1,5 mg/kg de AC04 a ratos Wistar.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Câncer

Conceitualmente, o câncer caracteriza-se por uma proliferação anormal e desordenada de um determinado tecido, que passa a agir de forma autônoma e descontrolada, podendo acometer diversos órgãos e tecidos de diferentes origens histológicas (BARACAT et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005). As características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si variam de acordo com o tipo de célula acometida, sua velocidade de multiplicação e a capacidade de invadir tecido e órgãos distantes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). O surgimento do câncer ocorre através da transformação de uma célula normal em célula cancerosa devido à alteração do seu DNA (MURAD & KATZ, 1997). À medida que o tumor cresce e produz metástase, vários subclones celulares emergem, conferindo heterogeneidade à população celular maligna (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

A determinação das causas dos diferentes tipos de câncer é um árduo esforço realizado pelos epidemiologistas. Tabagismo, uso de álcool e baixa ingestão de frutas e verduras são os principais fatores de risco de morte por câncer no mundo e, o fumo, o álcool e a obesidade são as causas mais importantes do câncer em países de alta renda (DANAIEI et al., 2005). Apesar de um grande número de estudos, as causas da maioria dos tipos de cânceres ainda são incertas (KARP, 2005).

O câncer representa a segunda causa de morte, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares, constituindo assim um problema de saúde pública (WHO, 2007). O ano de 1971 foi o da “declaração da guerra contra o câncer”, pois de cada grupo de 100 mil habitantes dos Estados Unidos, 163 morriam de câncer (MELLO & MENCARINI, 2008). Após 40 anos, apesar dos avanços médico-tecnológicos e do aumento global na expectativa de vida, a incidência do câncer aumenta a cada ano, assim como o número de mortes causadas por esta doença. Um em cada dois homens e uma em cada três mulheres serão diagnosticados com câncer ao longo de suas vidas (KUFÉ et al., 2003). Em 2007, o câncer matou 7,9 milhões de pessoas, representando 13% de todas as mortes no mundo. Em 2015, acredita-se num aumento desse número para 9 milhões e em 2030 para 11,5 milhões de mortes causadas pelo câncer (WHO, 2007). O câncer de pulmão é o câncer mais prevalente no

mundo hoje e o de mama, o segundo, sendo que os números crescem ano a ano. Uma estatística impressionante mostra que 40% de todos os americanos vivos hoje receberão o diagnóstico de câncer em algum momento de suas vidas (MELLO & MENCARINI, 2008).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para os anos de 2010 e 2011 foi previsto o diagnóstico de cerca de 490 mil novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes no país são câncer de próstata e pulmão para o sexo masculino, e o de mama e colo do útero para o sexo feminino (BRASIL, 2009).

2. Tratamento do câncer

Existem quatro principais tipos de tratamento para o câncer: a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a terapia biológica. A técnica cirúrgica consiste na remoção de tumores, sendo eficaz quando não há metástase. A radioterapia (raios gama, radioisótopos como cobalto-60, raios X) é comumente usada em conjunto com a cirurgia, aumentando a eficácia do tratamento. Outro tratamento antitumoral promissor é a imunoterapia, que promove a estimulação do sistema imunológico do paciente por meio do uso de substâncias como o interferon e a interleucina-2. No entanto, ainda representa uma técnica antineoplásica adjuvante, usada especialmente para destruir as células cancerosas residuais após a intervenção cirúrgica (ALMEIDA et al., 2005).

Recentemente, a técnica de fotorradiação tem representado um grande avanço no tratamento, pois permite a localização e a destruição do câncer com maior seletividade (ALMEIDA et al., 2005). No entanto, esta técnica é aprovada somente no tratamento de alguns tumores, como o de pulmão, esôfago, pele e bexiga (ALLISON & SIBATA, 2010).

Apesar da existência de diferentes técnicas, quando há ocorrência de metástase e visando também sua prevenção, além dos casos onde a cirurgia não é possível, faz-se necessário uma abordagem sistêmica, que pode ser efetuada, em cerca de 60-70 % dos casos, com a quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005). O principal objetivo da quimioterapia é destruir as células cancerosas mantendo as normais. Portanto, a quimioterapia desejável faz uso das mais altas doses toleráveis do fármaco para atingir o maior número de

células cancerosas. Porém, a maioria dos agentes atua de forma inespecífica, atingindo além das células cancerosas também as células normais, o que resulta nos efeitos colaterais comuns provocados pela quimioterapia. Visando obter agentes quimioterápicos mais específicos, eficazes e seguros continua o grande interesse na pesquisa científica de novos fármacos antitumorais (MENDONÇA, 2008).

3. Fármacos antitumorais

A quimioterapia antitumoral, desde seu início em meados do século 20 até o presente momento, tem sido dominada pelo desenvolvimento de fármacos genotóxicos. O primeiro fármaco descoberto com propriedades anticancerígenas foi a mostarda nitrogenada, seguida pelo metotrexato, análogo ao ácido fólico, nos anos de 1940. Desde então, os grandes avanços na terapia anticâncer são devido ao desenvolvimento de duas estratégias: a inibição de vias específicas de crescimento celular e a inibição do crescimento do câncer como um tecido (BAGULEY, 2002). Um dos princípios mais importantes no tratamento do câncer emerge do fato de que a perda do controle no nascimento das células cancerígenas está mecanisticamente associada a um aumento na tendência celular em entrar em apoptose, de forma que o crescimento do câncer é resultado de um balanço entre o nascimento e a morte celular (FRANK, 2007). A citotoxicidade, então, entra como um fator de desequilíbrio, aumentando a morte celular, sendo alvo de intensos estudos. Novos agentes citotóxicos vêm sendo identificados, podendo-se destacar aqueles que utilizam como sítio de ação a tubulina e as DNA-topoisomerasas I e II (KUFE et al., 2003; HSIAO et al., 2008; HAJBI et al., 2010).

A síntese orgânica tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento de fármacos antitumorais. A partir dos anos de 1950, o conhecimento do metabolismo do DNA permitiu o desenvolvimento semi-racional de análogos e antagonistas de nucleotídeos. Este fato, somado a um grande período de *screening* randômico de novas moléculas, apoiado pelo *United States National Cancer Institute* (NHI – USA), resultaram em inúmeros compostos naturais, sintéticos e semi-sintéticos, bem como um grande número

de análogos de purinas e pirimidinas de estruturas simples, utilizados na terapia antitumoral (Figura 1). Como consequência da inserção terapêutica destes novos fármacos obteve-se, além do resultado terapêutico, uma importante contribuição nos estudos dos mecanismos do câncer e no desenvolvimento de novos conceitos de moléculas antitumorais (DENNY, 2002).

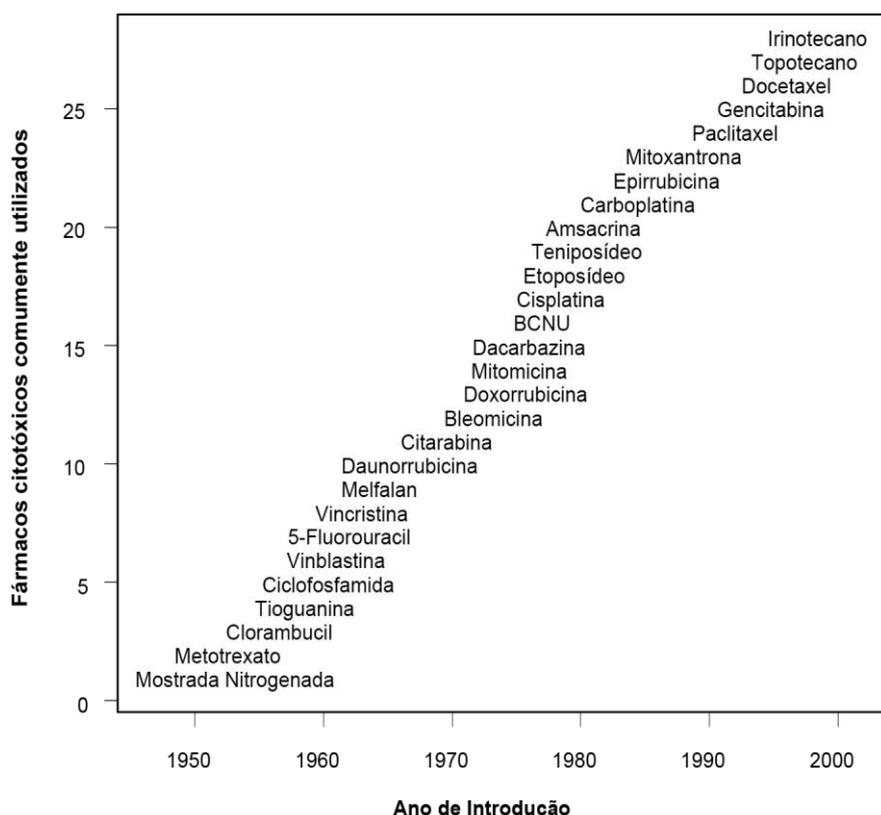


Figura 1. Cronologia do desenvolvimento de alguns fármacos antitumorais citotóxicos (BAGULEY, 2002).

Apesar dos avanços na síntese orgânica, um número limitado de fármacos para o tratamento de câncer estão disponíveis no mercado, portanto há a necessidade urgente da pesquisa de novos agentes antitumorais (SONDHI et al., 2010).

Apesar de numeros estudos *in vitro* e em animais demonstrarem a eficácia de diversos candidatos a antitumorais, essas atividades promissoras, frequentemente, não são bem traduzidas para os resultados clínicos esperados. Os tumores mais comuns são resistentes aos antitumorais disponíveis e a maioria destes agentes tem atividade limitada contra tumores

sólidos devido à restringida capacidade dos fármacos em penetrar no tecido do tumor e alcançar todas as células tumorais em concentração letal (TRÉDAN et al., 2007; WONG et al., 2009). A Tabela 1 comprova esta afirmação mostrando que apenas 5 dos 25 antitumorais listados, comumente utilizados, possuem atividade preferencial contra tumores sólidos e, além disso, esses agentes têm pouco impacto na sobrevida dos pacientes (MANS et al., 2000).

Tabela 1. Relação de fármacos antitumorais comumente utilizados (MANS et al., 2000).

Exclusivamente utilizados contra neoplasias hematológicas	Utilizados contra neoplasias hematológicas e tumores sólidos	Exclusivamente utilizados contra tumores sólidos
<i>L</i> -asparaginase	Bleomicina	Carboplatina
Busulfano	Ciclofosfamida	Cisplatina
Clorambucil	Dacarbazina	5-Fluorouracil
Citarabina	Dactinomicina	Mitomicina C
Daunorrubicina	Etoposida	Tamoxifeno
Mecloretamina	Ifosfamida	
6-Mercaptopurina	Melfalan	
Procarbazina	Metotrexato	
6-Tioguanina	Vimblastina	
	Doxorrubicina	

4. Derivados acridínicos

Derivados acridínicos são um grupo bem conhecido de compostos aromáticos policíclicos com uma grande variedade de propriedades biológicas, como agentes intercalantes do DNA, anticarcinogênicos, bactericidas, antimaláricos, inseticidas, fungicidas (ALBERT,1951), anti-leishmania (DI GIORGIO et al., 2003), anti-inflamatórios e analgésicos (SONDHI et al., 2004). Um grande número de alcalóides naturais e derivados sintéticos contendo o grupamento acridínico tem sido testados como agentes antitumorais (BURREN et al., 1989; DEMEUNYNCK et al., 2001).

Dentre os compostos obtidos por síntese, a *m*-AMSA, um composto acridínico utilizado no tratamento de alguns tipos de câncer incluindo leucemia aguda em pacientes pediátricos e adultos (LOUIE & ISSELL, 1985; HUANG et al., 2005), atua ligando-se ao DNA pela intercalação de seu grupamento cromóforo acridina. Além disso, os derivados 9-arilacridínicos como a PZA e a DACA, que intercalam no DNA e inibem seletivamente a síntese do RNA (BERG et al., 1991), em conjunto com a *m*-AMSA interferem no funcionamento normal das enzimas topoisomerases I e II (Figura 2). Estudos mostraram que a DACA induz a clivagem do DNA na presença da topoisomerase I, bem como da topoisomerase II (FINLAY et al., 1996). Devido ao seu caráter lipofílico, a DACA possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, atingindo os tumores cerebrais (SALEEM et al., 2001). Além disso, DACA é ativa contra uma linhagem de células humanas de leucemia, que têm quantidades reduzidas da topoisomerase II e são altamente resistentes à etoposida e doxorrubicina (TWELVES et al., 1999). Desse modo, essas substâncias agem como toxinas para as enzimas, subvertendo sua função e levando à quebra do DNA, resultando em apoptose celular (BERG et al., 1991; HICKS et al., 2001; TWELVES et al., 2002). Além de inibir a topoisomerase II, os derivados acridínicos como os tetra-acridínicos, possuem como alvo a inibição da maquinaria do proteosoma, levando também à apoptose celular (VISPÉ et al., 2007).

As mutações no gene de supressão tumoral p53 estão entre as anormalidades genéticas mais comuns encontradas numa ampla variedade de tumores (ROSA, 2002) e o estado funcional do gene p53 tem sido relacionado ao prognóstico, à progressão e à resposta terapêutica dos tumores. Estudo realizado por WANG e colaboradores (2005) demonstrou que derivados acridínicos são capazes de estabilizar a proteína p53 e induzir a apoptose p53-dependente das células tumorais.

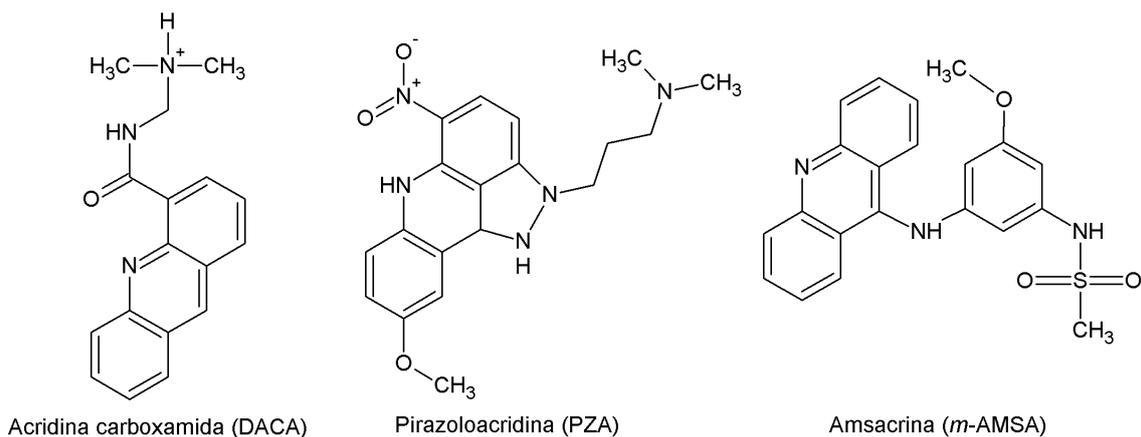


Figura 2. Estruturas químicas dos agentes antitumorais: acridina carboxamida (DACA), pirazoloacridina (PZA) e amsacrina (*m*-AMSA).

Estudos com a amsacrina revelaram que o fármaco estimula a formação de um complexo DNA-topoisomerase II, o que pode ser a causa da citotoxicidade e outros efeitos, tais como rearranjos na seqüência de DNA e troca de cromátides-irmãs (NELSON et al., 1984). Além disso, alguns derivados tioacridínicos, como 3-amino-9-tio-(4'-nitrobenzil)acridinona e 2,7-dimetoxi-9-tio-(2'-dietilaminoetil)acridinona, são capazes de reduzir significativamente a expressão do gene *mdr1*, bloqueando a função da glicoproteína-P (P-gp) (HEVÉR et al., 1998), que é outra atividade importante para os agentes antitumorais, pois a P-gp promove o efluxo celular do quimioterápico, levando à resistência aos quimioterápicos mediada pela P-gp (HUBER et al., 2010).

O alvo biológico da porção acridina dos antitumorais acridínicos é a dupla fita de DNA, sendo a intercalação o modo predominante de ação (ADAMS et al., 1999). O anel acridínico planar da *m*-AMSA intercala no DNA através de uma interação π - π entre o intercalador e os pares de bases do DNA (Figura 3) (CHOURPA & MANFAIT, 1995; AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008). Recentemente, a modelagem molecular de compostos tricíclicos com substituintes anilino mostrou que a substituição isostérica do grupamento benzeno de 9-anilinoacridinas por um anel heterocíclico parece ter uma influência importante sobre a geometria e as propriedades eletrônicas dos compostos resultantes, bem como sobre as suas propriedades de ligação ao DNA (LOZA-MEJÍA et al., 2009). Corroborando com esse achado, CHILIN e colaboradores (2009) demonstraram a importância do grupamento acridínico através da substituição do anel acridínico pelo sistema análogo 2-oxo-2H-

pirano[2,3-b]quinolina, o que reduziu a atividade citotóxica do composto em quatro linhagens de células tumorais e também reduziu seu potencial de intercalar no DNA.

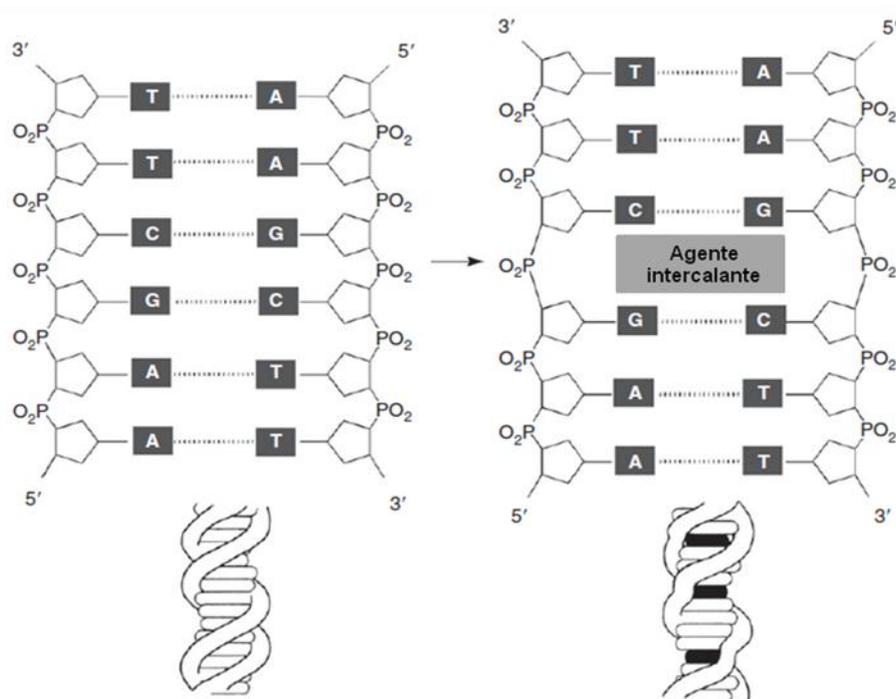


Figura 3. Deformação do DNA provocada por agente intercalante (AVENDAÑO & MENÉNDEZ, 2008).

5. 3-(4-metil-benzil)-5-(acridina-9-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona (AC04)

Em busca de novos agentes antitumorais, uma série de derivados acridínicos com atividade antitumoral potente foi sintetizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (MOURÃO et al., 2005), os quais apresentaram excelente atividade anticancerígena em modelos murinos *in vivo*, sendo o AC04 o composto mais promissor da série (PITTA et al., 2007).

Resumidamente, conforme mostrado na Figura 4, a síntese do AC04 inicia com a obtenção da tiazolidina-2,4-diona por reação da tiouréia com o ácido cloroacético (2). Numa segunda etapa a tiazolidina-2,4-diona reage com o cloreto de 4-metil-benzila, com a formação da 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (4). Paralelamente, obtem-se 9-metil-acridina através da reação da

difenilamina (5) com ácido acético glacial (6). A síntese do acridina-9-carboxaldeído (7) é realizada por uma reação de oxidação da 9-metil-acridina com o clorocromato de piridínio. Por sua vez, reagindo esse aldeído com o cianacetato de etila obtem-se o éster 2-ciano-acridina-9-il-acrilato de etila (8). Finalmente, a 3-(4-metil-benzil)-tiazolidina-2,4-diona sofre uma reação de adição pelo éster cianocinâmico, conduzindo ao produto final (9). AC04 foi purificado e analisado antes da utilização (SILVA, 2001; PITTA et al., 2004).

O AC04, como os demais derivados acrínicos, foi desenhado visando agir como inibidor da topoisomerase II e intercalador do DNA. O intercalamento no DNA dos derivados acrínicos sintetizados pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE foi estudado por Leite e colaboradores (2006) através de *docking in silico* e os resultados sugerem que este seja o provável mecanismo de ação desses derivados.

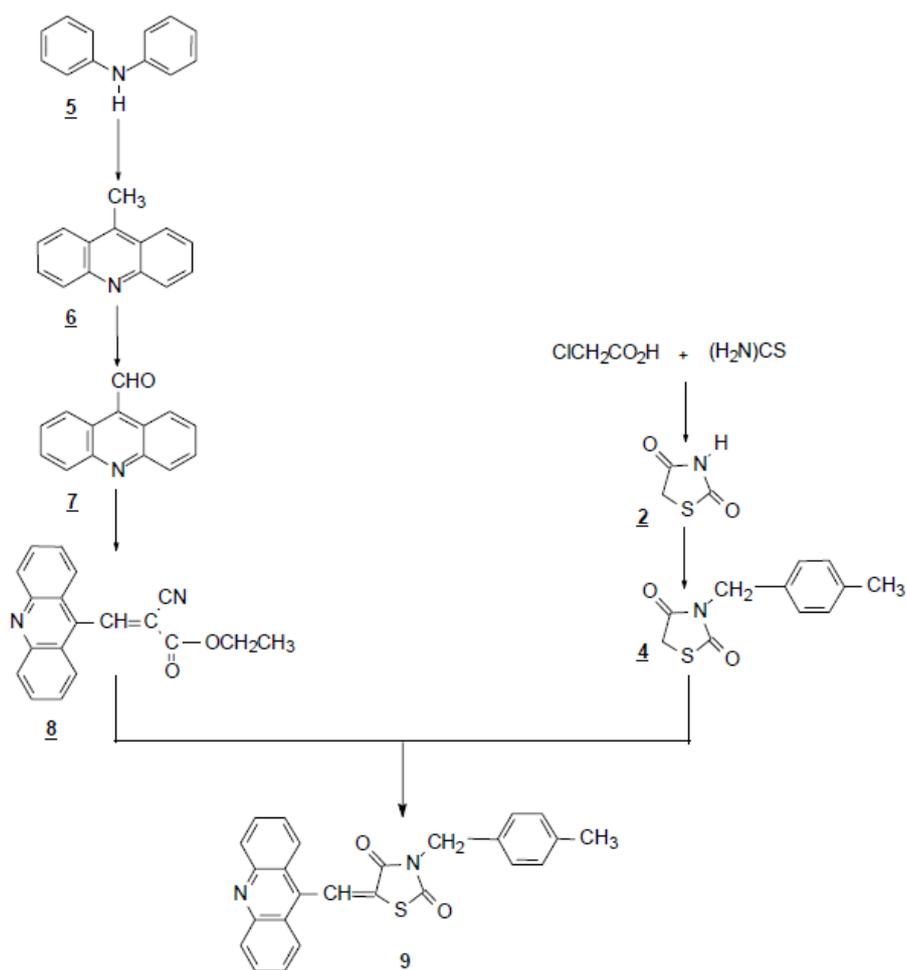


Figura 4. Esquema de síntese do 3-(4-metil-benzil)-5-(acridina-9-il-metileno)-tiazolidina-2,4-diona (AC04) (SILVA, 2001).

Estudos farmacodinâmicos realizados em camundongos no modelo de Sarcoma 180 demonstraram atividade antitumoral do AC04 em doses que variaram de 6,25 a 100 mg/kg (PITTA et al., 2007). Os animais foram tratados com as diferentes doses de AC04 pela via intraperitoneal durante 8 dias, em um tratamento que se iniciou 48 horas após a implantação do tumor. Os resultados podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Percentual de Inibição do crescimento tumoral observado para o derivado acridínico AC04 no modelo murino de Sarcoma 180 (dados não publicados).

Dose i.p. de AC04 (mg/kg/dia/8 dias)	Inibição do crescimento tumoral em relação ao controle (%)
100	85,4
38	73,4
12,5	60,7
6,25	56,3

O sarcoma 180 é um tumor originário de camundongos e é uma das linhagens de células mais utilizadas na pesquisa *in vivo* de novos agentes antitumorais, uma vez que histologicamente apresenta-se como massa sólida formada por células com pleomorfismo acentuado, estroma conjuntivo vascularizado circundando e permeando o tumor, necrose central e padrão histológico misto apresentando aspecto tanto de carcinoma como de sarcoma (KURASHIGE e MITSUHASHI, 1982). A atividade de inibição do AC04 frente a um tumor com estas características revela uma substância de alto poder citotóxico e com grande poder de penetração em massas sólidas, fator determinante para um candidato a fármaco antitumoral.

O AC04 mostrou atividade dose-dependente tendo na dose mais baixa testada, 6,25 mg/kg uma atividade superior a 50%, a qual atingiu 85% na dose de 100 mg/kg.

A atividade antitumoral do AC04 também foi investigada *in vitro* frente a linhagens de células cancerígenas: MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon) e SF-295 (sistema nervoso central) na dose de 100 µg/mL. Os percentuais de

inibição do crescimento celular (IC%) foram, respectivamente, $54,6 \pm 3,4\%$, $90,7 \pm 0,4\%$ e $82,4 \pm 2,5\%$ (dados não publicados).

Conforme mencionado anteriormente, grande parte dos agentes antitumorais descobertos demonstra atividade antileucêmica, mas apresenta pouca atividade em tumores sólidos, os quais são mais difíceis de serem tratados. Na investigação de novos agentes quimioterápicos tem-se tentado otimizar a atividade dos potenciais candidatos a fármacos sobre tumores sólidos, selecionando-se agentes que são relativamente mais citotóxicos para cultura de carcinoma humano ou de murino do que para cultura de células leucêmicas (SEBOLT et al., 1987). Nesse sentido, o AC04 apresentou resultados de inibição do crescimento celular da linhagem de um adenocarcinoma ileocecal (HCT-08), que é um tumor sólido de difícil tratamento, superior a 90%, indicando um importante potencial terapêutico.

A resposta de inibição de crescimento superior a 80% frente à linhagem de células SF-295, caracterizada histologicamente como um glioblastoma multiforme (TOSHIMITSU e BODELL, 1987), é bastante promissora, pois a alta lipofilia do AC04 ($\text{LogP} = 4,83$) sugere que esse composto seja capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica.

O AC04 também inibiu a linhagem de células tumorais de mama MDA-MB435 tipo receptor de estrogênio negativo, de alta tumorigenicidade e grande poder de metástase (BAGHERI-YARMAND et al., 2001).

A concentração de AC04 capaz de inibir em 50% do crescimento celular (IC_{50}) foi calculada a partir dos resultados de inibição do crescimento tumoral frente à HL-60 (leucemia), MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon), e está descrita na Tabela 3 (dados não publicados).

Tabela 3. IC₅₀ observada para o AC-04 frente às linhagens de células HL-60, MDA-MB435 e HCT-8.

Composto	HL60 (leucemia)	MDA-MB435 (mama)	HCT-8 (cólón)
	IC ₅₀ µg/mL (Intervalo de confiança)		
AC04	> 25	> 25	5.94 (4.15-8.5)

Esses resultados demonstram que o AC04 é uma molécula bastante ativa, principalmente no tratamento de tumores sólidos. Vale salientar que tais resultados são obtidos com doses/concentrações relativamente baixas tanto nos estudos *in vivo* (6,25 mg/kg) quanto *in vitro* (5,94 µg/mL), revelando um composto de alta potência.

Estudos de toxicidade aguda foram realizados com derivados acridínicos da série AC utilizando doses crescentes até 1000 mg/kg, pela via intraperitoneal, e não foi observado óbito dos animais para nenhuma dose investigada (dados não publicados).

6. A importância do metabolismo durante o desenvolvimento de um novo fármaco

O metabolismo de fármacos e outros agentes xenobióticos é parte integrante do processo de descoberta de fármacos e é essencial para a eliminação destes compostos do organismo. A maioria dos fármacos possui grupos oxidáveis que os tornam alvos ideais para o metabolismo oxidativo quando são introduzidos no organismo humano (BERNARDOU & MEUNIER, 2004). O conhecimento do metabolismo oxidativo catalisado pelo citocromo P450 de um novo fármaco é fundamental, pois esse processo pode afetar significativamente a sua segurança e eficácia, visto que na metabolização pode ocorrer a formação de metabólitos tóxicos (BERNARDOU & MEUNIER, 2004; MANSUY, 2007). Desse modo, o estudo do metabolismo surge como parte essencial das etapas pré-clínica e clínica de desenvolvimento de um novo fármaco (BARREIRO & FRAGA, 2008).

FERNANDEZ-METZLER e colaboradores em 1999 já indicavam a importância desta etapa afirmando que a caracterização de metabólitos saiu dos estágios finais do desenvolvimento de fármacos para se tornar um componente integral dos estágios iniciais de pesquisa, fornecendo informações para a fase de síntese e, assim, possibilitando modificações que venham a aumentar a segurança e/ou melhorar a farmacocinética do novo agente terapêutico.

O processo de biotransformação de fármacos envolve uma variedade de reações bioquímicas seqüenciais, divididas em reações de funcionalização de fase I e reações biossintéticas de fase II. As reações de fase I englobam oxidação, redução e hidrólise do composto original e visam a produção de metabólitos mais polares para facilitar a excreção. Esta etapa compreende, basicamente, a inserção de um átomo de oxigênio, originário de uma molécula de O₂, no substrato orgânico. Sob condições fisiológicas *in vivo*, estas reações de oxidação em presença de O₂ requerem elétron do NADPH ou NADH via proteínas de transferência de elétrons (flavoproteína citocromo P450 redutase) (BARREIRO & FRAGA, 2008). Reações de fase II compreendem a etapa de conjugação, envolvendo reações de glicuronidação, sulfatação, acilação, metilação e conjugação com a glutatona, acetato, glucuronato, sulfato ou glicina para produzir os compostos que serão excretados (STRNAD, 2000; BARREIRO & FRAGA, 2008).

6.1. Citocromo P450

O processo de biotransformação de fármacos em metabólitos tem caráter essencialmente enzimático, sendo que a família de cisteinato-heme enzimas do citocromo P450 (CYP450) constitui-se no principal sistema que desempenha a transformação oxidativa de moléculas endógenas e exógenas, como os fármacos (MEUNIER & BERNARDOU, 2002).

A maior parte do metabolismo de fase I ocorre através do sistema enzimático do citocromo P450. O fígado é a principal fonte de isoenzimas do CYP450, localizadas no retículo endoplasmático liso (microsomas) dos hepatócitos. Outros órgãos com capacidade biotransformadora considerável

são os rins, a pele, os pulmões e o trato gastrointestinal, principalmente os enterócitos do epitélio do intestino delgado (THUMMEL et al., 1997).

Todos os CYP450 descritos contêm a ferroprotoporfirina IX como grupo prostético (Figura 5), a qual está inserida dentro das cadeias de polipeptídeos da proteína, com um sítio de ligação bem definido que confere acessibilidade específica ao substrato (MONTELLANO, 2004).

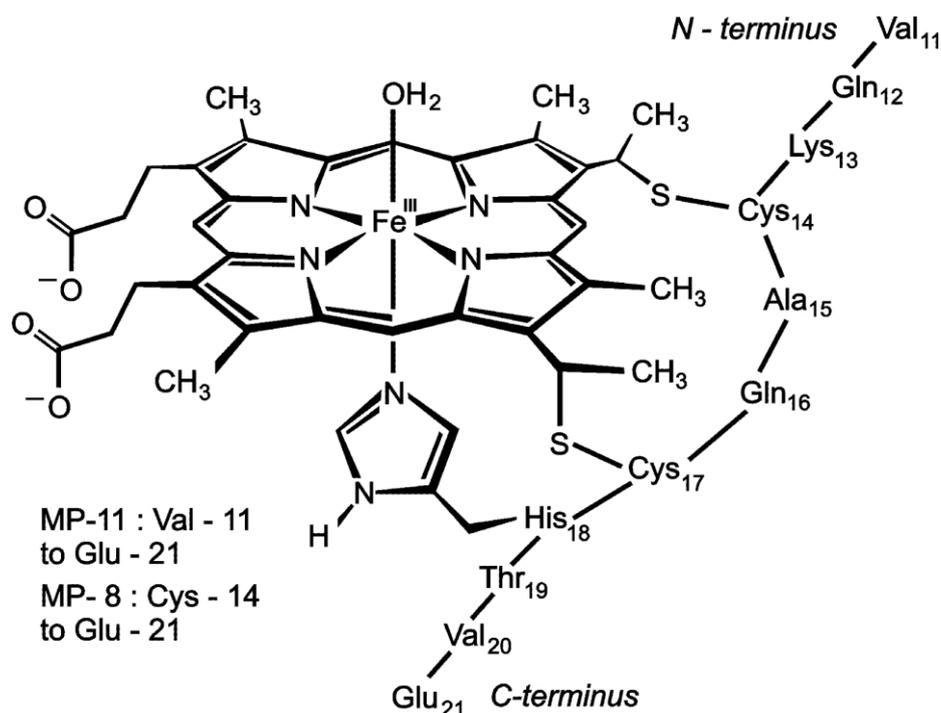


Figura 5. Ferroprotoporfirina IX na matriz protéica (VASHI & MARQUES, 2004).

O sítio ativo do CYP450 com a ferroprotoporfirina IX dentro de um ambiente protéico hidrofóbico é relativamente simples. O quinto sítio ativo de ligação do íon Fe^{III} central possui um enxofre de um resíduo de cisteína, responsável pela ligação do sítio ativo à enzima, e o sexto sítio está ligado a uma molécula de água. Quando é reduzido para o estado ferroso (Fe^{II}), a enzima pode fazer ligações com o oxigênio (O_2) e o monóxido de carbono (CO). O complexo com o monóxido de carbono tem absorção máxima em 450 nm, por esse motivo o CYP recebe o nome de citocromo P450 (GROVES, 1995; MONTELLANO, 2004; ZHANG et al., 2007).

O ciclo catalítico do CYP450 é desencadeado pela entrada do substrato no interior do sítio ativo deslocando a molécula de água ligada de forma axial (MEUNIER & BERNARDOU, 2002). As características do mecanismo do

CYP450 estão mostradas e descritas de acordo com a Figura 6 (MEUNIER & BERNARDOU, 2002; VINHADO, 2005).

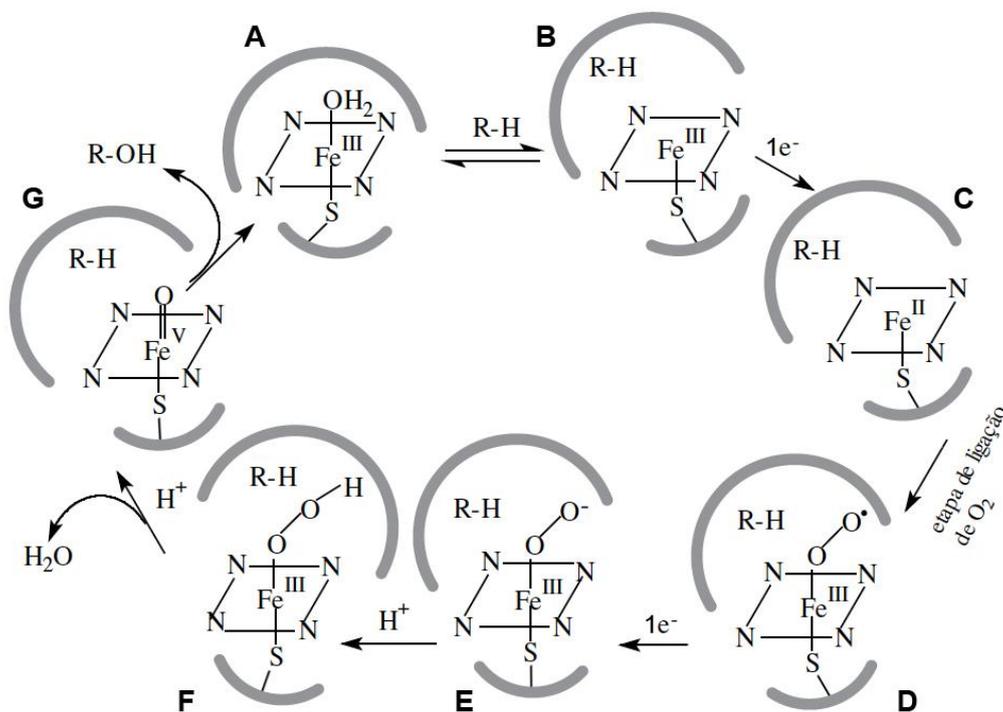


Figura 6. Ciclo catalítico do CYP450. Os semicírculos em cinza representam a proteína ao redor do sítio ativo (Adaptada de MEUNIER & BERNARDOU, 2002; VINHADO, 2005).

O substrato (R-H) na Figura 6 desloca o estado de equilíbrio energético do centro Fe^{III} para um nível de *spin* mais elevado, de modo a suportar a formação do aduto enzima-substrato. A entrada de R-H no sítio catalítico expulsa a molécula de H_2O (o sexto ligante) (etapa A para B). A seguir, a forma oxidada do P450 ($\text{P450-Fe}^{\text{III}}$) recebe um elétron do NADPH (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) levando à formação do complexo reduzido $\text{P450-Fe}^{\text{II}}$ (etapa B para C). O $\text{P450-Fe}^{\text{II}}$ reage então com O_2 (etapa C para D) formando $\text{P450-Fe}^{\text{III}}(\text{O-O}^\bullet)$, e, após a entrada de mais um elétron do NADPH, forma-se o nucleófilo estável $\text{P450-Fe}^{\text{III}}(\text{O-O}^-)$ (etapa D para E). O complexo peroxo $\text{P450-Fe}^{\text{III}}(\text{O-O}^-)$ é protonado formando o complexo hidropoxo $\text{P450-Fe}^{\text{III}}(\text{O-OH})$ (etapa E para F). A seguir, uma segunda protonação do átomo de oxigênio distal leva à saída de H_2O e à formação da espécie $\text{Fe}^{\text{V}}(\text{O})^+$ (etapa F para G). Ao final, o outro átomo de oxigênio é transferido para o R-H (substrato), havendo regeneração da enzima e início de

novo ciclo catalítico (etapa G para A) (MEUNIER & BERNARDOU, 2002; VINHADO, 2005).

A presença de múltiplas espécies oxidantes, como o complexo Fe^{III}-hidroperoxo, Fe^{III}-peroxo e Fe^V(O)⁺, pode explicar a notável versatilidade desta família de enzimas em uma ampla variedade de transformações catalisadas pelo CYP450 (DENISOV et al., 2005).

6.2. Enzimas do CYP450

As CYPs são proteínas de membrana localizadas no retículo endoplasmático (microsomas) das células, embora existam enzimas do CYP450 localizadas na mitocôndria celular, onde desempenham um importante papel na biossíntese de hormônios esteróides e no metabolismo da vitamina D (HAN et al., 2010).

As CYPs foram isoladas de vários tecidos de mamíferos (fígado, rins, intestino, pulmão e córtex adrenal), assim como de insetos, plantas, fungos e bactérias, e são conhecidas por catalisar reações de hidroxilação, epoxidação, N-, S- e O- desalquilação, N- e S- oxidação, sulfoxidação e desalogenação. Estas reações são essenciais no metabolismo de fármacos e xenobióticos (ISIN & GUENGERICH, 2007; ZHANG et al., 2007).

As enzimas do CYP450 são classificadas dentro de famílias e subfamílias, baseado nos dados genéticos conforme a similaridade da sequência de aminoácidos. Em uma dada família, pelo menos 40% da sequência de aminoácidos é idêntica, sendo a família indicada por números arábicos (1, 2, 3, etc). A sequência dentro de uma subfamília possui mais do que 55% de semelhança, sendo designada por letras (2A, 2B, 2C, etc). Finalmente, dentro de cada subfamília uma enzima tem mais do que 70% da sequência de aminoácidos idêntica, sendo designada com números arábicos como incremento. Então, por exemplo, CYP3A4 é o quarto membro da subfamília A e da família 3 (HAN et al., 2010). As enzimas P450 têm em comum uma estrutura terciária global, apresentando uma alta conservação da região central, apesar de possuírem similaridades menores que 20% em sua sequência de aminoácidos entre as diferentes famílias. Apesar de a estrutura

terciária ser altamente conservada, há diversidade estrutural suficiente para permitir a ligação de substratos de tamanhos diferentes para diferentes P450. Alguns P450 são altamente régio- e estéreo-específicos na oxigenação do substrato, enquanto outros, tais como o CYP3A4 do fígado humano, metabolizam cerca de 50% de todos os fármacos comercializados (DENISOV et al., 2005).

Muitos membros da superfamília do citocromo P450 são conhecidos e o número continua a crescer à medida que mais genomas são sequenciados (DENISOV et al., 2005). Os microsomas do fígado humano contêm mais de 35 enzimas do CYP450, onde a CYP3A4 é quantitativamente a mais abundante, representando 34% do total das CYPs hepáticas, a CYP1A2 representa 13%, a CYP2A6 5%, a CYP2D6 2%, a CYP2C9 17% e a CYP2E1 representa 15%. A CYP2D6, embora representando somente 2%, metaboliza 25% dos fármacos comercializados (HAN et al., 2010).

7. Modelos para o estudo de metabolismo

O crescente número de novas entidades químicas sob investigação nos últimos anos tem exigido técnicas rápidas de *screening* que fornecem informações confiáveis e de fácil acesso sobre a biotransformação de um candidato a fármaco. Por razões econômicas, é importante que este *screening* seja realizado na fase inicial para descartar candidatos a fármacos impróprios ainda no processo de desenvolvimento (LOHMANN & KARST, 2008).

No campo da investigação dos metabólitos gerados pela biotransformação são utilizados vários sistemas com o intuito de desenvolver modelos práticos capazes de prever o metabolismo de candidatos a fármacos e, eventualmente, produzir em larga escala metabólitos que apresentem uma síntese complicada. Os métodos variam desde experimentos *in vivo* com animais até o uso de frações subcelulares. Mais recentemente, modelos químicos que biomimetizam o CYP450 aparecem como uma alternativa para a redução do uso de animais.

A Figura 7 compara os diferentes métodos utilizados no estudo do metabolismo de acordo com a complexidade, transferabilidade dos resultados e praticabilidade.

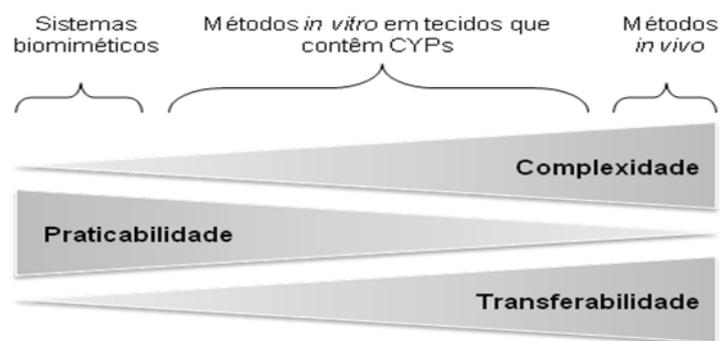


Figura 7. Correlação entre modelos biomiméticos, métodos *in vitro* utilizando tecidos que contêm CYPs e sistemas *in vivo* para investigação da metabolização de fármacos (LOHMAN & KARST, 2008).

7.1. Sistemas biológicos

Em relação aos sistemas biológicos, são realizados estudos *in vivo* ou *in vitro*. Os estudos *in vivo* envolvem a análise de metabólitos presentes no sangue, na urina e nas fezes de animais e humanos (LIM & LORD, 2002). Apesar de apresentarem resultados mais fidedignos, possuem desvantagens como o rendimento muito baixo de metabólitos e os maiores tempo de avaliação e custo quando comparados aos estudos *in vitro* (EKINS et al.; 2000).

Os estudos *in vitro*, por outro lado, permitem a geração de metabólitos em larga escala, o desenvolvimento de ensaios bioanalíticos para os metabólitos e a comparação do metabolismo entre diferentes espécies, pois a preparação é mais simples e rápida (EKINS et al., 2000; GRAAF et al., 2002), fornecendo informações científicas valiosas em estágios iniciais de desenvolvimento de um fármaco, a um custo razoável (CASTELL & GÓMEZ-LECHÓN, 1996).

As técnicas *in vitro* utilizadas no estudo do metabolismo podem ser divididas em duas categorias. A primeira é composta por técnicas que utilizam preparações de células intactas como hepatócitos e cortes de tecido hepático e a segunda, pelas frações subcelulares, as quais incluem os microsomas, o citosol e outras organelas celulares (EKINS et al., 2000).

7.1.1. Hepatócitos

Uma vez isolados, os hepatócitos podem ser mantidos em suspensão e, nesse caso, permanecem viáveis por apenas algumas horas, ou podem ser mantidos em cultura por no máximo 4 semanas. Os hepatócitos representam uma ótima ferramenta para analisar o perfil metabólico *in vitro* de uma variedade de fármacos. No entanto, tem sido observado que as culturas de hepatócitos estão sujeitas a uma perda gradual das funções específicas, em especial a redução da expressão das CYPs. Esta perda é diferente para isoformas específicas do CYP450: para algumas isoformas torna-se evidente após alguns dias de cultura (CYP2E1 e CYP3A4), enquanto que para outras permanece quase inalterada (CYP1A2 e CYP2C9) (BRANDON et al., 2003).

Uma vantagem dos hepatócitos isolados em relação aos cortes de fígado é a possibilidade de criopreservação. Hepatócitos criopreservados mantêm a atividade da maioria das enzimas de fase I e fase II (SILVA et al., 1999). Devido à criopreservação, hepatócitos podem ser viáveis por até quatro semanas (BRANDON et al., 2003). Alguns estudos, no entanto, afirmam que apenas 60% dos hepatócitos sobrevivem quando descongelados (WRIGHTON et al.; 1995).

7.1.2. Cortes de fígado

A incubação de fatias de fígado em meio nutritivo oferece uma poderosa ferramenta para o estudo de biotransformação *in vitro*. Este modelo necessita de cortadores de tecido de alta precisão para produzir fatias uniformes possibilitando resultados reprodutíveis. O tecido ressecado pode ser armazenado a 4 °C por até 48 h, sem perda de atividade enzimática. A duração da atividade das CYPs é curta, provavelmente devido à difusão diminuída de nutrientes e oxigênio na porção de tecido (BRANDON et al., 2003).

Na segunda categoria, estão as frações subcelulares que possuem vantagens tais como: facilidade de preparação, baixa quantidade de tecido hepático necessária, capacidade de reter a atividade enzimática quando armazenadas por longa duração e ampla caracterização das condições ótimas de incubação. As desvantagens encontram-se na característica de algumas

enzimas que, por serem mais lábeis, requerem cofatores que devem ser adicionados à incubação para substituir aqueles perdidos devido à diminuição da integridade celular durante a preparação da fração (EKINS et al.; 1999; GRAAF et al., 2002) e também por possuírem potência variada (CHORGADE et al., 1996).

7.1.3. Fração citosólica

A fração citosólica do fígado contém as enzimas de fase II, N-acetil transferase, glutatona S-transferase, e sulfotransferase (LOHMANN & KARST, 2008). A fração é obtida por centrifugação diferencial, como os microsomas. Para a atividade catalítica das enzimas de fase II são necessários vários cofatores. A principal vantagem é a presença de apenas três enzimas em concentrações mais elevadas. A capacidade de biotransformação das enzimas pode ser estudada separadamente ou em combinação, dependendo do cofatores adicionados. Uma desvantagem é que outras enzimas localizadas no retículo endoplasmático não podem ser estudadas e, portanto, as vias metabólicas não podem ser investigadas com este modelo (BRANDON et al. 2003).

7.1.4. Fração S9

A fração S9 do fígado contém as frações microsomal e citosólica (EKINS et al.; 1999). Semelhante aos microsomas, um sistema NADPH e cofatores são necessários para suprir a demanda de energia das enzimas do CYP450 e de fase II. As frações S9 oferecem uma representação mais completa do perfil metabólico, pois englobam as reações de fase I e II. A fração S9 tem sido usada desde a década de 1970, mas não de forma tão extensiva como os microsomas. Em alguns casos, alguns metabólitos não são vistos, pois a atividade enzimática global é inferior quando comparada aos microsomas e citosol isolados (BRANDON et al. 2003).

7.1.5. Microsomas

Até hoje, a maioria dos estudos de metabolismo de fármacos utilizam frações subcelulares, dentre as quais os microsomas são os mais utilizados por conterem as enzimas do CYP450 (EKINS et al.; 1999; STRNAD, 2000).

A grande disponibilidade de microsomas e sua simplicidade na utilização contribuem para a popularidade deste modelo *in vitro*. Microsomas hepáticos são vesículas do retículo endoplasmático do hepatócito e são preparados por centrifugação diferencial. Logo, contêm apenas enzimas do CYP450 e enzimas do sistema UGT (uridina-difosfato-glucoronil transferase). O sistema NADPH é necessário para suprir a demanda energética do CYP450 (BRANDON et al., 2003).

Modelos *in vitro*, entretanto, constituem uma simplificação de um organismo animal mais complexo (BERNADOU & MEUNIER, 2004) e devem ser empregados juntamente com os modelos *in vivo* de forma a fornecer informações complementares um ao outro, explorando-se sempre as vantagens que cada um tem a oferecer.

Estudos realizados com derivados acridínicos como a amsacrina demonstraram que estas moléculas são metabolizadas pelo sistema microsomal do tecido hepático de ratos. O metabolismo da amsacrina foi quantificado pelo seu desaparecimento em um sistema composto de microsomas, oxigênio, citosol (ou GSH) e sistema gerador NADPH. O metabolismo foi reduzido em aproximadamente 90% quando o sistema gerador NADPH, microsomas ou citosol foram omitidos da mistura de incubação, confirmando o envolvimento da amsacrina com o sistema microsomal. O estudo *in vitro* também possibilitou a identificação dos seus metabólitos, *m*-AQDI e *m*-AQI (SHOEMAKER et al., 1984).

REID e colaboradores (2004) avaliaram o metabolismo *in vitro* de outro derivado acridínico, a pirazoloacridina (PZA), empregando microsomas de fígado de camundongo e humano. A reação de oxidação gerou três metabólitos, 9-desmetil-PZA, *N*-demetil-PZA e *N*-óxido-PZA, identificados por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (EC-EM) (REID et al., 2004).

7.2. Sistemas biomiméticos de metabolismo oxidativo

Devido às dificuldades e problemas associados ao uso de sistemas biológicos em estudos de metabolismo, sejam eles realizados com animais experimentais inteiros ou com órgãos isolados, bem como em função da dificuldade de isolamento dos metabólitos formados, na maioria das vezes hidrofílicos, alguns autores tem sugerido na literatura o uso de modelos biomiméticos da atividade das enzimas do CYP450 (CHORGHAE et al., 1996; BERNADOU & MEUNIER, 2004; LOHMAN & KARST, 2008; SCHAAB et al., 2010).

Os sistemas biomiméticos fornecem informações importantes como mecanismo e possíveis rotas do metabolismo de fármacos. Estes modelos são análogos sintéticos que reproduzem uma ou mais propriedades significativas de um sítio ativo de uma proteína. O análogo sintético não pode simular os efeitos ambientais e impedimentos estéricos impostos pela conformação das proteínas, o que pode ser considerado uma vantagem, pois eles refletem as propriedades intrínsecas do sítio de coordenação não modificado pelo meio da proteína. O análogo reproduz a reação catalítica que transforma substrato em produto, como faz a enzima, mesmo que a diferentes velocidades e não necessariamente com a mesma estereoquímica. Portanto, deve-se ter em mente que os modelos análogos dão alguma idéia dos possíveis mecanismos, delimitando os caminhos da reação, no entanto, o mecanismo enzimático pode ser desenvolvido somente pela própria enzima (HOLM & SOLOMON, 2004).

Os sistemas biomiméticos, puramente químicos, apresentam algumas vantagens em relação aos sistemas biológicos, tais como: levam à formação de diversos produtos, são fáceis de operar e podem produzir quantidades suficientes para o isolamento e identificação dos mesmos metabólitos originados *in vivo*; dependendo da quantidade obtida, os metabólitos gerados podem ser empregados em testes farmacológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*; metabólitos instáveis podem ser identificados e algumas vezes isolados sob condições de reação controladas e conseqüentemente, o número de animais experimentais pode ser bastante reduzido (BALOGH & KESERU, 2004).

O progresso da pesquisa nas três últimas décadas tem desenvolvido diversos sistemas biomiméticos capazes de reproduzir as reações de oxidação,

hidroxilação e oxigenação mediadas pelo CYP450, estimulando o desenvolvimento de catalisadores de baixo custo que sejam eficientes e estáveis o suficiente para tornarem-se competitivos nos processos em larga escala (NAZARI et al., 2005).

7.2.1 Modelos biomiméticos do citocromo P450: metaloporfirinas sintéticas e complexos salen

Visando compreender o mecanismo das oxidações mediadas pelo CYP450, na década de 1970 surgiu um campo de pesquisa em catálise oxidativa utilizando metaloporfirinas sintéticas (LOHMANN & KARST, 2008). As metaloporfirinas são análogas ao grupo prostético de enzimas contendo o grupo heme, as quais catalisam seletivamente várias reações de oxidação com o mesmo metal de transição (ferro) e o mesmo ligante (protoporfirina IX). O controle da atividade catalítica dessas enzimas heme, em termos de especificidade de substrato, quimiosseletividade, ativação do agente oxidante ou razão de oxidação não se deve apenas ao metal ou ao ligante tetrapirrol, mas também a toda estrutura da proteína (SCHEID, 2009).

Como o centro ativo no CYP450 contém ferro, os complexos de ferro são mais comumente utilizados, embora o manganês também seja aplicado nestes sistemas (BERNADOU & MEUNIER, 2004).

A enzimas do CYP450 utilizam a molécula de oxigênio como o doador de átomo de oxigênio e o sistema biomimético faz uso de outros doadores de oxigênio como hipoclorito de sódio (NaOCl), iodosilbenzeno (PhIO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), terc-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH) ou ácido 3-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA) (LOHMANN & KARST, 2008; NASR-ESFAHANI et al., 2009).

Metaloporfirinas são capazes de catalisar uma ampla gama de reações mediadas pelo CYP450, incluindo epoxidação, hidroxilação aromática e alifática e oxidação de heteroátomos. A maioria dos experimentos utilizando metaloporfirinas são voltados para a oxidação de compostos orgânicos com apenas um grupo funcional, a fim de estudar um mecanismo de oxidação específico. Muito menos esforços têm sido empregados para simular a oxidação de moléculas mais complexas com uma gama de funcionalidades,

tais como os fármacos (LOHMANN & KARST, 2008). No entanto, alguns fármacos têm sido oxidados por sistemas biomiméticos do CYP450 envolvendo metaloporfirinas. Estes estudos têm mostrado que, apesar das limitações dos modelos, geralmente os mesmos metabólitos observados *in vivo* são produzidos (BERNADOU & MEUNIER, 2004), auxiliando no entendimento do metabolismo pelo CYP450. Entre os exemplos de estudos com sistemas biomiméticos que resultaram em metabólitos semelhantes aos obtidos *in vivo* pode-se citar a lidocaína (CARRIER et al., 1993), o praziquantel (MELO et al., 2005) e o acetaminofeno (VIDAL et al., 1993). SANTOS e colaboradores também estudaram modelos metaloporfirínicos na oxidação da cloroquina. Nesse estudo, vários metabólitos foram identificados, incluindo aqueles observados nos sistemas *in vivo* (SANTOS et al., 2005).

Apesar de serem os modelos mais fidedignos do CYP450, os catalisadores metaloporfirínicos apresentam algumas desvantagens que impedem sua utilização em larga escala, como a difícil síntese e purificação, o que aumenta consideravelmente seu custo, e a atividade catalítica que não atinge os níveis necessários para sua utilização industrial. Sendo assim, os catalisadores metaloporfirínicos possuem maior potencial de aplicação na química fina e em estudos biomiméticos de mecanismos (MACLEOD, 2008).

Paralelamente à química das metaloporfirinas, o uso do ligante salen como catalisador de reação de ativação do oxigênio foi investigado, devido às características similares às metaloporfirinas: estrutura eletrônica e atividade catalítica (KATSUKI, 1995). No entanto, os dois complexos diferem quanto à estrutura química (Figura 8). O complexo salen com ligante tetradentado consiste de 2 nitrogênios e 2 oxigênios ao invés de 4 nitrogênios, como no caso das metaloporfirinas. Uma diferença significativa entre os catalisadores salen e as metaloporfirinas é a facilidade de síntese do primeiro, que apresenta rendimento superior a 90% e a elevada estabilidade, conseqüentemente estes complexos dificilmente sofrem degradação oxidativa sob condições normais (BOTTCHEER et al., 1996).

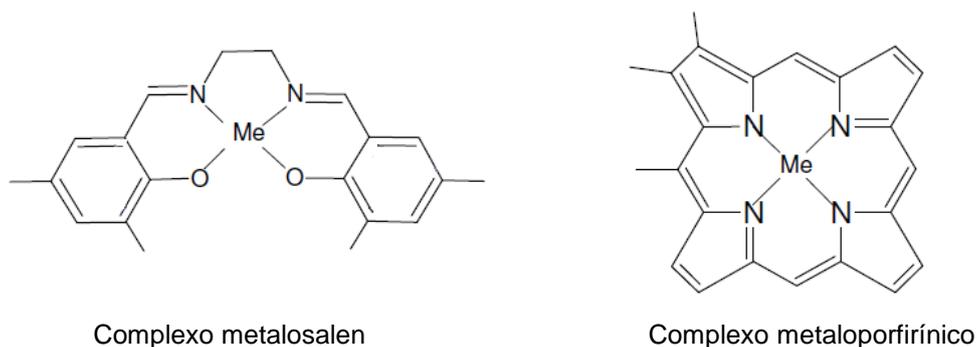


Figura 8. Estrutura química da metaloporfirina e do complexo de salen.

Uma grande diversidade de complexos salen com Cr^{III} , Mn^{III} e Fe^{III} foram sintetizados e estudados. Os $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{salen})$ alcançaram aproximadamente 2/3 da atividade catalítica dos melhores catalisadores metaloporfirínicos em reações de epoxidações e hidroxilações (BOTTCHEER et al., 1996) e imitaram a atividade das enzimas oxigenases do CYP450 catalisando a oxigenação de sulfetos orgânicos (SIVASUBRAMANIAN et al., 2002), enquanto os complexos contendo Mn^{III} , utilizados na epoxidação de olefinas com uma variedade de oxidantes, forneceram um método extremamente versátil e altamente enantiosseletivo para a síntese orgânica, mostrando-se superiores aos seus análogos porfirínicos, atraindo considerável atenção nos estudos que biomimetizam o CYP450. Complexos de $\text{Cr}^{\text{III}}(\text{salen})$ têm sido amplamente utilizados como catalisadores de transformações oxidativas de uma variedade de substratos orgânicos (VENKATARAMANA et al., 2005). Estes exemplos comprovam o potencial de aplicabilidade destes catalisadores.

Um complexo muito estudado é o chamado catalisador de Jacobsen, que é essencialmente um complexo quiral de $\text{Mn}(\text{salen})$ contendo grupos *terc*-butil nas posições 3,3', 5 e 5' e um substituinte cicloexano nos carbonos C1'' e C2'' (Figura 9) (MACLEOD, 2008). Este catalisador possui a capacidade de converter olefinas não quirais a epóxidos quirais com um excesso enantiomérico maior que 90 % (JACOBSEN et al., 1991). Outro exemplo é mostrado por SENANAYAKE e colaboradores (1996) que utilizaram o catalisador de Jacobsen para preparar o epóxido indeno com excesso enantiomérico de 88 %, que é um precursor do indinavir, utilizado como inibidor da protease do vírus da imunodeficiência humana.

A grande vantagem do catalisador de Jacobsen é a sua simplicidade de preparação, podendo ser sintetizado em larga escala (na ordem de quilogramas) com baixo custo. As reações utilizam pequenas quantidades do catalisador em relação ao substrato e o oxidante geralmente é de baixo custo, o que é essencial para a indústria (MACLEOD, 2008).

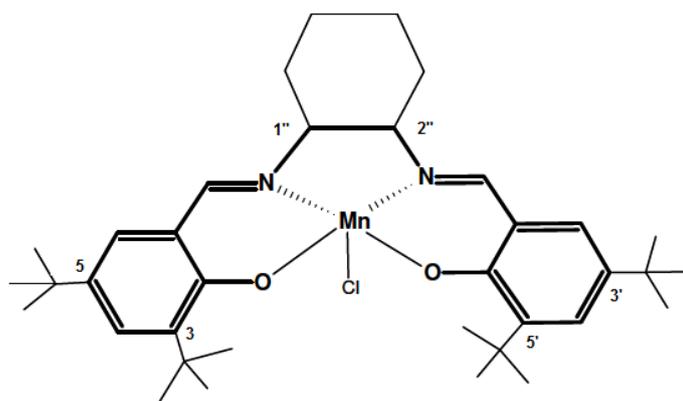


Figura 9. Estrutura química do catalisador de Jacobsen (Cloreto de N,N'-bis(3,5-di-*t*-butilsalicilideno)-1,2-diaminocicloexil manganês (III)).

Embora existam muitos outros exemplos utilizando o catalisador de Jacobsen para epoxidação assimétrica aplicada na indústria farmacêutica e para preparação de intermediários utilizados na síntese de medicamentos, são encontrados poucos estudos do metabolismo de fármacos utilizando este complexo. Um dos trabalhos realizado por MACLEOD e colaboradores (2008) utilizou o Mn(salen) no metabolismo do anticonvulsivante primidona, formando os seus dois principais metabólitos, a feniletilmalondiamida e o fenobarbital, também formados pelo CYP450 (CPY2C9/19). Nesse trabalho os autores também testaram três diferentes oxidantes (*m*-CPBA, *t*-BOOH e H₂O₂), onde o *m*-CPBA foi o que proporcionou um maior rendimento na formação dos metabólitos. Outro trabalho, realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, mostrou a oxidação seletiva do anticonvulsivante carbamazepina, catalisada por Mn(salen), formando o seu principal metabólito, a carbamazepina-10,11-epóxido (MACLEOD et al., 2007).

Esses estudos recentes estimulam a utilização desses catalisadores na investigação da metabolização de candidatos a fármacos. Entretanto, para obter êxito, estudos devem ser conduzidos combinando catalisadores

modulados com grupos substituintes eficientes, oxidantes e condições reacionais adequadas que possam permitir a obtenção de altos rendimentos.

Uma vez que o AC04 demonstrou interessante atividade antitumoral nos estudos farmacodinâmicos *in vivo* e *in vitro* e considerando a importância dos estudos de farmacocinética pré-clínica durante o desenvolvimento de fármacos visando obter informações necessárias para os estudos clínicos de Fase 1, esta dissertação está organizada em dois capítulos.

O primeiro capítulo aborda a avaliação do metabolismo do candidato AC04 através de modelos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados obtidos permitiram a redação do artigo intitulado “Metabolism evaluation of the anticancer AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes”. O segundo capítulo inclui a avaliação farmacocinética do candidato AC04 e do seu metabólito 1-oxo-AC04 obtido na primeira parte desse trabalho. O conjunto de resultados possibilitou a redação do artigo intitulado “Pre-Clinical Pharmacokinetic and Metabolism Investigation of the Acridine Antitumor Candidate AC04”.

CAPÍTULO 1

Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by
biomimetic oxidative model and rat liver microsomes

Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes

Maiara Cássia Pigatto^a, Maria do Carmo Alves de Lima^b, Suely Lins Galdino^b, Ivan da Rocha Pitta^b, Ricardo Vessecchi^c, Marilda das Dores Assis^d, Joicy Santamalvina dos Santos^d, Teresa Dalla Costa^a, Norberto Peporine Lopes^c

^a*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS 90.610-000, Brazil*

^b*Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, PE 50670-901, Brazil*

^c*Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticas (NPPNS), Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, SP 14040-903, Brazil*

^d*Departamento de Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, SP 14040-901, Brazil*

Abbreviations

Cytochrome P450 (CYP450), 5-acridin-9-ylmethylene-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (AC04), 5-acridin-9-ylmethylene-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione 1-oxide (1-oxo-AC04), liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), hydrogen peroxide (H₂O₂), 3-chloroperoxybenzoic acid (*m*-CPBA), potential electrostatic map (MEP), multiple-reaction monitoring (MRM), internal standard (IS), thin layer chromatography (TLC), ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR), proton affinities (PA), gas-phase basicities (GB), intravenous (i.v.), new chemical entity (NCE)

Abstract

Jacobsen reagents, in the presence of monooxygen donors, appear as an alternative to produce metabolites from biological active compounds. This reaction may mimic the oxidation and oxygenation reactions of cytochrome P450 (CYP450) enzymes upon various drugs and biologically active compounds. Acridines represent a well known group of polyaromatic compounds capable of acting as DNA intercalating agents. Viewing to search for new anticancer agents, one promising new acridine, the 5-acridin-9-ylmethylene-3-(4-methyl-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (AC04) (**2**), has been studied by our group and the *in vitro* metabolism was investigated in this work, aiming to advance in the pre-clinical pharmacokinetic investigation. A systematic investigation of the gas phase reaction, supported by computational chemistry, of the AC04 (**2**) was studied to help the structure elucidation of possible *in vivo* metabolites. To confirm the methodology, the oxidized product was obtained in large scale for NMR analysis and the data confirmed the structure. In addition, AC04 (**2**) was submitted to an *in vitro* metabolism assay employing rat liver microsomes and also, a pilot study was conducted in rats after AC04 intravenous (i.v.) dosing of 1.5 mg/kg. A single oxidized product was obtained from microsomal metabolism and detected in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis corresponding to the same product formed by Jacobsen-catalyzed reaction. These results indicate that Jacobsen oxidation reactions, combined to *in vitro* metabolism assays employing isolated microsomes, could replace some *in vivo* metabolism studies, thus reducing the use of animals in new chemical entities pre-clinical investigation.

Keywords: AC04, antitumor candidate, oxidative metabolism, liver microsomal metabolism

CAPÍTULO 2

Pre-Clinical Pharmacokinetic and Metabolism Investigation
of the Acridine Antitumor Candidate AC04

**Pre-Clinical Pharmacokinetic and Metabolism Investigation of the
Acridine Antitumor Candidate AC04**

Maiara Cássia Pigatto^{1,2} , Flávia De Toni Uchôa² , Bruna Torres^{1,2}, Sandra Haas^{1,2}, Maria do Carmo Alves de Lima³, Suely Lins Galdino³, Ivan da Rocha Pitta³, Norberto Peporine Lopes⁴, Teresa Dalla Costa^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

²Centro Bioanalítico de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

³Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil;

⁴Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticas (NPPNS), Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, SP, Brazil

Abstract

Purpose AC04 is an acridine derivative with high activity against solid tumors in mice. The goal of this work was to investigate the pharmacokinetics and tissue distribution of AC04 as well as its 1-oxo-AC04 metabolite disposition in Wistar rats.

Methods After a single AC04 1.5 mg/kg i.v. *bolus* dose blood samples were taken from lateral tail vein up to 120 h. AC04 and metabolite were separated from plasma by deproteinization and quantified by previously validated LC-MS/MS method. Plasma protein binding was determined by ultrafiltration. AC04 tissue disposition was evaluated after the same i.v. *bolus* dose.

Results A two-compartment open model provided the best fit for AC04 individual concentration-time profiles showing CL_{tot} of 3.4 ± 3.4 L/h/kg, Vd_{SS} of 137.9 ± 91.4 L/kg, $AUC_{0-\infty}$ of 788 ± 483 ng·h/mL and a $t_{1/2}$ of 45.5 ± 31.5 h. Plasma protein binding was $98.1 \pm 1.6\%$. AC04 distribution into different organs showed a higher penetration in lung, spleen and liver, with AUC_{0-t} of 798443, 263211 and 303722 ng·h/mL, respectively. The 1-oxo-AC04 metabolite represented 10% of the parent drug concentration of plasma, showing a $t_{1/2}$ of 23.2 ± 10.4 h.

Conclusions These results suggest that despite the small free plasma fraction, AC04 is capable of crossing extensively and reach high concentrations at most tissues residing for a long time, which is important for its activity on solid tumors. The drug is metabolized forming 1-oxo- AC04. All results combined indicate that AC04 is potentially a good antitumor candidate.

Keywords: AC04, antitumor candidate, pre-clinical pharmacokinetics, 1-oxo-AC04 metabolite disposition

DISCUSSÃO GERAL

O câncer é a segunda doença mais frequente da atualidade e de difícil cura em alguns casos. Um dos principais métodos de tratamento do câncer é a quimioterapia, sendo que a maioria dos fármacos utilizados são citotóxicos e visam a morte celular, interferindo no funcionamento do DNA da célula. Fármacos citotóxicos podem causar sérios efeitos colaterais, pois não atuam unicamente nas células cancerosas, uma vez que as diferenças entre células saudáveis e cancerosas são muito sutis. Nesse contexto, o grande desafio da terapia antitumoral continua sendo a descoberta de novos fármacos mais potentes, seletivos e seguros.

A química medicinal na área de agentes antitumorais tem usado a citotoxicidade como alvo de intensos estudos, podendo-se destacar fármacos que utilizam como sítio de ação a tubulina e as DNA-topoisomerasas I e II (KUFÉ et al., 2003). Neste cenário, o candidato a antitumoral AC04 surge como uma molécula promissora tendo como sítio de ação o DNA e as topoisomerasas e tendo apresentado excelente atividade anticancerígena em modelos murinos.

Visando avançar na investigação farmacológica pré-clínica do derivado acridínico AC04, o presente trabalho objetivou o estudo farmacocinético e do metabolismo *in vitro* e *in vivo* desse composto, visando obter informações necessárias para o futuro estabelecimento de ensaios clínicos.

Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos atualmente buscando determinar o papel do CYP450 no metabolismo de fármacos em fase de desenvolvimento. As metaloporfirinas, sistemas biomiméticos do CYP450, têm se destacado como excelentes modelos em fases iniciais da investigação de metabólitos tendo como vantagem, em relação aos métodos clássicos, a não utilização de animais. Entretanto, poucos trabalhos têm utilizado os complexos de salen com a mesma função das metaloporfirinas. Considerando que os complexos de salen possuem algumas vantagens como custo e facilidade de síntese, um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar a capacidade de um dos catalisadores de salen em mimetizar o CYP450 no metabolismo do AC04.

Nas reações de oxidação através do catalisador de Jacobsen foram empregadas diferentes condições a fim de se obter um maior rendimento do metabólito. Os resultados mostraram que, no sistema empregado, o maior rendimento foi obtido quando se utilizou o *m*-CPBA como oxidante, o acetato

de etila como solvente e a razão molar substrato:oxidante:catalisador de 1:150:30. A identificação do metabólito obtido na reação de oxidação foi realizada com auxílio da análise por IES-EM/EM, com base nos resultados experimentais e teóricos. Os dados sugerem que a oxidação ocorre na molécula de enxofre do AC04 e a estrutura foi confirmada juntamente com os dados de RMN de prótons.

Com o objetivo de estabelecer uma correlação entre o sistema químico biomimético e o sistema biológico utilizados no estudo do metabolismo, o AC04 foi submetido ao metabolismo *in vivo* através da administração em ratos Wistar pela via intravenosa e ao metabolismo *in vitro* empregando microsomas de fígado de ratos. Na análise por CLAE-EM/EM dos estudos *in vitro* e *in vivo*, observou-se a formação do metabólito 1-oxo-AC04, correspondendo ao mesmo composto formado nas reações de oxidação química (1-oxo-AC04, m/z 427).

Os resultados deste estudo revelaram que o catalisador de Jacobsen mostrou ser um bom modelo na oxidação do AC04, podendo substituir alguns estudos do metabolismo *in vivo* e dessa forma reduzindo o número de animais utilizados na pesquisa. Este modelo também pode ser empregado para sintetizar o metabólito e fornecer amostras para estudos farmacológicos e toxicológicos, visando à ampla elucidação do metabolismo deste candidato a antitumoral.

Na seqüência dos estudos, avaliou-se tanto o perfil farmacocinético plasmático do AC04 e do 1-oxo-AC04, visando determinar os parâmetros que descrevem a disposição da droga e seu metabólito no organismo, quanto a distribuição da droga em diferentes órgãos e tecidos do organismo, uma vez que a penetração tecidual é fundamental para a ação de antitumorais.

O perfil farmacocinético do AC04 após administração i.v *bolus* da dose 1,5 mg/kg a ratos Wistar foi adequadamente descrito pelo modelo aberto de dois compartimentos, resultando na determinação de $t_{1/2}$ longo, em torno de 45 h, um grande V_{dSS} de $137,9 \pm 91,4$ L/kg, e um CL_{tot} de $3,44 \pm 3,4$ L/h/kg. A ligação do AC04 a proteínas plasmáticas é elevada, provavelmente devido à lipofilia do composto, ficando em torno de 98%.

A análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos obtidos por abordagem compartimental e não-compartimental não mostrou diferença

significativa ($\alpha = 0,05$), comprovando que o modelo matemático escolhido foi adequado para descrever os dados experimentais.

A distribuição do AC04 foi avaliada em diferentes tecidos (cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rim e tecido adiposo) após administração de dose única i.v. *bolus* de 1,5 mg/kg. O AC04 apresentou ampla e rápida distribuição para os tecidos. A alta lipofilia do composto sugere que a perfusão nos tecidos é o passo limitante para o processo de distribuição, resultando em uma lenta eliminação em órgãos de baixa perfusão. Os picos de concentração no pulmão, fígado, baço, coração e rins foram alcançados entre 5 minutos e 1 hora após administração.

As maiores concentrações teciduais do AC04 foram observadas no pulmão em comparação com os outros tecidos investigados. Como o AC04 é uma molécula com características lipofílicas, esta propriedade físico-química poderia justificar a alta penetração pulmonar. Uma segunda explicação para a alta razão tecido/plasma observada nos pulmões poderia ser a presença de sangue nos pulmões durante a retirada do órgão, devido à alta perfusão desse órgão, que estaria mascarando os níveis reais determinados no homogeneizado de tecido.

A prolongada fase de eliminação observada para o AC04, com uma meia-vida de 45 h, está relacionada com a eliminação da droga dos tecidos, especialmente fígado, pulmão, baço e tecido adiposo. O pico de concentração no tecido adiposo (compartimento periférico) foi somente alcançado em 72 horas após a administração da droga, demonstrando que a gordura é o provável tecido de acumulação e, por razões de segurança, estudos complementares devem ser realizados para evitar uma toxicidade tardia com o uso continuado dessa droga.

A baixa razão tecido/plasma observada no cérebro leva à conclusão de que a penetração cerebral do AC04 é muito baixa. Considerando que a barreira hematoencefálica atua como uma barreira ao transporte de moléculas para dentro do cérebro, devido à bomba de efluxo ATP-dependente como a P-gp, pode-se supor que o AC04 é um substrato da mesma. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Considerando os resultados do perfil farmacocinético do metabólito em ratos, observou-se que este produto é formado em pequenas quantidades,

representando aproximadamente 10% da concentração do AC04, calculada pela razão entre as ASCs do metabólito e do AC04, assumindo-se volumes de distribuição similares do composto e do seu metabólito. Embora as médias dos tempos de meia-vida do AC04 ($45,5 \pm 31,5$ h) e do seu metabólito ($23,2 \pm 10,4$ h) pareçam ser diferentes, não houve diferença estatística entre eles ($\alpha = 0.05$). Deve-se investigar se 1-oxo-AC04 contribui para a atividade do AC04 ou se ele é potencialmente tóxico.

O conjunto de resultados da investigação farmacocinética do AC04 em ratos mostrou que a droga se distribui amplamente nos tecidos, exceto o cérebro e que possui uma meia-vida extensa, acumulando-se no fígado, pulmão, baço e tecido adiposo. A ampla acumulação e o elevado tempo de meia-vida são características importantes para ação dessa droga em tumores sólidos. Estas conclusões, associadas aos resultados farmacodinâmicos, mostram o grande potencial deste composto como um novo agente antitumoral, cuja investigação deve ser continuada.

CONCLUSÕES

Os estudos de farmacocinética e metabolismo do candidato a fármaco antitumoral AC04 possibilitaram concluir que:

- O catalisador biomimético de Jacobsen levou à formação do mesmo produto de oxidação observado com o uso de preparação microsomal de fígado de ratos e *in vivo*, após administração do AC04, identificando (IES-EM, IES-EM/EM e ¹H RMN) o metabólito como sendo 1-oxo-AC04;
- O perfil farmacocinético plasmático do AC04 após administração i.v. *bolus* na dose de 1,5 mg/kg foi adequadamente descrito pelo modelo aberto de 2 compartimentos, sendo que a droga se distribui rápida e amplamente nos tecidos (pulmão, fígado, baço, rim, coração e tecido adiposo), com elevado volume de distribuição e baixa depuração, levando a uma meia-vida de eliminação alta;
- O 1-oxo-AC04 formado *in vivo* atinge baixas concentrações plasmáticas, sendo eliminado com uma meia-vida de $23,2 \pm 10,4$ h.
- O conjunto de resultados obtidos indica que o AC04 apresenta um comportamento farmacocinético adequado, que provavelmente contribui para a atividade observada previamente em modelos murinos de tumores sólidos, sendo recomendada a continuação de sua investigação pré-clínica com vistas a subsidiar estudos clínicos futuros.

REFERÊNCIAS

ADAMS, A. Crystal Structure of the Topoisomerase II Poison 9-Amino-[N-(2-dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide Bound to the DNA Hexanucleotide d(CGTCAG)₂. *Biochemistry*, v. 38, p. 9221–9233, 1999.

ALBERT, A. *The acridines: Their preparation, physical, chemical, and biological properties and uses*. Hardcover Book, London, 1951.

ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, p. 61-75, 2010.

ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. DNA Intercalators and Topoisomerase Inhibitors. In: AVENDAÑO, C. & MENÉNDEZ, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier B.V. 2008.

BAGHERI-YARMAND, R. Etk/Bmx tyrosine kinase activates Pak1 and regulates tumorigenicity of breast cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, v. 3, p. 29403-9, 2001.

BAGULEY, B. C.; Brief history of cancer chemotherapy. In: BAGULEY, B. C.; KERR, D.J. *Anticancer drug development*, C. 1; San Diego: Academic Press, 2002.

BALOGH, G. T.; KESERU, G. M. Metalloporphyrin mediated biomimetic oxidations. A useful tool for the investigation of cytochrome P450 catalyzed oxidative metabolism. *Arkivoc*, v. 7, p. 124-139, 2004.

BARACAT, F.F., FERNANDES JR, H.J., SILVA, M.J. *Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar*. São Paulo. Editora Roca, 2002.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, Artmed Ed. Ltda: Porto Alegre, 2001.

BERG, S. L. et al. Pharmacokinetics of Pyrazoloacridine in the Rhesus Monkey. *Cancer Research*, v. 51, p. 5467-5470, 1991.

BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Biomimetic Chemical Catalysts in the Oxidative Activation of Drugs. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 346, p. 171–184, 2004.

BÖTTCHER, A. Aerobic oxidation of hydrocarbons catalyzed by electronegative iron salen complexes. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 113, p. 191-200, 1996.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro.

BURRES, N.S. et al. Antitumor activity and nucleic acid binding properties of dercitin, a new acridine alkaloid isolated from a marine *Dercitus* species sponge. *Cancer Research*, v. 49, p. 5267-5274, 1989.

CARRIER, M. N.; BATTIONI, P.; MANSUY, D. Studying drug metabolic oxidation with biomimetic metalloporphyrin systems - problems and solutions in the case of lidocaine. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, v. 130, p. 405-416, 1993.

CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (Eds). *In vitro methods in pharmaceutical research*. Amsterdam: Academic Press, 1996. 467 p.

CHILIN, A. et al. Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: The critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 523-529, 2009.

CHORGHADE, M. S.; HILL, D. R.; LEE, E. C.; PARIZA, R. J. Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 enzymes. *Pure and Applied Chemistry*, v. 68, p. 753-756, 1996.

CHOURPA, I.; MANFAIT, M. Specific molecular interactions of acridine drugs in complexes with topoisomerase II and DNA. SERS and resonance Raman study of m-AMSA in comparison with o-AMSA. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 26, p. 813–819, 1995.

DANAEI, G. et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, v. 366, p. 1784–1793, 2005.

DEMEUNYNCK, M.; CHARMANTRAY, F.; MARTELLI, A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, v. 7, p. 1703-1724, 2001.

DENISOV, I. G. et al. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chemical Reviews*, v. 105, p. 2253-2277, 2005.

DENNY, W. A.; The contribution of synthetic organic chemistry to anticancer drug development in anticancer drug development. In: BAGULEY, B. C.; KERR, D.J. *Anticancer drug development*, C. 1; San Diego: Academic Press, 2002.

DI GIORGIO, C. In vitro activities of 7-substituted 9-chloro and 9-amino-2-methoxyacridines and their bis- and tetra-acridine complexes against *Leishmania infantum*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 47, p. 174-180, 2003.

EKINS, S. et al. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, n. 1, p. 313-324, 2000.

EKINS, S.; MAENPAA, J.; WRIGHTON, S. A. In vitro metabolism: subcellular fractions. In: T. F. Woolf (Ed.), *Handbook of drug metabolism*, New York: Marcel Dekker, p. 363-399, 1999.

FERNANDEZ-METZLER, C. L. et al. Rapid liquid chromatography with tandem mass spectrometry-based screening procedures for studies on the biotransformation of drug candidates. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 27, p. 32-40, 1999.

FINLAY, G. J.; RIOU, J.F.; BAGULEY, B.C. From Amsacrine to DACA (N-[2-(Dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide): Selectivity for Topoisomerases I and II Among Acridine Derivatives. *European Journal of Cancer*, v. 32A, n. 4, pp. 708-714, 1996.

FRANK, S. A. *Dynamics of Cancer: Incidence, Inheritance, and Evolution*; Princeton: Princeton University Press; 2007.

GARÓFOLO, A. et al. Diet and cancer: an epidemiological view. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, 2004.

GRAAF, A. M. et al. Comparison of in vitro preparations for semi-quantitative prediction of in vivo drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 30, p. 1129-1136, 2002.

GROVES, J. T. Reactivity and mechanisms of metalloporphyrin-catalyzed oxidations. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 4, p. 350-352, 2000.

HAJBI, Y. et al. Synthesis and biological activities of new furo[3,4-b]carbazoles: Potential topoisomerase II inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 5428-5437, 2010.

HAN, C.; DAVIS, C. B.; WANG, B. *Evaluation of Drug Candidates for Preclinical Development*. Pharmacokinetics, Metabolism, Pharmaceutics and Toxicology, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2010.

HEVÉR, A. Effect of new thioacridine derivatives on P-gp function and on mdrl gene expression. *Anticancer Research*, v. 18, p.3053-3058, 1998.

HICKS, K. O. et al. Extravascular Transport of the DNA Intercalator and Topoisomerase Poison N-[2-(Dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (DACA): Diffusion and Metabolism in Multicellular Layers of Tumor Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 297, p.1088–1098, 2001.

HOLM, R. H.; SOLOMON, E. I. Preface: Biomimetic Inorganic Chemistry. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 2, 2004.

HSIAO, C. J. et al. WRC-213, an L-methionine-conjugated mitoxantrone derivative, displays anticancer activity with reduced cardiotoxicity and drug resistance: Identification of topoisomerase II inhibition and apoptotic machinery in prostate cancers. *Biochemical Pharmacology*, v. 75, p. 847-856, 2008.

HUANG, Y. B. et al. Highly sensitive analysis of the anti-tumor agent 1-[4-(furo[2,3-b]-quinolin-4-ylamino)phenyl]ethanone in rat plasma by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 38, n. 3, p. 551-555, 2005.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Química Nova*, v. 33 n. 10, 2010.

ISIN, E. M.; GUENGERICH, F. P. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, p. 314–329, 2007.

JACOBSEN, E. N. et al. Highly Enantioselective Epoxidation Catalysts Derived from 1,2-Diaminocyclohexane. *Journal of the American Chemical Society*, v. 113, p. 7063–7064, 1991.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. A célula Cancerosa. In: *A Célula Biologia Celular e Molecular*, 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 16, p. 292-303.

KARP, G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. Tradução Maria Dlava Cesário et al. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2005.

KATSUKI, T. Catalytic asymmetric oxidations using optically active (salen) manganese (III) complexes as catalysts. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 140, p. 189-214, 1995.

KUFE, D. W. et al. (editors) Ed. 6. *Cancer Medicine*, Hamilton (Canada): BC Decker, 2003.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. *Gann Japanese Journal of Cancer Research*, v. 73, p.85-90, 1982.

LEITE, L.F.C. C. et al. Docking Studies of Acridines with Anticancer Activity. In: III Simpósio Brasileiro em Química Medicinal (BrazMedChem), São Pedro-SP, 2006.

LIM, C.; LORD, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, p. 547-557, 2002.

LOHMANN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: Strategies, advantages and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, p. 79–96, 2008.

LOUIE, A.C.; ISSELL, B.F. Amsacrine (AMSA)-A Clinical Review. *Journal of Clinical Oncology*, v. 3, p. 562-592, 1985.

LOZA-MEJÍA, M. A.; CASTILLO, R., LIRA-ROCHA, A. Links Molecular modeling of tricyclic compounds with anilino substituents and their intercalation complexes with DNA sequences. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2009.

MACLEOD, T. C. O. *Metaloporfirinas e compostos salen como modelos biomiméticos do citocromo P450 no metabolismo de fármacos anticonvulsivante e antidepressivo*. (Tese de Doutorado) Pós-graduação em Química, Univeridade de São Paulo-FFCLRP, 2008.

MACLEOD, T. C. O. et al. Primidone oxidation catalyzed by metalloporphyrins and Jacobsen catalyst. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 296, p. 54–60, 2008.

MACLEOD, T. C. O. et al. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for theoxidation of an antiepileptic drug. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v.273, p. 259–264, 2007.

MANS, D.R.; DA ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist*. v. 5 p. 185-198, 2000.

MANSUY, D. A brief history of the contribution of metalloporphyrin models to cytochrome P450 chemistry and oxidation catalysis. *Comptes Rendus Chimie* p. 392-413, 2007.

MELLO, M. V. T. C.; MENCARINI, A. C. M. Epidemiologia do câncer. In: GUIMARÃES, J.L.M., ROSA, D.D. (Org.). *Rotinas em Oncologia*. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2008.

MELO, A. J. B. et al. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphyrins. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 226, p. 23-31, 2005.

MENDONÇA, L.M. *Avaliação genotóxica e antígenotóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12*. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2008.

MEUNIER, B.; BERNARDOU, J. Metal-Oxo Species in P450 Enzymes and Biomimetic Models. Oxo-Hydroxo Tautomerism with Water-Soluble Metalloporphyrins. *Topics in Catalysis*, v. 21, p. 347-354, 2002.

MONTELLANO, O. P. R. *Cytochrome P450: Structure, Function and Mechanism*, 2. ed. Ed. Plenum Press. New York, p. 245-303, 2004.

MOURÃO, R. H. et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, n. 11, p. 1129-1133, 2005.

MURAD, A. M.; KATZ, A. *Oncologia: bases clínicas do tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1997.

NASR-ESFAHANI, M.; MONTAZEROZOHORI, M.; AKHLAGHI, P. Efficient Biomimetic Oxidative Decarboxylation of Some Carboxylic Acids Catalyzed by a Manganese (III) Schiff Base Complex. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 30, n. 7, 2009.

NAZARI, K. Iron(III)protoporphyrin/MCM41 catalyst as a peroxidase enzymemodel: Preparation and typical test reactions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 239, 2005.

NELSON, E.M., TEWEY, K.M., LIU, L.F. Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 8, p. 1361-1365, 1984.

PITTA, I. R.; LIMA, M. C. A.; LINS, GALDINO, S. L.; BARBE, J., inventors; (Conselho Nacional De Desenvolvimento Científico E Tecnológico - Cnpq, Brazil), assignee. Molecules with antitumor activity and chemical synthesis. Patent number WO/2004/024058. 25 março 2004.

PITTA, I. V.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. C. A., inventors. Acridine derivatives with antitumoral activity. Patent number WO/2007/109871. 10 abril 2007.

REID, J. M. et al. The Metabolism of Pyrazoloacridine (NSC 366140) by Cytochromes P450 and Flavin Monooxygenase in Human Liver Microsomes *Clinical Cancer Research*, v. 10, p. 1471-1480, 2004.

ROSA, A. R. P.; *Valor prognóstico das expressões da proteína p53 e do fator de crescimento do endotélio vascular em pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago submetidos a esofagectomia.* (Tese de Doutorado), Porto Alegre, 2002.

SALEEM, A. et al. Pharmacokinetic Evaluation of N-[2-(Dimethylamino)Ethyl]Acridine-4-Carboxamide in Patients by Positron Emission Tomography, *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 5, p. 1421-1429, 2001.

SANTOS, M. D. et al. Oxidative metabolism of 5-o-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), a bioactive natural product, by metalloporphyrin and rat liver mitochondria, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 26, p. 62-70, 2005.

SCHAAB, E. H. et al. Biomimetic Oxidation of Piperine and Piplartine Catalyzed by Iron(III) and Manganese(III) Porphyrins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, n. 5, p. 912—916, 2010.

SCHEID, S. *Síntese e caracterização de meso-Tetrakis(4-metóxiifenil)porfirina e metaloderivados.* (Dissertação de Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2009.

SEBOLT, J.S., et al. Pyrazoloacridines, a New Class of Anticancer Agents with Selectivity against Solid Tumors in Vitro. *Cancer Research*, v. 47, p. 4299-4304, 1987.

SENANAYAKE, C. H. et al. The Role of 4-(3-Phenylpropyl)pyridine N-Oxide (P3NO) in the Manganese-Salen-Catalyzed Asymmetric Epoxidation of Indene. *Tetrahedron Letters*, v. 37, n. 19, p. 3271-3274, 1996.

SHOEMAKER, D. D. et al. Metabolism of 4'-(9 Acridinylamino)methanesulfonamide by Rat Liver Microsomes. *Cancer Research*, v. 44, p. 1939-1945, 1984.

SILVA, F. S. V. C. B, *Síntese e avaliação biológica de novos derivados acridino-tiazolidínico e benzilideno-imidazolidínicos.* (Dissertação de Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2001.

SILVA, J. M.; DAY, S. H.; NICOLL-GRIFFITH, D. A. Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, v. 121, p. 49–63, 1999.

SIVASUBRAMANIAN, V. K. et al. Iron(III)-Salen Complexes as Enzyme Models: Mechanistic Study of Oxo(salen)iron Complexes Oxygenation of Organic Sulfides. *Journal of Organic Chemistry*, v. 67, p. 1506-1514, 2002.

SONDHI, S. M. et al. Antiinflammatory, analgesic and kinase inhibition activities of some acridine derivatives. *Central European Journal of Chemistry*, v. 2, p. 1-15, 2004.

SONDHI, S.M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. *European Journal Medicinal Chemistry*, v. 45 p. 555–556, 2010.

STRNAD, C. F. Drug-Drug Interactions: Studies *In Vitro* and *In Vivo*; Therapeutic products programme (Guidance document), Canadá, 2000.

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

TOMASZEWSKI, J.E; et al. Relevance of preclinical pharmacology and toxicology to phase I trial extrapolation techniques: relevance of animal toxicology. In: BAGULEY, B. C.KERR, D.J. *Anticancer drug development*. San Diego: Academic Press, 2002.

TOSHIMITSU, A.; BODELL, W.J. Cellular Resistance to Chloroethylnitrosoureas, Nitrogen Mustard, and m-Diamminedichloroplatinum(II) in Human dial-derived Cell Lines, *Cancer Research*, v. 7, p. 1361-1366, 1987.

TRÉDAN, O.; et al. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, p. 1441–54, 2007.

TWELVES, C. J. et al. Phase I and pharmacokinetic study of DACA (XR5000): a novel inhibitor of topoisomerase I and II, *British Journal of Cancer*, v. 80, p.1786–1791, 1999.

TWELVES, C. et al. Phase II study of XR5000 (DACA) administered as a 120-h infusion in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Annals of Oncology*, v. 13, p. 777–780, 2002.

VASHI, P.R.; MARQUES, H.M. The coordination of imidazole and substituted pyridines by the hemeoctapeptide N-acetyl-ferromicroperoxidase-8 (FeIIINAcMP8). *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 98, p. 1471-1482, 2004.

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

VIDAL, M. et al. Model systems for oxidative drug-metabolism studies - catalytic behavior of water-soluble metalloporphyrins depends on both the intrinsic robustness of the catalyst and the nature of substrates. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 21, p. 811-817, 1993.

VINHADO, F. S. *Modelos químicos do citocromo P-450: oxigenação de ligações C-H de alcanos catalisadas por metaloporfirinas sintéticas*. (Tese de doutorado), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras-USP, Ribeirão Preto, SP, 2005.

VISPÉ, et al. Novel tetra-acridine derivatives as dual inhibitors of topoisomerase II and the human proteasome. *Biochemical Pharmacology*, v. 73, p. 1863-1872, 2007.

WANG, W. et al. Acridine Derivatives Activate p53 and Induce Tumor Cell Death through Bax. *Cancer Biology & Therapy*, v. 4, n.8, p. 893-898, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The World Health Organization's Fight Against Cancer. Strategies That Prevent, Cure and Care*. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, 2007.

WONG, H. L.; XIAO, Y. W; BENDAYAN, R. Multidrug Resistance in Solid Tumor and Its Reversal. In: LU, Y.; MAHATO, R.I. (eds.), *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, Springer New York, 2009.

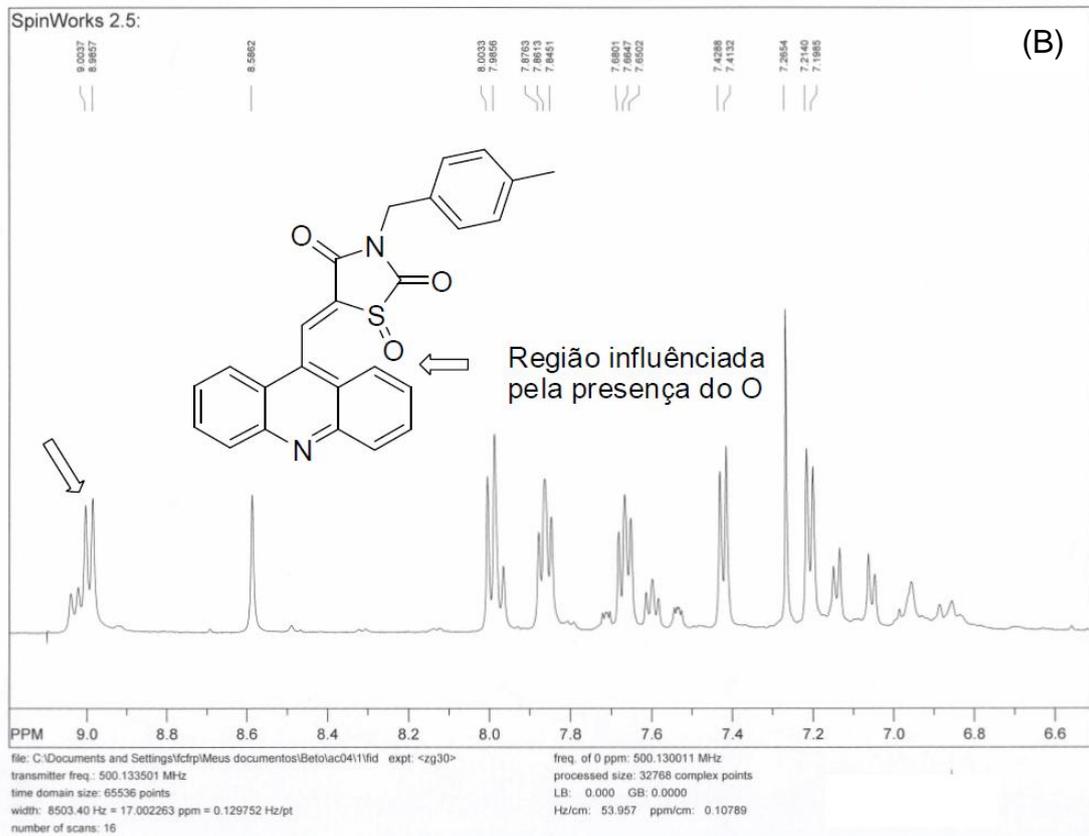
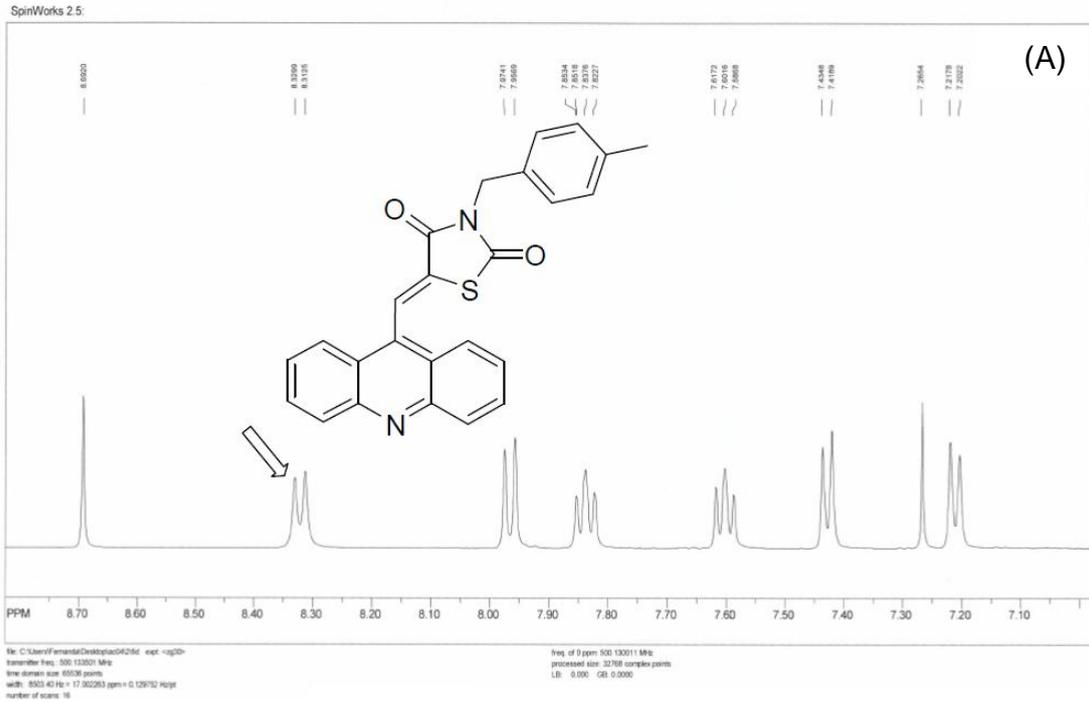
WRIGHTON, S. A.; RING, B. J.; VANDENBRANDEN, M.; The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety. *Toxicologic Pathology*, v.23, n. 2, 1995.

ZHANG, D.; ZHU, M.; HUMPHREYS, W. G. *Drug Metabolism in Drug Design and Development: Basic Concepts and Practice*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.

ANEXOS

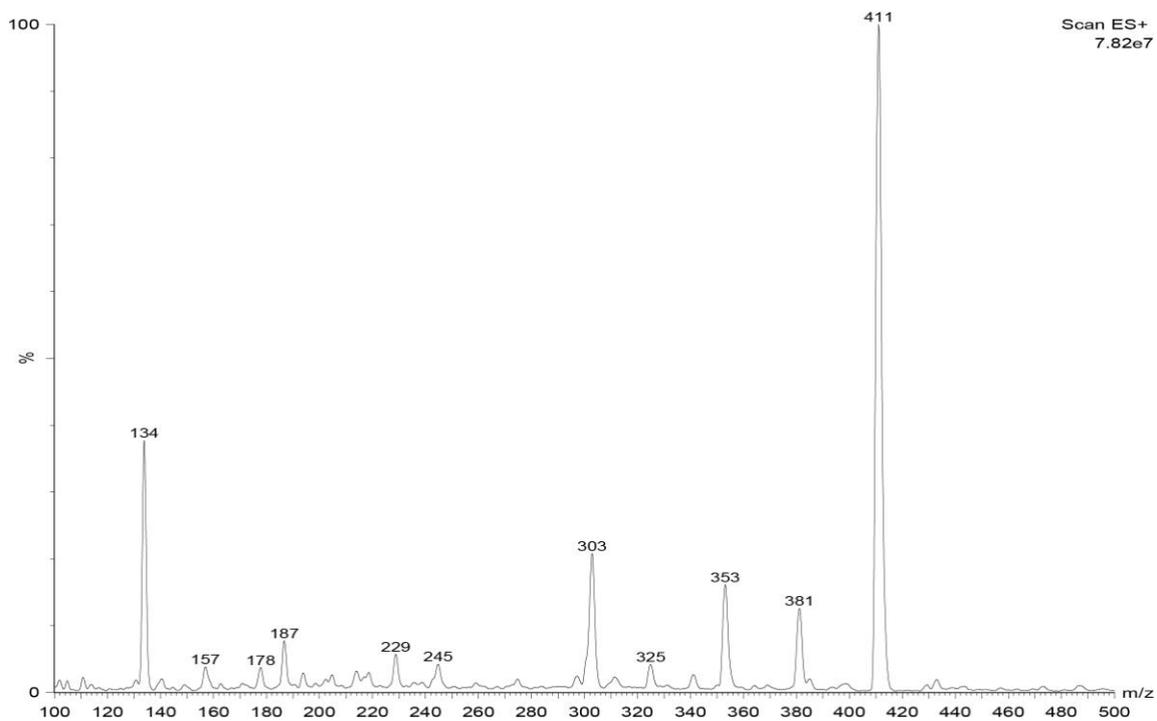
ANEXO 1

Espectro de ^1H RMN do AC04 (A) e do seu metabólito 1-oxo-AC04 (B).



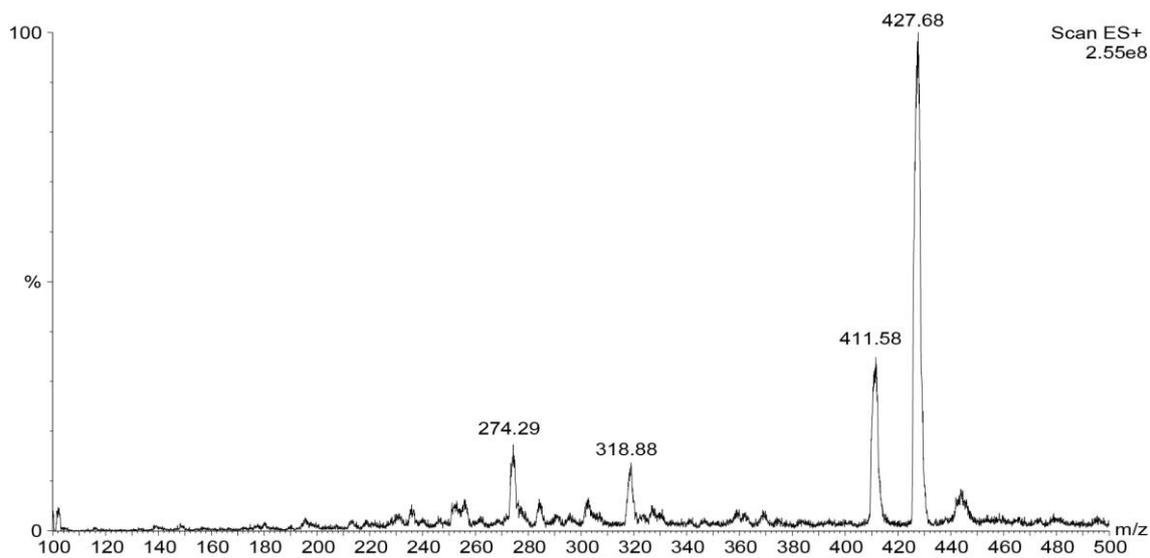
ANEXO 2

Espectro de IES-EM da reação de oxidação biomimética sem adição de catalisador. AC04 (m/z 411).



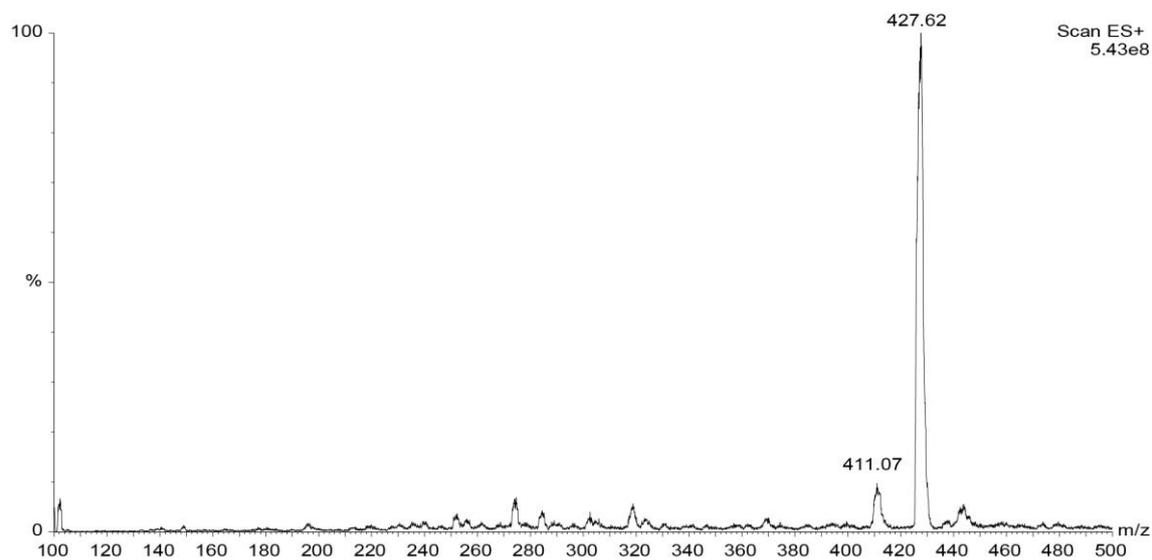
ANEXO 3

Espectro de IES-EM da reação de oxidação catalisada pelo complexo de Mn(salen) na proporção 1:150:30 (substrato:oxidante:catalisador) em acetato de etila. AC04 (m/z 411) e metabólito (m/z 427).



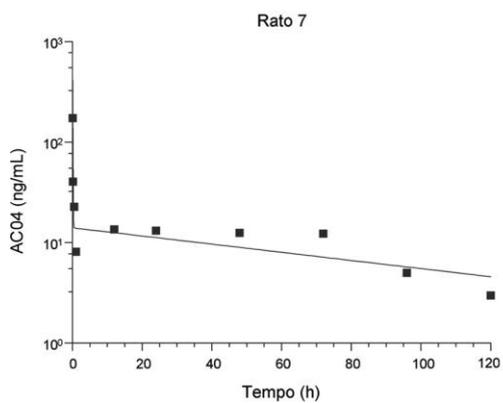
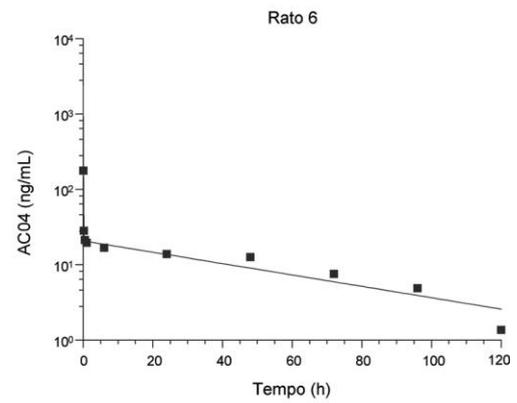
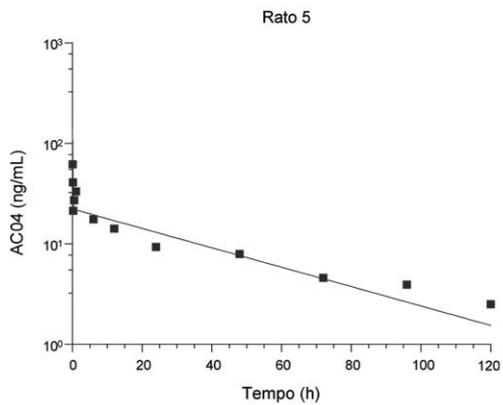
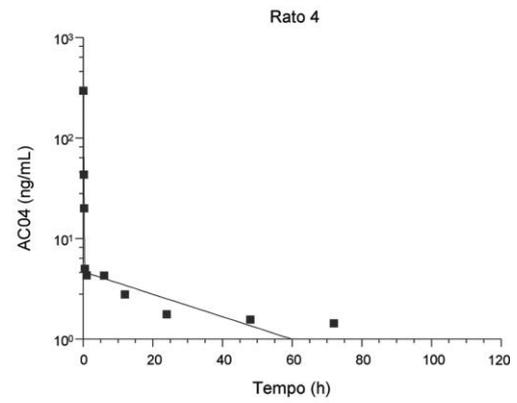
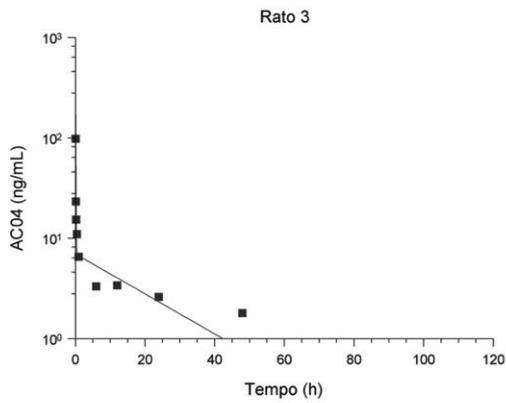
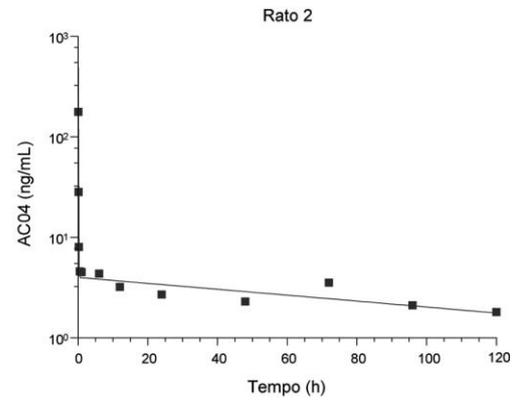
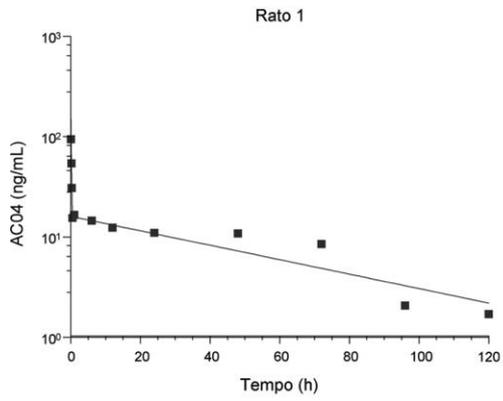
ANEXO 4

Espectro de IES-EM após isolamento do metabólito através de cromatografia em camada delgada preparativa. AC04 (m/z 411) e metabólito (m/z 427).



ANEXO 5

Modelagem dos perfis plasmáticos individuais dos ratos obtidos após administração i.v. *bolus* de 1,5 mg/kg de AC04.



ANEXO 6

Cartas de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Título: Estudo Pré-Clinico do Candidato à Fármaco Antitumoral AC-04: Farmacocinética em Roedores

Número: 2007843

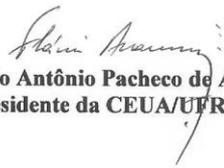
Pesquisador (es)

NOME
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA
FLÁVIA DE TONI UCHÔA
SANDRA ELISA HAAS

PARTICIPACÃO
PESQUISADOR RESPONSÁVEL
PESQUISADOR
PESQUISADOR

O mesmo foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, setembro de 2010


Flávio Antônio Pacheco de Araujo
Presidente da CEUA/UFRGS

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2008032

Título : AVALIAÇÃO DA METABOLIZAÇÃO DO CANDIDATO A ANTITUMORAL AC-04

Pesquisador (es)

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE 63</u>
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA	PESQ. RESPONSÁVEL	dalla.costa@ufrgs.br	33085218
FLAVIA DE TONI UCHÔA	PESQUISADOR	flaviadetoni@yahoo.com.br	
MAIARA CÁSSIA PIGATTO	PESQUISADOR		

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS em reunião nº 63, ata 143, de 7/1/2010, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, segunda-feira, 1º de março de 2010


JOSÉ ARTUR BOGO CHIES
Coordenador do CEP-UFRGS

