

UNIVERSIDADE BANDEIRANTE DE SÃO PAULO

GILVAN DE PAULA LEONARDO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO, FARMACOCINÉTICA E
BIODISTRIBUIÇÃO DO DM1 EM CAMUNDONGOS

São Paulo

2010

MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMÁCIA NA ÁREA DE PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO, FARMACOCINÉTICA E
BIODISTRIBUIÇÃO DO DM1 EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à Universidade
Bandeirante de São Paulo, como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Farmácia na Área de Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos.

Orientadora: Profa. Dra. Claudete Justina
Valduga

São Paulo

2010

VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO, FARMACOCINÉTICA E
BIODISTRIBUIÇÃO DO DM1 EM CAMUNDONGOS

Presidente da banca: Profa. Dra. Claudete Justina Valduga

Banca Examinadora

Profa. Dra. Daniela Gonçalves Rando

Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro

Professores Suplentes:

Prof. Dr. André José Araújo Gabriel

Prof. Dr. Niraldo Paulino

Aprovada em:

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles que acompanharam esta minha jornada e torceram para que o mesmo fosse concluído. Ao meu pai pelo incentivo em todos os momentos, e a minha esposa, pelo companherismo e carinho de maneira incondicional.

Agradecimentos

A Deus pela orientação e pela dádiva da vida.

À minha esposa pelo carinho e incondicional apoio durante toda minha caminhada.

Ao meu pai e meus irmãos pelo suporte e em especial a memória de minha mãe que sempre foi uma grande entusiasta de meus projetos e conquistas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Claudete Justina Valduga pelo enorme apoio, dedicação e amizade ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Durvanei A. Maria pela importante colaboração e auxílio para a realização dos experimentos em animais.

Aos professores do curso de mestrado da Universidade Bandeirante de São Paulo pelo grande incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. José A. Quincoces pelo auxílio na síntese dos compostos aqui estudados.

Ao Prof. Dr. Raul C. Maranhão por disponibilizar seu laboratório para realização dos experimentos.

À funcionária do Instituto do Coração (INCOR), Maria das Dores Pereira, pelas dicas e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Reginaldo P. dos Santos, Carla M. Moreira, René Marins dos Santos, Maria Aparecida dos Santos (Cida) e Ozeraldo V. Rocha.

Ao pessoal da secretaria da pós-graduação da UNIBAN.

A todos que de alguma maneira contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO, FARMACOCINÉTICA E BIODISTRIBUIÇÃO DO DM1 EM CAMUNDONGOS

Autor: Gilvan de Paula Leonardo

Orientadora: Profa. Dra. Claudete Justina Valduga

A 1,5-diarilpenta-1,4-dien-3-ona e derivados, como a 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**1**), são compostos fenólicos com estrutura similar à da curcumina (**3**), composto de origem natural com uma grande variedade de efeitos biológicos. O Grupo de Síntese Orgânica da UNIBAN vem trabalhando há alguns anos com o composto **1**, que possui boa atividade antitumoral e baixa toxicidade animal, conforme estudos *in vivo* demonstraram. O composto **1** foi convertido em seu respectivo sal monossódico, o 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio (DM1, **2**), a fim de tornar-se solúvel em água e facilitar a realização dos estudos *in vivo*. Em ensaios de regressão tumoral em camundongos, os dois compostos mostraram-se igualmente ativos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método bioanalítico e dar continuidade aos estudos pré-clínicos do DM1, como farmacocinética e biodistribuição em camundongos. Para análise e quantificação do DM1 foi desenvolvida uma metodologia analítica por HPLC, a qual apresentou parâmetros de validação dentro daqueles nacional e internacionalmente aceitos para métodos bioanalíticos. Os estudos de farmacocinética e biodistribuição foram conduzidos em camundongos BALB/c, após administração de 50 mg/kg de DM1, por via endovenosa. Os resultados obtidos mostraram que o DM1 apresentou tempo de meia-vida muito menor quando comparado à sua forma neutra, devido à rápida metabolização. Foram identificados vários metabólitos possíveis do DM1, produtos de metabolismo de fase I (oxidação, redução e alquilação) e de fase II, pela conjugação com sulfato, glicuronato e glutamyl, através de análise por LC/MS e GC/MS.

Palavras-chave: validação de métodos analíticos, pentadienonas, farmacocinética, biodistribuição.

ABSTRACT

VALIDATION OF BIOANALYTICAL METHOD, PHARMACOKINETIC AND BIODISTRIBUTION OF THE DM1 IN MICE

Autor: Gilvan de Paula Leonardo

Orientadora: Profa. Dra. Claudete Justina Valduga

1,5-diarylpenta-1,4-dien-3-one and derivatives as 1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-penta-1,4-dien-3-one (**1**) are phenolic compounds with structure similar to curcumin, a natural substance with a large variety of biological effects. UNIBAN's Organic Synthesis Group has been working for some years with compound **1**, which shows a good antitumor activity and a low toxicity as confirmed by the *in vivo* studies. Compound **1** was converted in its respective monosodium salt sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxyphenolate (DM1, **2**), in order to become water-soluble and to facilitate *in vivo* studies. In tumor regression assays, in mice, both compounds showed similar activity. The aim of this work was to develop a bioanalytical method and keep going on pre-clinical studies of the DM1, as pharmacokinetics and biodistribution in mice. An analytical method was developed to analyze and quantify DM1, which showed validation parameters in agreement with both those national and internationally accepted for bioanalytical methods. Pharmacokinetic and biodistribution studies were performed in BALB/c mice, after intravenous injection of 50 mg/kg of DM1. The results showed that the half-life of DM1 was lesser than that of the neutral ones due to its fast metabolization. Many possible metabolites of DM1 were identified, products of phase I metabolism (oxidation, reduction and alkylation) and of phase II, conjugation with sulphate, glucuronide and glutamyl, through analysis by LC/MS e GC/MS.

Key-words: validation of analytical method, pentadienones, pharmacokinetic, biodistribution

Lista de figuras

Figura 1. Fórmula estrutural da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (1), 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio (2) e curcumina (3).

Figura 2. Estruturas dos compostos FLLL-11, GO-Y030 e FLLL-12.

Figura 3. Curcumina (3) e seus metabólitos desmetóxicurcumina (4) e bisdesmetóxicurcumina (5).

Figura 4. Análogos da curcumina.

Figura 5. Reação de condensação de Knoevenagel para obtenção de derivados da curcumina com anel aromático ligado ao carbono central C4; condições reacionais: (a) benzaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina), trifetilfosfina (catalisador), 75-80 °C/3 h.

Figura 6. Metabolismo do ácido araquidônico.

Figura 7. Síntese do 1,5bis(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-penta-1,4-dien-3-ona, a partir do composto 1; (a) em anidrido acético em presença de acetato de sódio.

Figura 7. Síntese do 1,5bis(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-penta-1,4-dien-3-ona, a partir do composto 1; (a) em anidrido acético em presença de acetato de sódio.

Figura 8. Estrutura geral dos derivados monocarbonilados estruturalmente relacionados à curcumina, utilizados para estudos de REA (sem a β-cetona).

Figura 9. Exemplo das duas fases no metabolismo de fármacos: metabolização da Aspirina[®].

Figura 10. Produtos de decomposição da curcumina.

Figura 11. Síntese do 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio (2).

Figura 12. Fluxograma do procedimento de farmacocinética e biodistribuição.

Figura 13. Cromatograma do DM1 (2) obtido por HPLC utilizando como fase móvel água:acetonitrila:ácido acético (65:33,75:1,25) a um fluxo de 1,0 mL/min e 210 nm.

Figura 14. Cromatograma de extrato de plasma de camundongo controle obtido por HPLC utilizando como fase móvel água:acetonitrila:ácido acético (65:33,75:1,25) a um fluxo de 1,0 mL/min e 210 nm.

Figura 15. Varredura do composto 1 em UV, diluído em metanol.

Figura 16. Varredura do composto 2 (DM1) em UV, diluído em metanol.

Figura 17. Curva de calibração do DM1 (2) em plasma humano.

Figura 18. Curva de decaimento plasmático do DM1 (2) após a administração de 50 mg/kg em nove grupos de 4 camundongos BALB/c, em bolo, através do plexo ocular.

Figura 19. Estruturas dos possíveis metabólitos de fase I, do DM1 (2), analisados por GC.

Figura 20. Estruturas dos possíveis metabólitos de fase I e II, do DM1 (2), analisados por GC/MS e LC/MS.

Figura 21. Estruturas dos possíveis metabólitos de fase I e II, do DM1 (2), analisados por LC/MS.

Figura 22. Estruturas dos possíveis metabólitos de fase I e II, do DM1 (2), analisados por LC/MS.

Figura 23. Fotos dos animais biopsiados: (a) controle, (b) 5 min, (c) 1 h, (d) 4 h e (e) 8 h após injeção do DM1 por via IV.

Lista de tabelas

Tabela 1. Atividade inibitória de curcuminóides e análogos da curcumina sobre a α -glicosidase (DU et. al., 2006).

Tabela 2. Análogos estruturais monocarbonilados da curcumina: ciclopentanona (**A**), 1,5-diarilpentadieno-3-ona (**B**) e cicloexanona (**C**) (LIANG et. al., 2008).

Tabela 3. Análogos monocarbonilados da curcumina utilizados no estudo de avaliação da atividade antiinflamatória (LIANG et. al., 2008).

Tabela 4. Análogos da curcumina sintetizados para avaliação da atividade inibitória da COX -1 e COX-2 (HANDLER et. al., 2007).

Tabela 5. Exemplos de fármacos comuns que são substratos das isoenzimas CYP P450.

Tabela 6. Exemplos de reações de conjugação de fase II.

Tabela 7. Concentração das amostras para a curva de calibração.

Tabela 8. Concentração da amostras para análise da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdias).

Tabela 9. Concentração das amostras para análise da exatidão (critério de aceitação para exatidão). Dados da concentração absoluta x concentração encontrada.

Tabela 10. Concentração da amostras para determinar a exatidão nas análises no intradia e interdias.

Tabela 11. Dados de farmacocinética do DM1 (**2**) após a administração de 50 mg/kg em nove grupos de 4 camundongos BALB/c, em bolo, através do plexo ocular.

Tabela 12. Concentração das amostras para a curva de calibração.

Tabela 13. Concentração plasmática do DM1 (**2**) após a administração de 50 mg/kg em nove grupos de 4 camundongos BALB/c, em bolo, através do plexo ocular.

Lista de abreviaturas e símbolos

CH₃OH - Metanol

AINE - antiinflamatório não esteroideal

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18 - Coluna de sílica com fase reversa de octadecilsilano

CCl₄ - Tetracloreto de carbono

COX - Enzima ciclooxigenase

CV - coeficiente de variação

CYP 450 - Citocromo P 450

CYP 450 - citocromo P450

DM1 - 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio
(2)

DPR - Desvio padrão relativo

GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

IC₅₀ -Concentração de um composto necessária para reduzir o crescimento populacional de organismos, ou ponto de referência para citotoxicidade a células

IL - interleucina

INCOR - Instituto do coração

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia

LC-MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas

LDM - Limite de detecção do método

LQM - Limite de quantificação do método

MRC - Material de Referência Certificado

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato de hidrogênio

OMS - Organização mundial de Saúde

PGs - prostaglandinas

RE - Erro relativo

REA - relação estrutura química atividade biológica

RPM - Rotações por minuto

TNF - Fator de necrose tumoral

TRx -Tioredoxina redutase

UDPGA - ácido uridina – difosfato – glicurônico

UV – ultravioleta

Vd – Volume de distribuição

WHO – “World Health Organization”

SUMÁRIO

Contra-capá.....	ii
Banca examinadora	iii
Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de figuras	viii

Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas e símbolos	xi
SUMÁRIO	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Curcumina e derivados monocarbonilados: isolamento, síntese e atividade biológica	3
2.1.1. Isolamento e síntese	3
2.1.2. Atividade antitumoral	4
2.1.3. Atividade inibitória da enzima α -glicosidase	6
2.1.4. Propriedades antimicrobianas	9
2.1.5. Atividade antiinflamatória	11
2.1.5.1. Inibidores da COX-1	13
2.2. Estudos farmacocinéticos dos curcuminóides	15
2.3. Estudos de relação entre estrutura química e atividade biológica (REA) da curcumina e análogos monocarbonilados	17
2.4. Metabolismo de fármacos	19
2.4.1. Mecanismo da enzima citocromo P450 (CYP 450)	20
2.4.1.1. Reações de fase I	20
2.4.1.2. Reações de fase II	21
2.4.2. Produtos de decomposição e metabolização da curcumina	21
2.5. Validação de métodos analíticos	22
2.5.1. Especificidade	23
2.5.2. Limite de detecção	23
2.5.3. Limite de quantificação	23
2.5.4. Faixa linear de trabalho	23
2.5.5. Exatidão	24
2.5.6. Precisão	24
2.5.7. Repetibilidade	24
2.5.8. Precisão intermediária	25

2.5.9.	Reprodutibilidade	25
2.5.10.	Seletividade	25
2.5.11.	Recuperação	26
2.5.12.	Padrão Externo	26
2.5.13.	Padrão Interno	27
2.5.14.	Estabilidade	27
2.6.	Espectrometria de massa	27
2.7.	Cromatografia líquida alta eficiência (HPLC)	28
3.	OBJETIVO	29
3.1.	Objetivos específicos	29
4.	EXPERIMENTAL	30
4.1.	Solventes, reagentes e outros materiais	30
4.2.	Equipamentos	30
4.3.	Metodologia	31
	Síntese da 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona	
4.3.1.	(2) e seu respectivo sal sódico (DM1, composto 1)	31
4.3.2.	Análise dos compostos 1 e 2 (DM1) por ultravioleta (UV)	32
4.3.3.	Preparo da solução estoque e das curvas de calibração do DM1 (2)	32
4.3.4.	Condições Cromatográficas	33
4.3.5.	Espectrometria de massa	33
4.3.6.	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa	33
4.3.7.	Espectrofotometria de UV	34
4.3.8.	Validação de Método bioanalítico por HPLC	34
4.3.8.	Estudos <i>in vivo</i>	36
4.3.8.1.	Farmacocinética e biodistribuição	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
	Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para análise e	
5.1.	quantificação do DM1 (2)	38
5.1.2.	Curva de calibração	41
5.1.3.	Precisão	44

5.1.4. Exatidão	46
5.2. Farmacocinética e biodistribuição do DM1 (2) em camundongos	48
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8. ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

Milhares de novos compostos são sintetizados anualmente visando melhorar a qualidade de vida do homem, ou ainda diminuir o sofrimento em algumas doenças crônicas. Entre elas, o câncer é uma das doenças mais pesquisadas nos últimos anos. Inúmeros compostos isolados ou sintetizados apresentam atividade antitumoral, porém existe um caminho muito longo desde a confirmação da atividade até sua aplicação e aprovação para ser utilizado na terapêutica. Por isso, é imprescindível o envolvimento de profissionais das múltiplas áreas do conhecimento.

O câncer é um dos maiores desafios que a ciência enfrenta nesse início de século XXI, sendo que 7 milhões de pessoas morrem a cada ano, ficando atrás somente das doenças cardiovasculares. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), para o ano de 2007, foram registradas 7,9 milhões de mortes e para 2030 espera-se um aumento de 45 %, saltando para 11,5 milhões de mortes. O número de novos casos também deverá saltar de 11,3 milhões em 2007, para 15,5 milhões em 2030 (WHO 2010). A principal causa do aumento do número de casos é o envelhecimento da população, que faz com que a doença seja considerada um problema de saúde pública.

Muitos dos compostos utilizados no tratamento das mais variadas doenças humanas são oriundos de produtos naturais, de origem animal ou vegetal, tais substâncias são produzidas como mecanismo de defesa. Muitas dessas substâncias já são sintetizadas em laboratório, com a finalidade de aumentar a quantidade de produto disponível para testes, ou então modificadas, para melhorar algumas das suas propriedades. Um exemplo disso é a 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**1**) (Figura 1), que possui estrutura análoga a compostos encontrados na própolis, os quais possuem atividade antifúngica, antitumoral, antiparasitária, entre outras (SUAREZ, et al, 2006). Este composto vem sendo extensivamente estudado pelo grupo de Síntese Orgânica da UNIBAN, devido, principalmente, à sua excelente atividade antitumoral encontrada em estudos pré-clínicos. Porém, devidos às suas características estruturais, o composto **1** não é hidrossolúvel. A solubilidade em água é uma propriedade almejada por todos os profissionais que trabalham na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

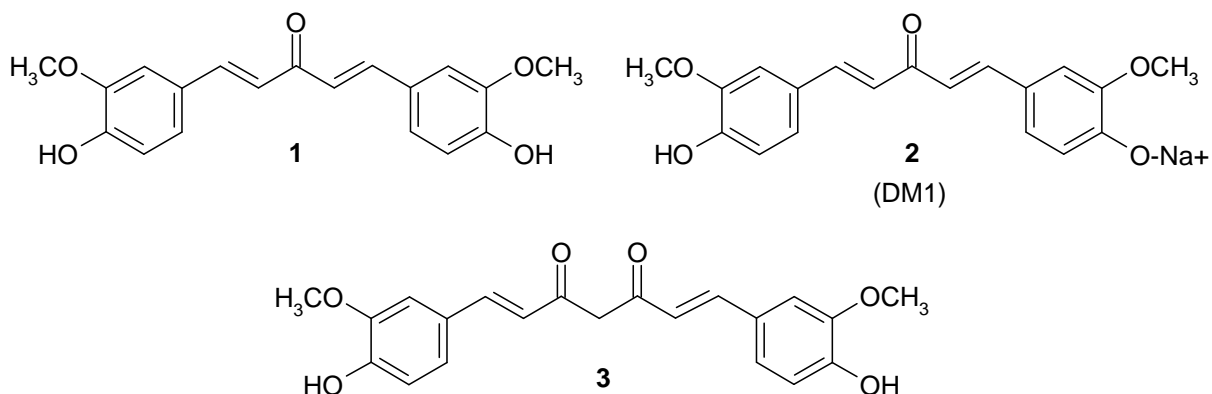


Figura 1. Fórmula estrutural da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (1), 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio (2) e curcumina (3).

Devido aos problemas relacionados à solubilidade, o composto **1** foi transformado no seu derivado em forma de sal, solúvel em água, o 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio (**2**, DM1), que apresenta atividade antitumoral idêntica ao composto original. O objetivo desta modificação era dar continuidade aos estudos farmacológicos, como farmacocinética e biodistribuição.

Estes compostos possuem características estruturais semelhantes às da curcumina (**3**), que é um produto de origem natural com uma série de atividades biológicas interessantes. Estruturalmente, a diferença entre eles, é a presença de uma ou duas carbonilas cetônicas. Por isso, a grande maioria dos estudos biológicos relacionados a estes compostos é feita de maneira comparativa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir serão descritas as principais propriedades farmacológicas envolvendo os compostos **1** e **2** (DM1), a curcumina e outros análogos estruturais, com objetivo de enfatizar a importância da pesquisa envolvendo este grupo de princípios ativos. Ainda, serão abordadas bases teóricas correlacionadas ao objeto de estudo desta dissertação.

2.1. Curcumina e derivados monocarbonilados: isolamento, síntese e atividade biológica

2.1.1. Isolamento e síntese

Os compostos estruturalmente relacionados com o composto **1** são muito explorados como promissores agentes farmacológicos devido à sua similaridade com a curcumina (**3**) (Figura 1), um produto natural encontrado na *Curcuma longa*, proveniente da Índia e é utilizado como pigmento e condimento alimentar (“curry”). Nas últimas décadas, a curcumina vem sendo extensivamente estudada devido às suas propriedades farmacológicas multifuncionais, como atividade antitumoral, antioxidante, antiartrite, antiamilóide e antiinflamatória (ANAND et al, 2008). Estudos clínicos recentes mostraram que a curcumina pode ser utilizada para tratamento por via oral, com doses máximas de 12g ao dia, sem causar efeitos tóxicos em humanos (NCI, DCPC, 1996).

A curcumina foi isolada pela primeira vez em 1815, e obtida em forma cristalina em 1870 (GOEL et al, 2008).

A 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (**1**) foi sintetizada pela primeira vez em 1927 (GLASER e TRAMER, 1927) e, desde então, explorada biologicamente como um análogo da curcumina. Somente em 1993, o composto **1** foi isolado e caracterizado a partir de rizomas da mesma planta (MASUDA et al, 1993). Nesse trabalho o autor relatou a atividade antioxidante e antiinflamatória destas pentadienonas.

2.1.2. Atividade antitumoral

Ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* confirmam a enorme potencialidade do composto **2** em inibir o desenvolvimento de células tumorais do tipo melanoma B16F10. Melanoma é um tipo de câncer que é responsável por 75% de mortes por câncer de pele (HALL et al,1999). Os ensaios *in vivo*, realizados em colaboração com o Instituto Butantan, mostraram a capacidade deste composto em inibir, não só o crescimento de tumores, como também o desenvolvimento de metástases (FLORES et al, 2008). Em experimentos utilizando o composto **2**, em camundongos inoculados com células melanoma B16F10, tratados diariamente com 0,71 mg/kg, observou-se regressão da massa tumoral em 84 % em comparação com o grupo não-tratado (SUÁREZ et al, 2002, 2006 e 2008). Os resultados de estudos de avaliação da toxicidade aguda do composto **1** em miglyol®, como determinação da dose letal 50% (DL₅₀), e toxicidade subcrônica, evidenciaram a quase ausência de toxicidade. Já, o seu derivado monossódico (**2**), que foi produzido para tornar o composto solúvel em água, apresentou DL₅₀ de 700 mg/kg, por via intraperitonial e 14 mg/Kg, endovenoso. Não foram observadas alterações hematológicas, como imunossupressão ou reações auto-imunes, degenerativas, ou hipersensibilidade.

Análogos da curcumina, obtidos através da reação de condensação de Knoevenagel, se mostraram efetivos na inibição do fator de necrose tumoral (TNF), em vários tipos de tumores (ZAMBRE et al, 2006). Estudos recentes demonstraram que a curcumina é capaz de reduzir a proliferação de células de carcinoma ovariano com a mesma eficiência da cisplatina (ADAMS et al, 2004), que é um composto de uso clínico utilizado no tratamento de vários tipos de câncer. Considerando que a estabilidade química da molécula é fundamental, foram sintetizados derivados da curcumina, através de reações simples e com bom rendimento, para avaliar a melhora no perfil farmacocinético. Os derivados da curcumina foram testados contra células cancerígenas de carcinoma de ovário humano. Quando comparados com a cisplatina, os derivados apresentaram melhor desempenho no combate às células cancerígenas, e o uso concomitante (cisplatina e derivados da curcumina) aumentou a seletividade para as células cancerígenas, preservando as células saudáveis (FERRARI et al, 2009).

Análogos da curcumina, como GO-Y030, FLLL-11 (igual composto **1**) e FLLL-12 (Figura 2), demonstraram ser mais potentes que a própria molécula de curcumina

na prevenção e desenvolvimento de linhagens de células de câncer coloretal e apoptose (morte programada de células) (CEN et al, 2009). O estudo comprovou que os compostos FLLL-11 e FLLL-12 apresentaram toxicidade de até 200 vezes maior que a curcumina em linhagens de células de câncer coloretal.

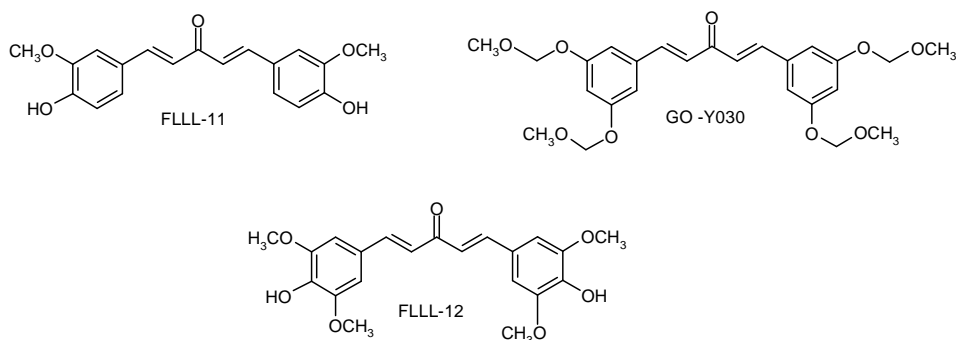


Figura 2. Estruturas dos compostos FLLL-11,GO-Y030 e FLLL-12.

Além dos derivados sintéticos da curcumina, alguns metabólitos também apresentam atividade biológica superior, como é o caso da desmetóxicurcumina (**4**) (Figura 3), que se mostrou mais ativa no aspecto antitumoral, antioxidante e antimutagênico, e a Bisdesmetóxicurcumina (**5**), que apresentou um desempenho superior ao da curcumina como inibidora da proliferação de células de câncer de mama e na indução da atividade antiparasitária (ANAND et al, 2008).

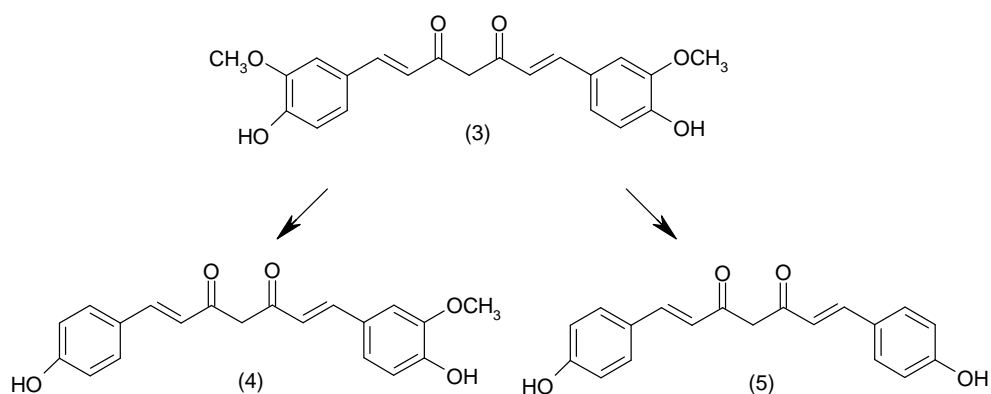
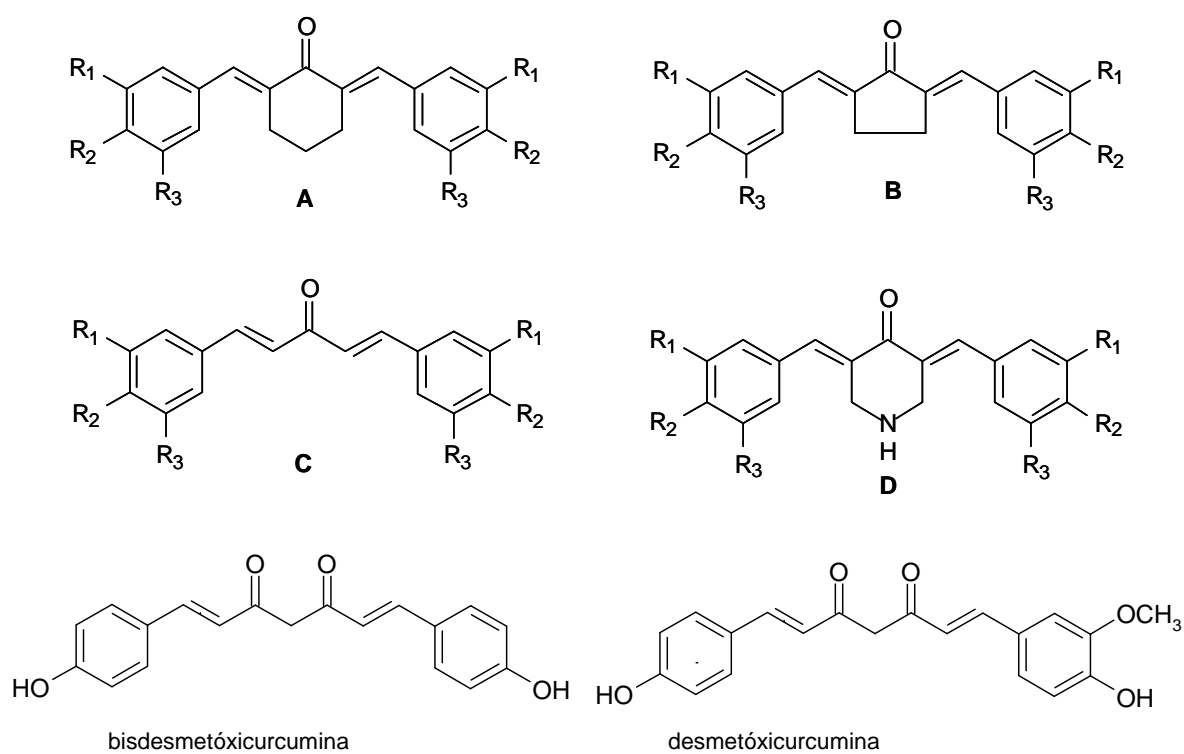


Figura 3. Curcumina (**3**) e seus metabólitos desmetóxicurcumina (**4**) e bisdesmetóxicurcumina (**5**).

2.1.3. Atividade inibitória da enzima α -glicosidase

O poder de ação antiinflamatória, antioxidante e principalmente de inibição da α -glicosidase, que é uma enzima chave na digestão de carboidratos, foi evidenciado e comprovado, pela redução dos níveis de açúcar no sangue em estudos com curcuminóides, como desmetóxicurcumina (**4**) e bisdesmetóxicurcumina (**5**) (Figura 3). A α -glicosidase foi relacionada como um contribuinte para a glicosilação do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-I) (WALKER et al, 1987). O composto **4** demonstrou maior atividade em relação à inibição da enzima do que **3 e 5**, sendo que a inibição foi expressa em valores IC_{50} (que é a concentração requisitada para a produção de 50 % de inibição no teste). Derivados contendo grupos tetraidroxil exibiram atividade inibitória com valores de IC_{50} menores ainda que **4**. O estudo revelou um grande potencial inibitório dos curcuminóides e análogos da curcumina em relação à inibição da α -glicosidase, podendo ter grande importância na pesquisa e desenvolvimento de fármacos para o combate a diabetes (DU et al, 2006).

Na Figura 4 estão desenhadas as estruturas dos análogos da curcumina que participaram do estudo para avaliação da atividade inibitória da α -glicosidase, acompanhadas dos seus respectivos radicais. E na Tabela 1, estão relacionadas as atividades inibitórias dos respectivos análogos.



A₁/B₁/C₁/D₁: R₁ = R₃ = H, R₂ = OH

A₂/B₂/C₂/D₂: R₁ = R₂ = OH, R₃ = H

A₃/B₃/C₃/D₃: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OCH₃

A₄/B₄/C₄/D₄: R₁ = R₃ = C(CH₃)₃, R₂ = OCH₃

A₅/B₅/C₅/D₅: R₁ = R₂ = OCH₃, R₃ = H

A₆/B₆/C₆/D₆: R₁ = R₃ = OCH₃, R₂ = OH

A₇/B₇/D₇: R₁ = Br, R₃ = OCH₃, R₂ = OH

Figura 4. Análogos da curcumina.

Tabela 1. Atividade inibitória de curcuminóides e análogos da curcumina sobre a α -glicosidase (DU et al, 2006).

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	IC50 (μ M)	Inibição (%)
Curcumina	OCH ₃	OCH ₃	-	37,2	ND
Desmetoxicurcumina	H	OCH ₃	-	42,7	ND
Bisdesmetoxicurcumina	H	H	-	23,0	ND
A₁	H	OH	H	37,6	ND
A₂	OH	OH	H	2,8	ND
A₃	OCH ₃	OH	H	47,0	ND
A₄	C(CH ₃) ₃	OH	C(CH ₃) ₃	>100	25,6
A₅	OCH ₃	OCH ₃	H	>100	SI
A₆	OCH ₃	OH	OCH ₃	>100	35,8
A₇	B r	OH	OCH ₃	29,3	ND
B₁	H	OH	H	32,5	ND
B₂	OH	OH	H	2,6	ND
B₃	OCH ₃	OH	H	52,8	ND
B₄	C(CH ₃) ₃	OH	C(CH ₃) ₃	>100	28,6
B₅	OCH ₃	OCH ₃	H	>100	SI
B₆	OCH ₃	OH	OCH ₃	>100	37,4
B₇	B r	OH	OCH ₃	33,9	ND
C₁	H	OH	H	21,8	ND
C₂	OH	OH	H	1,6	ND
C₃	OCH ₃	OH	H	37,0	ND
C₄	C(CH ₃) ₃	OH	C(CH ₃) ₃	>100	27,5
C₅	OCH ₃	OCH ₃	H	>100	SI
C₆	OCH ₃	OH	OCH ₃	>100	31,3
D₁	H	OH	H	61,3	ND
D₂	OH	OH	H	8,2	ND
D₃	OCH ₃	OH	H	>100	38,2
D₄	C(CH ₃) ₃	OH	C(CH ₃) ₃	>100	23,3
D₅	OCH ₃	OCH ₃	H	>100	SI
D₆	OCH ₃	OH	OCH ₃	>100	28,9
D₇	B r	OH	OCH ₃	38,1	ND

ND: não determinado; **SI:** sem inibição

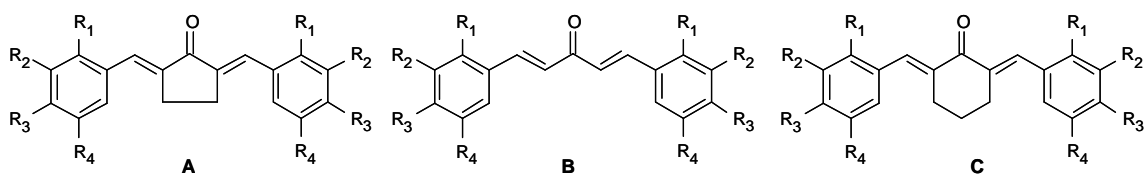
Os análogos com substituição em R₁ e R₂ pelo grupo OH, apresentaram considerável poder de inibição da enzima com baixos valores de IC₅₀, chegando até 15 vezes menos que o composto **3**. A introdução de grupos metóxi e OH nas posições *orto* e *para*, respectivamente, evidenciaram que **C3** (composto **1**) apresentou uma queda na capacidade de inibição da enzima α-glicosidase.

2.1.4. Propriedades antimicrobianas

Os ensaios antiparasitários *in vitro* e *in vivo* realizados no departamento de parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo mostraram que composto **1** é um potencial leishmanicida, exibindo atividade expressiva, particularmente, contra amastigotas de *Leishmania amazonensis* (SUAREZ et al, 2002 e FLORES et. al, 2008).

Derivados da curcumina, com apenas uma carbonila na estrutura, como a ciclopentanona (**A**), 1,5-diarilpentadieno-3-ona (**B**) e cicloexanona (**C**) (Tabela 2), apresentaram atividade bactericida superior contra bactérias do gênero *Enterobacter cloacae*, e frente a bactérias gram-positivas, como *S. aureus*, *Micrococcus*, *S. saprophyticus* e *S. epidermidis* (LIANG et al, 2008). Os análogos **B** foram mais efetivos na inibição do crescimento das bactérias testadas do que **A** e **C**, principalmente os compostos **B13** e **B14** (composto **1**), que possui os grupos CH₃O e OH comprovando que a posição do substituinte tem grande importância na atividade antibacteriana.

Tabela 2. Análogos estruturais monocarbonilados da curcumina: ciclopentanona (**A**), 1,5-diarilpentadieno-3-ona (**B**) e ciclohexanona (**C**) (LIANG et al, 2008).



Compostos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	H	OCH ₂ CH ₃	H
2	H	H	F	H
3	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
4	H	H	N(CH ₃) ₂	H
6	Br	H	H	H
7	H	CF ₃	*	H
8	F	CF ₃	H	H
10	H	Br	H	H
11	H	OCH ₃	*	H
12	H	H	*	H
13	H	H	OH	H
14	H	OCH ₃	OH	H
16	H	H	OCH ₂ CH=CH ₂	*
17	H	OCH ₃	OCH ₂ CH=CH ₂	H

Estudos recentes, com diferentes grupos ligados à molécula de curcumina, obtidos através de reações de condensação de Knoevenagel (Figura 5), indicaram o potencial da curcumina em atuar como agente antimalárico. Foi evidenciada inibição do crescimento de células *in vitro* do *P. falciparum*, que é o protozoário transmissor da malária. Todos os compostos sintetizados apresentaram atividade superior à da curcumina. O composto que possui R₁=H, R₂=OCH₃ e R₃=OH exibiu grande capacidade de inibição do crescimento do microorganismo, sendo o mais potente de todos. O resultado indica que a presença do grupo hidroxí (OH) no anel ligado ao carbono central C4 seja o responsável pelo aumento da atividade antimalárica (MISHRA et al, 2008).

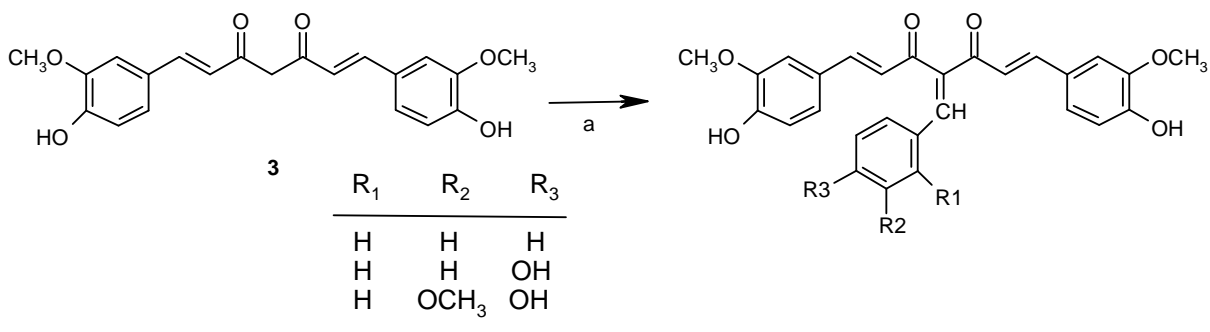


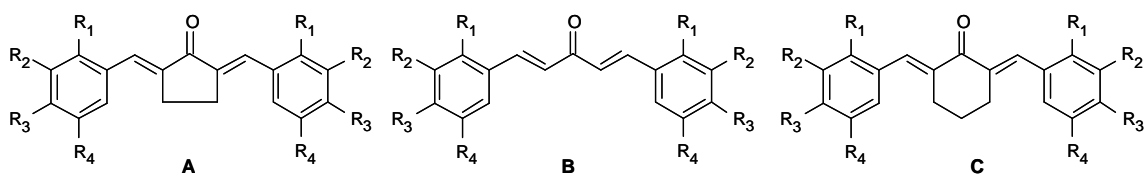
Figura 5. Reação de condensação de Knoevenagel para obtenção de derivados da curcumina com anel aromático ligado ao carbono central C4; condições reacionais: (a) benzaldeído, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina), trifetilfosfina (catalisador), 75-80 °C/3 h.

2.1.5. Atividade antiinflamatória

Estudos demonstraram que a inflamação está relacionada com a patogênese de várias doenças incluindo câncer, arteriosclerose, diabetes, artrite reumatóide e doenças inflamatórias intestinais (KRISHINAMOORTHY et al, 2006 e JANKUN et al 2006).

A curcumina tem apresentado efeitos benéficos na indução de citocinas, como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), que são mediadoras de processos inflamatórios. Porém, como barreira limitante tem-se o pobre perfil farmacocinético e credita-se a isso à presença do grupo β -dicetona da molécula de curcumina, que faz com que ocorra um rápido metabolismo e baixa absorção da substância. Baseado nisso, LIANG e colaboradores (2008) sintetizaram novos compostos com estruturas mais estáveis para que fossem avaliadas suas atividades antiinflamatórias *in vitro* (Tabela 3). A maioria dos compostos demonstrou aumento da indução do TNF- α e IL-6 em macrófagos. Os análogos sintetizados foram ciclopentanona (**A**), 1,5-diaryl-1,4-pentadieno-3-ona (**B**) e ciclohexanona (**C**).

Tabela 3. Análogos monocarbonilados da curcumina utilizados no estudo de avaliação da atividade antiinflamatória (LIANG et al, 2008).



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	H	OH	H
2	H	OCH ₃	OH	H
3	BR	H	H	H
4	F	CF ₃	H	H
5	H	Br	H	H
6	H	H	F	H
7	H	H	OCH ₂ CH ₃	H
8	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
9	H	H		H
10	H	H	N(CH ₃) ₂	H
11	H	OCH ₃		H
12	H	H	OCH ₂ CH=CH ₂	H
13	H	OCH ₃	OCH ₂ CH=CH ₂	H
14	H	H		H

Os compostos **B2**, **C2** e **A14** apresentaram maior capacidade de indução do TNF- α e IL-6 do que a curcumina, remetendo à importância dos substituintes e posicionamento dos grupos OH e metóxi na posição *orto* para a melhora das propriedades antiinflamatórias.

Em experimentos *in vivo*, realizados através da indução da inflamação (edema) em orelhas de ratos, comprovaram o aumento da atividade antiinflamatória da curcumina com a administração oral, na forma de nanoemulsões, contendo triacilgliceróis e Twin 20 (WANG et al, 2008).

Estudos recentes comprovaram a ação antiinflamatória da curcumina administrada por via oral emulsionada em carboximetilcelulose (CMC). A formulação

apresentou um potente efeito antiinflamatório no gene deficiente da interleucina-10 (IL-10), que está bem caracterizada na doença inflamatória intestinal (UNG et al, 2009).

2.1.5.1. Inibidores da COX-1

A inibição do metabolismo do ácido araquidônico pela curcumina tem remetido a um papel chave, de grande importância no mecanismo de ação anticarcinogênica. A enzima ciclooxygenase (COX) catalisa o primeiro dos dois passos na síntese de prostaglandinas (PGs) do substrato ácido araquidônico (Figura 6). Até o momento sabe-se da existência de duas isoformas da COX, a COX-1 e a COX-2; a primeira (COX-1) tem função constitutiva, sendo responsável pela manutenção fisiológica do organismo e, a prostaglandina produzida, tem um papel de proteção. A outra isoforma da enzima (COX-2) é uma forma induzida, e sua função é afetada por vários estímulos como mitógenos, oncogenes e promotores tumorais e esse papel em carcinogênese e angiogênese tem sido bem documentado (FORNIER et al, 2000).

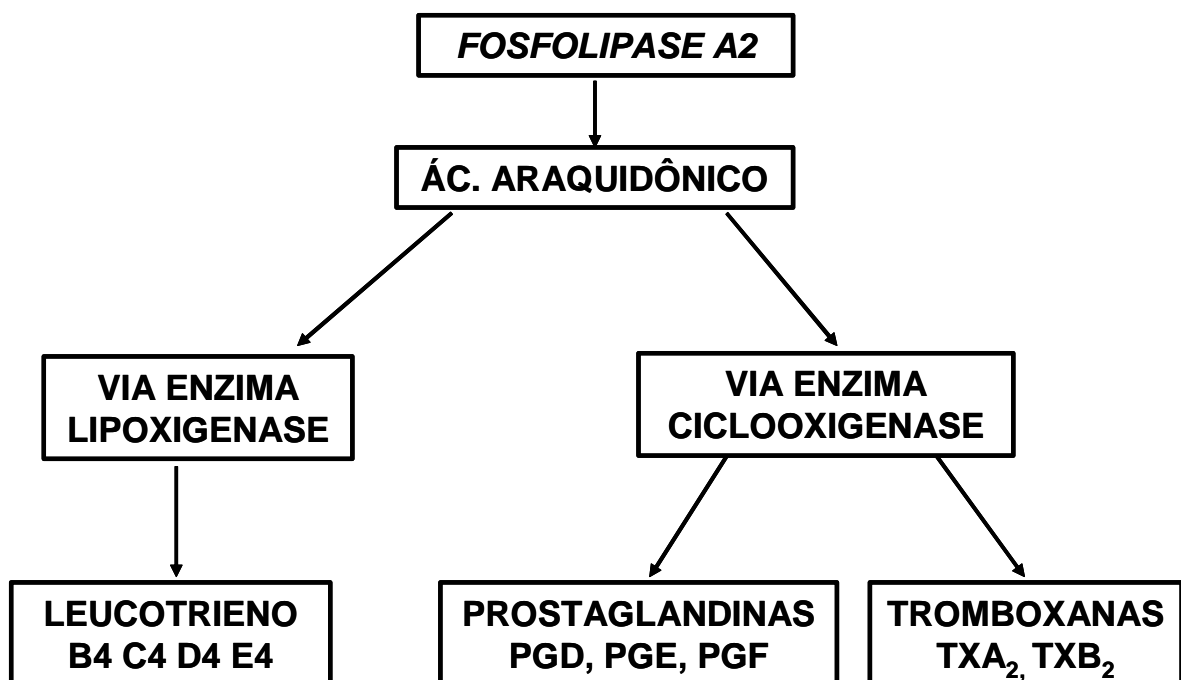
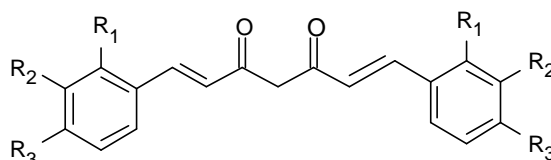


Figura 6. Metabolismo do ácido araquidônico.

Os medicamentos utilizados como inibidores da COX-2 foram suspensos devido à associação desses fármacos com o aumento da incidência de eventos cardiovasculares, como ataques cardíacos e derrames cerebrais. Estudos recentes indicaram um possível envolvimento de outra isoforma da COX, a COX-1 em angiogênese (KITAMURA et al, 2004), fornecendo razões para o desenvolvimento de inibidores da COX-1. Posteriormente, outros estudos indicaram que a COX-1 está expressa de forma significativa em células cancerígenas de ovário (SANO et. al., 2006).

Análogos da curcumina, com diferentes grupos ligados nos anéis aromáticos (Tabela 4), foram testados quanto ao poder de inibição da COX-1 e COX-2 *in vitro*, para posterior comparação com valores obtidos pelo uso do celecoxibe, um antiinflamatório não esteróide (AINE) inibidor seletivo da COX-2 (HANDLER et al, 2007).

Tabela 4. Análogos da curcumina sintetizados para avaliação da atividade inibitória da COX -1 e COX-2 (HANDLER et al, 2007).



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (COX-1)	IC ₅₀ (COX-2)
1	H	F	F	0,33	12,58
2	H	H	SCH ₃	n.d	n.d
3	H	H	SO ₂ CH ₃	2,68	>100
4	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	0,06	>100
5	H	H	COOCH ₃	0,05	<0,0005
Curcumina	H	OCH ₃	OH	50	>100
Celecoxib				13,7	0,03

n.d: não determinado

Em um estudo recente (PAULINO et al, 2009) relacionando a atividade antiinflamatória de um derivado acetilado da pentadienona **1**, foi comprovado o efeito antiinflamatório da 1,5-bis-(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-penta-1,4-dien-3-ona

representada na Figura a seguir. Os autores sugerem que o composto tenha a capacidade de ativar a bradicinina, prostaglandinas e de produzir ácido nítrico.

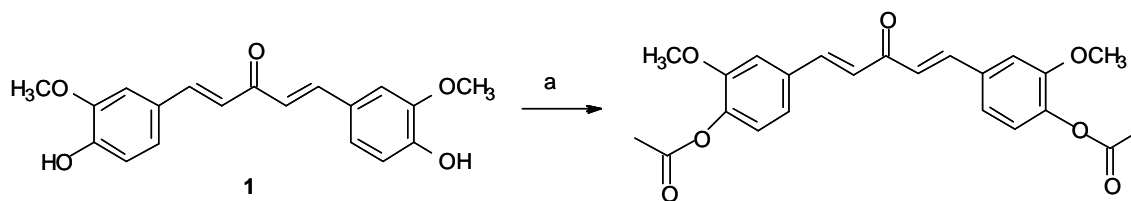


Figura 7. Síntese do 1,5bis(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-penta-1,4-dien-3-ona, a partir do composto 1; (a) em anidrido acético em presença de acetato de sódio.

2.2. Estudos farmacocinéticos dos curcuminóides

A farmacocinética pode ser definida como a seqüência temporal das concentrações do fármaco alcançadas em diferentes regiões do organismo durante e após a administração de uma dose, isto é, os eventos observados após a interação do fármaco com seu receptor, ou outro local primário de ação (RANG et. al., 2003). Ela se caracteriza, entre outros aspectos, pela construção de modelos que representam um sistema de compartimentos no organismo e nos quais se supõe que se distribui o fármaco depois de administrado. Um compartimento pode ser um grupo de tecidos com características fisiológicas e físico-químicas similares, tais como o fluxo sanguíneo, afinidade por fármacos, etc. Depois de sua introdução na corrente sanguínea, por um processo de absorção, bem como, por injeção intravenosa, o fármaco se distribui nestes compartimentos. O processo de absorção é, em geral, rápido e se caracteriza por ser reversível. Sendo assim, o fármaco presente no sangue se encontra em estado de equilíbrio com o fármaco em outros fluidos, tecidos ou órgãos de distribuição. Como consequência deste equilíbrio, as trocas de concentração do fármaco no sangue indicam trocas de concentração em outros compartimentos. A transferência do fármaco do sangue para urina ou a outros compartimentos de excreção, assim como os processos de biotransformação dos fármacos, no plasma e tecidos, em produtos metabólicos, geralmente inativos, são processos irreversíveis. Esta irreversibilidade dá lugar ao processo denominado eliminação, que compreende todos aqueles mecanismos que determinam à

eliminação do fármaco do organismo, seja por excreção urinária, biliar ou outras vias (CÁRCAMO, 1982). A farmacocinética também pode ser definida como sendo o estudo da dinâmica de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de um fármaco (WILKINSON, 2001). Assim, o objetivo da farmacocinética é descrever as alterações na concentração de fármacos e de seus metabólitos nos vários fluidos do organismo e tecidos em função do tempo. Equações matemáticas e modelos são utilizados para descrever os resultados experimentais e para obter parâmetros farmacocinéticos, tais como: constante de velocidade de transferência (k), constantes de absorção, metabolismo e eliminação de fármacos, volume de distribuição (V_d), o grau de ligação às proteínas plasmáticas, entre outros (WILKINSON, 2001).

Diversos trabalhos têm tido como alvo, o estudo do perfil farmacocinético da curcumina e seus metabólitos. Na pesquisa de novos fármacos para o combate e prevenção de doenças, um quesito que é bastante avaliado é a questão da absorção e biodisponibilidade da substância, desde o local de aplicação até a chegada ao plasma. A absorção depende fundamentalmente de fatores como motilidade gastrointestinal, pH gastrointestinal, tamanho de partículas e interação físico-química da substância com o conteúdo intestinal.

A curcumina apresenta baixa biodisponibilidade por via oral (MAITI et al, 2007 e WANG et. al, 2008). Em ensaios para avaliação da biodisponibilidade da curcumina em ratos, após administração por via oral (500 mg/Kg), a biodisponibilidade oral foi em torno de 1% (YANG et al, 2007). A curcumina presente no plasma dos ratos foi quantificada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS), após validação do método bioanalítico.

A grande dificuldade para continuidade dos estudos das propriedades da curcumina é a sua baixa solubilidade em água, sendo assim os pesquisadores têm buscado outras alternativas e mecanismos para melhorar a absorção da substância. Dentre elas, o uso de nanopartículas lipídicas para a distribuição de curcumina em tecidos de macrófagos da região da medula óssea e baço, por via intravenosa, que apresentou bons resultados, 6 horas após a administração. Pôde ser observado através de microscopia que a curcumina tinha sido em grande parte distribuída pelos

tecidos. Esse sistema pode ser útil e apropriado para terapias antioxidante e antiinflamatórias (SOU et al, 2007).

Uma nova formulação de curcumina em combinação com os fosfolipídios com o propósito de superar a limitação de absorção, e de investigar o efeito protetor do complexo curcumina-fosfolipídeo em tetracloreto de carbono (CCl₄), por um processo de indução hepática em ratos, permitiu avaliar as enzimas hepáticas na condição de estresse oxidativo. O complexo curcumina-fosfolipídeo protegeu o fígado, restabelecendo os níveis de enzimas do sistema glutatona hepática e de superóxido dismutase, catalase e ácido tiobarbitúrico em relação ao grupo tratado com tetracloreto de carbono. O complexo proporcionou melhor proteção para o fígado de ratos do que a curcumina livre em doses iguais. O resultado mostrou que o complexo curcumina-fosfolipídeo obteve melhor atividade hepatoprotetora. Além disso, apresentou atividade antioxidante superior à da curcumina livre, no mesmo nível de dose (MAITI et al, 2007).

Estas possibilidades podem ser estendidas a outros derivados da curcumina que apresentaram atividade biológica superior, mas que apresentam os mesmos problemas de solubilidade.

LIANG e colaboradores (2009) analisaram o perfil farmacocinético do composto **1** comparado à curcumina, após administração oral de 500 mg/kg, por via oral, em camundongos. A absorção de **1** foi em torno de 10 vezes maior que a curcumina, além de apresentar meia-vida 2 vezes superior e como consequência a metabolização foi mais lenta.

2.3. Estudos de relação entre estrutura química e atividade biológica (REA) da curcumina e análogos monocarbonilados

Durante a última década, estudos com modificações na estrutura da curcumina apontaram para um aumento da bioatividade, por isso, estes compostos têm sido intensamente estudados. Entretanto, alguns desses estudos estão focados na melhora do perfil farmacocinético. Estudos anteriores sugerem que o perfil

metabólico e a estabilidade da curcumina (**3**) pode ser aumentado pela retirada da fração β -cetona (LIANG et al, 2008).

Não existem ainda estudos que comprovem o mecanismo de ação do composto **1**, bem como para os curcuminóides em geral (ANAND et al, 2008). Mas, acredita-se que as duas hidroxilas sejam importantes para o efeito biológico. Apesar da vasta ação biológica apresentada pelo composto **1** e derivados, o grande problema relacionado à aplicação clínica é a instabilidade dos compostos e problemas relacionados à absorção e biodisponibilidade. Sendo assim, existe um grande interesse na síntese e na exploração do potencial biológico de compostos análogos que possuam uma estrutura mais estável (Figura 8), onde se tem um composto monocarbonílico.

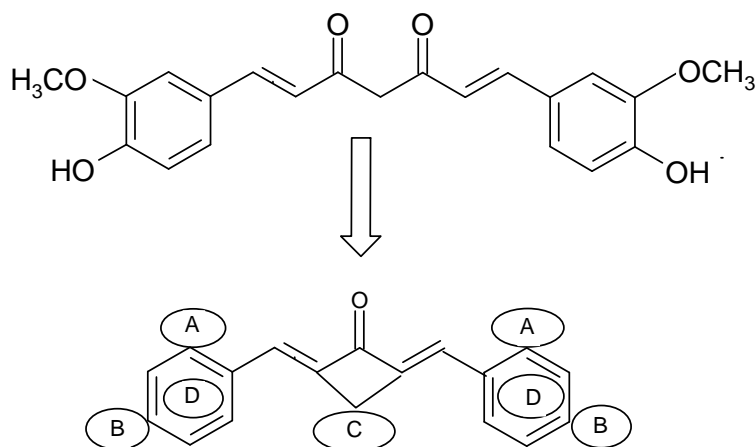


Figura 8. Estrutura geral dos derivados monocarbonilados estruturalmente relacionados à curcumina, utilizados para estudos de REA (sem a β -cetona).

Para os derivados monocarbonilados com estrutura geral representada anteriormente, os estudos de REA mostraram que um substituinte fortemente retirador de elétrons na posição **A** pode aumentar a bioatividade e, quanto mais eletroatraente é o grupo, mais citotóxico é o composto. Um doador fraco de elétrons na posição **B** é mais favorável para a atividade antitumoral do composto, enquanto que um forte retirador de elétrons pode remover a bioatividade do composto. A presença de uma cetona ou uma cicloexanona na posição **C** aumenta a atividade do composto quando comparado com uma ciclopentanona. A presença de um

heteroátomo em qualquer posição do anel é bem acessível do ponto de visto farmacológico.

A atividade citotóxica contra células cancerígenas tem um aumento expressivo quando a posição **C** é ocupada por uma cetona ou uma cicloexanona, quando comparado com a curcumina. O composto com uma cetona em **C** (composto **1**) apresentou expressiva atividade antiproliferativa frente a células de tumores de mama e próstata, apresentando potência 4 vezes maior que a curcumina (FUCHS et al, 2009).

A exploração de estudos de REA com análogos da curcumina é cada vez mais freqüente, com o propósito de encontrar substâncias com maior estabilidade, seletividade e biodisponibilidade.

2.4. Metabolismo de fármacos

O metabolismo de fármacos envolve dois tipos de reações importantes conhecidas como reação de fase I e fase II, que freqüentemente, mas não de forma invariável, essas reações ocorrem em seqüência (Figura 9). As reações de fase I são catabólicas (oxidação, redução e hidrólise) e quase sempre os produtos são mais reativos. As reações de fase II são sintéticas (anabólicas), e envolvem a conjugação com a formação de compostos inativos (RANG et al, 2003). As reações de fase I e II ocorrem no fígado, embora algumas ocorram no plasma.

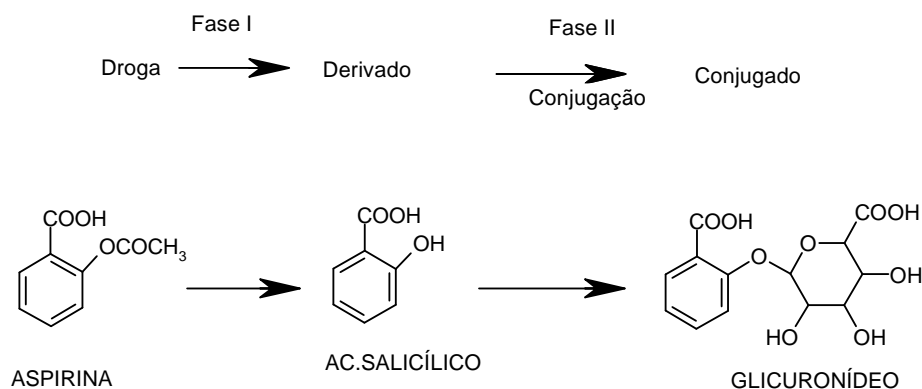


Figura 9. Exemplo das duas fases no metabolismo de fármacos: metabolização da Aspirina[®].

2.4.1. Mecanismo da enzima citocromo P450 (CYP 450)

2.4.1.1. Reações de fase I

As enzimas do citocromo P450 formam uma grande família de enzimas correlatas, porém distintas. Até o momento se sabe que existem 74 famílias de genes CYP, sendo que três principais (CYP1, CYP2 e CYP3) estão envolvidas no metabolismo de fármacos no fígado humano. A oxidação dos fármacos pelo sistema da monooxigenase P450 necessita da presença do fármaco que atua como substrato, da enzima P450 e, além disso, de oxigênio molecular, NADPH e uma flavoproteína (NADPH-P450 redutase). A seguir estão relacionadas as enzimas envolvidas no metabolismo de alguns dos fármacos mais utilizados na terapêutica (Tabela 5) (RANG et al , 2003).

Tabela 5. Exemplos de fármacos comuns que são substratos das isoenzimas CYP P450.

Isoenzima P450	Fármacos
CYP1A1	Teofilina
CYP1A2	Cafeína, paracetamol, tacrina e teofilina
CYP2A6	Metoxiflurano
CYP2C8	Taxol
CYP2C9	Ibuprofeno, fenitoína, tolbutamida, warfarina
CYP2C19	Omeprazol
CYP2D6	Clozapina, codeína, debrisoquina, metoprolol
CYP2E1	Álcool, enflurano, halotano
CYP3A4/5	Ciclosporina, losartan, nifedipina, terfenadina

2.4.1.2. Reações de fase II

Se o fármaco tiver um grupo hidroxila, tiol ou amino na molécula original ou num produto decorrente do metabolismo de fase I, ele é suscetível à conjugação, isto é, a fixação de um grupo substituinte e essa etapa é conhecida como fase II.

Os grupamentos mais freqüentes envolvidos na formação de conjugados são: Sulfato, metila, acetila, glicila e glutaciona. A formação de glicuronídeo envolve a formação de um composto de alta energia – o ácido uridina – difosfato – glicurônico (UDPGA). Ocorrem também reações de acetilação e de metilação com as enzimas (Tabela 6) (RANG et al, 2003).

Tabela 6. Exemplos de reações de conjugação de fase II.

Tipo de reação	Substrato	Enzima envolvida	Produto
Glicuronidação	R-OH		R-O-G
	RNH ₂	UDPG →	RNH-G
	R-SH	UDPG Tranferase	R-S-O
Metilação	R-OH	S-adenosil-metionina →	R-O-CH ₃
Acetilação	RNH ₂	Acetil – Côa N- acetiltransferase →	RNHCOCH ₃

2.4.2. Produtos de decomposição e metabolização da curcumina

Estudos comprovaram um grande efeito na inibição de algumas isoformas da enzima citocromo P450 como a CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 e CYP2B6 pela curcumina (**3**) e os metabólitos vanilina, ácido vanilínico, ácido ferrúlico e aldeído ferrúlico (Figura 10), obtidos por decomposição da curcumina em pH 7,4, o que pode comprometer a eficácia de um tratamento terapêutico pela ineficiência da absorção de medicamentos (OPONG et al, 2007).

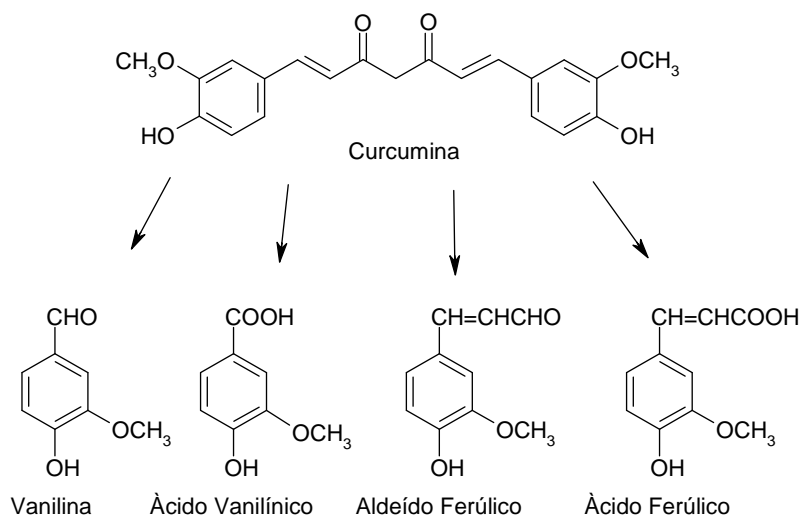


Figura 10. Produtos de decomposição da curcumina.

2.5. Validação de métodos analíticos

A validação é o ato ou efeito de validar, tornar válido, tornar legítimo ou legal, com o objetivo de diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado que foi gerado. Entre esses fatores podem ser citados: variabilidade de amostra, eventual contaminação, reagentes inadequados, pipetagem errada, variações de temperatura, descuido na manutenção de equipamentos, calibração ineficiente, analista despreparado e perdas durante a análise. Segundo a ANVISA (RE 899/03) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações pretendidas, assegurando a confiabilidade dos resultados. No desenvolvimento de um método analítico, é importante avaliar se os parâmetros de validação estão de acordo com os requisitos estabelecidos pelo protocolo utilizado na validação da metodologia. Com relação aos parâmetros de desempenho e critérios de aceitação, os laboratórios, ao reproduzirem métodos oficiais este é considerado validado quando forem avaliados parâmetros como precisão, especificidade e linearidade. No caso de metodologias não-oficiais, a metodologia só será considerada validada se forem avaliados os seguintes requisitos, quando aplicável: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (ANVISA, RE 899/03, SHAH et al, 1991 e FDA, 1995).

2.5.1. Especificidade

É a capacidade que o método analítico possui em discriminar a substância a analisar de outras substâncias presentes na matriz (isômeros, metabólitos, produtos de degradação, componentes da matriz, etc.). Este parâmetro de desempenho do método, após as investigações necessárias, é utilizado para a avaliação de possíveis falsos negativos, falsos positivos e se a quantificação é apreciavelmente influenciada (ANVISA, 2003).

2.5.2. Limite de detecção

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, não necessariamente quantificado sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Limite de detecção do método (LDM) é a menor concentração de uma substância que pode ser detectada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero.

2.5.3. Limite de quantificação

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinada, com precisão e exatidão aceitáveis, sob condições experimentais aceitáveis (ANVISA, 2003).

2.5.4. Faixa linear de trabalho

Em um determinado método quantitativo, existe um determinado intervalo de concentração em que o analito pode ser quantificado com exatidão, precisão e linearidade adequadas. Este intervalo especificado compreende a faixa superior e inferior do limite de quantificação, sendo definido pela resposta do analito no equipamento em que foi efetuada a análise. Na maioria dos casos este procedimento é derivado do estudo da linearidade (ANVISA, 2003). Na prática, a linearidade é determinada por intermédios de gráficos de calibração, seguidos de tratamento estatístico.

O número mínimo de pontos geralmente aceito nos gráficos de calibração varia entre 5 e 8 pontos. As concentrações devem ser escolhidas de forma a cobrir uma faixa desde 50% até 150% do valor que se espera encontrar na amostra em estudo (SHAH et al, 1991).

2.5.5. Exatidão

Expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro. Valores baixos de exatidão são ocasionados por erros sistemáticos que provocam desvios ou tendências nos resultados. Assim uma exatidão expressa como 105% indicaria uma tendência positiva de desvio de 5%, enquanto uma exatidão expressa como 95% significaria uma tendência negativa de 5%. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são a utilização de materiais de referência certificados (MRC), comparações interlaboratoriais e testes de recuperação (INMETRO, 2002).

2.5.6. Precisão

Expressa a concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra, podendo ser avaliada em condições de repetibilidade ou reprodutibilidade. A precisão pode ser expressa como intradia (intra-day), quando medida no mesmo dia, ou como interdias (inter-days), quando medida ao longo de vários dias. Sendo essas determinações particularmente importantes no caso de amostras biológicas (LANÇAS, 2004).

2.5.7. Repetibilidade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, sob as mesmas condições analíticas, chamadas de condições de repetibilidade. Devem ser usados os mesmos procedimentos de medição, analista, local e repetições em um curto espaço de tempo.

Em análises cromatográficas é importante conhecer a repetibilidade de pelo menos dois parâmetros: o tempo de retenção e área do tempo de retenção, já que

na maior parte das análises cromatográficas, ela é usada para confirmação de identidade do composto. A repetibilidade da área de um pico é importante por ser o parâmetro utilizado na quantificação do composto de interesse (LANÇAS, 2004).

2.5.8. Precisão intermediária

Trata-se da concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou equipamentos diferentes. Recomenda-se pelo menos um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes. A variação entre dias, por exemplo, pode ser avaliada preparando-se uma nova solução de amostra, do padrão e de fase móvel, a cada dia (LANÇAS, 2004).

2.5.9. Reprodutibilidade

É a concordância entre os resultados das medições efetuadas em condições variadas de medição. O estudo da reprodutibilidade é realizado através de estudos colaborativos entre laboratórios. Na maioria das vezes é utilizada para a padronização de metodologias ou para inclusão de métodos analíticos ou farmacopéias. Sua grande importância se dá pelo fato de confirmar se determinada metodologia pode ou não ser transferida de um laboratório para outro, gerando resultados aceitáveis dentro dos critérios estabelecidos (LANÇAS, 2004, INMETRO, 2002).

2.5.10. Seletividade

Corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias que possam interferir na determinação. Tem grande importância nas análises de resíduos de pesticidas em alimentos por exemplo. Em geral uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse (LANÇAS, 2004).

Entretanto, para matrizes complexas (como resíduos de pesticidas em alimentos, fármacos em medicamentos, etc) somente esse critério poderá não ser suficiente para atestar a seletividade de um método. Deve-se ainda, demonstrar que o pico observado no tempo de retenção do analito de interesse possui apenas o componente de interesse, ou seja, é realmente o analito procurado. Isso é importante em decorrência da possibilidade de co-eluição do composto com outros interferentes principalmente em análise contendo muitos compostos (ANVISA, 2003).

2.5.11. Recuperação

Trata-se de uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente. Deve-se avaliar a recuperação em várias concentrações, uma vez que esta pode variar bastante em concentrações muito baixas. Em geral, o valor obtido empregado na fórmula é a media das várias recuperações conseguidas em diferentes concentrações. Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa de 70% -120% são aceitas, a menos que a faixa desejada seja especificada com outros valores (LANÇAS, 2004 e SHAH et al, 1991).

A quantificação do analito durante os estudos de recuperação é, geralmente, feita por meio de métodos do padrão externo ou do padrão interno. O método do padrão externo é mais simples, rápido e barato, porém muitas vezes sujeito a erros; o método do padrão interno é mais demorado, caro e menos sujeito a erros, desde que o padrão interno seja escolhido adequadamente (LANÇAS, 2004).

2.5.12. Padrão Externo

Neste caso, a porcentagem em massa de uma amostra de concentração desconhecida é determinada a partir de um gráfico de calibração.

2.5.13. Padrão Interno

O padrão interno é um composto que é adicionado à amostra contendo o componente cuja massa se pretende determinar, de forma que nunca interfira na análise (LANÇAS, 2004). Para tal, ele deve:

- (a) nunca ser encontrado na amostra
- (b) estar disponível em elevado grau de pureza
- (c) ser adicionado à amostra em concentrações similares ao composto a ser analisado.

Esse procedimento é útil, pelo fato de independer de pequenas mudanças em variáveis experimentais, como temperatura da coluna, fluxo do gás de arraste e tamanho da amostra.

2.5.14. Estabilidade

Refere-se ao tempo durante o qual as soluções-padrão e da amostra contendo o analito podem ser utilizadas sem que haja decomposição apreciável dentro de condições experimentais fixadas.

Dependendo do analito, da matriz e do objetivo do estudo, as condições de avaliação da estabilidade dos analitos podem ser melhor ajustadas. Assim, por exemplo, é comum determinar a estabilidade das soluções em função da temperatura, em diferentes tempos de estudo (LANÇAS, 2004).

2.6. Espectrometria de massa

A espectrometria trata-se de um método de análise baseado na medida de absorção quando um feixe de luz branca passa através dele. Quando se tem a radiação é devido às reflexões na superfície e em parte à dispersão por qualquer partícula em solução, mas acima de tudo, é devido à absorção da energia radiante pelo líquido (MOFFAT et al, 1986).

Na mistura de componentes (princípios ativos), a espectroscopia direta muitas vezes não pode caracterizá-los, devido à superposição de bandas, impedindo assim a caracterização do componente de interesse.

2.7. Cromatografia líquida alta eficiência (HPLC)

É um método físico-químico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases: uma fixa de grande área superficial denominada fase estacionária, e outra um fluido que percorre através dela sendo por isto, denominada fase móvel (COLLINS et al, 1997).

3. OBJETIVO

Desenvolvimento de um método bioanalítico para quantificar o 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio (**2**, DM1), em amostras de plasma e realizar os experimentos de farmacocinética e biodistribuição deste princípio ativo, que são indispensáveis para a continuidade dos experimentos pré-clínicos que se encontram em fase bastante avançada de desenvolvimento, visando sua aplicação clínica como antitumoral.

3.1. Objetivos específicos

- Desenvolver um método específico de análise e quantificação do composto em estudo na ausência de interferentes;
- Determinar uma metodologia eficiente de extração do princípio ativo de amostras de plasma;
- Validar o método analítico (precisão e exatidão) e determinar o limite de detecção e quantificação do método;
- Avaliar o perfil farmacocinético e de biodistribuição da substância em diferentes órgãos de camundongos;
- Analisar os possíveis metabólitos do DM1.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Solventes, reagentes e outros materiais

- Metanol grau cromatográfico (Merck®)
- Acetonitrila grau HPLC (Merck®)
- Ácido acético glacial 100 % p.a. (Merck®)
- 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-penta-1,4-dien-3-ona (1)
- 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio (2, DM1)
- Papel de filtro quantitativo
- Tubos de ensaio
- Micropipetas Eppendorf

4.2. Equipamentos

- HPLC Shimadzu – Modelo SPDV 10 AV (INCOR-HC-FM-USP)
- Detector de UV - $\lambda = 210$ nm
- Coluna Shim-pack 4,6 mm I.D X 15 cm, CLC-ODS (M) C18
- Pré-coluna Luna C18 (2) (Phenomenex)
- HPLC Shimadzu – Modelo SPDV 10 AV acoplado a um Espectrômetro Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics) equipado com “Electrospray” para ionização da amostra - (Central analítica – IQ-USP)
- Espectrômetro acoplado a um HPLC Shimadzu LC-10AD (Shimadzu) (Central analítica – IQ-USP)
- Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GC-17A acoplado ao um espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP5050A - (Central analítica – IQ-USP)
- Centrífuga de alta rotação 10000 rpm (Eppendorf)
- Balança de precisão de 0,01g (Mettler Toledo)
- Sistema Millipore de purificação de água MilliQ-Plus.

4.3. Metodologia

4.3.1. Síntese da 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona (2) e seu respectivo sal sódico (DM1, composto 1)

Os compostos foram obtidos de acordo com procedimentos já descrito na literatura (SUÁREZ et al, 2006).

Procedimento: Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 0,01 mol (1,56 g) de vanilina e 2,0 mL de ácido clorídrico e deixou-se em banho de ultra-som por 10 minutos para dissolução da vanilina. Foram adicionados 0,005 mol (0,37 mL) de acetona e a mistura permaneceu em banho de ultra-som, resfriado, por mais 3 horas. Deixou-se a reação em repouso por 8 dias. Dissolveu-se a mistura reacional em solução de NaOH (1M), em banho de gelo, e em seguida acidificou-se com solução de HCl 50 %, formando-se um precipitado amarelo-esverdeado, que foi filtrado e lavado com água. O sólido obtido foi dissolvido em acetonitrila e foi-se adicionando água até precipitação. O sólido amarelo-claro foi filtrado e seco sob vácuo, obtendo-se rendimento de 84 %. O produto (composto 2) obtido foi dissolvido em etóxido de sódio/etanol, em uma relação molar 1:1 de etóxido/composto 2. A mistura foi agitada até completa dissolução da substância. O solvente foi removido em rotaevaporador, restando um sólido marrom escuro (sal sódico), DM1, com rendimento de 100 %.

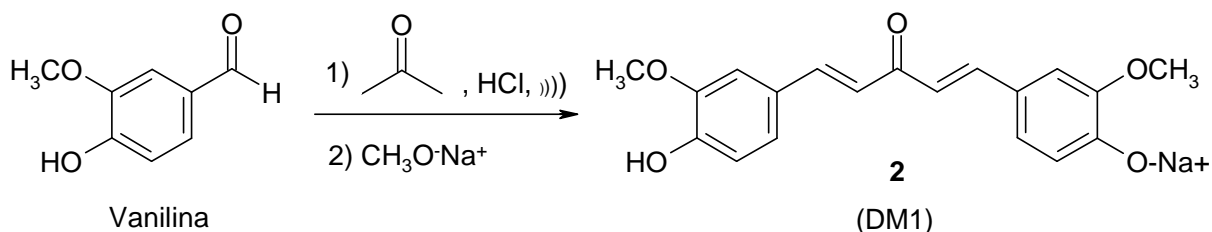
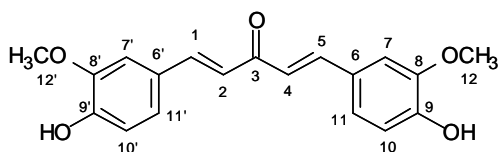


Figura 11. Síntese do 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio (2).



$C_{19}H_{18}O_5$
326,34 g/mol

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 3,88 (s, 6H, H12 e H12'), 6,94-7,05 (m, 4H, H2, H4, H11 e H11'), 7,10-7,30 (m, 4H, H1, H5, H10 e H10'), 7,60 e 7,58 (s, 2H, H7 e H7').

^{13}C NMR (62,9 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 55,82 (C12), 111,55, 121,39, 125,37, 129,64, 129,87,

129,92, 133,51, 141,73, 142,64, 151,41 (C=C alifáticos e aromáticos), 188,40 (C3).

IV (KBr): ν (cm^{-1}) = 1712 (C=O, cetona), 1600 (C=C), 1507 (CH_3), 1255 (C(O)-O aromático).

4.3.2. Análise dos compostos 1 e 2 (DM1) por ultravioleta (UV)

Foi dissolvido 1 mg de cada um dos compostos em metanol grau HPLC e foi feita uma varredura em espectrofotômetro de UV, de 190-500 nm para determinação do comprimento de onda máximo de absorção para análise no HPLC.

4.3.3. Preparo da solução estoque e das curvas de calibração do DM1 (2)

Uma solução estoque primária de plasma de concentração 0,5 mg/mL foi preparada a partir da solução de DM1 1,0 mg/mL, e em seguida foi congelada no freezer na temperatura de 4 °C. Esta solução foi diluída em plasma para preparar os padrões de plasma nas concentrações de 7,8 a 1000 μ g/mL. A cada tubo foram adicionados 200 μ L das soluções padrão de plasma e 400 μ L de acetonitrila. Os tubos foram agitados em vórtex por 1 minuto e então centrifugados a 10000 rpm por 10 min, em seguida 500 μ L do sobrenadante foram transferidos para tubos de ensaio limpos e evaporados sob fluxo de nitrogênio a 36 °C. O resíduo foi reconstituído com 200 μ L de metanol e 20 μ L foram injetados no HPLC.

4.3.4. Condições Cromatográficas

A pureza e quantificação do DM1 foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em equipamento Shimadzu Modelo SPD-10AV com detector de UV ($\lambda = 210$ nm), coluna Shim-pack 4,6 mm I.D X 15 cm, CLC-ODS (M) C18 (Shimadzu, Columbia, ML) e uma pré-coluna Luna C18 (2) (guard cartridge) (Phenomenex, Torrance, USA). Foi utilizada uma mistura de água:acetonitrila:ácido acético (65:33,75:1,25) como fase móvel a um fluxo de 1,0 mL/min. Para a quantificação das amostras foi realizada uma curva de calibração com concentrações de 7,8 -1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.5. Espectrometria de massa

O espectro de massas dos metabólitos do DM1, foi obtido em espectrômetro Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics) equipado com electrospray para ionização da amostra e acoplado a um HPLC Shimadzu LC-10AD na Central Analítica do Instituto de Química da USP. As amostras foram diluídas em metanol e 50,0 μL foram injetados no HPLC, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente. Como gás de nebulização foi utilizado nitrogênio ultra-puro a 7 L/min. Os metabólitos foram analisados com potencial de 4 kV para o capilar de ESI (ionizador eletro-spray) e temperatura de 320 °C. A análise foi realizada utilizando varredura de scan de m/z 50 a 500.

4.3.6. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

A análise dos metabólitos do DM1 também foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), utilizando um cromatógrafo Shimadzu GC-17A (Shimadzu, Columbia, ML), espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP5050A (Shimadzu, Columbia, ML), de baixa resolução. Utilizou-se ionização por impacto de elétrons (EI). Temperatura inicial 40 °C, temperatura final de 280 °C, varredura de 0-550 m/z . Variação de temperatura da coluna, 10 °C/min. Coluna SGE BPX5 30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 μm film.

4.3.7. Espectrofotometria de UV

Os dados de espectrofotometria de ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro Beckman DU 530 UV/Vis (Life Science) e Hitachi U2001 Spectrophotometer.

4.3.8. Validação de Método bioanalítico por HPLC

Enquanto que a exatidão envolve a comparação com o valor tido como certo, a precisão compara o resultado com medidas feitas do mesmo modo.

A exatidão de uma medida é geralmente descrita em termos de erro absoluto e que é definido como a diferença entre o valor observado e o valor aceito como verdadeiro. O valor pode ser expresso como erro absoluto (AE) ou erro relativo (RE) (fórmulas abaixo).

$$CV = \frac{DP}{Média} \quad (\text{eq. 1})$$

$$AE = \text{CONCENTRAÇÃO ABSOLUTA} - \text{CONCENTRAÇÃO ENCONTRADA} \quad (\text{eq. 2})$$

$$RE = \frac{\text{CONCENTRAÇÃO ABSOLUTA} - \text{CONCENTRAÇÃO ENCONTRADA}}{\text{CONCENTRAÇÃO ABSOLUTA}} \quad (\text{eq. 3})$$

$$RE \% = (RE - 1) \times 100 \quad (\text{eq. 4})$$

Para validar o método (controle de qualidade – QC) foram determinadas precisão e exatidão.

Para avaliar a precisão, foram preparadas amostras nas concentrações baixa, média e alta (15,6, 62,5 e 250 µg/mL).

Foram preparados 10 mL amostra de plasma para cada uma das três concentrações e analisados no mesmo dia da preparação (análise interdica - “intra-day”), foram tiradas cinco alíquotas de cada uma das concentrações para fazer o

procedimento de extração e posterior análise. O restante da amostra foi armazenado no freezer a -20°C e descongelado em outros dias para a análise de “inter-day” (3^o dia – 1^o ciclo). Foram retiradas novamente cinco alíquotas para extração e análise, o plasma foi congelado novamente e descongelado em outros dois dias (8^o dia – 2^o ciclo e 15^o dia – 3^o ciclo) para extração e análise. Foram calculadas as médias, desvio padrão, coeficiente de variação (CV) que é o desvio padrão dividido pela média. Também foram calculados, o CV percentual, multiplicando-se o valor encontrado de CV por 100, o erro relativo (RE), que é a média da concentração absoluta menos a média das respectivas concentrações no interdia e no intradia, dividido pela concentração absoluta. Este valor pode ser representado desta forma simplesmente ou por valores percentuais, pegando-se o valor de RE menos um e multiplicando-se por 100.

Para determinação da exatidão, que determina a eficiência da extração, foram injetadas as três concentrações (15,6, 62,5 e 250 mg/mL – oito injeções para cada concentração) diretamente, sem adicionar no plasma (amostra diluída em metanol). A concentração obtida da análise por HPLC é a concentração absoluta. As mesmas concentrações em $\mu\text{g/mL}$ de plasma foram extraídas e analisadas, obtendo-se assim, a concentração encontrada. Foram calculadas as médias, desvio padrão, coeficiente de variação, o coeficiente de variação percentual, o erro relativo (RE) que é a concentração absoluta, menos a concentração encontrada, dividido pela concentração absoluta (este valor pode ser representado desta forma simplesmente ou por valores percentuais, pegando-se o valor de RE menos um e multiplicando-se por 100). Alguns valores de RE podem ser negativos. O resultado do RE refere-se à eficiência do processo de extração.

Em alguns trabalhos de validação de método bioanalítico para experimentos de farmacocinética são representados os valores normais de RE e em outros são representados os valores percentuais, não parece ter uma regra de representação, ambas são aceitas.

4.3.8. Estudos *in vivo*

Nos experimentos de farmacocinética e biodistribuição foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c, com peso mínimo de 17g e idade de 6 a 8 semanas, obtidos do Biotério do Instituto Butantan. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, sob supervisão do Dr. Durvanei A. Maria. Este projeto é parte de um projeto maior e que já passou e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Butantan, sob o número de protocolo 408/08.

Os animais foram mantidos no biotério, à temperatura de 22 ± 3 °C, em ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso à água e ração *ad libitum*, exceto durante os experimentos. Os experimentos conduzidos de acordo com o manejo experimental de animais de laboratório e normas para investigação em animais conscientes (ZIIMMERMANN, 1983) Ao final dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

4.3.8.1. Farmacocinética e biodistribuição

Foram utilizados 09 grupos de 04 animais e mais dois como controle. Os animais injetados 50 mg/kg de DM1 (2) por via endovenosa (plexo ocular). Foram coletados 600 µL de sangue nos tempos 5', 10', 15', 30', 1h, 2h, 4h, 8h e 24h. Os animais foram sacrificados imediatamente após a coleta e os seguintes órgãos foram coletados para extração: coração, fígado, baço, pulmão, cérebro, linfonodo e rim. Os órgãos foram pesados, macerados e deixados por 24 h em clorofórmio/metanol 2:1, 5 mL, para extração. As amostras foram filtradas, concentradas sob fluxo de nitrogênio, ressuspendidas em 200 µL de metanol e analisadas em HPLC e LC/MS e GC/MS (Figura 12).

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas a 10.000 r.p.m./10min. O plasma foi separado e foram utilizados 200 µL para extração. Em cada tubo foram adicionados 400 µL de metanol, foram agitados por 1 min em vórtex e centrifugados a 10.000 r.p.m./10min. Foram transferidos 500 µL do sobrenadante para tubos de ensaio e evaporados sob fluxo de nitrogênio. As amostras foram ressuspendidas em

200 μL de metanol e injetadas no HPLC (Figura 12). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados de acordo com modelo multicompartmental usando programa da PK Solutions (Ashland, Ohio).

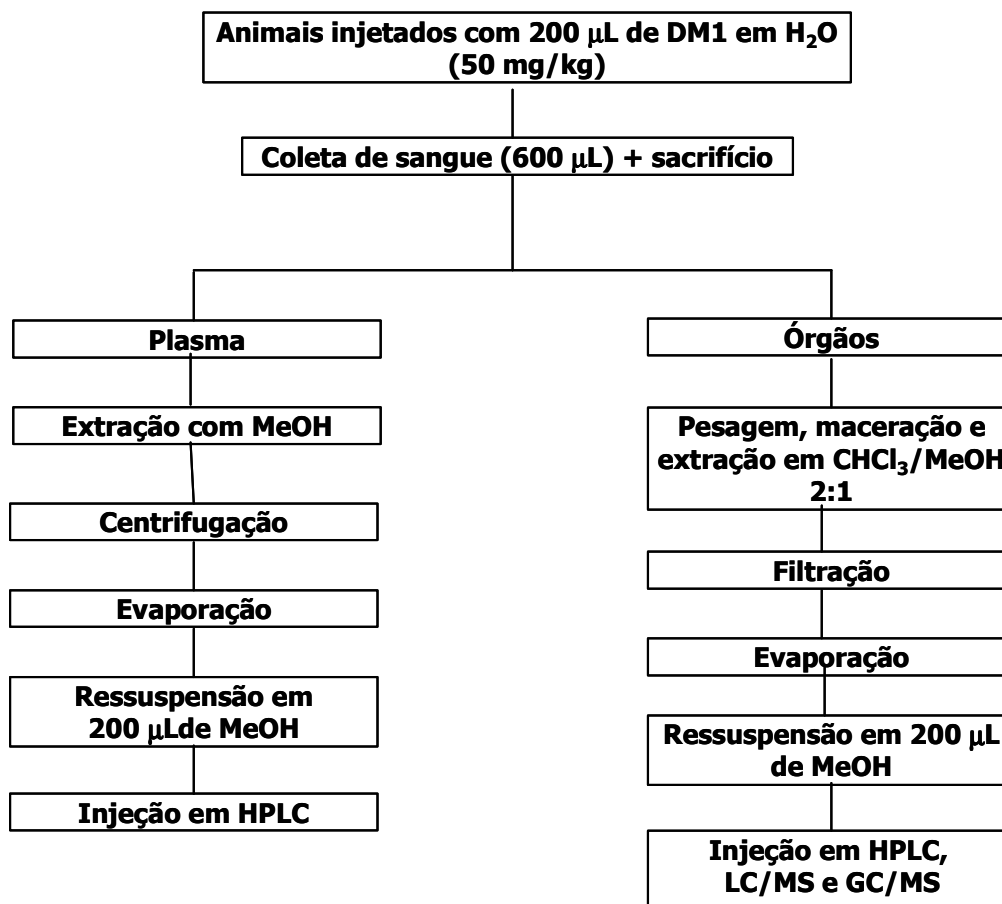


Figura 12. Fluxograma do procedimento de farmacocinética e biodistribuição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento e validação do método bioanalítico para análise e quantificação do DM1 (2)

Para o desenvolvimento do método cromatográfico de análise, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), empregando a modalidade em fase reversa, onde existe uma competição das moléculas da amostra e a fase móvel na ocupação de sítios ativos da superfície da fase estacionária apolar. Foram testados vários tipos e misturas de solventes, no sentido de ajustar o tempo de retenção entre 7 e 10 minutos de eluição, evitando assim a interferência de componentes do plasma, que normalmente saem nos primeiros minutos de eluição. O sistema de solventes que apresentou o melhor resultado foi a mistura água:acetonitrila:ácido acético (65:33,75:1,25) a um fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda da análise de 210 nm. O pico do analito encontra-se em 8,8 minutos.

As Figuras 13 e 14 mostram os cromatogramas obtidos para o composto em estudo (**2**, DM1) e para uma amostra de plasma de camundongo, após extração, respectivamente. É possível verificar que o método de análise é bastante específico, pois não existe nenhuma interferência no analito.

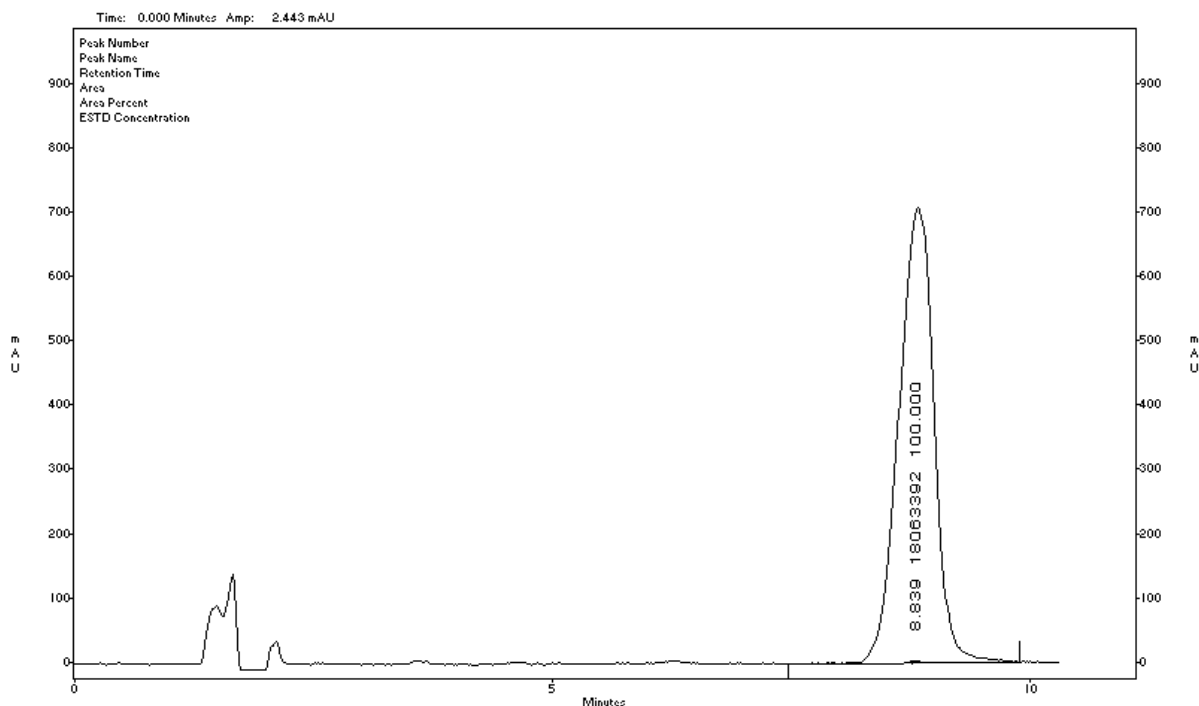


Figura 13. Cromatograma do DM1 (2) obtido por HPLC utilizando como fase móvel água:acetonitrila:ácido acético (65:33,75:1,25) a um fluxo de 1,0 mL/min e 210 nm.

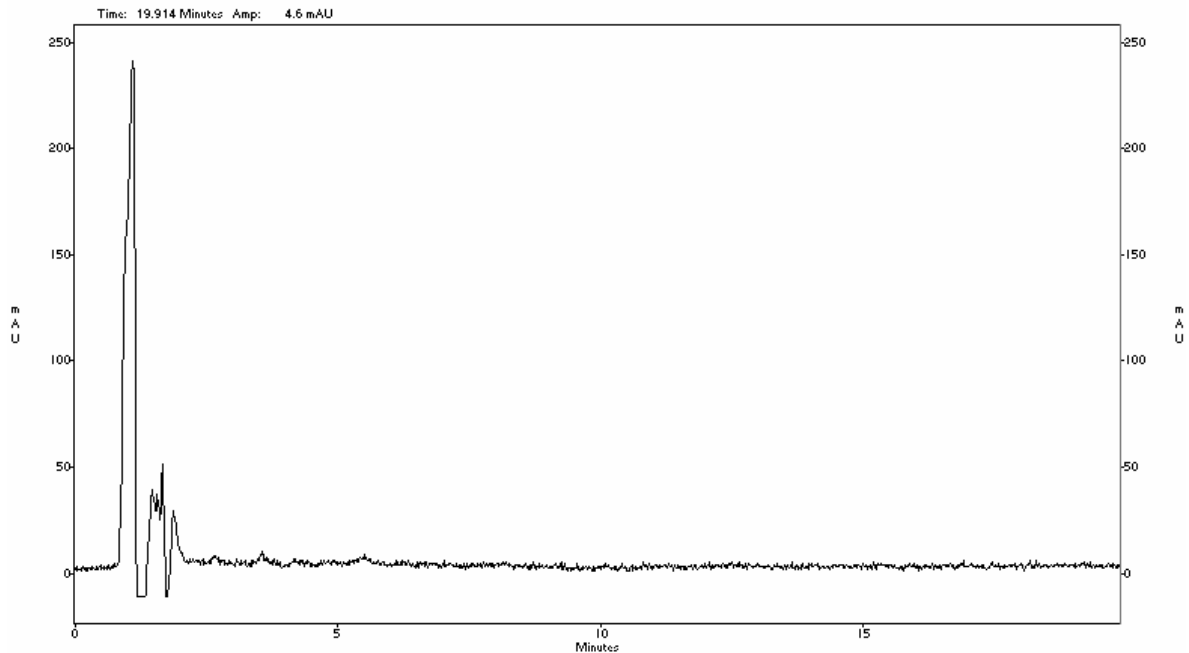


Figura 14. Cromatograma de extrato de plasma de camundongo controle obtido por HPLC utilizando como fase móvel água:acetonitrila:ácido acético (65:33,75:1,25) a um fluxo de 1,0 mL/min e 210 nm.

A escolha do melhor comprimento de onda para análise e quantificação foi feita após varredura no ultravioleta (Figuras 15 e 16). O espectro no ultravioleta do composto **1**, e seu derivado DM1 (**2**), diluídos em metanol, apresentaram boa absorção na região do visível, em torno de 370 nm, apesar disso o comprimento de onda escolhido foi 210 nm, mesmo sendo próximo do limite inferior do ultravioleta. A escolha pela análise na região do ultravioleta se deu em função dos possíveis metabólitos presentes no plasma, que poderiam não absorver na região do visível.

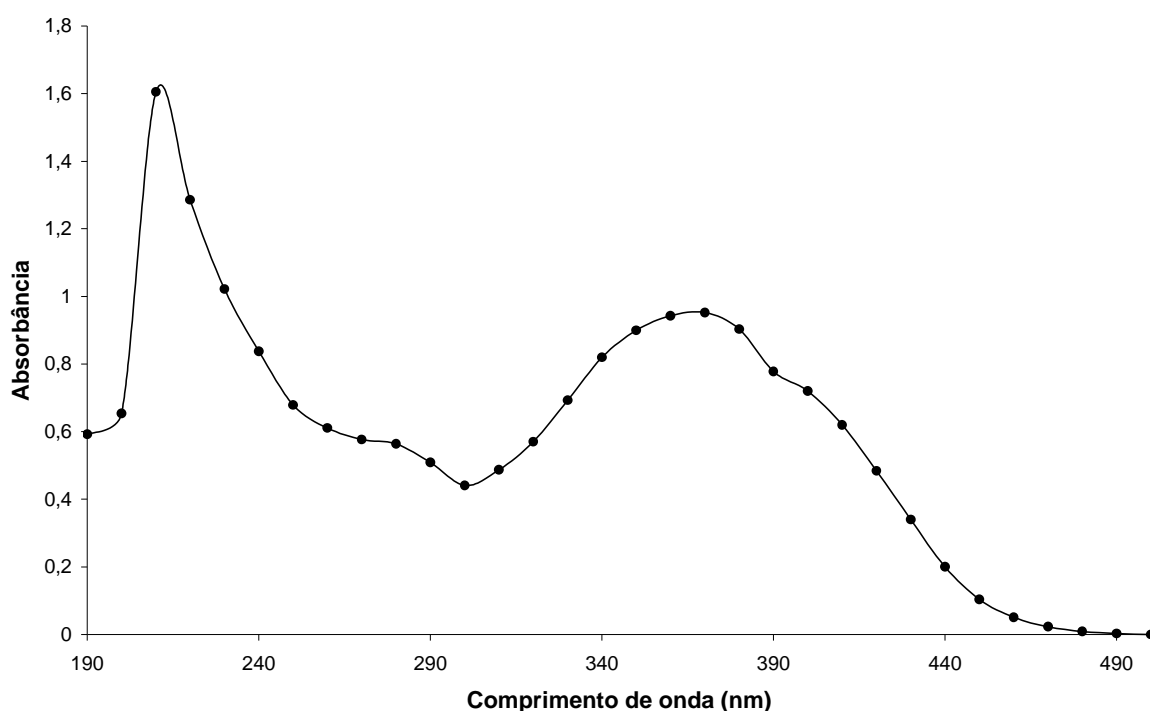


Figura 15. Varredura do composto **1** em UV, diluído em metanol.

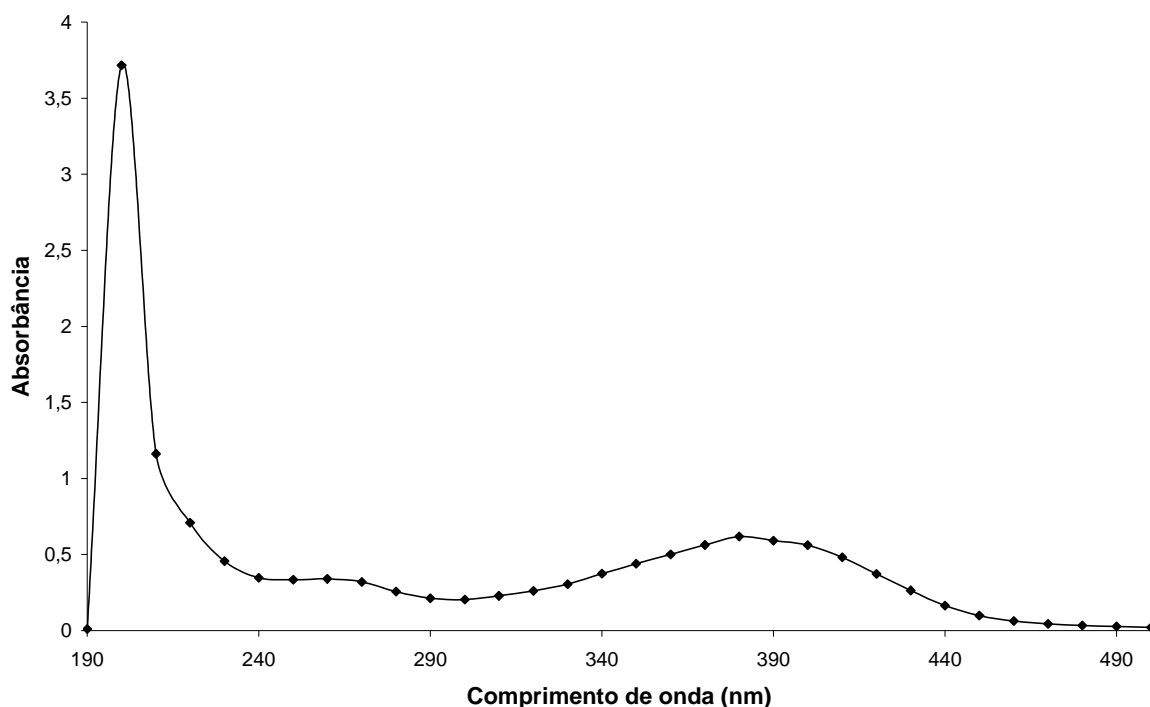


Figura 16. Varredura do composto 2 (DM1) em UV, diluído em metanol.

5.1.2. Curva de calibração

A curva de calibração, bem como toda a validação da metodologia para análise e quantificação do DM1 (2) foi realizada com plasma humano, obtido do Banco de Sangue do Instituto do coração (INCOR-HC-FM-USP). Esta escolha se deu pela impossibilidade de se obter plasma de camundongo - modelo animal utilizado para a realização dos experimentos de farmacocinética e biodistribuição - em quantidade suficiente para a realização dos ensaios.

A análise e quantificação de substâncias no plasma podem ser feitas através da injeção direta do plasma, após centrifugação, diretamente no HPLC, porém este método não é adequado devido à grande quantidade de substâncias, como proteínas e sais que estão presentes e acabam contaminando a coluna, diminuindo assim o seu tempo de vida útil. Por isso, são empregados métodos de extração,

através do uso de solventes orgânicos, que podem ser miscíveis ou imiscíveis. Quando são utilizados solventes miscíveis, o processo deve promover a precipitação das proteínas e as substâncias analisadas devem ficar solúveis no sobrenadante. Para esse fim, os solventes mais utilizados são etanol, metanol, isopropanol e acetonitrila. Quando são utilizados solventes imiscíveis, ocorre separação de fases, sendo que as substâncias analisadas devem estar solúveis na fase orgânica. Neste caso, os solventes mais utilizados são éter, clorofórmio e diclorometano.

Para extração do DM1 (**2**) do plasma, foram testadas as duas metodologias citadas anteriormente, sendo que o método de extração por precipitação se mostrou mais eficiente. Foram testados todos os solventes listados acima, tanto puros como misturas. O solvente que apresentou maior eficiência de extração foi o metanol, que promove a precipitação das proteínas plasmáticas e a solubilização do DM1 (**2**), que permanece no sobrenadante, permitindo a recuperação quase total do princípio ativo adicionado.

Foi observado que o DM1 (**2**), em pequenas concentrações, em contato com o plasma, é imediatamente convertido na sua forma neutra, o composto **1**. Isto é confirmado pela mudança de cor, de vinho escuro para amarelo, respectivamente. Indicando que o pH de 7,4, do plasma, é suficiente para promover esta transformação. Além disso, nas condições de análise cromatográfica, em que o pH é ácido, o DM1

No método analítico, a linearidade pode ser determinada por uma análise estatística de regressão linear, com isto é possível determinar a proporcionalidade entre a resposta instrumental e a concentração do analito a ser determinado (BRITTAIN,1998). A curva de calibração foi construída utilizando-se oito concentrações, 7,8, 15,63, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL de DM1 (**2**), em amostras de plasma humano. O número recomendado para se obter uma boa resposta é de 5 a 8 (SHAH, et. al., 1991). A Tabela 7 mostra a média e o desvio padrão de oito análises, para cada uma das concentrações (os dados de todas as análises encontram-se nos anexos). O valor do coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9999$) encontrado mostra boa linearidade (Figura 17).

Tabela 7. Concentração das amostras para a curva de calibração.

Conc. teórica (µg/mL)	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,8
Conc. encontrada (µg/mL)	985,50	503,88	254,88	131,25	63,13	39,00	19,55	11,91
DP	126,74	34,55	24,77	22,41	5,64	6,93	4,29	4,64

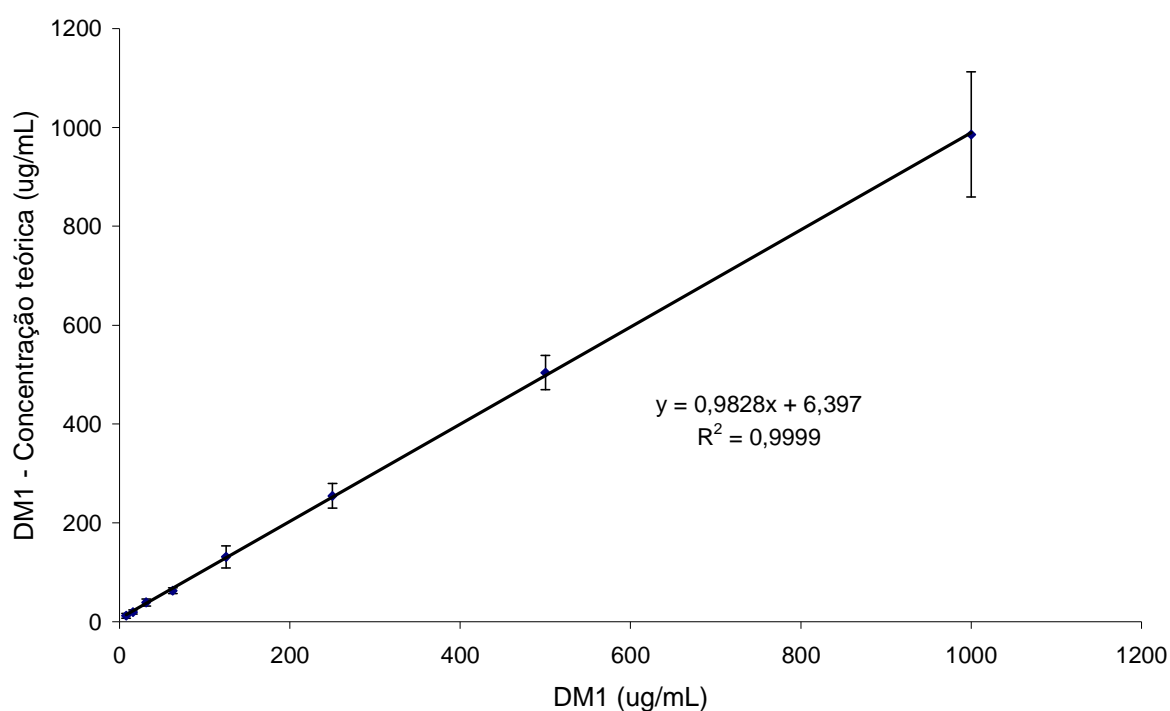


Figura 17. Curva de calibração do DM1 (2) em plasma humano.

O limite de detecção da amostra, que é a menor concentração que pode ser detectada, foi de 7,8 µg/ml e o limite de quantificação, que apresenta relação sinal/ruído maior ou igual a 3 vezes, foi de 15,63 µg/mL.

5.1.3. Precisão

A precisão do método foi determinada após a análise de 15 amostras de plasma contendo o DM1 (2), extraídas no mesmo dia da preparação (precisão intradia), e 5 amostras para cada concentração (baixa, média e alta) nos ciclos de congelamento e descongelamento, para verificar a estabilidade do princípio ativo no plasma. Normalmente, o mínimo são 5 determinações por concentração e os ciclos de descongelamento e congelamento devem ser no mínimo de 2, para validação de método bioanalítico (SHAH et al, 1991). Neste trabalho, foram utilizados 3 ciclos de congelamento/descongelamento, no 3º, 8º e 15º dia após a preparação das soluções de DM1 (2) em plasma.

Para cada concentração foram calculadas as médias das leituras, o desvio padrão e o coeficiente de variação (Tabela 8). O resultado encontrado para o coeficiente de variação, tanto para a análise de precisão intradia, como para a análise de precisão interdias foi de 7,18 – 8,58 %, para as concentrações 250 e 62,5 µg/mL e de 8,03 e 14,06 %, para 15,63 µg/mL (limite de quantificação). Os dados mostram que os valores obtidos estão dentro dos padrões estabelecidos para a validação de métodos analíticos para estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética, que não deve ser superior a 20 % para o limite de detecção, e para dos demais controles 15 % (SHAH et al, 1991).

Tabela 8. Concentração da amostras para análise da repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdias).

	Precisão intradia			Ciclo	Precisão interdias		
	250µg/mL	62,5µg/mL	15,6µg/mL		250µg/mL	62,5µg/mL	15,6µg/mL
	234,47	61,59	14,95	1o	273,47	63,46	18,28
	232,46	61,34	14,14		275,68	70,37	17,37
	251,50	70,87	15,45		266,27	69,77	15,66
	265,53	68,52	16,16		256,36	68,67	16,43
	256,51	59,37	16,16		248,15	63,06	17,98
	258,52	57,79	17,27	2o	265,27	63,46	16,67
	263,53	71,18	18,58		236,74	64,76	12,83
	243,49	60,78	16,36		251,75	54,55	14,14
	228,46	66,78	15,45		248,15	57,66	13,13
	255,51	60,88	14,85		252,55	54,05	12,63
	260,52	63,72	13,33	3o	213,71	60,26	13,33
	292,58	57,84	15,96		229,73	62,86	15,66
	221,44	59,74	17,47		240,84	63,26	11,62
	263,53	76,18	16,36		249,75	64,36	13,64
	263,53	59,14	15,66		289,29	56,56	14,65
Média	252,77	63,71	15,88		253,18	62,48	14,93
DP	18,16	5,47	1,27		19,17	5,09	2,10
CV	0,07	0,09	0,08		0,08	0,08	0,14
RSD	7,18	8,58	8,03		7,57	8,15	14,06
CV (%)	7,18	8,58	8,03		7,57	8,15	14,06

5.1.4. Exatidão

A exatidão do método foi determinada através da comparação entre a concentração absoluta (teórica) e a concentração encontrada (experimental), demonstrando a eficiência (ou exatidão) do processo de extração, que foi calculada pela divisão entre o resultado da concentração média experimental e a concentração teórica multiplicada por 100.

Taxa recuperação=[conc. encontrada/conc. absoluta] x 100.

Os valores encontrados nos cálculos para determinação da exatidão foram entre 100,08 e 102,62 %, apresentando uma tendência de erro positivo de menos de 3 % (Tabela 9), sendo que o valor da variação não deve ser maior que 15 % de erro (ANVISA 2003), no entanto para o limite de quantificação este pode ser de até 20 % (SHAH et al, 1991).

Tabela 9. Concentração das amostras para análise da exatidão (critério de aceitação para exatidão). Dados da concentração absoluta x concentração encontrada.

	Concentração (µg/mL)					
	250		62,5		15,6	
	Absoluta	Encontrada	Absoluta	Encontrada	Absoluta	Encontrada
	241,35	234,47	55,23	61,59	14,44	14,95
	266,76	232,46	69,72	61,34	18,27	14,14
	276,28	251,50	70,67	70,87	19,43	15,45
	174,08	265,53	59,04	68,52	14,22	16,16
	283,82	256,51	56,18	59,37	13,09	16,16
	238,32	258,52	76,57	57,79	16,23	17,27
	258,13	263,53	65,32	71,18	14,32	18,58
	243,56	243,49	58,30	60,78	15,78	16,36
Média	247,79	250,75	63,88	63,93	15,72	16,13
DP	34,14	12,69	7,86	5,38	2,18	1,37
CV	0,14	0,05	0,12	0,08	0,14	0,09
CV (%)	13,78	5,06	12,30	8,41	13,87	8,51
RE	-0,01		0,00		-0,03	
RE (%)	101,20		100,08		102,62	

A exatidão das análises no interdia, obtidas pela relação das concentrações encontradas nos dias da preparação das amostras, com a concentração absoluta, mostraram boa repetitividade (RE (%) de 94,97 a 102,18 %). Os resultados da análise interdias, mostraram que, além da boa repetitividade, o DM1 (2) permaneceu bastante estável durante o período de análise (RE (%) de 99,74 a 102,01) (Tabela

10). Estes valores para exatidão estão dentro daqueles preconizados na literatura (SHAH et al, 1991).

Tabela 10. Concentração da amostras para determinar a exatidão nas análises no intradia e interdias.

	Intradia			Interdias		
	250 µg/mL	62,5µg/mL	15,6µg/mL	250µg/mL	62,5µg/mL	15,6µg/mL
Média	253,18	62,48	14,93	252,77	63,71	15,88
[] absoluta	247,79	63,88	15,72	247,79	63,88	15,72
RE	-0,02	0,02	0,05	-0,02	0,00	-0,01
RE (%)	102,18	97,80	94,97	102,01	99,74	100,98

5.2. Farmacocinética e biodistribuição do DM1 (2) em camundongos

Foram analisados 9 grupos de 4 animais (BALB/c) e 2 como controle. Os nove grupos de animais receberam uma dose de 50 mg/Kg de DM1 (2) por via endovenosa, através do plexo ocular. Foram coletadas amostras de sangue nos tempos 5, 10, 15, 30 minutos e 1, 2, 4, 8 e 24 h, para análise dos parâmetros farmacocinéticos como área sob a curva (AUC), volume de distribuição (Vd), clearance (CL) e meia-vida ($t_{1/2}$ min).

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados de acordo com modelo multicompartmental usando programa da PK Solutions (Ashland, Ohio). O log da concentração plasmática versus a curva de tempo foi ajustada pela equação biexponencial e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), foi calculado pela divisão de 0,693 pela taxa constante em cada fase. O clearance total foi calculado pela divisão da dose pela área sob a curva. O volume de distribuição foi estimado graficamente através da área trapezoidal total.

A Figura 2 mostra a curva de decaimento plasmático do DM1 (2). É possível observar que já no ponto de 5 minutos (primeiro tempo de coleta) a concentração no plasma decaiu rapidamente, demonstrando que a substância é rapidamente removida do plasma e distribuída para os tecidos. Como consequência disso, o tempo de meia-vida é muito baixo, da ordem de $11,09 \pm 0,86$ minutos (Tabela 11).

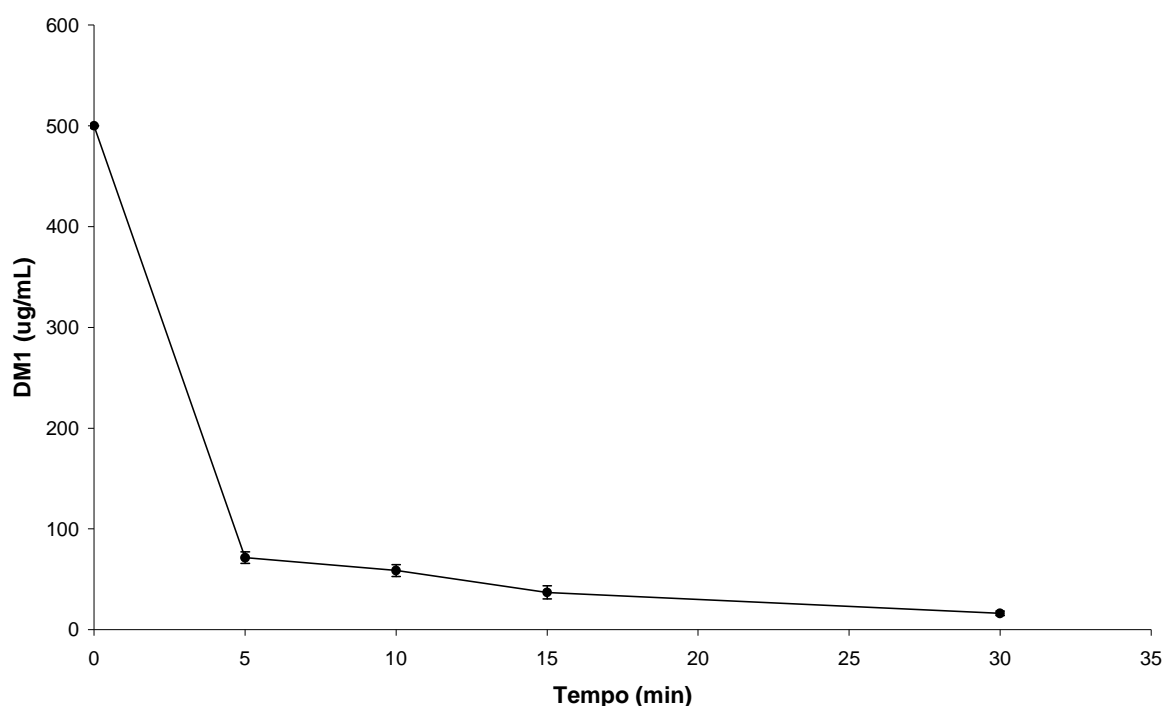


Figura 18. Curva de decaimento plasmático do DM1 (2) após a administração de 50 mg/kg em nove grupos de 4 camundongos BALB/c, em bolo, através do plexo ocular.

Tabela 11. Dados de farmacocinética do DM1 (**2**) após a administração de 50 mg/kg em nove grupos de 4 camundongos BALB/c, em bolo, através do plexo ocular.

Parâmetros	Camundongo					
	C1	C2	C3	C4	Média	DP
Dose(µg/Kg)	50.000	50.000	50.000	50.000	50.000	0,00
Cmax (µg/mL)	500	500	500	500	500	0,00
AUC(0-t) (µg-h/mL)	2332,9	2528,6	2238,1	2466,4	2391,50	130,86
Vd (mL)	334,9	285,3	318	272,9	302,78	28,65
CL(mL/h/kg)	18,96	17,71	20,45	18,56	18,92	1,15
t _{1/2} (min)	12,24	11,16	10,78	10,19	11,09	0,86

Comparando os dados obtidos com os da literatura para o composto **1** (forma neutra do DM1), o tempo de meia-vida foi reduzido de maneira expressiva, de $5,9 \pm 4,314$ horas para $11,09 \pm 0,86$ minutos. Sendo que, após 30 minutos ele desaparece da circulação plasmática. Deve-se considerar que o composto **1** foi administrado por via oral. Porém, o pico máximo de absorção foi obtido em 5 minutos após a administração. Os valores de AUC para o DM1 são muito menores e o clearance é maior, que é a depuração renal da substância. O resultado obtido mostrou que a transformação do composto **1**, no seu respectivo sal, DM1, diminuiu drasticamente o tempo de meia-vida da substância. Isto se deve, provavelmente, ao fato de o composto **1** quando na circulação, estar associado às proteínas plasmáticas, permanecendo assim por mais tempo em circulação, enquanto que o DM1 (**2**) por estar na forma livre é imediatamente distribuído pelos tecidos e órgãos, principalmente fígado e rins, que são os dois principais órgãos envolvidos nos processos de metabolização.

Em relação à biodistribuição do DM1 (**2**), não foi possível detectar a presença, nos órgãos analisados, mesmo da forma neutra. Porém, foram identificados vários possíveis metabólitos, o que justifica a rápida metabolização. A presença de metabólitos do DM1 (**2**), nos diferentes órgãos, foi analisada por LC/MS e GC/MS, após a extração em clorofórmio/metanol (2:1). Observou-se a presença de

metabólitos de fase I fase II (Figuras 19, 20, 21 e 22). Na figura 19 estão representados os possíveis metabólitos numerados de I a XV, sendo todos produtos de reação de fase I, obtidos pela ação das enzimas do citocromo P450, por reações de redução (eliminação de OH e adição de hidrogênio), oxidação (hidroxilação, desalquilação – desmetilação) e metilação. As enzimas do CYP450 promovem a biotransformação para facilitar eliminação ou então a conjugação com posterior eliminação, evitando o acúmulo no organismo e a produção de efeitos tóxicos indesejados.

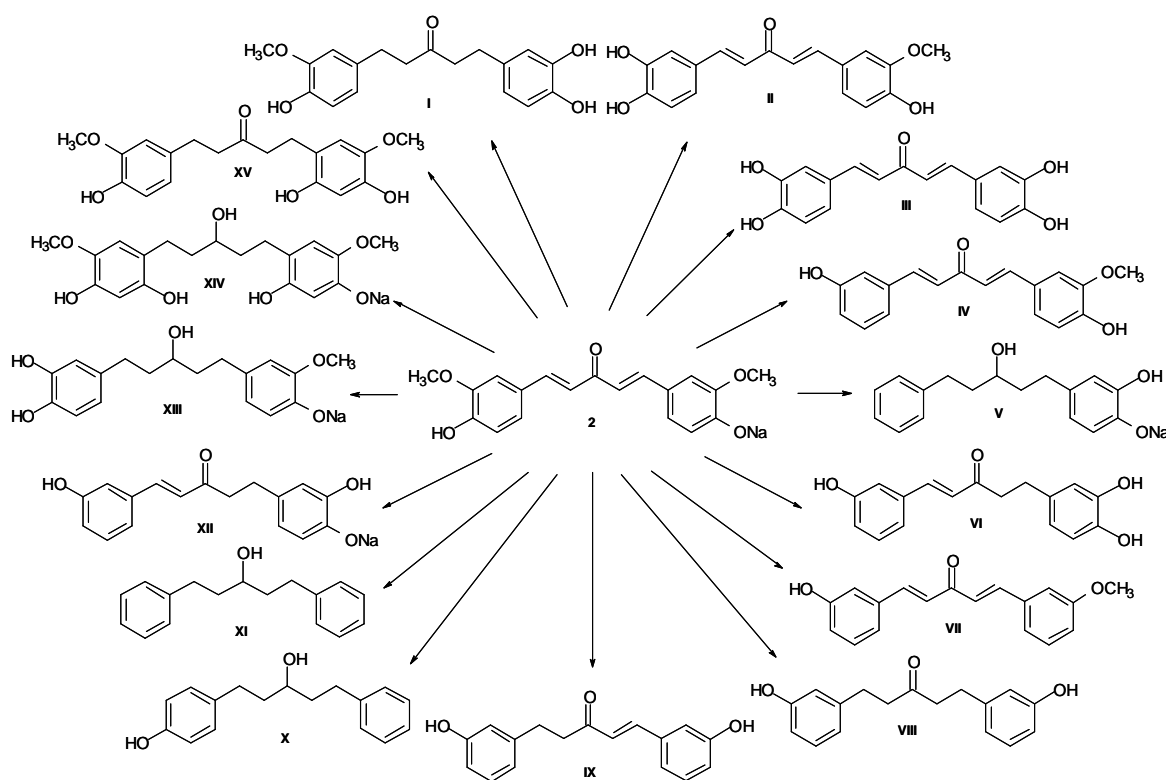


Figura 19. Estruturas dos possíveis metabólitos de fase I, do DM1 (2), analisados por GC/MS e LC/MS.

Na Figura 20 estão representados possíveis produtos de metabolismo de fase I e fase II. Os produtos sofreram primeiro, reações de fase I, como as descritas anteriormente e depois sofreram reações de fase II, como sulfatação, através da conjugação com o grupo sulfato (OSO_3H), pela ação das sulfotransferases ou conjugação com o glicuronato, pela ação das glicuronidases, transformando-se no derivado glicuronidado, ambos mais hidrossolúveis.

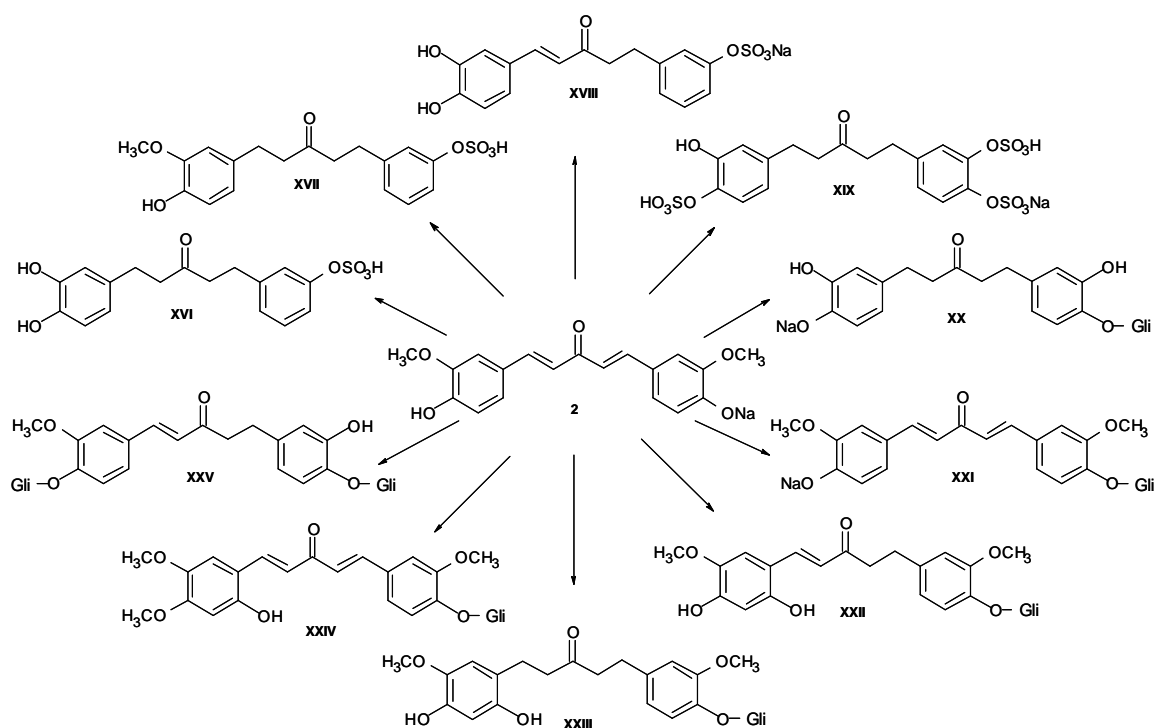


Figura 20. Estruturas dos possíveis metabólitos de fase I e II, do DM1 (**2**), analisados por GC/MS e LC/MS.

Na Figura 21 são mostrados produtos de reações de metabolismo de fase I (redução e oxidação) e reações de fase II, com conjugação do grupo sulfato (OSO_3H) e glicuronato na mesma molécula, mostrando que uma mesma molécula pode sofrer ação das glicuronidases bem como das sulfotransferases.

A Figura 22 mostra alguns produtos de massa molecular maior, que foram obtidos também por metabolismo de fase I e II na mesma molécula. Porém, estes produtos sofreram a ação da enzima glutatona s-transferase, além das glicuronidases e sulfotransferases.

Produtos de metabolização, semelhantes aos obtidos neste trabalho, também foram encontrados em estudos realizados com a curcumina (ANAND et al, 2008).

O método clássico, comumente utilizado para extração de substâncias de órgãos e tecidos, envolve a extração com clorofórmio/metanol 2:1, filtração dos sólidos e posterior lavagem com água, para remoção dos sais (FOLCH et al, 1957).

Nos experimentos realizados aqui, a análise dos compostos apresentados nas Figuras 19, 20, 21 e 22 só foi possível devido ao método de extração das substâncias presentes nos órgãos, que não envolvia a extração posterior com água.

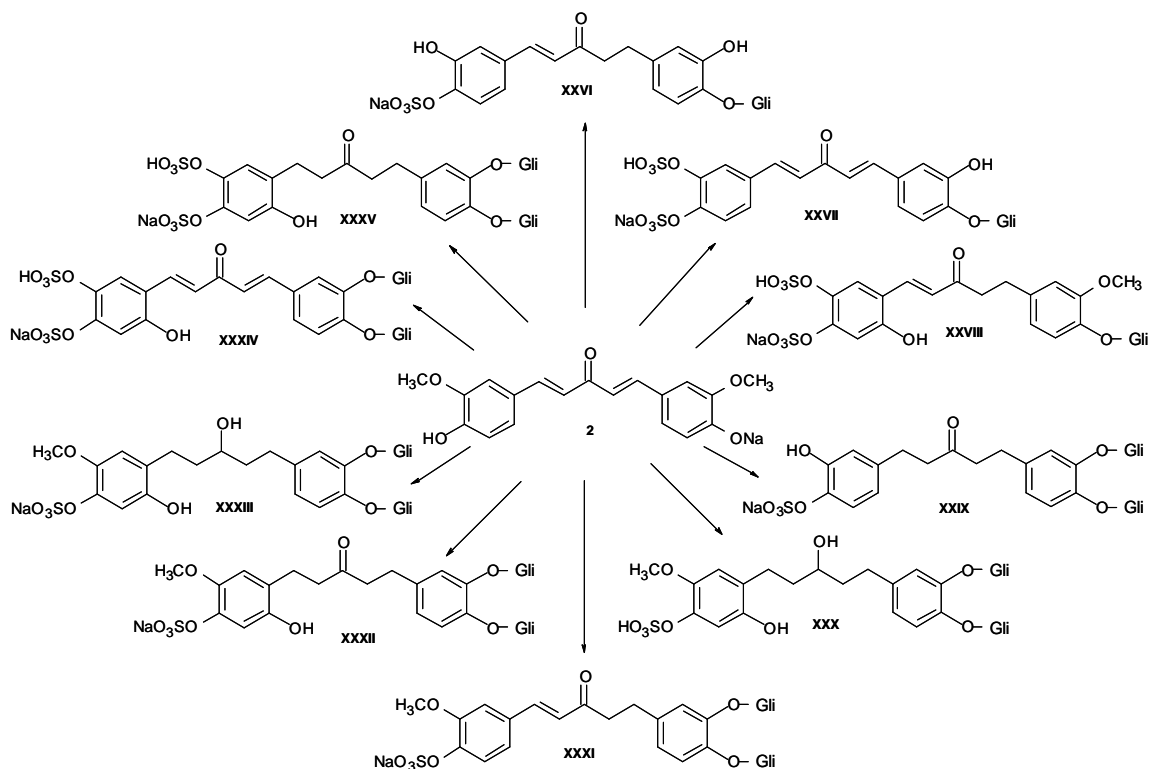


Figura 21. Estruturas dos possíveis metabólitos de fase I e II, do DM1 (2), analisados por LC/MS.

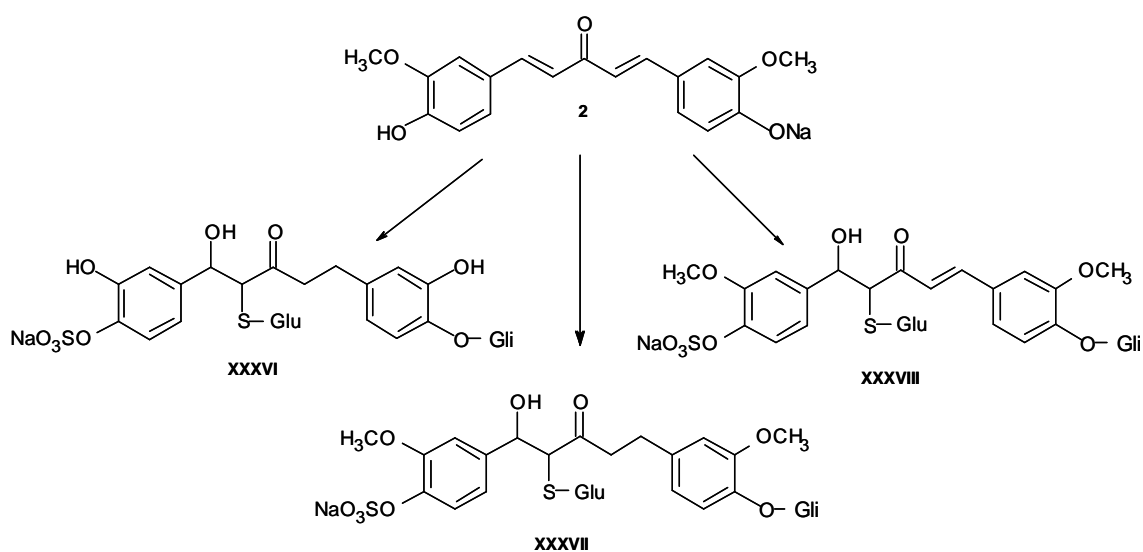


Figura 22. Estruturas dos possíveis metabólitos de fase I e II, do DM1 (2), analisados por LC/MS.

Ainda, foram observadas alterações nos animais injetados com DM1 Logo após a injeção os animais ficaram prostrados, taquicárdicos e hipotensos.

Depois de 5 minutos da injeção do DM1(2), já se observava a urina com coloração amarela mais intensa que o normal, e aos 10 minutos, a coloração era ainda mais intensa. Durante o período de 4 h foi observada essa alteração na cor da urina. Observou-se, pela biópsia dos animais uma grande concentração de princípio ativo no fígado, sendo este provavelmente o principal órgão envolvido no metabolismo do DM1(2) e ainda, que a principal via de eliminação é a gástrica. Foi possível observar, com o decorrer do tempo, uma coloração amarelada, em porções diferentes do intestino, conforme os animais eram biopsiados. A coloração era tão intensa, que nos tempos de 1-4 h, se observaram manchas amareladas inclusive na membrana que recobre o peritônio (Figura 23). Já após 8 horas da administração, o aspecto dos animais biopsiados era semelhante aos controles.

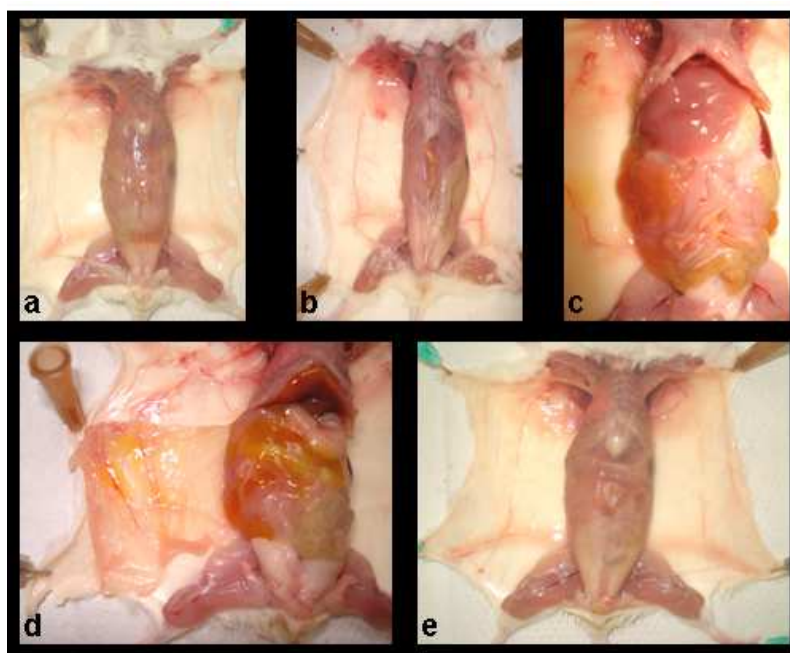


Figura 23. Fotos dos animais biopsiados: (a) controle, (b) 5 min, (c) 1 h, (d) 4 h e (e) 8 h após injeção do DM1 por via IV.

6. CONCLUSÃO

O método de análise por HPLC desenvolvido para o DM1 (2), fazendo o uso de coluna de fase reversa e mistura de solventes (água:acetonitrila:ácido acético - 65:33,75:1,25), possibilitou a identificação do analito de maneira específica, na ausência dos interferentes do plasma.

A eficiência atingida no processo de extração do DM1 (2) foi devida à precipitação das proteínas plasmáticas, promovida pelo metanol, liberando o analito para o sobrenadante.

O método analítico desenvolvido mostrou características como precisão e exatidão dentro dos limites nacional e internacionalmente aceitos para estudos de biodisponibilidade, bioequivalência e farmacocinética.

Certamente, a transformação do DM1 (2) em seu derivado monossódico poderia ser uma solução para tornar o princípio ativo solúvel e facilitar a realização dos estudos pré-clínicos, bem como clínicos. Porém, o tempo de meia-vida é reduzido expressivamente, devido à rápida metabolização. Não foi detectada a presença do DM1 (2) em nenhum dos órgãos analisados, porém foram identificados vários metabólitos.

Foram identificados produtos de reações de metabolismo de fase I (redução e oxidação e alquilação) e reações de fase II, pela conjugação com o grupo sulfato (OSO₃H), glicuronato ou glutamil, algumas vezes na mesma molécula, mostrando que uma mesma molécula de DM1 (2) pode sofrer ação das enzimas do citocromo P450, sulfotransferases glicuronidases e glutathione s-transferase.

Apesar de o DM1 (2) ser convertido na sua forma neutra (composto 1), em contato com plasma, quando em baixas concentrações, a maior parte dele se encontra na forma livre (sal solúvel), por isso ele é rapidamente distribuído e metabolizado. Apesar disso, não foram observadas grandes diferenças na capacidade de regressão tumoral do DM1 (2) quando comparado à forma neutra (composto 1).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, B.K.; FERST, E.M.; DAVIS, M.C.; HEROLD, M.; KURTKAYA, S.; HOLLINGSHEAD, M.G.; KAUR, G.; SAUSVILLE, E.A. ; RICKLES, F.R.; SNYDER, J. P.; LIOTTA, D.C.; SHOJI, M. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents **Bioorg.Med.Chem.**v.12. p. 3871-3883. 2004.
- ANAND, P.; THOMAS, S. G.; KUNNUMAKKARA, A. B.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K. B.; SUNG, B.; THARAKAN, S. T.; MISRA, K.; PRIYADARSINI, I. K.; RAJASEKHARAN, K. N.; AGGARWAL, B. B. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochem. Pharmacol.**, v.76, p.1590 -1611. 2008.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 maio 2003.
- BRITAIN, H. G. Validação de métodos não cromatográficos. **Pharm. Technol.** Ed. Bras. ,São Paulo, v.2,n.3,1998. p.4-9.
- CÁRCAMO, E. C. **Introduction a la farmacocinética.** Washington, D.C., 1982.
- CEN, L. ; HUTZEN, B. ; BALL, S. ; DEANGELIS, S. ; CHEN, S. ; FUCHS, J. ; LI, C. ; New structural analogues of curcumin exhibit potent growth suppressive activity in human colorectal carcinoma cells. **BMC Cancer.** 2009.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos , 7 ed. Ed. da Unicamp, São Paulo. 1997.
- DU, Z.; LIU, R.; SHAO, W.; MAO, X. ; MA, Z.; GU, L. ; HUANG, Z.; CHAN, A. α -Glucosidase inhibition of natural curcuminoids and curcumin analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 41, p. 213 -218. 2006.

FDA. International Conference on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology; Availability Federal Register.V.60(40)

p. 11260 -11262,1995.

FERRARI, E.; LAZZARI,S.; MARVERTI, G.; PIGNEDOLI, F.; SPAGNOLO, F.; SALADINI, M. Synthesis, cytotoxic and combined cDDP activity of new stable curcumin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 3043-3052, 2009.

FLORES, F.; PARDI P.; SANTOS, R.; RANDO, D.; SUÁREZ, J. ; MARIA,D. Antiproliferative and antimetastatic activity of DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate, in B16F10 melanoma. **Cancer Research**, p. 72-79. 2008.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol. Chem**, p.497-509. 1957.

FOUNIER D.B., GORDON G.B. COX-2 and colon cancer: potential targets for chemoprevention. **J. Cell Biochem. Suppl**, p.97-102. 2000.

FUCHS, J.; PANDIT, B.; BHASIN, D. ; ETTER, J.;REGAN, N.; ABDELHAMID, D.; LI,C.; LIN,J. Structure–activity relationship studies of curcumin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, V.19, p. 2065-2069.2009.

GLASER, E., TRAMER, E. Über neue Kondensationsprodukte des Vanillins und des Salicylaldehyds mit Aceton und über den Mechanismus dieser Kondensationen. **J. Prakt. Chemie**, v.116, p. 331-346.1927.

GOEL, A.; AJAIKUMAR, B.; BHARAT B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. **Biochemical Pharmacology**, p.787 – 809.2008.

HALL, H.L.; MILLER, D.R.; ROGERS, J.D.; BEWERSE, B. Update on the incidence and mortality from melanoma in United States. **J. Am. Acad. Dermatol.** ,v.40, p.35-42.1999.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaio químicos**. DOQ-CGCRE-008, revisão:00-outubro 2002.

Instituto Nacional do Câncer, disponível no endereço: www.inca.gov.br. Acessado em fevereiro de 2010.

JERZY , J.; ALEEM,A.; MALGORZEWICZ, S.; SZKUDLAREK,M.; AVODSZKY,M.; DEWITT, D.; FEIG, M.; SELMAN,S.; JANKUN,E. Synthetic curcuminoids modulate the arachidonic acid metabolism of human platelet 12-lipoxygenase and reduce sprout formation of human endothelial cells. **Mol. Cancer Ther** , p.1371-1382. 2006.

KEITARO , S.; INENAGA, S.; TAKEOKA, S.; TSUCHIDA,E. Loading of curcumin into macrophages using lipid-based nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics** , p. 287–293.2008.

KITAMURA, T.; ITOH, M.; NODA, T.; MATSUURA, M.; WAKABAYASHI, K. Combined effects of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selective inhibitors on intestinal tumorigenesis in adenomatous polyposis coli gene knockout mice. **Int. J.Cancer**. p. 576-580. 2004.

KRISHNAMOORTHY, S; HONN, K.V. Inflammation and disease progression. **Câncer Metastasis Rev.**,v.3, p.481. 2006.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LIANG, G.; YANG, S.; JIANG, L.; ZHAO, Y.; SHAO, L.; XIAO, J.; YE, F.; LI, Y.; LI, X. Synthesis and anti-bacterial properties of mono-carbonyl analogues of curcumin. **Chem. Pharm. Bull** (Tokyo). Feb;56(2):162-167. 2008.

LIANG, G., SHAO, L., WANG, Y., ZHAO, C., CHU, Y., XIAO, J., ZHAO, Y., LI, X., YANG, S. Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents, **Bio. Med. Chem.**,v. 17, p.2623-2631. 2009.

MAITI, K.; MUKHERJEE, K.; GANTAIT, A.; SAHA, B.; MUKHERJEE, K. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 155-163. 2007.

MASUDA, T., JITO, A., ISOBE, J., NAKATANI, N., YONEMORI, S. Anti-oxidative and Anti-Inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *Curcuma domestica*. **Phytochemistry**, v.32, 1557-1560.1993.

MISHRA, S.; KARMODIYA, K.; SUROLIA, K.; SUROLIA, A. Synthesis and exploration of novel curcumin analogues as anti-malarial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p.2894-2902.2008.

MOFFAT, A.C.; JACKSON, J.V.; WIDDOOP, B. **Ultraviolet, visible and fluorescence spectrometry. Clarkes isolation and Identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material**. 2 ed. London. Pharmaceuticals.1986.p 221-232,669.

NCI, DCPC, **J. Cell. Biochem.** 1996, 26S, 72. n.5.1996. p.737-757.

OPONG, R.; COMMANDEUR, J.; LUSSENBURG, B.; VERMEULEN, N. Inhibition of human recombinant cytochrome P450s by curcumin and curcumin decomposition products. **Toxicology**, p. 83-91. 2007.

PAULINO, N.; SUÁREZ, J. A. P. Q.; MICHALIK, D.; SANTOS, R. P.; PARDI, P. C.; VOGEL, C.; FEIST, H.; SCREMIN, A.; RODRIGUES, N. C. Evaluation of anti-inflammatory effect of synthetic 1,5-bis(4-acetoxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one, HB2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. BMC-D-09-00227R-4295, 2009.

QIU, X.; LIU, Z.; SHAO, W.Y.; LIU, X.; JING D.P.; YU, J.; AN, K.; HUANG S.L.; BU, X.Z.; HUANG Z.S.; GU L.Q. Synthesis and evaluation of curcumin analogues as potential thioredoxin reductase inhibitors. **Bioorg Med Chem.**, p. 8035-41.2008.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia** 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara, 1997.

SANO, H.; NOGUCHI, T.; MIYAJIMA, A.; HASHIMOTO, Y.; MIYACHI, H. Anti-angiogenic activity of basic-type, selective cyclooxygenase (COX)-1 inhibitors. **Bioorg. Med.Chem. Lett.**,v.16, p.3068-3072. 2006.

SHAH, V. P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.; SKELLY A. Y.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.T.; COOK, C. E., MCDOWALL, R.D., PITTMAN, K.A., SPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies, **Eur. J. Drug Metab. Pharmacok.**, v. 16, p.249-255. 1991.

SUÁREZ, J.A. P.Q.; PESEKE, K.; KORDIAN, M.; CARVALHO, J.E.; KOHN, L.K.; ANTONIO, M.A.; BRUNHARI, H. Propriedades antitumorais do 1,5-Bis(4-Hidroxi-3-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-one e seus derivados e seu procedimento de obtenção. **PI0207141-0**. 2002.

SUÁREZ, J.A.P.Q.; PISCO, L.; PESEKE, K.; FEIST, H.; ROGER, E.E.; CARVALHO, J.; MICHALIK, D.; RANDO, D.G.; HAMILTON, G.; KORDIAN, M. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 41, 401-407. 2006.

SUÁREZ, J.A.P.Q.; MARIA, D.A.; RANDO, D.G.; JASULIONIS, M.G.; SANTOS, M.; SANTOS, R.P.; PARDI, P.C.; VALDUGA, C.J. Compostos derivados de 4-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído, processo de obtenção, composição farmacêutica, uso de um ou mais compostos. **PI0803375-7**.2008.

SUAREZ, J.A.Q. Propriedades antitumorais da 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil) penta-1,4-dien-3-ona e seus derivados. **PI 0602640-0**, 2006.

SUÁREZ, J.A., RANDO, D.G., MARTINS, C., PASSARELLI, C.G., SANTOS, R.P.; ROSSI, D. **30º Congresso da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

UNG, V.; FOSHAU, R.; MACFARLANE, S.; CHURCHIL, B.; DOYLE, T.; SYDORA, B. Oral Administration of Curcumin Emulsified in Carboxymethyl Cellulose Has a Potent Anti-inflammatory Effect in the IL-10 Gene-Deficient Mouse Model of IBD. **Digestive Diseases and Sciences**, 2009.

WALKER, B.D.; KOWALSKI, M.; GOH, W.C.; KOZARSKY, K.; KRIEGER, C.; ROSEN, L. **Pro.Natl.Acad.Sci**,USA 84 .1987.p. 8120-8124.

WANG, X.; JIANG, Y.; WANG, Y.; HUANG, M.; HO,C.; HUANG, Q. Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. **Food Chemistry** ,v.108, p. 419 - 424. 2008.

WILKINSON, R.G. Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption distribution and elimination. In: GOODMAN & OILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics** IO. ed.New York. N.Y.:Mc Graw-Hiel, 2001.

YANG , K.; LIN, L.; TSENG,T.; WANG, S.; TSAI,T. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, 853. p.183 -189. 2007.

ZAMBRE, A.P.; KULKARNI, V.M.; PADHYE, S.; SANDUR, S.; AGGARWAL, B. Novel curcumin analogs targeting TNF-induced NF- κ B activation and proliferation in human leukemic KBM-5 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 14, p.7196 - 7204.2006.

ZIIMMERMANN, M. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals**. Pain. 1983, 6, 109–110.

ANEXO 1 – TABELAS DE DADOS

Tabela 12. Concentração das amostras para a curva de calibração.

Conc teórica (g/mL)	Curva									
	1	2	3	4	5	6	7	8	Média	DP
1000	911	1000	1006	1038	920	748	1111	1150	985,5	126,7
500	491	439	481	527	541	537	493	522	503,9	34,5
250	225	234	232	251	285	256	293	263	254,9	24,8
125	109	111	136	136	140	125	178	115	131,3	22,4
62,5	58	61	61	70	68	59	57	71	63,1	5,6
31,25	38	38	43	47	36	39	46	25	39,0	6,9
15,63	16	25	14	19	25	16	23	18,4	19,6	4,3
7,8	12	21	9	15	14	7	9	8,3	11,9	4,6

Tabela 13. Concentração plasmática do DM1 (2) após a administração de 50 mg/kg em nove grupos de 4 camundongos BALB/c, em bolo, através do plexo ocular.

Tempo (min)	Camundongos				Média	DP
	1	2	3	4		
0	500	500	500	500	500,00	0,00
5,0	68,12	75,63	65,12	77,13	71,50	5,80
10,0	58,43	64,45	50,56	61,23	58,67	5,94
15,0	32,11	44,12	30,98	40,89	37,03	6,48
30	17,21	18,26	13,32	15,43	16,06	2,17

ANEXO 2 – ESPECTROS DE MASSA DOS POSSÍVEIS METABÓLITOS DO DM1 (2) EM CAMUNDONGOS

