

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

Revisão de literatura sobre as propriedades antitumorais da Arterpelina C e estudos preliminares de farmacocinética em roedores

SCHAIANE FERRI

PORTO ALEGRE, 2021

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

SCHAIANE FERRI

Revisão de literatura sobre as propriedades antitumorais da Arterpelina C e estudos preliminares de farmacocinética em roedores

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, financiada com bolsa de estudos do CNPq.

Orientadora: Prof(a). Dra. Bibiana Verlindo de Araújo

Coorientadora: Prof. Dra. Teresa Dalla Costa

Porto Alegre, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 07 de maio de 2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Andréa Diniz

Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Eduardo Luis Konrath

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Francine Johansson Azeredo

Universidade Federal da Bahia

CIP - Catalogação na Publicação

FERRI, SCHAIANE
Revisão de literatura sobre as propriedades antitumorais da Arterpelina C e estudos preliminares de farmacocinética em roedores / SCHAIANE FERRI. -- 2021.
129 f.
Orientador: BIBIANA VERLINDO DE ARAÚJO.

Coorientador: TERESA DALLA COSTA.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Arterpelina C. 2. Farmacocinética. 3. PBPK. 4. Revisão de Escopo. I. VERLINDO DE ARAÚJO, BIBIANA, orient. II. DALLA COSTA, TERESA, coorient. III. Título.

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, ao professor Jairo pela parceria do projeto, a Fapesp pelo financiamento do projeto e ao Laboratório do Centro Bioanalítico de Medicamentos que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de estar na pós-graduação e por ter tido saúde para vivenciar esta etapa de minha vida.

Agradeço aos meus pais, Roni e Carmen, pelas marmitas que preparam para mim, pelos potes feijão para congelar e poder comer durante a semana, pelo aconchego do lar ao voltar de Porto Alegre. Agradeço por estarem comigo nesse momento, mesmo não entendendo o porquê estudo tanto.

Sou grata pelo meu companheiro de caminhada, meu namorado, Luan. Esteve e está comigo desde o início da minha graduação, me apoiou quando decidi ir para a pós-graduação e sempre acreditou que eu seria capaz. Obrigada por me ajudar na mudança de ida e volta de Porto Alegre, por me escutar chorar nos primeiros meses longe de casa e por me incentivar a continuar. Obrigada por acreditar em mim e por me incentivar, tornou essa trajetória um pouco mais leve.

Agradeço aos meus amigos que estiveram comigo nesta etapa, em especial as minhas amigas farmacêuticas distintas: Franciele, Jéssica, Carolina e Sabrina. A minha amiga Laís, que mesmo morando na Bahia sempre esteve presente nesta trajetória. Obrigada pelas conversas, pelos desabafos e incentivos e principalmente por vivenciarem essa etapa comigo. Agradeço a Patrícia Weimer e o Josué. A pati, pelas conversas nos corredores, pelas sopas pós experimento, pelas conversas a distância, por toda ajuda durante esta etapa. E ao Josué, pelos momentos de descontração, saiba que foi fundamental. Obrigada pelos passeios em Porto Alegre, por me fazer rir mesmo quando eu queria chorar. Agradeço a Patrícia, minha colega de apartamento, por dividir seu lar comigo, por conversar comigo, me escutar chorar e também pelos momentos de descontração. Agradeço por seu humor, que as vezes era estranho, mas me tirou o riso de momentos muito inesperados e que foram importantes! Obrigada por não me deixar desistir e por me mostrar que mesmo vivendo situações difíceis, não podemos deixar de lutar pelos nossos sonhos e objetivos.

Não posso deixar de agradecer as novas amizades que esta etapa me trouxe. Obrigada Karolina e Raiza por me receberem e me acolherem tão bem, pelas trocas de experiências e por acreditarem que tudo daria certo. Agradeço a Keli, pela amizade, conversas, desabafos, trocas e parcerias e por sempre me ajudar quando precisei. Obrigada por me acompanhar ao Lanagro, pela companhia de treino e por sempre

me incentivar a seguir adiante. Obrigada Grazi, Vic, Bruna, Laura e Carol pelos ensinamentos, trocas, conversas e obrigada por ficarem até tarde da noite comigo no laboratório, por me ajudarem nos experimentos e nas análises, por me ensinarem técnicas cirúrgicas e pelos bons momentos que tivemos na hora do café PK. Não posso deixar de agradecer a Grazi pelo delivery das amostras no Lanagro. Obrigada Adria, Lizania e Pricilla, por serem sempre tão gentis comigo.

Agradeço também a Lana, amizade que fiz durante uma disciplina e que além de conhecimentos, compartilhamos momentos de lazer, fiel companheira nas caminhadas até a Orla do Guaíba, momentos estes, muito importantes.

Agradeço também a minha orientadora, Bibiana, por ter me recebido em seu laboratório, por aceitar a me orientar, pelas conversas e trocas de conhecimento. Obrigada por ter retornado meu e-mail, ainda quando estava pensando em iniciar na pós-graduação. Agradeço também a minha coorientadora, Teresa, por ter me orientado enquanto a Bibiana esteve fora.

Obrigada a minha psicóloga Luana, por confiar em mim nesse processo e me ajudar a organizar meus pensamentos, mostrando para mim que sempre existe algo positivo.

Por fim, eu me agradeço, por nunca ter desistido mesmo com tantas dificuldades, por ter superado cada desafio. Por todas as vezes em que eu tinha vontade de ficar em Farroupilha e eu ia para Porto Alegre. Por ter confiado no meu processo de adaptação em uma cidade nova e grande, por ter tido coragem para me permitir viver diferentes experiências e por ter feito o meu melhor dentro das condições que eu tive e que me foram oferecidas.

Obrigada Deus e ao universo, por me permitir essa oportunidade em minha vida, pelas pessoas que conheci, pelos momentos que vi, sendo eles difíceis ou alegres e pela pessoa que me tornei vivendo essa trajetória.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”

Mario Sergio Cortella

RESUMO

A Arterpelina C (AC) destaca-se, devido as suas diversas propriedades biológicas: anticâncer, antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, efeitos antiproliferativos frente a células humanas tumorais de estômago, intestino, mama e próstata, porém estudos PK para AC são escassos. A modelagem e simulação, é uma ferramenta nova que integra dados, conhecimentos e mecanismos auxiliando no desenvolvimento de novos fármacos e os modelos PBPK, destacam-se nesta área. **Objetivos:** Realizar uma revisão bibliográfica do tipo escopo das atividades antitumorais da AC bem como trazer resultados preliminares de um estudo farmacocinético piloto em ratos Wistar saudáveis e de modelo PBPK para esta substância. **Metodologia:** O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (projeto nº 37453). O artigo de revisão foi escrito a partir de estudos selecionados nas bases de dados PubMed, Embase, Scopus, Web of Science, ao todo foram selecionas 19 artigos para compor a revisão bibliográfica. Foi desenvolvido um método bioanalítico preliminar para o doseamento da AC por cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por espectrometria de massa/massa (LC MS/MS). A linearidade do método foi avaliada na faixa de concentração de 10-50.000 ng/mL e a bacarina foi utilizada como padrão interno (20.000 ng/mL). Para o estudo piloto PK preliminar ratos wistar machos (n=2), receberam uma dose de 10 mg/Kg IV e a coleta das amostras foi feita pela carótida (animal anestesiado) ou pela veia caudal (animal acordado). O modelo PBPK foi desenvolvido para camundongos no software PK-SIM® e os dados físico-químicos e biológicos da AC foram obtidos do ADMET Predictor. **Resultados e discussões:** O artigo de revisão proposto demonstrou o potencial de atividade antitumoral da AC em distintos modelos *in vitro* e *in vitro*, no entanto o número de estudos ainda é reduzido, indicando a necessidade de novos investimentos na área de pesquisa desse tema. Em relação aos estudos de farmacocinética, a linearidade preliminar do método bioanalítico em desenvolvimento demonstrou um $r=0,993$, mas com baixa exatidão considerando que apenas 5 pontos da curva de calibração apresentaram a variação de acordo com o preconizado pelo FDA (2018). O estudo PK piloto demonstrou que ajustes na faixa de linearidade são necessários e que o anestésico modifica a meia-vida da AC nos animais, com valores de $t_{1/2}$ de 0,32h (animais anestesiados) e 1,24h (animais acordados). O modelo PBPK preliminar apresentou uma possível

recirculação hepática da AC no tempo aproximado de 11h, os quais não puderam ser confirmados pelos dados da literatura que são escassos. **Considerações finais:** A artepelina C é uma substância conhecida a muito tempo e sua utilização, segurança, eficácia e toxicidade deve ser explorada, uma vez que diversos estudos mostram uma associação benéfica a saúde quanto ao seu uso.

Palavras-chave: Artepelina C. Farmacocinética. PBPK. Revisão de escopo.

ABSTRACT

Arterpillin C (AC) stands out due to its various biological properties: anticancer, antidiabetic, anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antiproliferative effects against human tumor cells of the stomach, intestine, breast and prostate, however PK studies for AC are scarce. Modeling and simulation is a new tool that integrates data, knowledge and mechanisms, assisting in the development of new drugs and PBPK models, stand out in this area. **Objectives:** Perform a bibliographic review of the scope of CA antitumor activities as well as bring preliminary results from a pilot pharmacokinetic study in healthy Wistar rats and preliminary modeling and simulation of a PBPK model for this substance. **Methodology:** The project was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (project nº 37453). The review article was written based on studies selected from the PubMed, Embase, Scopus, Web of Science databases. In total, 19 articles were selected to compose the bibliographic review. A preliminary bioanalytical method was developed for the determination of CA by high performance liquid chromatography and detection by mass / mass spectrometry (LC MS / MS). The linearity of the method was evaluated in the concentration range of 10-50.000 ng / mL and baccharin was used as an internal standard (20.000 ng / mL). For the preliminary PK pilot study, male wistar rats (n = 2) received a dose of 10 mg / kg IV and the samples were collected by the carotid (anesthetized animal) or by the caudal vein (awake animal). The PBPK model was developed for mice using the PK-SIM® software and the physical, chemical and biological data of the CA were obtained from the ADMET Predictor. **Results and discussions:** The proposed review article demonstrated the potential for antitumor activity of CA in different models in vitro and in vitro, however the number of studies is still small, indicating the need for new investments in the area of research on this topic. Regarding the pharmacokinetic studies, the preliminary linearity of the bioanalytical method under development showed an $r = 0.993$, but with low accuracy considering that only 5 points of the calibration curve showed the variation according to what is recommended by the FDA (2018). The pilot PK study demonstrated that adjustments in the linearity range are necessary and that the anesthetic modifies the AC half-life in animals, with $t_{1/2}$ values of 0.32 h (anesthetized animals) and 1.24 h (awake animals). The preliminary PBPK model showed a possible hepatic recirculation of AC in the approximate time of 11 h, which could not be confirmed by the scarce data in the

literature. **Final considerations:** Artepillin C has been a known substance for a long time and its use, safety, efficacy and toxicity must be explored, since several studies show a beneficial association with health regarding its use.

Key-words: Atepillin C. Pharmacokinetics. PBPK. Scoping review.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química artepelina C.....	31
Figura 2 - Esquema representativo de uma sonda de microdiálise.....	39
Figura 3 - Aplicações da modelagem e simulação durante as fases de desenvolvimento de um novo medicamento	45
Figura 4 - Estrutura de um modelo PBPK	48
Figura 5 - Informações para construção de um modelo PBPK.....	50
Figura 6 - Aplicações PBPK	53
Figura 7 - Linearidade preliminar.....	107
Figura 8 - Perfil de Concentração por tempo animal anestesiado (coleta na carótida)	109
Figura 9 - Perfil de Concentração por tempo animal acordado (coleta na cauda)...	110
Figura 10 - Simulação do perfil de concentração por tempo da artepelina C	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estudos de atividade farmacológica para artepelina C	33
Tabela 2 - Parâmetros otimizados do Potencial do Orifício (DP, Declustering Potential), Energia de Colisão (CE, Collision Energy) e Potencial de Saída da Cella de Colisão (CXP, Collision Cell Exit Potential) para as transições monitoradas em modo MRM.....	102
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas e biológicas da Artepelina C.....	105
Tabela 4 – Valore de Km e V _{max} para artepelina C em CYP2C19 e CYP2C9.....	105
Tabela 5 - Percentual de variação.....	108
Tabela 6 – t _{1/2} estudo farmacocinético piloto	110
Tabela 7 - Parâmetros farmacocinéticos	111

LISTA DE SIGLAS

AC	Artepelina C
ACF	Criptas Aberrantes de Colón
ARE	Elemento Antioxidante Responsivo
ASC	Área Sob a Curva
Ca	Cálcio
C_d	Concentração do Fármaco Livre no Microdialisado
C_i	Concentração do Fármaco Livre no Fluido Intersticial
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG - MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas
CL	Clearance
CLAE - ECD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Eletroquímico
$C_{máx}$	Concentração Máxima
C_p	Concentração do Fármaco/Analito no Líquido de Perfusão
Cu	Cobre
Fe	Ferro
Fu	Fração livre
Fe-NTA	Nitritotriacetato Férrico Cancerígeno Renal
GLUT	Transportador de Glicose
GST	Glutathione S-transferase
IAP	Proteína Inibidora da Apoptose
iWAT	WAT Inguinal Primário
K	Potássio
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrômetro de Massas/massa
LLQ	Limite Inferior de Quantificação
MD	Microdiálise
M&S	modelagem e Simulação
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Na	Sódio

NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBPK	Modelos farmacocinéticos embasados pela fisiologia
OMA	Azoximetano
OSCC	Carcinoma de Células Escamosas Oral
OXA	Oxaliplatina
PD	Farmacodinâmica
PK	Farmacocinética
PPAR γ	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma Tipo Gama
QR	Quinona Redutase
RD	Retrodiálise
RR	Recuperação Relativa
$t_{1/2}$	Tempo de Meia Vida
$t_{máx}$	Tempo Máximo
UCP1	Proteína Desacopladora 1
Vd	Volume de distribuição
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	25
1.1.1 Objetivo Geral	25
1.1.2 Objetivos Específicos	25
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1 PRÓPOLIS: DEFINIÇÃO E HISTÓRICO DE USO.....	26
2.1.1 Própolis Brasileiras	28
2.1.1.1 Própolis Marrom	28
2.1.1.2 Própolis Vermelha	29
2.1.1.3 Própolis Verde.....	30
2.2 ARTEPELINA C	31
2.2.1 Propriedades Biológicas e Estudos Farmacocinéticos da Artepelina C ...	32
2.3 ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS.....	38
2.4 MICRODIÁLISE.....	38
2.5 FARMACOMETRIA	43
2.5.1 Modelagem Farmacocinética (PK)	44
2.5.2 Modelo Farmacocinético Embasado pela Fisiologia (PBPK)	47
2.5.2.1 Aplicações	52
3 PROPOSTA DE ARTIGO	56
4 ESTUDOS PRELIMINARES DE FARMACOCINÉTICA DA ARTERPELINA	97
4.1 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PRELIMINAR DO MÉTODO BIOANALÍTICO .	99
4.1.1 Solventes	99
4.1.2 Instrumentação	99
4.1.3 Preparo das Soluções Padrão no Plasma de Ratos para Avaliação Preliminar da Linearidade do Método Bioanalítico	100
4.1.4 Processamento das Amostras Biológicas	101
4.1.5 Condições Cromatográficas	101
4.2 ESTUDO PILOTO FARMACOCINÉTICO	102
4.3 DESENVOLVIMENTO PBPK PARA ARTEPELINA C	103
4.3.1 Dados Bibliográficos	103
4.3.2 Softwares	104
4.3.2.1 xyExtract Graph Digitizer.....	104

4.3.2.2 ADMET Predictor	104
4.3.2.3 PK-SIM® (Open Systems Pharmacology).....	104
4.3.3 Modelo Biológico	104
4.3.4 Propriedades Físico-químicas e Biológicas da Artepelina C	105
5 RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÕES	99
5.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA LINEARIDADE DO MÉTODO BIOANALÍTICO.....	107
5.2 ESTUDO PILOTO FARMACOCINÉTICO	108
5.3 DESENVOLVIMENTO PBPK PARA ARTEPELINA C	111
CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
5.1 PERSPECTIVAS.....	118
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	127
ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS APÓS ADENDO.....	129

INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que da população dos países em desenvolvimento, 70 a 95% das pessoas utilizam produtos naturais como alternativa terapêutica, estimando um mercado global de produtos derivados de plantas em US\$ 83 bilhões por ano, caracterizando-o como um campo em ampla expansão. Além disso, apenas 15% das aproximadamente 300.000 espécies de plantas em todo o mundo tiveram seu potencial farmacológico avaliado e as pesquisas nessa área mostram um enorme potencial para a descoberta de novos compostos, desta forma, o uso de produtos de origem natural como potenciais fármacos são incentivados em todo o mundo (ANVISA, 2011; De Luca et al., 2012; OMS, 2011).

A própolis é definida como um produto balsâmico e resinoso com uma composição química complexa e variável e é considerada uma matriz com alto potencial biotecnológico. Estudos demonstram diferentes propriedades biológicas da própolis, tais como: antioxidante, antimicrobiano, antiviral, antiparasitário, antitumoral, imunomodulatório, antiinflamatório e hepatoprotetor. Estas propriedades justificam seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (Bankova et al., 2014; Massaro et al., 2015; Silva et al., 2016; Zhao et al., 2016)

A própolis brasileira, em especial a verde, possui alta concentração de artepelinina C (AC), sendo assim altamente valorizada no mercado internacional devido aos seus efeitos benéficos para a saúde e está ganhando cada vez mais importância comercial (Santos et al., 2020). Esta substância destaca-se em relação aos outros compostos, em virtude de suas diversas propriedades biológicas, tais como: anticâncer, antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano, antiproliferativas frente a células humanas tumorais de estômago, intestino, mama e próstata (Carrão, 2015). Na literatura existem poucos estudos avaliando as atividades farmacológicas da artepelinina C e estudos farmacocinéticos são ainda mais escassos.

A farmacocinética tem por objetivo estudar a absorção, distribuição, biotransformação e eliminação de fármacos. O conhecimento do comportamento do fármaco no organismo auxilia na análise dos dados farmacológicos/toxicológicos, no regime de dosagem e nos estudos clínicos de eficácia e toxicidade (URSO; BLARDI; GIORGI, 2002). Os parâmetros farmacocinéticos são determinados a partir de dados de concentração plasmática total do fármaco, como pico de concentração máxima ($C_{máx}$) e área sob a curva de concentração (ASC). Porém é mais adequado utilizar o

conhecimento da fração livre plasmática, visto que somente esta fração é capaz de exercer efeito farmacológico, ou da fração livre tecidual, quando se trata de fármacos que irão ou deverão atuar em tecido específico (TASSO, 2008).

Uma técnica utilizada para determinar a fração livre de fármacos é a microdiálise. A técnica de microdiálise (MD) se baseia na implementação de uma pequena sonda no tecido a ser estudado, sendo continuamente irrigada com líquido de perfusão (geralmente solução fisiológica relevante). A parte da sonda em contato direto com o tecido possui uma membrana semipermeável, funcionando como um filtro e impedindo a passagem de moléculas maiores que seu *cut off* para o líquido de perfusão. O fluido de perfusão (perfundido) passa pela sonda e apenas moléculas pequenas, aquelas não ligadas as proteínas, presentes no fluido sofrem difusão passiva pela membrana e são recolhidas pelo perfundido. O líquido recolhido pela outra extremidade da sonda é chamado de dialisado e este é analisado com metodologia validada para quantificação da fração de fármaco não ligada (Brunner & Derendorf, 2006; Chaurasia et al., 2007; Elmquist & Sawchuck, 2000).

Uma estratégia inovadora que vem sendo utilizada os últimos anos e acelerando os estudos de farmacocinética é a modelagem e simulação, pois ela permite integrar dados, conhecimentos e mecanismos para auxiliar no desenvolvimento e utilização de novos fármacos. Modelos apropriados fornecem informações precisas para predição do tempo de exposição e resposta para diferentes protocolos de administração (Mould & Upton, 2012). Os modelos farmacocinéticos embasados pela fisiologia (PBPK), destacam-se nesta área, já que vem sendo utilizados a fim de integrar mecanismos fisiológicos e características dos fármacos através de relações matemáticas para predizer, simular e compreender sua farmacocinética. A modelagem fisiológica visa a transição da biologia de uma ciência descritiva para uma ciência preditiva (Owen; Fiedler-Kelly, 2014).

Diante disso, o presente trabalho visa realizar uma revisão bibliográfica do tipo Scopus das atividades anticâncer (*in vitro* ou *in vivo*) da artemelina C e trazer resultados preliminares de um estudo farmacocinético piloto, além de desenvolver um modelo PBPK preliminar para esta molécula.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa foi realizar uma revisão bibliográfica do tipo Scopus das atividades anticâncer (*in vitro* ou *in vivo*) da artepelina C bem como trazer resultados preliminares de um estudo farmacocinético piloto em ratos Wistar saudáveis e modelagem e simulação preliminar de um modelo farmacocinético embasado na fisiologia para esta substância.

Inicialmente, o objetivo deste trabalho era avaliar o perfil farmacocinético da artepelina C por via oral e intravenosa além de verificar a concentração da mesma em tecido prostático de ratos saudáveis, por meio de microdiálise, visando um possível tratamento de câncer de próstata. Porém, devido a disseminação e agravamento da COVID-19 e consequente impossibilidade de frequentar o laboratório a pesquisa foi adaptada à nova realidade. Diante disso, os resultados que foram obtidos antes desta adaptação também serão apresentados.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desta pesquisa são apresentados abaixo:

- Realizar uma revisão bibliográfica dos estudos que avaliam as diferentes atividades biológicas associada aos efeitos antitumorais da artepelina C;
- Apresentar dados preliminares de um estudo piloto realizado em animais saudáveis;
- Desenvolver um modelo farmacocinético embasado na fisiologia com dados presentes da literatura para artepelina C em camundongos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste tópico serão abordados assuntos pertinentes ao tema desta pesquisa.

2.1 PRÓPOLIS: DEFINIÇÃO E HISTÓRICO DE USO

Por meio de uma mistura entre cera de abelha (*Apis mellifera*) e compostos resinosos, coletados seletivamente da vegetação, pelas mesmas, obtém-se a própolis, a qual possui grandes quantidades de metabólitos secundários bioativos (Sawaya et al., 2011; Sousa et al., 2007). O termo "própolis", "Pro" em prol da e "polis", cidade de abelhas, o que significa em defesa do pente do mel, foi descrito no século XVI na França e no século XVII a própolis foi considerada uma droga oficial (Marcucci, 2001; Kujumgiev et al., 1999).

Nos séculos subsequentes houve grande interesse pelas propriedades medicinais da própolis, especialmente no Leste da Europa. Em 1908, o primeiro artigo científico sobre a composição química e propriedades da própolis foi publicado e indexado ao Chemical Abstracts. Em 1968, o resumo da primeira patente requerida foi publicado no mesmo jornal (Helfenberg, 1908; Luliu, 1965).

A utilização de produtos naturais em práticas medicinais demonstra amplo crescimento, em virtude de aspectos econômicos (baixo custo), sociais, disponibilidade de matéria-prima e eficácia farmacológica. A própolis é um exemplo de produto natural reconhecido e utilizado mundialmente. Segundo Pereira, Seixas e Neto (2002) este produto natural é utilizado pela humanidade durante séculos, desempenhando diversas funções. No Egito (1700 a.C.), por exemplo, era aplicado para embalsamar mortos. Porém, a primeira aplicação na medicina popular foi descrita em 300 a.C (Marcucci, 2001). Em 1908, foi publicado o primeiro trabalho científico sobre a composição e propriedades químicas da própolis. A primeira patente foi publicada em 1968, que tratava da aplicação da própolis em loções de banho. Funari e Ferro (2006) descrevem um aumento significativo em estudos com a própolis a partir de 1980. Atualmente a própolis é amplamente estudada em relação a diversas propriedades farmacológicas.

Na medicina tradicional a própolis é utilizada como substituto de antibiótico, para curar feridas, úlceras, febres e infecções. Nas últimas décadas, ganhou ampla

aceitação na medicina tradicional em várias partes do mundo e este interesse pela própolis em vários países incentivou um grande número de estudos sobre as propriedades químicas e biológicas da mesma (Salatino et al., 2011; Toreti et al., 2013).

A propolis *in natura*, em geral, é composta por 30% de cera, 50% resina e bálsamo vegetal, 10% óleos essenciais e aromáticos e 5% de pólen e outras substâncias (Burdock, 1998). Estudos demonstram mais de trezentas substâncias identificadas em amostras de própolis, com predominância de flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas), das quais destacam-se: galangina, crisina, artepelinina C tectocrisina, pinocembrina, campferol e quercetina, bem como os aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (bacarina, drupanina, ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzóico) e alguns oligoelementos, tais como: alumínio, vanádio, ferro, cálcio, silício, manganês, estrôncio, e vitaminas B1, B2, B6, e C (Bankova et al., 1996; Marcucci et al., 2001). A própolis também contém vitaminas importantes, como vitaminas B1, B2, B6, C e E, e minerais úteis como magnésio (Mg), cálcio (Ca), potássio (K), sódio (Na), cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe). Algumas enzimas, como desidrogenase succínica, glicose-6-fosfatase, adenosina trifosfatase e fosfatase ácida, também estão presentes (Khalil, 2006). A constituição bioativa e a eficiência biológica da própolis dependem da área geográfica, do clima, da flora e da diversidade das abelhas onde é produzida (Szliszka et al., 2012). A própolis brasileira é altamente valorizada no mercado internacional devido a presença de alguns componentes bioativos que são encontrados em altas concentrações, ganhando cada vez mais importância comercial (Santos et al., 2020).

Atualmente, no mercado brasileiro e em vários outros países, é possível encontrar própolis em diferentes apresentações, tais como extratos líquidos ou secos, cápsulas, comprimidos, xaropes, cremes, entre outros. As principais atividades são como agente antimicrobiano, antioxidante, imunomodulatório, anti-inflamatório, antiviral, entre outros, as quais foram confirmadas em ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* (Hori et al., 2013; Machado et al., 2012; Marquele et al., 2005; Rocha et al., 2013; Nascimento et al., 2013; Orsatti et al., 2010; Orsolíc et al., 2004; Paulino et al., 2008; Urushisaki et al., 2011).

As abelhas brasileiras são fruto do cruzamento entre as *Apis mellifera* europeia e africana, o que levou a formação de uma linhagem “brasileira” africanizada altamente resistente a doenças, sem necessidade do uso de tratamentos químicos como em outros países, o que garante produtos apícolas brasileiros de excelente qualidade e livres de contaminação. No Brasil, as própolis denominadas verde, marrom e vermelha são as que possuem maior importância econômica e se destacam no comércio nacional e internacional, em especial a própolis verde, por apresentar altas concentrações de artepelinina C (Bastos; Ambrósio, 2017).

2.1.1 Própolis Brasileiras

As própolis brasileiras foram divididas em doze classes de acordo com Park, Alencar e Aguiar (2002): cinco são da região Sul e apresentam as cores amarelo, marrom claro (duas), marrom escuro e marrom esverdeada, respectivamente. Em relação às própolis encontradas no Nordeste, estas são divididas em seis grupos: marrom avermelhado, castanho esverdeado, marrom escuro, amarelo, amarelo-escuro e amarelo, respectivamente. Na região Sudeste são produzidas, principalmente, as própolis: marrom, castanho esverdeado e verde (Freires; Alencar; Rosalen, 2016). Em 2007 foi adicionado o 13º tipo de própolis, proveniente dos manguezais dos estados brasileiros de Sergipe, Alagoas, Paraíba, Pernambuco e Bahia. Entre as própolis brasileiras, as marrons, a vermelha e a verde são as mais estudadas e relevantes para a economia brasileira devido às suas atividades biológicas e à exportação para outros países, principalmente os países asiáticos (Figueiredo-Rinhel et al, 2013).

2.1.1.1 Própolis Marrom

A cor marrom é característica de própolis de diferentes lugares e apesar de muitos compostos químicos presentes neste produto já terem sido identificados, bem como numerosos dos seus efeitos biológicos já terem sido descritos, este tipo de própolis não tem sido bem estudada como as própolis vermelha e verde. A sua origem botânica ainda não foi plenamente esclarecida. Na região Sul do Brasil a própolis marrom pode ter origem em araucárias (exemplo *Araucaria heterophylla*). No Sudeste

pode ter origem em espécies de *Eucalyptus* e outras espécies relatadas como *Morus Alba* (amoreira branca), ainda não estudadas, as quais podem conter também diferentes proporções de metabólitos de *Baccharis dracunculifolia*, pois as abelhas podem combinar resinas de diferentes espécies vegetais (Bastos; Ambrósio, 2017).

Os principais compostos identificados na própolis marrom são: coniferaldeído; 2,2- dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano, ácido isocupressico, ácido acetil isocupressico, ácido imbricatoloico e uma mistura de isômeros *cis* e *trans* do ácido comunico, estes compostos estão relacionados a atividades anticâncer, antioxidante e antiinflamatória (Bankova et al, 1996; Huang et al, 2014; Sawaya et al, 2004; Toreti et al., 2013).

2.1.1.2 Própolis Vermelha

A própolis vermelha possui esta coloração devido à presença das isoflavanos retusapurpurinas A e B na resina de *Dalbergia ecastophyllum*, fonte botânica desta própolis. Uma série de propriedades biológicas, incluindo atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antiparasitárias, antifúngica, anticariogênico antitumorais, antioxidantes, metabólicas e nutracêuticas, antiproliferativo e citotóxico contra várias linhagens de células tumorais são atribuídas a este tipo de própolis, demonstrando o grande potencial de seu uso nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (Figueiredo-Rinhel et al., 2013; Freitas et al., 2017; De Mendonça et al., 2015; Fasolo et al., 2016).

A própolis vermelha teve muitos de seus compostos químicos identificados, tais como: elemicina, isoelemicina, metil isoeugenol, formononetina, biochanina A, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, homopterocarpana, quercetina e vestitol. Do extrato lipofílico foram isoladas as benzofenonas polipreniladas guttiferone E, xantochimol e oblongifolina A, entre outros. As isoflavanos formononetina, biochanina A, pinocembrina e medicarpina são considerados seus marcadores químicos devido as suas elevadas concentrações nesta espécie de própolis (Maróstica Junior et al., 2008; De Mendonça et al., 2015).

Além destes compostos, foram identificados o ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido umbelico, ácido *p*-cumárico, genisteína, canferol, catequina, dalbergioidina, epicatequina, daidzein, 2'-hidroxiformononetina, ácido evernico, naringenina,

calicosina, (7S), dalbergifenol, tevetiaflavona, cicloartenol, guttiferona C, e outros compostos, utilizando LC-Orbitrap-EMTF (Maróstica Junior et al., 2008).

Righi et al. (2011) identificaram alcanos, tais como *n*-tricosano, *n*-pentacosano, *n*-heptacosano, *n*-nonacosano, *n*-hentriacontano e *n*-tritiacontano no extrato hexânico da própolis vermelha, bem como β -amirina, α -amirina, lupeol, metilguaiacol, trans-anetol, resorcinol, anisilacetona, cis-asarone e farnesol. Nunes et al. (2009) identificaram 34 compostos voláteis na própolis vermelha, sendo o trans-anetol, α -copaeno e metil-cis-isoeugenol os majoritários.

Vários estudos avaliando as atividades farmacológicas da própolis vermelha estão disponíveis, mas os mecanismos moleculares ou compostos bioativos responsáveis por cada atividade ainda não foram completamente elucidados (Freitas et al., 2017).

2.1.1.3 Própolis Verde

A própolis brasileira produzida no cerrado, rica em derivados prenilados do ácido-p-cumárico é conhecida internacionalmente como própolis verde, *green propolis*, a qual tem como principal fonte vegetal a espécie de *Baccharis dracunculifolia* (Bankova et al., 1999).

A própolis verde é composta por quantidades elevadas de compostos fenólicos, como artepelinina C, bacarina, kaempferide, isosakuranetina, diidrokaempferide, drupanina, ácido p-coumárico, ácido cafeico, aromadendrina e derivados cafeoilquínicos, dentre outros compostos. A fonte principal destes compostos é o alecrim-do-campo, *Baccharis dracunculifolia*. A presença destas substâncias está relacionada a atividades anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa e anticâncer (Figueiredo-Rinhel et al, 2013; Nunes et al, 2009; Salatino et al, 2005; Bankova et al, 1996; Sawaya et al, 2004; Huang et al, 2014).

Em relação aos compostos voláteis encontrados na própolis verde brasileira, os principais são sesquiterpenos, tais como: (E)-nerolidol, β -cariofileno, espatulenol e δ -cadineno, os quais são responsáveis pelo aroma característico e também por muitas atividades biológicas relatadas na literatura. O valor comercial da própolis verde brasileira no mercado internacional é alto em virtude da alta concentração de

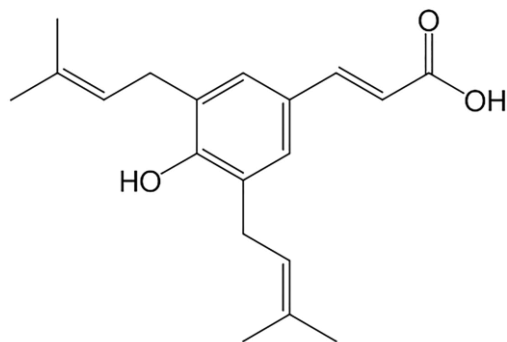
artepelina C, o qual agrega mais valor a este tipo de própolis (Maróstica Junior et al., 2008).

2.2 ARTEPELINA C

Dentre todos os tipos de própolis, a própolis verde brasileira, tem sido amplamente investigada em todo o mundo, devido à presença, principalmente, de artepelina C (Shimizu et al., 2004).

A artepelina C ou ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico é um composto fenólico derivado do ácido cinâmico, de baixo peso molecular ($300,39 \text{ g/mol}^{-1}$) e com $\text{pKa} = 4,65$, isolado da própolis verde brasileira. Possui dois grupos pré-alquilados ligado a um grupo fenil (Figura 1). Os grupos pré-alquilados em sua estrutura conferem hidrofobicidade e provavelmente favorece sua interação com agregados anfifílicos como membranas celulares, o que explicaria o amplo espectro da artepelina C em comparação com outros compostos cinâmicos, mas esta interação com membranas celulares não é muito conhecida (Alhassan et al., 2014; Camuri et al., 2018; Orsolíc et al., 2004; Paulino et al., 2008; Pazin et al., 2017; Shimizu et al., 2004).

Figura 1 - Estrutura química artepelina C



Fonte: Bastos; Ambrósio, 2017.

A presença de um grupo ácido carboxílico (COOH), demonstra uma sensibilidade ao pH. As diferenças na estrutura molecular de tais compostos dependentes do pH do meio, podem ser seletivos em suas ações biológicas, podendo existir uma correlação entre as propriedades biológicas da artepelina C e sua estrutura particular, ou seja, acredita-se que o composto, em condições fisiológicas saudáveis, melhore o potencial antioxidante do sistema biológico através da transferência de

átomos de hidrogênio, principalmente pela interação com as membranas celulares, provavelmente devido à presença de grupos pré-alquilados, evitando a formação de peroxidação lipídica causada por radicais livres que danificam a estrutura da membrana com baixa toxicidade, demonstrando um efeito antioxidante. Levando em consideração compostos sensíveis ao pH, uma característica particularmente interessante das células tumorais é a matriz extracelular ácida resultante da produção de lactato através da via glicolítica anaeróbica para geração de energia das células. O pH baixo da matriz extracelular pode alterar o estado de protonação dos compostos bioativos dependentes do pH, como a AC, provavelmente modulando sua ação para danificar a membrana celular das células tumorais, levando a um efeito antitumoral (Camuri et al., 2018; Nakanishi et al., 2003).

2.2.1 Propriedades Biológicas e Estudos Farmacocinéticos da Artepelina C

A artepelina C, além de ser o composto majoritário (em torno de 86%) da própolis verde brasileira, podendo ser utilizada como marcador fitoquímico para a identificação da mesma, destaca-se em relação aos outros compostos, devido a diversas propriedades biológicas que são atribuídas a esse composto, tais como: anticâncer, antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano (Carrão, 2017). Apresenta efeitos antiproliferativos frente a células humanas tumorais de estômago, intestino, mama e próstata, estando os mecanismos de ação destes derivados associados à indução de apoptose e à inibição da enzima AKR1C3 (aldoceto redutase 1C3) (Mishima et al., 2005; Endo et al., 2014). Esta enzima é uma 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 5 diretamente envolvida na biossíntese de testosterona e estrógeno, e encontra-se superexpressa em tumores de próstata e mama (Endo et al., 2014). Um estudo comparativo do efeito antiproliferativo com a própolis verde, extrato de *B. dracunculifolia*, a artepelina C, em diferentes linhagens tumorais revelou citotoxicidade (Oliveira, 2018).

Na literatura, não existem muitos estudos que avaliam as atividades farmacológicas da AC, no Tabela 1, pode-se visualizar os estudos encontrados. Estudos farmacocinéticos são ainda mais escassos, atualmente, apenas os estudos de Konishi et al. (2005) e Paulino et al. (2008) estão disponíveis na literatura, os quais

avaliaram a farmacocinética da artemelina C, administradas oralmente em camundongos.

Tabela 1- Estudos de atividade farmacológica para artemelina C

ATIVIDADE	MODELO	AUTOR
Antimicrobiana e antitripanossoma	<i>In vitro</i>	Marcucci et al., 2001.
Anti-inflamatória	<i>In vivo</i>	Paulino et al., 2008; Szliszka et al., 2012.
Antioxidante	<i>In vitro</i>	Shimizu et al., 2004
Gastroprotetora	<i>In vivo</i>	Costa et al., 2018.
Regulação glicêmica	<i>In vitro</i>	Choi et al., 2011.
Obesidade	<i>In vivo</i>	Nishikawa et al., 2016.

Fonte: Elaborado pela autora.

O estudo de Marcucci e colaboradores (2001), avaliaram a atividade da artemelina C frente ao *Trypanosoma cruzi* e as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Para a atividade antibacteriana, foram usadas cepas das bactérias descritas acima: ATCC 25922, ATCC 9027, ATCC13150 e ATCC 29212. A análise foi conduzida por meio de cultura celular, utilizando-se discos de papel filtro saturados com as amostras. A zona de inibição (mm) foi medida após 24 horas de incubação. A atividade antitripanossoma foi verificada por meio de ensaios *in vivo* em camundongos albinos, após 24 horas de administração de 8mg/mL contendo $10 \cdot 10^6$ cel/mL de parasita. Os resultados demonstram atividade contra *Trypanossoma cruzi* e todas as bactérias testadas.

Paulino et al. (2008), investigaram os efeitos anti-inflamatórios da Artemelina C (10mg/Kg, via oral) em camundongos. Induziu-se edema de pata por carragenina (300 µg/pata) nos animais e também realizou-se a determinação de prostaglandina E (2), produção de óxido nítrico *in vitro* (células RAW 264.7), atividade NF-Kappa B em células HEK 293. Os resultados demonstram uma inibição máxima de 38% após 6

horas de edema de pata, uma redução de prostaglandina E (2) em $58 \pm 5\%$, redução da produção de óxido nítrico em 100 microM. Nas células HEK 293, a Artepelina C reduziu a atividade de NF-kappaB com um IC₅₀ médio de 26 (22-30) mg/mL, sugerindo atividade anti-inflamatória, particularmente durante a inflamação aguda. Conforme os resultados, a Artepelina C mostrou efeitos anti-inflamatórios mediados, pelo menos em parte, pela prostaglandina E (2) e inibição do óxido nítrico através da modulação NF-kappaB.

No estudo de Souza et al. (2018), foram avaliados os efeitos da artepelina C na viabilidade celular em um painel abrangente de linhagens celulares derivadas do câncer cervical humano incluindo HeLa (papilomavírus humano/HPV 18-positivo), SiHa (HPV 16 positivos), CaSki (HPV 16 e 18 positivos) e C33A (HPV negativo) em comparação com uma linha celular epitelial humana imortalizada espontaneamente (HaCaT). A artepelina C apresentou efeito seletivo sobre a viabilidade celular, podendo induzir a apoptose por via intrínseca em todas as linhagens celulares derivadas de câncer do colo do útero, exceto em HaCaT. A artepelina C também foi capaz de inibir a migração e invasão de células cancerígenas.

Shimizu et al. (2004), avaliaram a artepelina C frente a células Caco-2, onde demonstrou atividade contra o dano oxidativo do DNA, ou seja, a artepelina C é um antioxidante biodisponível que pode prevenir a degeneração de doenças agindo sobre o DNA celular, podendo ser utilizado para o tratamento de câncer, por exemplo.

Szliszka et al. (2011), demonstram em estudos *in vitro* com o extrato de própolis verde potenciais alvos na via apoptótica induzida por TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral -TRAIL- é um potente estimulador da apoptose em células cancerígenas e uma importante molécula efetora imunitária na vigilância e eliminação de tumores em desenvolvimento. No entanto, muitas células cancerígenas são resistentes à morte mediada por TRAIL) para a atividade quimiopreventiva do câncer da própolis brasileira. Também foram examinados os efeitos citotóxicos e apoptóticos do extrato de própolis verde (contendo os principais componentes bioativos: artepelina C, quercetina, kaempferol e ácido p-cumárico) em combinação com TRAIL em células de câncer de próstata LNCaP. A apoptose foi detectada usando anexina V-FITC por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado usando a coloração

DePsipher por microscopia de fluorescência. A citometria de fluxo foi utilizada para analisar a expressão do receptor de morte (TRAIL-R1 e TRAIL-R2) em células LNCaP. A inibição da ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) (p65) nas células cancerígenas foi confirmada pelo kit TransAM NF- κ B baseado em ELISA. As células LNCaP mostraram-se resistentes à apoptose induzida por TRAIL. Neste estudo, verifica-se que o extrato de própolis sensibiliza células de câncer de próstata resistente a TRAIL, desta forma, a própolis brasileira e seus componentes bioativos aumentaram acentuadamente a apoptose e citotoxicidade mediada por TRAIL em células de câncer de próstata. Além disso, aumentou a expressão de TRAIL-R2 e a atividade do NF- κ B em células LNCaP. O co-tratamento de células de câncer de próstata com 100 ng/mL de TRAIL e 50 μ g/ml de extrato de própolis aumentou a porcentagem de células apoptóticas para $65,8 \pm 1,2\%$ e causou uma ruptura significativa de nas células LNCaP. Este estudo demonstrou que o extrato de própolis brasileira ajudou as células a superarem a resistência do TRAIL ao envolver as vias apoptóticas intrínseca e extrínseca e regular a atividade do NF- κ B. Os dados demonstram o importante papel da própolis verde brasileira e seus compostos bioativos na quimioprevenção do câncer de próstata através do aumento da apoptose mediada por TRAIL.

No estudo de Szliszka et al. (2012), os autores estudaram os mecanismos pelos quais a resistência a TRAIL pode ser superada em células de câncer de próstata (LNCaP) utilizando a artemelina C. A citotoxicidade foi medida por ensaios de MTT e lactato desidrogenase (LDH). A apoptose foi detectada usando coloração com Anexina V-FITC por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. A expressão do receptor de morte (DR) (TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5) foi analisada utilizando citometria de fluxo. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado usando a coloração DePsipher por microscopia de fluorescência. A inibição da ativação do NF- κ B (p65) foi confirmada com o kit TransAM NF- κ B baseado em ELISA. As atividades de caspase-8 e caspase-3 foram determinadas por ensaios colorimétricos de protease. Os resultados mostraram que artemelina C sensibilizou as células LNCaP resistentes a TRAIL, envolvendo as vias apoptóticas extrínsecas (mediadas por receptores) e intrínsecas (mitocondriais). Artemelina C aumentou a expressão de TRAIL-R2 e diminuiu a atividade do NF- κ B. O co-tratamento com TRAIL e artemelina

C induziu a ativação significativa de caspase-8 e caspase-3, bem como o rompimento de membranas. Estes resultados mostram que as células de cancro da próstata podem ser sensibilizadas para a imunoprevenção mediada por TRAIL pela artepelina C e confirmam o papel dos compostos fenólicos na imunoprevenção do cancro da próstata.

Costa e colaboradores (2018), avaliaram o efeito gastroprotetor da Artepelina C em camundongos com úlcera induzida por etanol/HCl. Foram avaliados parâmetros histológicos, histoquímicos, oxidativos e inflamatórios no tecido ulcerado. Atividades anti-secretoras de ácido também foram avaliadas. Uma dose de 0,3 mg/Kg via oral foi administrada. A gastroproteção foi acompanhada de normalização das atividades da superóxido dismutase, catalase e glutathione-S-transferase e redução da atividade da mieloperoxidase, além da diminuição do volume de suco gástrico, o pH, a acidez total e a atividade da pepsina nos camundongos.

A regulação glicêmica da artepelina C foi avaliada por Choi e colaboradores (2011). Os autores verificaram que a AC possui afinidade pela ligação ao receptor PPAR γ (receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama) e aumentou a diferenciação de adipócitos de células 3T3-L1 de forma dependente da dose. Como resultado da diferenciação de adipócitos induzida por AC, a expressão gênica de PPAR γ e seus genes alvo, como aP2, adiponectina e transportador de glicose (GLUT) 4, foi aumentada. Em adipócitos 3T3-L1 maduros, a artepelina C aumentou significativamente a captação de glicose basal e estimulada pela insulina. Estes resultados sugerem uma ação da AC frente a regulação glicêmica, dependente da dose.

Nishikawa e colaboradores (2016) demonstraram que a AC induz significativamente adipócitos semelhantes ao marrom em células C3H10T1/2 murinas e adipócitos derivados de WAT inguinal primário (iWAT). Esta indução significativa é devida à ativação do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma e à estabilização da proteína 16 contendo o domínio homólogo PRD1-BF-1-RIZ1 (PRDM16). Além disso, a administração oral de AC (10 mg/ g) por 4 semanas induziu significativamente adipócitos parecidos com marrom acompanhados por expressão significativa das proteínas UCP1 e PRDM16 em iWAT de camundongos, e foi independente da via de sinalização β 3-adrenérgica através do sistema nervoso

simpático. A indução de adipócitos semelhantes ao marrom no tecido adiposo branco sugere uma nova abordagem para prevenir e tratar a obesidade por meio da indução da termogênese associada à proteína desacopladora 1 (UCP1). Essas informações sugerem que a AC é capaz de aumentar o gasto energético através do escurecimento de adipócitos brancos em marrons e conseqüentemente apresenta uma possível ação contra a obesidade.

Em relação aos estudos farmacocinéticos da AC, apenas os estudos de Konishi et al. (2005) e Paulino et al. (2008) são encontrados na literatura e os mesmos trazem apenas a caracterização de alguns parâmetros. No estudo de Konishi e colaboradores (2005), uma dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$ foi administrada em ratos wistar machos, com pesos variando de 182 - 213g. A administração foi oral, por meio de intubação gástrica, contendo 50% de propilenoglicol. As amostras de sangue foram coletadas da artéria abdominal e da veia porta, nos tempos de 5, 10, 20, 30, 60 e 90 minutos após a administração da AC. As amostras foram analisadas em CLAE - ECD (Cromatografia líquida de alta eficiência com detector eletroquímico), com metodologia previamente validada pelos autores. A concentração sérica de AC atingiu um pico máximo em 5 minutos ($t_{\text{máx}}$), com um $C_{\text{máx}}$ de 19,7 $\mu\text{mol/L}$. A $ASC_{0-1,5h}$, calculada por método trapezoidal, foi de 182,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$, tempo de meia vida $t_{1/2}$: 86,6 minutos, estes dados são representativos das amostras coletadas a partir da veia porta. As coletas realizadas na artéria abdominal, demonstram um $C_{\text{máx}}$ de 0,55 $\mu\text{mol/L}$, $t_{\text{máx}}$: 5 minutos, $ASC_{0-1,5h}$ 7,72 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$ e um $t_{1/2}$ de 23,2 minutos. Estes dados demonstram que a AC tem maior suscetibilidade à eliminação hepática.

No estudo de Paulino e colaboradores (2008), somente o $t_{\text{máx}}$ e o $C_{\text{máx}}$ foram avaliados. Camundongos machos receberam uma dose de 10 mg/Kg de AC por via oral, a formulação de administração não foi informada. Amostras de sangue foram coletadas e analisadas cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG - MS). Os autores verificaram que após 1 hora ($t_{\text{máx}}$) da administração já se atinge o pico máximo de concentração, $C_{\text{máx}}$ de 22 $\mu\text{g/mL}$.

As atividades anticâncer serão abordadas no artigo de revisão.

2.3 ESTUDOS FARMACOCINÉTICOS

A investigação da terapia farmacológica tem por objetivo estabelecer relações entre a concentração do fármaco na biofase (local que o fármaco deve alcançar para exercer seu efeito terapêutico) e seu respectivo efeito farmacológico alcançados por estas concentrações (Mouton et al., 2005). O sucesso de uma terapia farmacológica é dependente da dose do fármaco administrada, do nível de concentração que este alcança na biofase e a Área Sob a Curva (ASC) versus tempo e quando se trata de medicamentos antimicrobianos, o sucesso também depende do tempo de duração em que os níveis séricos excedem a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Craig, 2001).

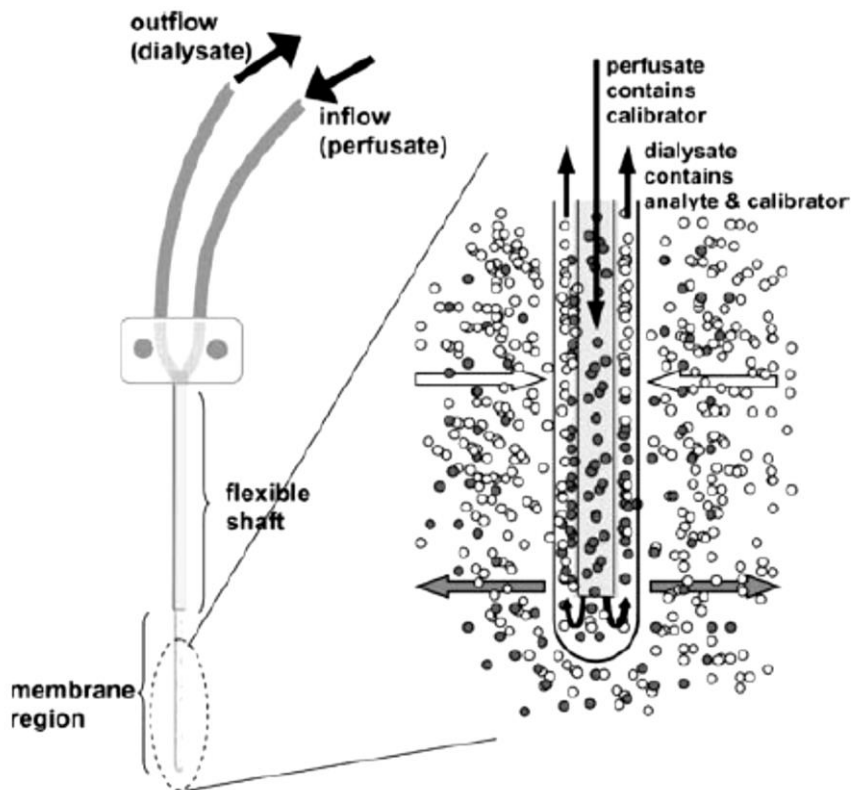
Os parâmetros farmacocinéticos demonstram a relação quantitativa entre o tempo (variável independente) e a concentração (variável dependente) dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos medicamentos, demonstrando as modificações que um sistema biológico produz em um princípio ativo. Através da caracterização do perfil plasmático dos fármacos é possível determinar parâmetros associados a esses processos como volume de distribuição (Vd), clearance (CL), meia-vida ($t_{1/2}$). Já a farmacodinâmica estuda os efeitos bioquímicos e fisiológicos que o medicamento causa, bem como seu mecanismo de ação, relacionando a concentração do fármaco e seus efeitos, os quais podem ser terapêuticos ou tóxicos. São as modificações que o fármaco produz no sistema biológico (CLSI, 2012).

2.4 MICRODIÁLISE

A microdiálise (MD) é uma técnica de amostragem minimamente invasiva, comparada a outras estratégias como homogeneizado de tecidos, que permite a determinação da fração livre do fármaco ou substância em estudo (podendo ser endógena ou exógena), ou seja, a fração não ligada a proteínas, aquela responsável por exercer o efeito farmacológico ou até mesmo toxicológico. A técnica se baseia na implementação de uma pequena sonda de microdiálise no tecido a ser estudado, sendo continuamente irrigada com líquido de perfusão (geralmente solução fisiológica relevante, como (Ringer, salina, Ringer lactato, entre outros). A parte da sonda em contato direto com o tecido possui uma membrana semipermeável, funcionando como

um filtro e impedindo a passagem de moléculas maiores que seu *cut off* (20 kDA) para o líquido de perfusão. O fluido de perfusão (perfundido) passa pela sonda a um fluxo baixo e constante (0,1 - 5 mL/min). Apenas moléculas pequenas, aquelas não ligadas as proteínas, presentes no fluido sofrem difusão passiva pela membrana e são recolhidas pelo perfundido. O líquido recolhido pela outra extremidade da sonda é chamado de dialisado ou microdialisado e este é analisado com metodologia validada para quantificação da fração de fármaco não ligada, sem necessidade de realização de pré-tratamento de amostra, diferentemente de uma amostra plasmática (Brunner & Derendorf, 2006; Chaurasia et al., 2007; Elmquist & Sawchuck, 2000). A figura 2 representa um esquema de funcionamento de uma sonda de MD, onde podemos observar a sonda e na porção terminal da mesma, uma membrana semipermeável, onde ocorre a difusão passiva sob condição *sink*.

Figura 2 - Esquema representativo de uma sonda de microdiálise



Fonte:

Chaurasia

et al., 2007.

A condição *sink* é estabelecida entre o líquido de perfusão (perfundido) e o meio intersticial, devido ao baixo fluxo de perfusão e assim permitindo a difusão de

sustâncias de baixo peso molecular presentes no tecido e ausentes no perfundido. Esta condição, não permite o equilíbrio de concentrações da molécula de investigação entre o líquido de perfusão e o líquido intersticial, mimetizando um capilar sanguíneo, carreando o fármaco do local onde a sonda é colocada (Chaurasia et al., 2007; Guillon et al., 2018).

A sonda pode ser utilizada tanto para entrega de fármaco quando em modo de amostragem, por exemplo, para um fluido de perfusão sem o composto de interesse, a concentração de microdialisado é geralmente uma fração de nível difusível extracelular do tecido (não ligado), essa fração é chamada de recuperação relativa (RR). A recuperação se torna dependente do tempo quando as concentrações extracelulares do tecido variam durante o experimento. A taxa de fluxo (perfusão), temperatura, composição da membrana da sonda, área superficial, tamanho das conexões da tubulação que liga a sonda à bomba de MD tecido a ser estudado e sua tortuosidade e propriedades físico-químicas do analito de interesse, são condições experimentais que influenciam a recuperação quando determinada *in vivo*. Quanto maior a taxa de fluxo de perfusão, menor a recuperação relativa. Uma maior área de membrana e temperaturas mais elevadas, aumenta a recuperação. As propriedades físico-químicas da substância em estudo, especialmente o coeficiente de partição, tem influência significativa na permeabilidade e, portanto, afeta o processo de difusão através da membrana. Conseqüentemente a recuperação pode variar de um experimento e outro se as condições não forem mantidas as mesmas, sendo assim, a otimização das condições experimentais torna-se fundamental para obtenção de resultados confiáveis (Bungay et al., 2001; Schuck; Rinas; Derendorf, 2004).

As concentrações coletadas no microdialisado não são iguais as concentrações livres de fármaco no tecido (concentrações no microdialisado sempre será mais baixas que os níveis reais no tecido), devido a condição *sink* estabelecida durante o experimento, levando a necessidade de determinar a recuperação relativa da sonda que expressa a razão entre a concentração real medida e a concentração média investigada. Na prática, a condição *sink* é estabelecida com a presença de um fluido de perfusão isenta do fármaco o qual impede que ocorra um equilíbrio entre os dois meios (fluido de perfusão e local onde sonda se encontra) e assim, a concentração no microdialisado representa apenas uma fração da concentração livre tecidual. Sendo

assim, é necessário conhecer a taxa de recuperação relativa das sondas, pois descreve a proporção da concentração de fármaco no dialisado e no tecido sob investigação, possibilitando assim a determinação da fração livre tecidual (Equação 1):

$$RR = \frac{C_d}{C_i} \times 100$$

(Equação 1)

onde C_d é a concentração do fármaco livre no microdialisado e C_i é a concentração do fármaco livre no fluido intersticial (Araujo et al., 2009; Guillon et al., 2018; Palma, 2018; Plock; Kloft, 2005).

Um método bastante utilizado para determinar a RR das sondas em estudos pré-clínicos e clínicos é a retrodiálise (RD). A RD, é uma técnica que se baseia na premissa de que a perda do fármaco através da membrana de MD para o tecido é igual ao ganho do tecido para a sonda. Durante a calibração através da retrodiálise, o líquido de perfusão contendo uma concentração conhecida do analito (C_p) é bombeado através da sonda, sendo determinada a concentração do analito no microdialisado (C_d) obtido:

$$RD = \left(1 - \frac{C_d}{C_p}\right) \times 100$$

(Equação 2)

onde C_p é a concentração do fármaco/analito no líquido de perfusão e C_d é a concentração do fármaco/analito no microdialisado (Palma, 2018).

Para verificar se não há adesão do composto de interesse na sonda de MD (RR se tornaria diferente da retrodiálise e diálise, ou seja, não seria adequada para calibração das sondas antes do experimento propriamente dito), a concentração do analito no perfundido deve ser previamente calculada através de experimentos *in vitro* (Palma, 2018).

As concentrações livres locais de fármacos em tecidos específicos muitas vezes podem ser diferentes da concentração encontrada na circulação sistêmica, sendo assim, mais representativa da penetração tecidual do fármaco (Elmqvist &

Sawchuck, 2000). Desta forma, a microdiálise permite a investigação da cinética de distribuição e entrega de fármacos a uma ampla variedade de tecidos-alvo, permitindo a quantificação de substâncias farmacologicamente ativas e não ligadas, sendo assim uma ferramenta muito poderosa para estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos de distribuição e penetração tecidual de fármacos (Brunner & Derendorf, 2006; Chaurasia et al., 2007).

Apesar da MD ser uma excelente técnica de avaliação de concentração tecidual, ela apresenta algumas limitações, tais como: dificuldade de se trabalhar com compostos lipofílicos (possibilidade de adesão à membrana da sonda, afetando a taxa de recuperação), moléculas com peso molecular muito elevado (dificuldade de difusão através dos poros da membrana), impossibilidade de determinar a concentração do fármaco em um único tempo, obtendo-se apenas a concentração média de cada intervalo de coleta além do mais, a inserção da sonda pode produzir um trauma limitado, acompanhado de resposta inflamatória, em estudos de investigação inflamatória, deve-se considerar esta limitação (Zhuang et al., 2015).

Apesar de ser uma desvantagem a utilização de compostos lipofílicos em microdiálise, alguns estudos já foram realizados, demonstrando possibilidade de se trabalhar com estes tipos de compostos (Araújo, 2008; Schuck; Rinas; Derendorf, 2004). Para substâncias hidrofílicas, a recuperação relativa apresenta valores iguais para micro e retrodiálise, já para substâncias moderadamente lipofílicas (Log P entre 1 - 4), as recuperações de micro e retrodiálise não são semelhantes, devido a ligação da substância a sonda de MD, dificultando a determinação da recuperação *in vivo*. A recuperação *in vitro* reduz proporcionalmente com o aumento da lipofilicidade da substância em investigação (Lindberger; Tomson; Stahle, 2002). Na literatura, algumas alternativas foram propostas para superar a limitação da microdiálise em compostos lipofílicos, como por exemplo, a utilização de albumina no fluido de perfusão, a fim de impedir a ligação da substância a tubulação das sondas. Porém, apesar de ter se mostrado eficiente, esta técnica, altera a composição do líquido de perfusão, não mimetizando a composição proteica do líquido extracelular ao redor da sonda, modificando o sistema de pressão osmótica e a fisiologia do tecido sob investigação. Uma outra abordagem que também tem sido utilizada é modelar matematicamente a ligação à sonda, utilizando um conjunto de equações para separar

a ligação ao tubo de microdiálise da droga no processo difusional através da membrana semipermeável e para obter a recuperação real a partir da recuperação aparente determinada experimentalmente (Lindberger; Tomson; Stahle, 2002; Rosenbloom; Sipe; Weedn, 2005; Traunmüller et al., 2006).

2.5 FARMACOMETRIA

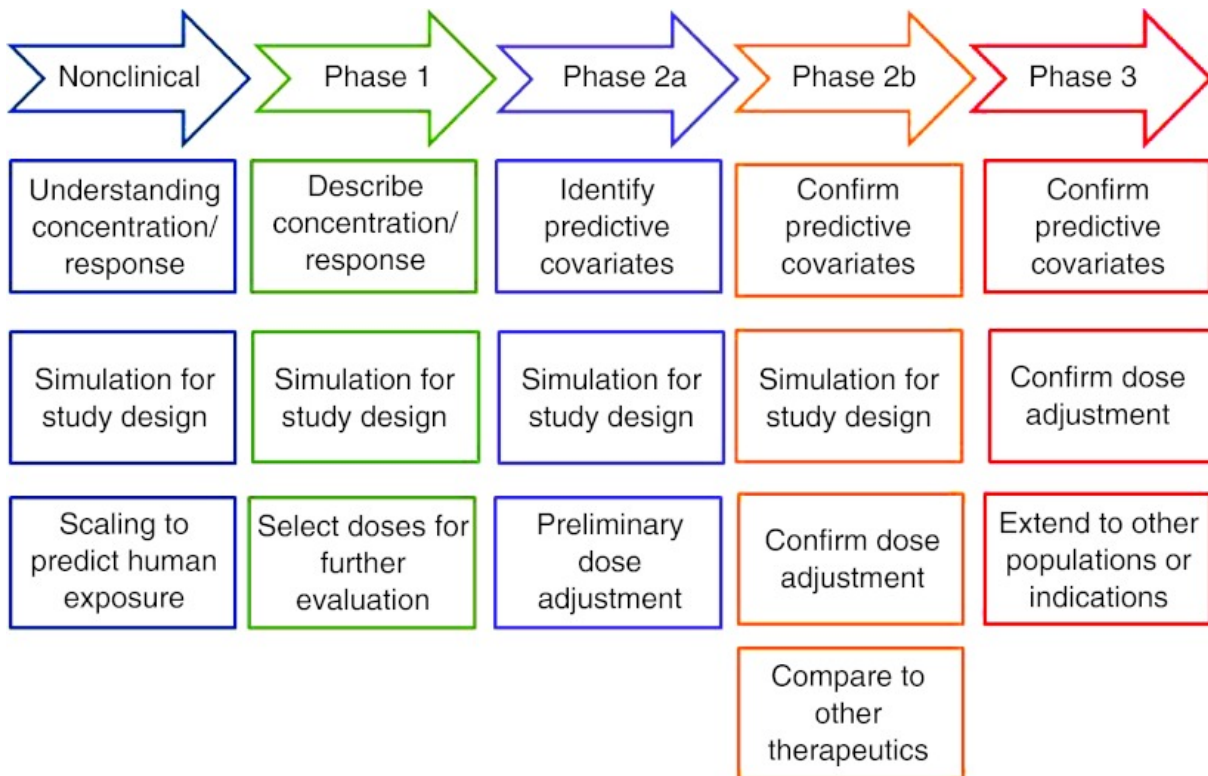
A farmacometria é a ciência que quantifica as características das doenças, medicamentos e testes com o objetivo de influenciar o desenvolvimento de medicamentos e as decisões regulatórias e terapêuticas. Essa ciência iniciou antes de 1960, com a quantificação de cursos de tempo de concentrações de drogas em biofluidos (farmacocinética ou PK) em experimentos laboratoriais. Os pesquisadores, então, desenvolveram métodos para vincular as exposições aos medicamentos às respostas farmacológicas em estado estacionário (farmacodinâmica ou PD). A fusão dos princípios da farmacologia e da farmacologia clínica foi essencial para desenvolver métodos e ferramentas inovadores para analisar dados de ensaios clínicos. E em 1979, cientistas farmacométricos adotaram métodos econométricos e biométricos (modelagem de efeitos mistos) para quantificar padrões em dados observacionais, abrindo oportunidades além dos pequenos estudos homogêneos. Em 1989, o FDA emitiu diretrizes para o estudo de medicamentos com probabilidade de uso em idosos (chamados de “triagem farmacocinética”), onde as informações relacionadas a farmacocinética são coletadas dos estudos de registro e a farmacometria avalia as fontes de variabilidade. Em 1999, o FDA emitiu orientações para a indústria sobre análises populacionais e em 2003 sobre as relações exposição-resposta e já nessa época, as declarações de rotulagem relativas a fatores intrínsecos e extrínsecos estavam sendo apoiadas por análises farmacométricas. Neste contexto, as pesquisas mais recentes estão focadas na construção de modelos quantitativos de testes de doenças e medicamentos. A importância desta ciência e o número crescente de farmacêuticos nesta área aumentaram a tal ponto que uma conferência focada em farmacometria (chamada Conferência Americana de Farmacometria, ACoP) foi criada em 2008.

2.5.1 Modelagem Farmacocinética (PK)

Durante o desenvolvimento de novos medicamentos e uso clínico dos mesmos, muitos questionamentos surgem em relação a segurança, eficácia e qual a melhor dose e essas perguntas podem ser respondidas através da ciência da farmacometria, onde emprega-se softwares como ferramentas para desenvolvimento de modelos matemáticos e estatísticos (Owen; Fiedler-Kelly, 2014). A modelagem e simulação (M&S), em farmacocinética, é a construção de modelos matemáticos que permitem descrever ou simular o perfil de concentração por tempo de um fármaco em um organismo, seja humano ou não, a partir de dados *in vivo* ou *in vitro* (Leahy, 2005).

A modelagem e simulação surgiram como ferramentas importantes para integrar dados, conhecimento e mecanismos para auxiliar na tomada de decisões racionais sobre o uso e desenvolvimento de medicamentos. Na Figura 3, observa-se algumas áreas onde a modelagem e simulação são frequentemente empregadas durante o desenvolvimento de medicamentos. Modelos apropriados podem fornecer uma estrutura para prever o tempo de exposição e resposta para diferentes regimes de dosagem (Mould and Upton 2012).

Figura 3 - Aplicações da modelagem e simulação durante as fases de desenvolvimento de um novo medicamento



Fonte: Mould; Upton, 2012.

É comum que os medicamentos apresentem na exposição e resposta variabilidade interindividual, ou seja, entre indivíduos e muitos estudos realizados durante o desenvolvimento do medicamento e estudos de farmacometria permitem identificar e quantificar essa variabilidade. Uma boa compreensão da influência de fatores como peso corporal, idade, genótipo, função renal/hepática e medicamentos concomitantes na exposição e resposta ao medicamento é importante para refinar as recomendações de dosagem, melhorando assim a segurança e eficácia de um agente medicamentoso por meio do controle apropriado da variabilidade na exposição ao medicamento (Mould; Upton, 2012).

Esta abordagem pode incluir modelos compartimentais, populacionais e fisiológicos. Pode-se aplicar diferentes métodos matemáticos dependendo do resultado que se quer obter. Essa abordagem numérica permite criar situações atípicas e críticas, e mostram resultados favoráveis no delineamento de um experimento (Gallo-Neto, 2012).

Os modelos são representações de um “sistema” projetado para fornecer conhecimento ou compreensão do sistema. Os modelos são geralmente representações simplificadas de sistemas e é a simplificação que pode torná-los úteis. Essa simplificação se relaciona na aplicabilidade do modelo, onde pretende-se utilizar, sendo assim, se adequam ao propósito. E esta ideia de adequação ao propósito foi articulada por George Box, o qual afirmou: “Essencialmente, todos os modelos estão errados”. A adequação ao propósito acarreta em “credibilidade” e “fidelidade”. A credibilidade requer que o modelo esteja em conformidade com os princípios e mecanismos aceitos que podem ser justificados e defendidos. Modelos credíveis são aqueles para os quais as suposições feitas na construção são compreendidas e claramente definidas. A fidelidade é medida comparando o modelo aos componentes do sistema (realidade) que são considerados importantes e conseqüentemente nem sempre a fidelidade implica em credibilidade. O desenvolvimento de modelos pode, portanto, ser considerado como uma classificação de modelos confiáveis de acordo com uma gama de métricas que destilam sua "adequação ao propósito", preferencialmente incluindo considerações de oportunidade e economia. Então, resumidamente, os modelos fornecem uma base para descrever e compreender o curso de tempo de exposição e resposta ao medicamento após a administração de diferentes doses ou formulações de um medicamento a indivíduos e fornecem um meio para estimar os parâmetros associados, como depuração e volume de distribuição de um medicamento (Mould and Upton 2012).

Os modelos PK descrevem a relação entre a concentração do fármaco e o tempo. Para construção de um modelo PK, utiliza-se um compartimento, região do organismo onde o fármaco está distribuído de forma homogênea, podendo assim descrever uma única concentração representativa em qualquer tempo. Como mencionado anteriormente, os modelos podem ser compartimentais, populacionais e fisiológicos. Os modelos compartimentais são modelos farmacocinéticos clássicos (empíricos) os quais apresentam um número limitado de compartimentos, onde normalmente se subdividem em central e periférico. O modelo é representado pelo plasma (compartimento central) com mais um ou dois compartimentos periféricos ligados a ele. São avaliados conforme critérios estatísticos e gráficos de ajuste do

modelo (godness-of-fit plots), no qual o modelo estrutural que melhor descreve os dados experimentais é o selecionado. Nestes modelos não se consideram os mecanismos internos da fisiopatologia do indivíduo (Nestorov, 2007).

Os modelos populacionais (PK) ou modelagem farmacocinética populacional (popPK) são uma ferramenta para identificação e descrição de relações entre as características fisiológicas de um paciente e a exposição ou resposta observada ao medicamento. Esta abordagem foi desenvolvida para lidar com dados de PK esparsos coletados durante o monitoramento de medicamentos, porém logo foi expandida para incluir modelos que descrevem a relação concentração/resposta. Consequentemente, esta abordagem cresceu e se tornou uma ferramenta importante no desenvolvimento de medicamentos. Esses modelos, assim como os mamilários, são modelos do tipo top-down, ou seja, que obtêm as informações a partir de dados experimentais. Outro tipo de abordagem são os do tipo bottom-up, onde informações prévias sobre as características do sistema e outras variáveis que podem resultar em uma observação são reunidas para prever um resultado. Esse é o caso dos modelos farmacocinéticos embasados pela fisiologia (PBPK) (Mould; Upton, 2012).

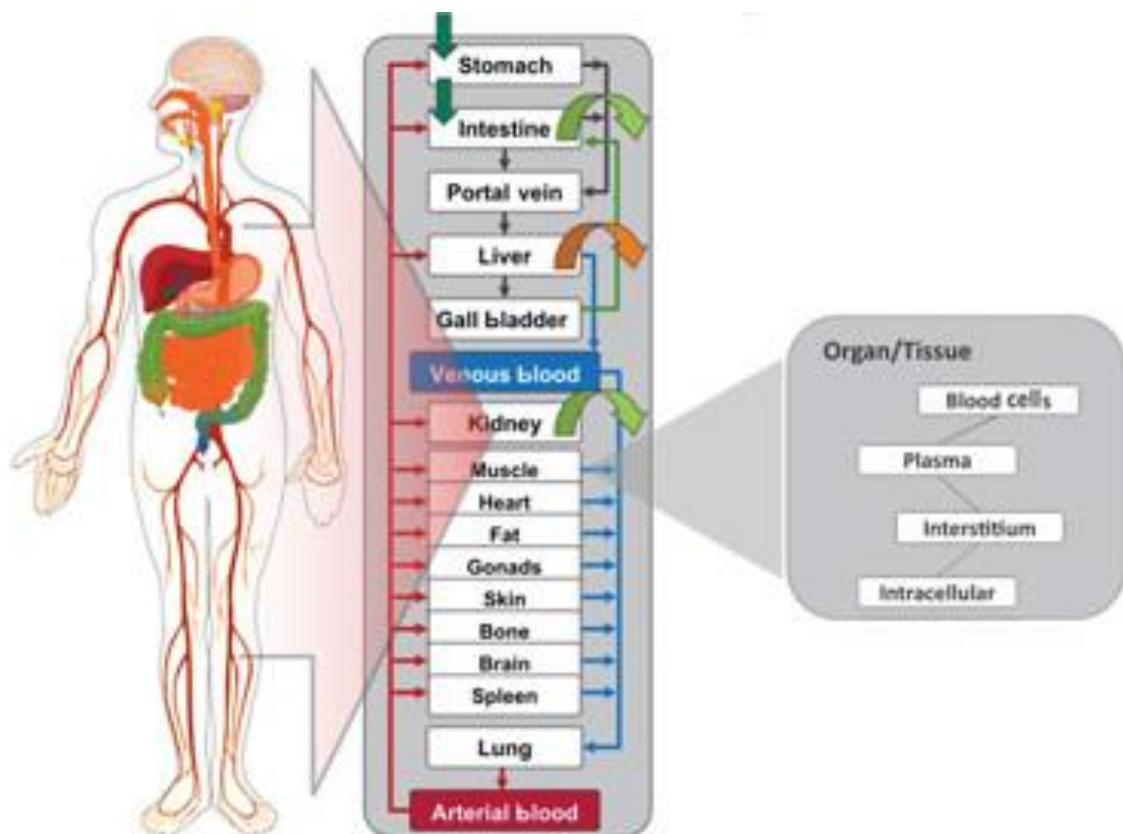
2.5.2 Modelo Farmacocinético Embasado pela Fisiologia (PBPK)

Esses modelos foram inseridos em 1924 com o intuito geral de dividir o organismo em compartimentos e órgãos fisiologicamente relevantes e estabelecer uma relação matemática para cada compartimento descrevendo as quantidades do fármaco dentro do compartimento estudado (Hindmarsh et al., 2018).

Os modelos farmacocinéticos embasados pela fisiologia integram informações relacionadas ao fármaco em estudo e a biologia e fisiologia do organismo, com o propósito de se ter uma representação mecanística do fármaco em sistemas biológicos permitindo a obtenção de simulações de perfis de concentração versus tempo do fármaco. Neste tipo de modelo, é possível se ter uma caracterização quantitativa dos perfis de concentração versus tempo em cada compartimento, uma vez que consideram os distintos órgãos e tecidos, permitindo estimar a exposição do fármaco em diferentes locais de ação (onde experimentalmente pode se ter uma dificuldade ou impossibilidade de medição) e não somente no plasma (Kuepfer et al., 2016).

Os modelos PBPK descrevem o organismo como um sistema fechado composto por órgãos que são relevantes para os processos farmacocinéticos: administração, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco. Estes órgãos são o coração, pulmão, cérebro, estômago, baço, pâncreas, intestino, fígado, rim, gônadas, timo, tecido adiposo, músculo, osso e pele. Os compartimentos de sangue arterial e venoso ligam os tecidos e cada um destes compartimentos é caracterizado por uma taxa de fluxo sanguíneo, volume, coeficiente de partição de tecido e permeabilidade. Os órgãos são subdivididos em subcompartimentos mais detalhados, como células sanguíneas, plasma, interstício e espaço intracelular. A Figura 4 demonstra a estrutura de um modelo PBPK (Shin; Kang; Tai no., 2016; Thiel et al., 2015).

Figura 4 - Estrutura de um modelo PBPK



Fonte: Thiel et al., 2015.

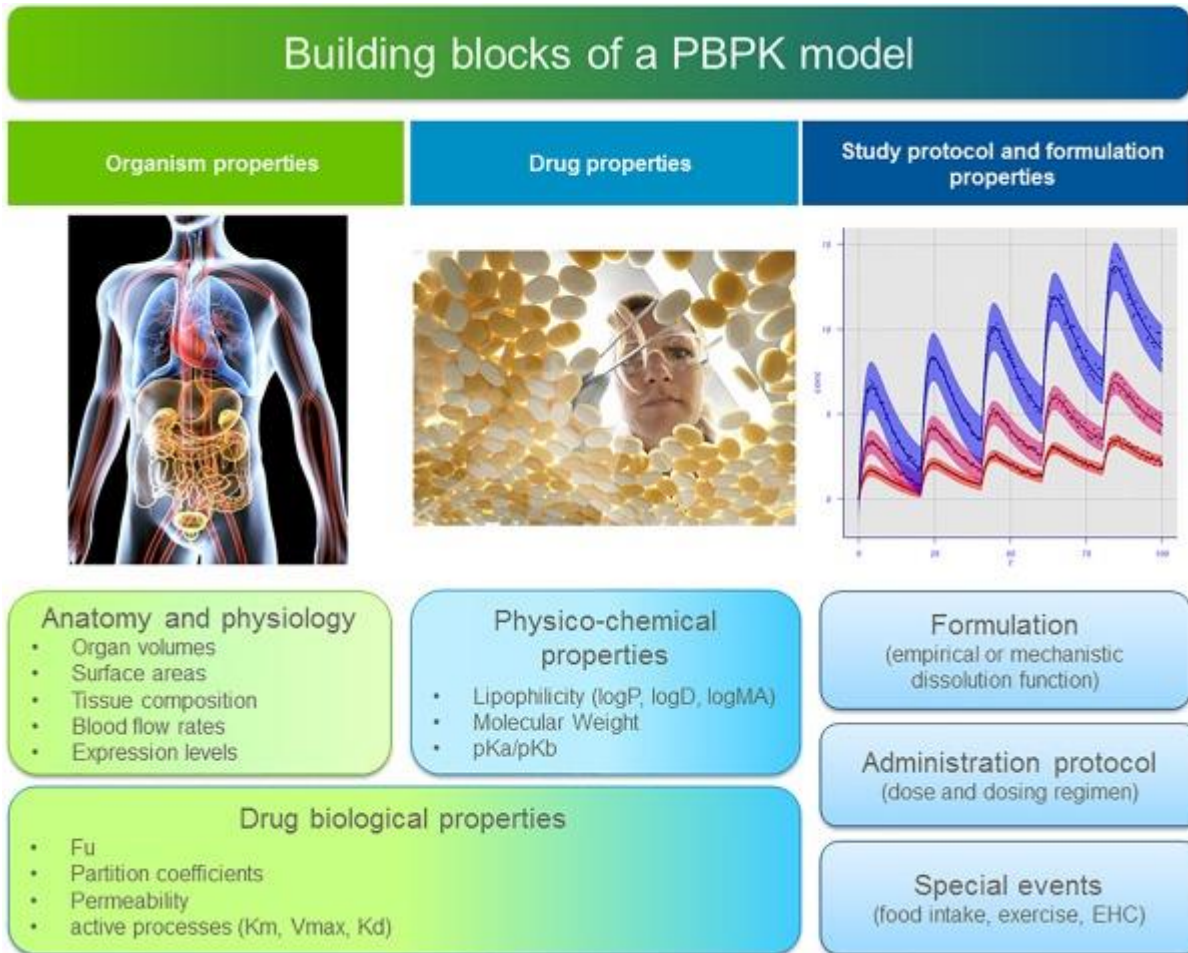
Os compartimentos e os fluxos sanguíneos são descritos usando parâmetros fisiologicamente significativos, permitindo a extrapolação entre espécies, alterando os

parâmetros fisiológicos de forma adequada. Um benefício chave para os modelos PBPK é que os fatores que influenciam a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de um fármaco podem ser incorporados em um modelo PBPK de uma forma mecânica e significativa, se um mecanismo for entendido e dados suficientes estiverem disponíveis. Este aspecto mecânico é apoiado por parâmetros fisiológicos que influenciam a absorção (por exemplo, valores de pH e tempos de trânsito através de várias seções do trato GI), distribuição (por exemplo, volumes e composição do tecido), metabolismo (por exemplo, níveis de expressão de várias enzimas hepáticas e transportadores envolvidos com eliminação metabólica) e eliminação (por exemplo, taxa de filtração glomerular e níveis de expressão de transportadores nos rins envolvidos na eliminação renal), que podem ser explicitamente incorporados no modelo PBPK (Reddy et al., 2013).

Neste modelo os órgãos são descritos por equações diferenciais para calcular mudanças de concentração dos fármacos em cada órgão em função do tempo. Além disso, a estrutura do modelo varia de acordo com o objetivo a ser estudado. Para o desenvolvimento de um modelo, informações sobre as propriedades físico-químicas da molécula (fármaco) em estudo e formulação, propriedades do sistema biológico que interagem na molécula e estrutura anatômica de órgãos e tecidos são importantes. Estes dados são obtidos a partir de compilações de conhecimentos anteriores (na própria literatura ou locais específicos como DRUGBANK, Pubchem entre outros) ou podem ser calculados a partir de fórmulas específicas e cuidadosamente validadas (Rowland; Peck; Tucker., 2011).

Os modelos PBPK são compostos por diferentes tipos de informações que são combinadas durante a construção do modelo e que podem ser utilizadas para gerar simulações de diferentes cenários de tratamento. Esses blocos de construção de informações incluídos no modelo são divididos em propriedades do organismo, propriedades do medicamento e protocolo de administração e propriedades da formulação, conforme mostra a Figura 5.

Figura 5 - Informações para construção de um modelo PBPK



Fonte: Kuepfer et al., 2016.

No que se refere as propriedades do organismo, considera-se a espécie e população em estudo e são necessários os conhecimentos, de por exemplo: volume e composição dos órgãos, fluxo sanguíneos, área de superfície e níveis de expressão de enzimas e proteínas. Quando o estudo tem por objetivo avaliar uma população ou condição específica, como população pediátrica ou gestante ou um carcinoma de mama, as propriedades do organismo devem levar em consideração as alterações fisiológicas que estas condições causam quando comparada a uma população de referência normal. Combinando estas características fisiológicas e anatômicas e as características do medicamento é possível estimar os parâmetros envolvidos no processo de distribuição do fármaco no organismo (Kuepfer et al., 2016).

Em relação as propriedades do fármaco, as propriedades físico-químicas (como lipofilia, peso molecular, solubilidade e valores de pKa) e biológicas (como

fração de droga não ligada ou coeficiente de partição do tecido-plasma) são informações necessárias para a construção do modelo. As propriedades físico-químicas são independentes da fisiologia, já as propriedades biológicas, apesar de específicas do fármaco, são definidas pela interação do fármaco e o sistema biológico (Kuepfer et al., 2016).

No estudo do protocolo e propriedades da formulação são considerados eventos especiais relacionados ao tempo, como tempo de esvaziamento gástrico, avaliando assim seu impacto na PK da droga (Kuepfer et al., 2016).

A adequação do modelo é verificada através da comparação através da comparação do perfil de concentração simulado com o perfil de concentração dos dados observados (experimentalmente ou dados da literatura) através dos parâmetros farmacocinéticos previstos e observados. Esse procedimento é conhecido como validação ou validação externa. A validação é definida como o processo pelo qual a confiabilidade e relevância de um determinado modelo são estabelecidas para um propósito definido. Uma outra abordagem de validação é utilizar método estático que comparem os perfis farmacocinéticos, como a percentagem do erro preditivo e o “average fold error”. Testar o modelo desenvolvido em diferentes cenários, doses, e populações é uma estratégia que garante maior confiabilidade no modelo e uma vez validado o mesmo está apto para uso em diferentes cenários de simulações (IPCS, 2007; Khot et al., 2017; Kuepfer et al., 2016).

Vários softwares foram desenvolvidos para construção de modelos PBPK, alguns exemplos são o SimCyp® (Certara), GastroPlus® (SimulationPlus) e PK-SIM® e Mobi (Bayer). Todos estes apresentam em suas configurações um modelo fisiológico genérico, normalmente completo, com populações e espécies clínicas e pré-clínicas pré-definidas, além disso incluem banco de dados fisiológicos combinados com informações específicas de compostos, bem como dados biométricos, e são usados para parametrizar um modelo PBPK em um nível de corpo inteiro (Kuepfer et al., 2016).

Um modelo PBPK apresenta algumas vantagens em relação a modelagem PK convencional, tais como:

- possibilidade de criar modelos a partir de informações fisiológicas, bioquímicas e anatômicas, obtendo um modelo mais próximo a realidade pré-clínica ou clínica;
- avaliação dos mecanismos pelos quais os processos biológicos influenciam a farmacocinética do fármaco, através da comparação dos resultados de PK com as previsões do modelo;
- obter informações de como as características bioquímicas governam a importância das várias vias de transporte no organismo;
- devido a base mecanística dos modelos é possível realizar extrapolações para diferentes situações e cenários além de extrapolações interespecies;
- aplicação dos modelos em avaliações de segurança (Andersen et al., 2005).

A base mecanística dos modelos PBPK permite determinar se os resultados obtidos experimentalmente são consistentes além da possibilidade de explorar possíveis mecanismos responsáveis por dados inesperados ou incomuns. A modelagem PBPK tem sido usada com grande efeito para extrapolação interespecies, tanto entre modelos animais e para prever a farmacocinética humana com base em dados de animais (Aarons, 2005).

2.5.2.1 Aplicações

Modelos PBPK são muito utilizados para escalonamento em população pediátrica, gestantes, idosos, entre outras populações específicas, ajuste de dose e previsão de efeitos adversos, prever as primeiras doses a serem testadas em humanos no desenvolvimento de novos fármacos, explicar as interações fármaco-fármaco, extrapolação entre uma espécie para outra e entender melhor os processos fisiopatológicos de uma droga no organismo (Thiel et al., 2015). Veja o esquema da aplicação de modelos PBPK:

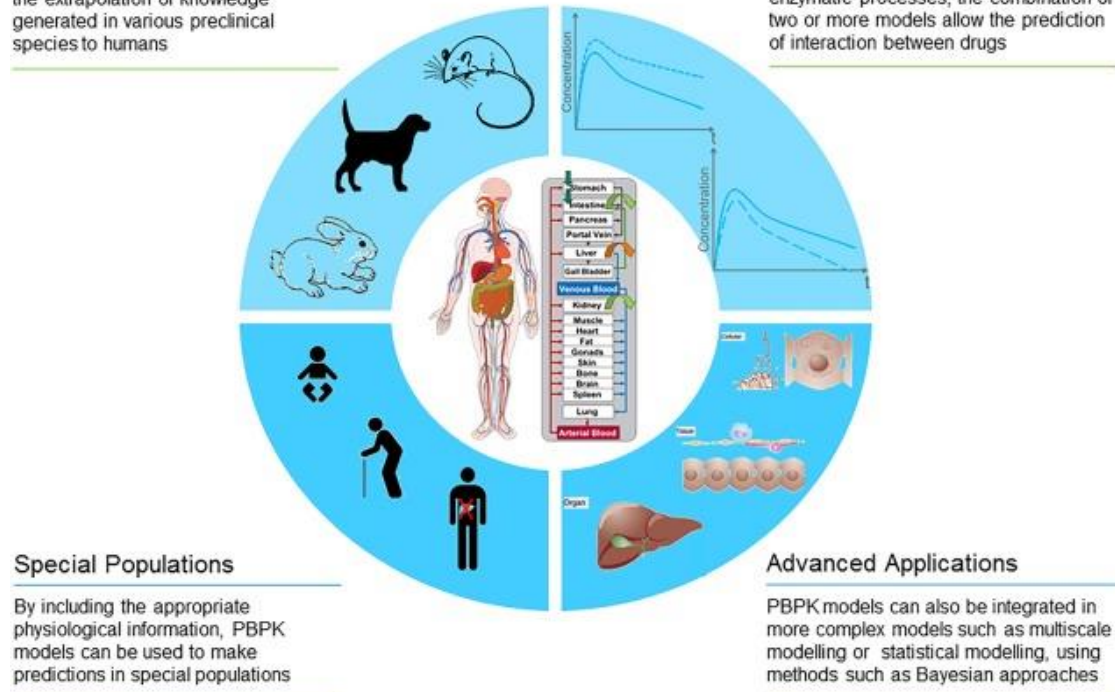
Figura 6 - Aplicações PBPK

Cross-Species Extrapolation

PBPK models can be used to facilitate the extrapolation of knowledge generated in various preclinical species to humans

Drug Drug Interactions (DDI)

Thanks of the explicit inclusion of enzymatic processes, the combination of two or more models allow the prediction of interaction between drugs

**Special Populations**

By including the appropriate physiological information, PBPK models can be used to make predictions in special populations

Advanced Applications

PBPK models can also be integrated in more complex models such as multiscale modelling or statistical modelling, using methods such as Bayesian approaches

Fonte: Kuepfer et al., 2016.

Exemplos dessas aplicações serão discutidas abaixo.

Em 2020, um estudo desenvolveu um modelo PBPK para simular a exposição do pulmão humano à ivermectina após doses orais de 12, 30 e 120 mg/Kg, como alternativa no tratamento da COVID-19. O modelo foi composto de um compartimento de absorção, compartimento pulmonar e os demais tecidos foram compilados em um único compartimento, todos interligados pela circulação sanguínea. Para validação deste modelo, foram utilizados dados da pesquisa de fase I para este tratamento. Apesar das limitações deste modelo, como a incapacidade de validar a exposição simulada de pulmão humano com quaisquer valores publicados, bem como não ser capaz de simular o acúmulo de fármaco no tecido após múltiplas dosagens, o modelo PBPK descreveu com precisão o perfil de concentração plasmática de ivermectina simulado em humanos. As exposições pulmonares de ivermectina simuladas atingiram uma concentração máxima de 772 ng/mL, muito menos do que o IC₅₀ estimado de 1750 ng/mL relatado para ivermectina contra SARS-CoV-2 in vitro. Estes

resultados corroboram estrategicamente para o direcionamento das pesquisas envolvendo a nova doença (Jermain et al., 2020).

Kovar e colaboradores (2020) desenvolveram um modelo PBPK para prever a farmacocinética da buprenorfina na população pediátrica e a interação fármaco-fármaco com claritomicina, itraconazol e rifampicina. O modelo foi desenvolvido no software PK-SIM®, para adultos e dimensionado para crianças e recém-nascidos prematuros, responsável pelas mudanças relacionadas à idade. Este estudo demonstrou a aplicabilidade de dimensionamento dos modelos de PBPK adultos para pediatria para a previsão de perfis de plasma individuais.

Sharma e colaboradores (2020) desenvolveram um modelo de PBPK de corpo inteiro pode prever as concentrações de flutamida (fármaco utilizado no tratamento do câncer de próstata) no plasma, fígado, rins e pulmão de humanos, além disso também foi aplicado para avaliação da eficácia e segurança da flutamida. O modelo de PBPK de rato foi extrapolado para humanos, onde a parametrização envolveu fisiologia específica para humanos, cinética metabólica derivada de estudos *in vitro* e o coeficiente de partição mesmo que o modelo de rato. O modelo foi harmonizado e integrando a diferentes conjuntos de dados *in vitro*, *in vivo* e fisiológicos, sendo possível simular diferentes cenários de exposição (diferentes órgãos). Os resultados deste estudo foram promissores para a aplicação da modelagem PBPK em avaliações de risco de flutamida em populações humanas no contexto da concentração de tecido alvo.

ARTIGO DE REVISÃO

Artepillin C As A Potential Antitumoral Biocompound: A Scoping Review

3 ARTIGO DE REVISÃO

O artigo de revisão, que na versão completa da dissertação compreende o intervalo de páginas entre 57 - 94, foram suprimidos por tratar-se de manuscrito submetido em periódico científico. O artigo de revisão descreve estudos in vivo e in vitro correlacionando a artepelinina C frente a diferentes atividades anticâncer durante o período de 1996 a 2021.

4 ESTUDOS PRELIMINARES DE FARMACOCINÉTICA DA ARTERPELINA

Conforme discutido anteriormente, estudos sobre as propriedades farmacocinéticas da arterpelina C são escassos na literatura, com apenas dois artigos publicados com modelos pré-clínicos de rato e camundongo. Considerando-se a importância de se conhecer os perfis de exposição alcançados por essa substância em distintas doses e vias de administração, um dos objetivos dessa dissertação foi realizar uma avaliação da farmacocinética a AC em ratos Wistar. Para o alcance desse objetivo, inicialmente um método bioanalítico capaz de quantificar os níveis plasmáticos de AC através de LC-MS/MS foi avaliado e com base nesse método, amostras de dois estudos pilotos distintos foram doseadas. Os resultados desses ensaios são mostrados nesse capítulo. Devido a suspensão das atividades presenciais em março de 2020, de acordo com as Portarias nº 2286 e 2291, ambas de 17 de março de 2020 como medida de prevenção e enfrentamento à pandemia causada pela COVID-19, novos experimentos não puderam ser realizados e uma abordagem do tipo botton up foi avaliada. Os resultados desses estudos são mostrados nesse capítulo.

4.1 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PRELIMINAR DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Os padrões de arterpelina C e bacarina foram gentilmente doados pela Equipe do Prof. Jairo K da USP Ribeirão Preto.

4.1.1 Solventes

A arterpelina C, fármaco em estudo, e a Bacarina (padrão interno) são extraídas da própolis verde pelo Laboratório de Farmacognosia da Universidade de São Paulo (SP, Brasil). A acetonitrila e metanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi obtida de um sistema Millipore Milli-Q®.

4.1.2 Instrumentação

Inicialmente foram testados a análise cromatográfica com detecção ultravioleta. O sistema HPLC consistia em um cromatógrafo líquido Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com um desgaseificador DGU-20A5, bombas

LC-6AD, amostrador automático SIL-10AD, forno de coluna CTO-20AC, detector SPD-20AV UV / VIS e CBM-20A módulo de comunicações. Os dados cromatográficos foram registrados e processados por LC Solution versão do software 1.24 SP2. A separação foi realizada com Coluna Phenomenex Gemini (3.0 μm , 50 mm \times 2 mm).

Diversas metodologias para extração de proteínas plasmáticas foram testadas para que se houvesse uma boa sensibilidade, porém, nenhum método testado foi adequado. Sendo assim, testou-se uma análise em cromatografia de massas e com um método simples de extração de proteínas do plasma foi possível se obter uma melhor sensibilidade.

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido (Agilent, Alemanha), acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (AB Sciex 5500 QTRAP, ABSciex, Canadá) – LC-MS/MS. As injeções foram realizadas por um injetor automático e as análises foram realizadas no software Analyst 1.6.2.

4.1.3 Preparo das Soluções Padrão no Plasma de Ratos para Avaliação Preliminar da Linearidade do Método Bioanalítico

Uma solução de acetonitrila de artepelina C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi preparada pela adição de 2,5 mg da substância em um frasco volumétrico de 2,5 mL. A partir dessa solução estoque, as diluições foram realizadas resultando em concentrações de 0,10–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dessas soluções, alíquotas de 10 μL foram retiradas e adicionadas a 90 μL de plasma de rato, obtendo-se as concentrações finais da curva padrão: 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000 e 50.000 ng/mL, para avaliação preliminar da linearidade do método.

As amostras da curva padrão foram homogeneizadas em um agitador vórtex por 30 segundos e devidamente processados conforme descrito no “processamento das amostras biológicas”. Para a solução do padrão interno, foi preparada uma solução estoque de bacarina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por diluição com acetonitrila em frasco volumétrico de 2,5 mL, da mesma forma de solução estoque de AC. A partir dessa solução estoque, diluições foram realizadas resultando na concentração de 20.000 ng/mL e 10 μL dessa solução foram retirados e adicionados a 90 μL de plasma de rato.

4.1.4 Processamento das Amostras Biológicas

Todas as amostras de plasma, incluindo curva padrão, controle de qualidade e amostras de experimentos farmacocinéticos pilotos, foram processadas da mesma maneira. Para as análises cromatográficas e produção de curvas padrão e controles de qualidade, 10 µL de padrão interno foram adicionados à solução padrão e submetidos à precipitação das proteínas pela adição de 200 µL de acetonitrila gelada, homogeneizando por 30 segundos em um misturador tipo vórtice. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos, 100 µL do sobrenadante foram retirados e adicionados a 900 µL de acetonitrila. Em seguida, homogeneizar por 30 segundos em um misturador vórtex e este utilizado para a avaliação por LC-MS/MS.

4.1.5 Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas utilizando sistema cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) composto de LC 1260 Infinity II (Agilent, Alemanha) e detector de massas API 5000 (Sciex, Canada). A aquisição dos dados e tratamento foi realizada empregando o Software Analyst 1.6.2 (Sciex, Canada).

O início do trabalho envolveu as otimizações do espectrômetro de massas dos parâmetros dependentes da fonte e dependente do composto. Os parâmetros dependentes do composto foram otimizados através de infusão direta na concentração individual de 200 ng/ml diluídos em uma solução água:acetonitrila (50:50, v/v), 0.1% ácido fórmico. A otimização dos parâmetros dependentes da fonte, realizada através de experimento de injeção em fluxo (FIA, Flow Injection Analysis).

Em seguida, realizados os testes para definição das condições cromatográficas e seleção da coluna. Uma coluna C18 Gemini 50x2.0 mm, partícula de 3 µm (Phenomenex, USA) acoplada a pré-coluna C18 5.0x3.0 mm, partícula de 5 µm (Phenomenex, USA). A fase móvel definida para os experimentos foi água (A) e acetonitrila (B) ambas contendo 0.1% de ácido fórmico a um fluxo de 0.5 mL/min e a coluna mantida a 40°C. A eluição dos compostos foi realizada através da utilização de gradiente iniciando com 95% de A reduzindo para 10% em 1 min, permanecendo até 3.5 min, retornando as condições iniciais em 4 min e mantido até 5 min. Dois minutos de equilíbrio foram aplicados anteriormente a cada injeção, sendo o tempo total de

análise de 7 min. O volume de injeção de 2 µL foi utilizado e a temperatura do autoinjeter mantida a 10°C.

Os parâmetros do espectrômetro de massas dependentes do composto, otimizados estão listados na tabela 1. A seleção das transições mais adequadas em termos de seletividade, serão avaliadas durante os procedimentos de validação do método bionalítico. As análises foram realizadas utilizando fonte de ionização electrospray negativo e a aquisição dos dados no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, Multiple Reaction Monitoring). Os valores otimizados dos parâmetros da fonte foram: Temperatura de dessolvatação de 600°C, gás de nebulização (GS1, Nebulizer Gas) 55 psi, secagem (GS2, Dryer Gas) 55 psi, gás de cortina (CUR, Curtain Gas) 30 psi, gás de colisão (CAD, Collision Gas) a 4 psi e voltagem do capilar -4.5 kV.

Tabela 2 - Parâmetros otimizados do Potencial do Orifício (DP, Declustering Potential), Energia de Colisão (CE, Collision Energy) e Potencial de Saída da Cella de Colisão (CXP, Collision Cell Exit Potential) para as transições monitoradas em modo MRM.

Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Dwell Time (ms)	ID	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
299,217	255,1	100	ART C 1	-145	-10	-26
299,217	199,8	100	ART C 2	-145	-10	-32
299,217	145	100	ART C 3	-145	-10	-42
363,099	187,1	100	BACCH 1	-145	-10	-26
363,099	149	100	BACCH 2	-145	-10	-30
363,099	170,8	100	BACCH 3	-145	-10	-38

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 ESTUDO PILOTO FARMACOCINÉTICO

O estudo foi realizado no laboratório do Centro de Medicamentos Bioanalíticos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (projeto nº 37453). Os ratos wistar machos (250-350 g) (n=2) utilizados neste breve estudo foram adquiridos do Laboratório de Reprodução e Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em condições controladas com ciclos diários de 12h de luz e 12h de escuridão, em sala climatizada com temperatura de 22 ± 1 °C, umidade relativa de aproximadamente 65% e água/ração ad libitum, no biotério da mesma universidade.

A artepelina C foi administrada como uma solução (pH = 8) contendo 5% de propilenoglicol e 2% de NaOH em solução salina. Uma dose de 10 mg/Kg foi administrada aos animais pela veia caudal. As amostras de plasma foram coletadas pela artéria carótida (com o intuito de verificar se o anestésico utilizado teria algum impacto na farmacocinética da substância, uma vez que para os futuros experimentos de microdiálise prostática seriam necessários anestésicar o animal) e veia caudal (para mimetizar a coleta das amostras daqueles animais que receberiam uma dose oral). Os animais foram anestesiados com carbamato de etila 1,25g/Kg, intraperitoneal. Amostras de sangue (aproximadamente 200 μ L) foram coletadas nos tempos: 0,08; 0,25; 0,50; 1; 2; 4; 6; 8; 10 e 12 horas após a administração, em tubos Eppendorf previamente heparinizados, e submetidas à centrifugação por 10 min a 12.000 rpm. O plasma foi separado, adicionado a tubo Eppendorf e congelado a -80° C até sua análise por LC-MS/MS. As amostras de plasma foram processadas conforme descrito acima.

Após a obtenção desses resultados, foi avaliado por análise não compartimental por meio do software Excel®. A área sob a curva ($ASC_{0-\infty}$) foi determinada usando a regra trapezoidal linear, a constante de taxa de eliminação (k_e) foi determinada pela inclinação do gráfico do logaritmo da concentração em relação ao tempo, o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foi calculada pela equação $0,693/k_e$ (considerando os tempos de 0,25 até 4h) e o clearance (CL) plasmático foi determinado através da razão da dose e $ASC_{0-\infty}$ (Shargel; Wu-Pong; Yu, 2012).

4.3 DESENVOLVIMENTO PBPK PARA ARTEPELINA C

4.3.1 Dados Bibliográficos

Os valores das concentrações plasmáticas totais foram extraídos do estudo de Paulino e colaboradores (2008), onde camundongos saudáveis receberam uma dose de 10 mg/Kg pela via oral.

4.3.2 Softwares

4.3.2.1 xyExtract Graph Digitizer

O software xyExtract Graph Digitizer versão 2.4 permite extrair pontos de dados de imagens gráficas e este foi utilizado para extração dos dados de Niraldo e colaboradores (2008). Estes dados foram exportados para uma planilha excel e posteriormente importados no PK-SIM®.

4.3.2.2 ADMET Predictor

O ADMET Predictor é um software de previsão de propriedades da ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) para espécie humana e ratos. Foi obtido uma licença gratuita durante 30 dias para obtenção de propriedades físico-químicas e biológicas da artepelina C.

4.3.2.3 PK-SIM® (Open Systems Pharmacology)

Para o desenvolvimento do modelo preliminar utilizou-se o software PK-SIM® versão 8.0. Esta ferramenta é gratuita e foi desenvolvida para a construção de modelos PBPK, podendo ser utilizado para modelagem e simulação de diferentes espécies como roedores, coelhos, cães e humanos. Este software caracteriza o organismo biológico em 18 diferentes compartimentos levando em consideração volume, peso e pH dos órgãos, bem como fluxo sanguíneo de entrada e saída dos mesmo para as diferentes espécies.

4.3.3 Modelo Biológico

O modelo foi construído utilizando os parâmetros de camundongos, já que os dados de literatura utilizados também são desta espécie. Os parâmetros anatômicos e fisiológicos, tais como: peso, volume, pH, fluxo sanguíneo de entrada e saída dos órgãos foram utilizados do default do próprio software PK-SIM®.

O software utilizado não apresenta valores de expressão gênica para a espécie requerida. Portanto, estes dados foram retirados da base de dados de humanos para a enzima CYP2C19 e CYP2C9.

4.3.4 Propriedades Físico-químicas e Biológicas da Artepelina C

As propriedades físico-químicas e biológicas utilizadas para construção do modelo PBPK preliminar serão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas e biológicas da Artepelina C

Variável	Valor
LogP	1,99
Fração Livre (fu)	3,93%
Peso molecular (g/mol)	300,40
pKa (ácido)	4,26
Solubilidade (mg/mL)	0,10
CL plasma (mL/min)	60*

Fonte: Elaborado pelo autor.

* O clearance (CL) plasmático foi calculado por meio da análise não compartimental a partir dos dados de Paulino e colaboradores (2008).

Os valores de K_m e V_{max} das enzimas CYP2C19 e CYP2C9 foram retirados do ADMET Predictor e estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Valore de K_m e V_{max} para artepelina C em CYP2C19 e CYP2C9

	K_m (μM)	V_{max} (nmol/mg proteína/min)
CYP2C19	50,91	28,19
CYP2C9	17,52	9,31

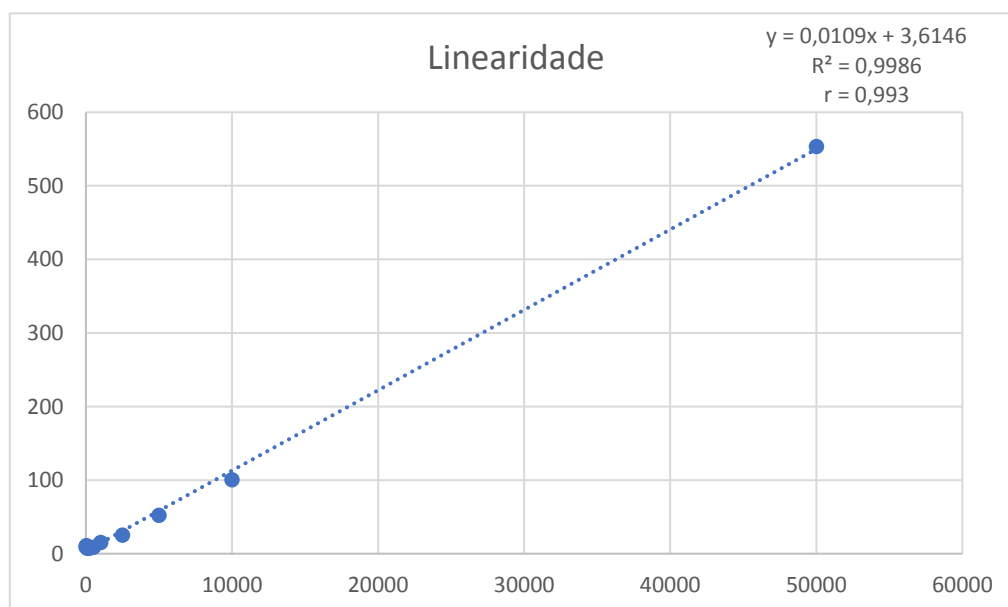
Fonte: Elaborado pelo autor.

5 RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA LINEARIDADE DO MÉTODO BIOANALÍTICO

Para a linearidade preliminar do método bioanalítico, foram considerados os parâmetros estabelecidos pelo FDA (2018). A linearidade do método em plasma de ratos foi avaliada nas concentrações de: 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000 e 50.000 ng/mL. O FDA preconiza que sejam realizados pelo menos 3 curvas de calibração para avaliação da linearidade, porém como ainda se estava testando, foram realizados apenas uma curva e assim que a mesma cumprisse todas as especificações, seriam realizadas as três curvas e avaliação dos demais parâmetros necessários para uma validação completa. A representação gráfica preliminar da linearidade pode ser visualizada na Figura 7.

Figura 7 - Linearidade preliminar



Fonte: Elaborado pelo autor.

A curva de calibração preliminar obtida apresentou-se linear na faixa de 10 a 50.000 ng/mL, evidenciando um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9986 e de correlação: $r = 0,993$.

Apesar dos coeficientes de determinação e correlação estarem ótimos, a legislação também preconiza uma variação de $\pm 15\%$ para todas as concentrações, exceto para o limite inferior de quantificação - LLQ (a concentração 10 ng/mL

representa o LLQ, neste estudo) que pode haver uma variação de $\pm 20\%$. Na Tabela 4, são demonstradas as variações obtidas para esta curva de calibração preliminar.

Tabela 5 - Percentual de variação

Concentração Teórica de AC (ng/mL)	% de Variação
10	+ 4974,55
25	+ 2413,73
50	+ 1094,50
100	+ 231,28
250	+ 36, 53
500	- 10,85
1.000	+ 3,20
2.500	- 20, 72
5.000	- 11,33
10.000	- 11,27
50.000	+ 0,87

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme demonstrado na tabela 4, as concentrações 10, 25, 50, 100, 250 e 2.500 ng/mL estão com uma variação muito além da preconizada, indicando uma possível necessidade de revisão do método de extração de proteínas, já que nas concentrações mais baixas foi onde se teve maior variação e possivelmente as proteínas presentes no plasma podem estar interferindo no método de quantificação e sensibilidade analítica.

5.2 ESTUDO PILOTO FARMACOCINÉTICO

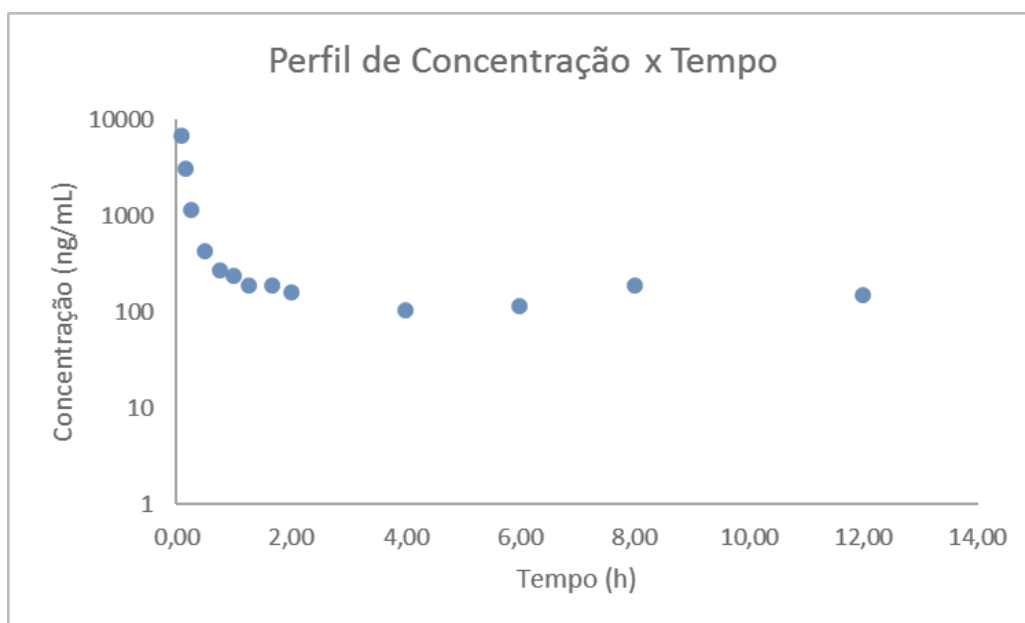
Com o intuito de verificar se seria necessário concentrações tão baixas para a validação bioanalítica, foi realizado um estudo piloto com os animais para se ter uma ideia das possíveis concentrações que seriam encontrados, obviamente pelo fato de

o método não estar validado, os dados não são confiáveis, mas traria uma ideia das concentrações a serem trabalhadas na validação do método bioanalítico.

Conforme mencionado anteriormente, o objetivo inicial desta pesquisa era avaliar as concentrações da artemelina C no plasma e no tecido prostático, através da microdiálise, desta forma, no estudo piloto foram coletadas as amostras de plasma da artéria carótida e da veia caudal. No animal anestesiado, a coleta foi realizada na carótida, já que de acordo com o objetivo, estes animais estariam com uma sonda de microdiálise fixada na próstata, inviabilizando que os mesmos estivessem acordados. E no animal acordado, a coleta foi realizada na cauda. Além disso, com esta abordagem seria possível verificar se haveria alguma interferência do anestésico nos parâmetros farmacocinéticos.

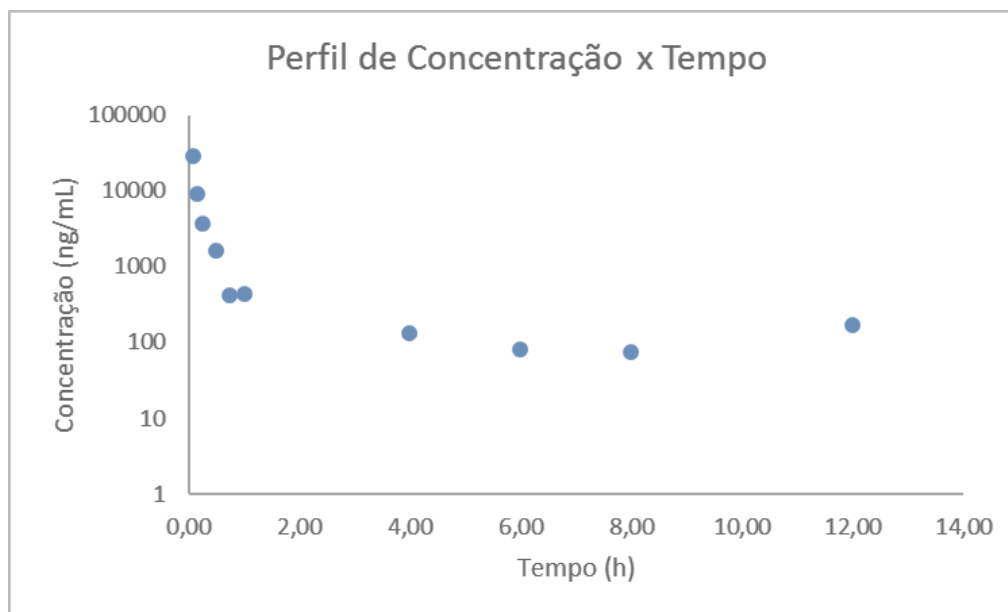
Abaixo é demonstrado o perfil de concentração por tempo obtido para os animais, na Figura 8 é representado ao animal anestesiado, onde a coleta das amostras plasmáticas foi realizada na carótida e na Figura 9 é representado o perfil do animal acordado, que não recebeu anestesia, onde a coleta foi realizada na cauda do mesmo.

Figura 8 - Perfil de Concentração por tempo animal anestesiado (coleta na carótida)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Perfil de Concentração por tempo animal acordado (coleta na cauda)



Fonte: Elaborado pelo autor.

No animal que não foi anestesiado (Figura 9), observam-se concentrações maiores em relação ao animal anestesiado (Figura 8), indicando que o anestésico interfere na cinética da artepelina C. Com este estudo farmacocinético piloto, também verificou-se que as concentrações para a faixa de validação devem ser maiores que as sugeridas inicialmente.

Os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) obtidos neste piloto são descritos na Tabela 5.

Tabela 6 – $t_{1/2}$ estudo farmacocinético piloto

Animal	$t_{1/2}$ (h)
Anestesiado (Fig. 8)	0,32
Acordado (Fig. 9)	1,24

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os animais anestesiados apresentaram um $t_{1/2}$ inferior, quando comparado ao animal acordado. Considerando que a Artepelina C é metabolizada pela CYP2E1, conforme demonstrado no estudo de Carrão e Colaboradores (2017) e o anestésico uretano também é metabolizado por esta enzima hepática, uma possível indução de

metabolismo pode estar ocorrendo, reduzindo o tempo de meia vida do fármaco quando administrado em animais que receberam o anestésico (Hoffler; El-Masri; Ghanayem, 2003).

5.3 DESENVOLVIMENTO PBPK PARA ARTEPELINA C

Os parâmetros farmacocinéticos calculados para o estudo de Paulino e colaboradores (2008) e obtidos no modelo preliminar desenvolvido são mostrados na Tabela 7.

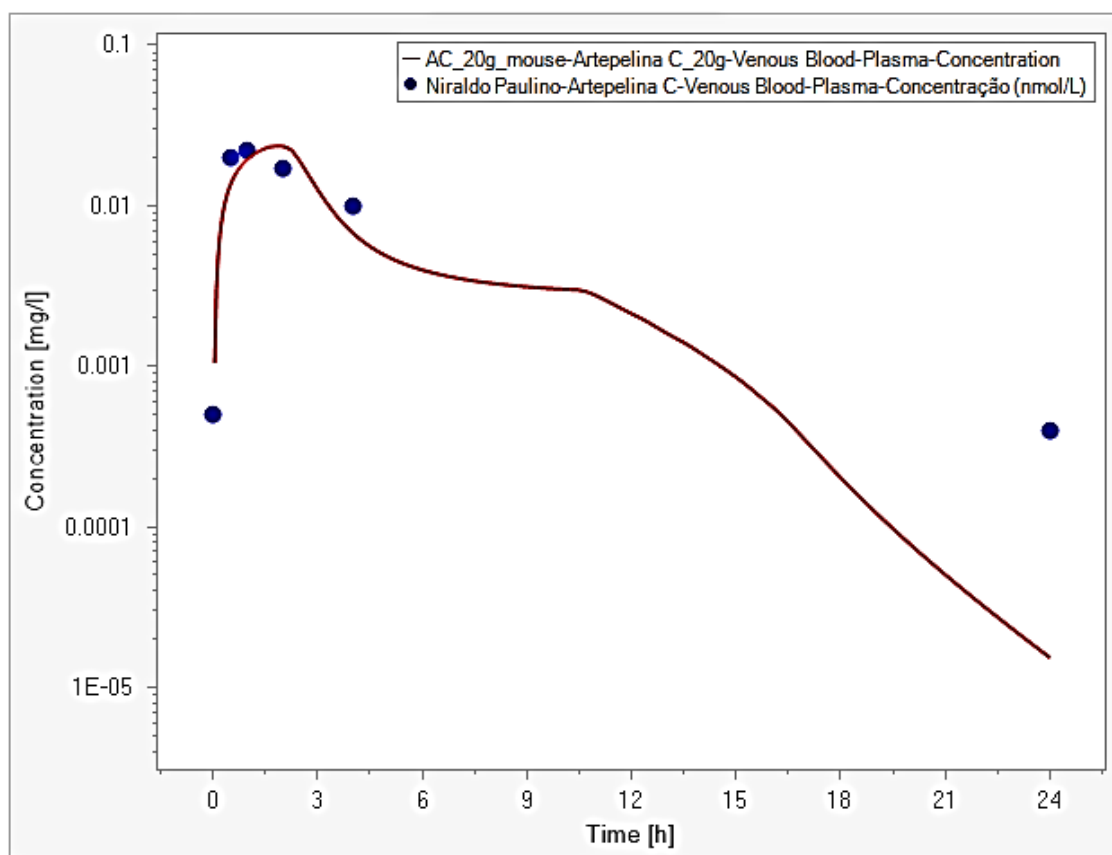
Tabela 7 - Parâmetros farmacocinéticos

Parâmetros PK	Paulino e colaboradores (2008)	PK-SIM®
dose (mg/Kg)	10	10
ASC_{0-0.5}	0,000005125	-
ASC_{0.5-1}	0,0000105	-
ASC₁₋₂	0,0000195	-
ASC₂₋₄	0,000027	-
ASC₄₋₂₄	0,000104	-
ASC_{0-t} (mg*h/Kg)	0,000166125	5,84
ASC_{extrap} (mg*h/Kg)	2,40	9,74
ASC_{0-∞} (mg*h/Kg)	0,000168526	5,8
Percentual ASC_{extrap} (%)	1,42	0,04
Ke (h⁻¹)	0,16	-
t_{1/2} (h)	4,16	1,83
CL (L/h)	59337,96501	-
C_{máx} (mg/h)	0,000022	0,02
t_{máx} (h)	1	2

Fonte: Elaborado pelo autor.

O perfil de concentração por tempo simulado pode ser visto na Figura 10. Os pontos em azul representam dos dados de Paulino e colaboradores (2008) e a linha em vermelha o perfil simulado.

Figura 10 - Simulação do perfil de concentração por tempo da artepelina C



Fonte: Obtido do software PK-SIM®.

Conforme demonstrado na tabela 6, existem grandes diferenças nos parâmetros farmacocinéticos observados e simulados, indicando a não adequação do modelo desenvolvido. Isso pode ser associado a escassez de dados de farmacocinética disponíveis na literatura, pois mesmo para a construção de um modelo bottom-up, há uma necessidade de dados de farmacocinética bem característicos para a validação do modelo, o que no caso da artepelina C não é uma realidade. Além disso todas as informações biológicas para construção do modelo, foram obtidas a partir do software ADMET Predictor, o qual fornece informações apenas para ratos e humanos, quando o modelo farmacocinético foi construído para camundongos, dado que os dados observados de Paulino e colaboradores (2008) eram provenientes desse modelo animal.

Apesar de todos os dados terem sido obtidos de apenas um software, encontram-se divergências de valores nos mesmos parâmetros quando comparados a alguns dados de literatura ou até mesmo outros softwares, e o ideal seria obter experimentalmente estes dados.

De acordo com o perfil simulado, podemos observar que no tempo de aproximadamente 11h, ocorre uma recirculação hepática (um pequeno aumento de concentração) e o mesmo foi verificado no estudo piloto realizado no laboratório. O mesmo não pode ser visualizado no estudo de Paulino e colaboradores (2008) pois os dados gráficos não informam as concentrações na faixa de tempo de 7 a 23h. Esta hipótese precisa ser confirmada e validada em laboratório, uma vez que na literatura não se tem estudos farmacocinéticos da artepelina C, dificultando também a construção de um modelo PBPK pela falta de dados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A artepelina C apresenta diversas propriedades biológicas estudadas *in vitro*, um estudo farmacocinético completo desta substância seria essencial e importante para elucidar questões do comportamento do fármaco no organismo, auxiliando nos estudos pré-clínicos e clínicos de eficácia e toxicidade. Além disso, estudos farmacocinéticos são de extrema importância quando se pensa em desenvolvimento de novos fármacos, direcionando um regime de dosagem eficaz e segurança na utilização do mesmo. A AC é um produto natural obtido da própolis verde brasileira, com sua farmacocinética elucidada, agregaria um maior valor econômico a esta substância.

A validação de método bioanalítico, garante que o método de análise é confiável, por isso antes mesmo de um estudo farmacocinético é de suma importância o método já estar validado.

Na literatura não se tem muitas informações sobre a AC, sendo assim o estudo de revisão foi importante para reunir as principais informações relacionadas a ela e a sua atividade anticancerígena avaliada *in vitro* e *in vivo*.

Apesar da modelagem e simulação ser uma ferramenta inovadora no desenvolvimento de novos fármacos, quando se tem poucas informações da substância em estudo, acaba-se tendo uma limitação no desenvolvimento de um modelo PBPK, uma vez que poucas informações físico-químicas e biológicas estão disponíveis. Uma ótima alternativa é poder obter estes dados experimentalmente, facilitando o desenvolvimento e a variabilidade de um modelo, já que as informações seriam obtidas de uma única fonte. Com todas as informações necessárias para construção de um modelo PBPK, se tem uma estratégia facilitadora para prever a farmacocinética da droga em estudo reduzindo tempo experimental e consequentemente redução de custos com reagentes, materiais de laboratório e tempo de pesquisa.

A artepelina C é uma substância conhecida a muito tempo e sua utilização, segurança, eficácia e toxicidade deve ser explorada, uma vez que diversos estudos mostram uma associação benéfica a saúde quanto ao seu uso.

5.1 PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho, pretende-se validar o método bioanalítico, aumentando as concentrações da faixa de linearidade, conforme demonstrado a necessidade no estudo piloto. Posteriormente seguir para o estudo farmacocinético e avaliação da concentração da artemelina C no tecido prostático, por meio da técnica de microdiálise. Dependendo das concentrações encontradas, um modelo animal de câncer de próstata poderia ser induzido para verificar se a artemelina C é capaz de prevenir ou curar um câncer prostático em modelo animal.

REFERÊNCIAS

- AARONS L. Physiologically based pharmacokinetic modeling: a sound mechanistic basis is needed. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 60, n. 6, p. 581-583, 2005.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, Brasília, 2011.
- ALHASSAN et al. Prenylation of aromatic secondary metabolites: a new frontier for development of novel drugs. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Nigeria, v. 13, n. 2, p. 307-314, 2014.
- ANDERSEN et al. A Historical Perspective of the Development and Application of PBPK Models. Hoboken: John Wiley & Sons; 2005. p. 1-18.
- ARAUJO et al. Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida sp.* infected Wistar rats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Porto Alegre, v. 33, n.2, p. 154–159, 2009.
- ARAUJO et al. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Porto Alegre, v. 4, n. 5, p. 876-881, 2008.
- BANKOVA et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Z Naturforsch C**, v. 51, n. 5-6, p. 277-80, 1996.
- BANKOVA et al. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. **Phytomedicine**, Bulgária, v. 21, n. 11, p. 1432-1438, 2014.
- BANKOVA et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. **Z Naturforsch C**, v. 54, n. 5-6, p. 401-405, 1999.
- BASTOS, Jairo Kenupp; AMBRÓSIO, Sérgio Ricardo. Projeto temático: Realização de estudos químicos, analíticos, biológicos, farmacológicos e tecnológicos para preenchimento das lacunas no desenvolvimento do setor brasileiro de própolis. Fundação de amparo a pesquisa do Estado de São Paulo, 2017.
- BRUNNER, M.; DERENDORF, H. Clinical microdialysis: current applications and potential use in drug development. **Trends in Analytical Chemistry**, Áustria, v. 25, n. 7, p. 674-680, 2006.
- BUNGAY et al. Probe Calibration in Transient Microdialysis *in Vivo*. **Pharmaceutical Research**, Bethesda, v. 18, n. 3, 2001.
- BURDOCK GA. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem Toxicol**, Flórida, v.36, p. 347–363. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9651052/>>. Acesso em: 31 mar. 2020.

CAMURI et al. Optical absorption and fluorescence spectroscopy studies of Artepillin C, the major component of green propolis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Ribeirão Preto, v. 98, n. p. 71-77, 2018.

CARRÃO et al. *In Vitro* Metabolism of Artepillin C by Rat and Human Liver Microsomes. **Planta Medica**, v. 83, n. 08, p. 737-745, 2017.

CARRÃO, Daniel Blascke. **Estudo de metabolismo *in vitro* do componente majoritário da própolis verde brasileira, Artepin C, empregando microsossomas hepáticos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2015.

CHAURASIA, C. S. et al. Microdialysis principles, application and regulatory perspectives. **The AAPS Journal**, Rockville, v. 9, n. 5, p. 48-59, 2007.

CHOI et al. Artepillin C, as a PPAR γ ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 7, p. 925-933, 2011.

CLINICAL LABORATORY STANDARTIZATION INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteéria that grow aerobically**. Approved standard – Ninth Edition, Pennsylvania, USA, v. 32, n. 2, 2012. ISSN: 2162-2914.

COSTA et al. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 226, n. 15, p. 82-89, 2018.

CRAIG, William A. Does the dose matter?. **Clinical Infectious Diseases**, Madison, v. 33, n. 3, p. 233-237, 2001.

DE LUCA et al., 2012. Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making. **Science**, v. 336, p. 1658-1661, 2012.

DE MENDONÇA et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 357, 2015.

ELMQUIST, W. F.; SAWCHUK, R. J. Use of microdialysis in drug delivery studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Omaha, v. 45, n. 2-3, p. 123-308, 2000.

ENDO et al. Synthesis of non-prenyl analogues of baccharin as selective and potent inhibitors for aldo-keto reductase 1C3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 19, p. 5220-5233, 2014.

FASOLO et al. Determination of benzophenones in lipophilic extract of Brazilian red propolis, nanotechnology-based product and porcine skin and mucosa. **Analytical and bioanalytical assays, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 57-66, 2016.

FIGUEIREDO-RINHEL et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 655-664, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry - Bioanalytical method validation. New Hampshire, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Physiologically Based pharmacokinetic Analyses - Format and Content, Guidance for Industry. 2018.

FREIRES, I. A.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 267-279, 2016.

FREITAS et al. Biological Activities of Red Propolis: A Review. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, Minas Gerais, n. 11, v. 1, p. 3-12, 2017.

FUNARI, Cristiano S.; FERRO, Vicente O. Análise própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GALLO-NETO, M. Modelagem Farmacocinética e Análises de Sistema Lineares para a Predição de Concentração de Medicamentos no Corpo Humano. p. 111, 2012.

GUILLON et al. Insights on animal models to investigate inhalation therapy: Relevance for biotherapeutics. **International Journal of Pharmaceutics**, Tours, v. 536, n. 1, p. 116-126, 2018.

HELFENBERG K.D. The analysis of bees wax and propolis. **Chemiker Zeitungum**, n. 31, p. 987-988, 1908.

HINDMARSH et al. Open Systems Pharmacology Suite Manual. Lawrence Livermore National Security, 2018.

HOFFLER, Undi.; EL-MASRI, Hisham A.; GHANAYEM, Buhran. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) Is the Principal Enzyme Responsible for Urethane Metabolism: Comparative Studies Using CYP2E1-Null and Wild-Type Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 2, p. 557-564, 2003.

HORI et al. The Inhibition of Inflammasome by Brazilian Propolis (EPPAF). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

HUANG et al. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v.19, n. 12, p. 19610-19632, 2014.

IPCS. International Programme on Chemical Safety (IPCS). Characterization and application of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment. 2007. Disponível em: <https://www.who.int/ipcs/methods/harmonization/areas/pbpc_models.pdf?ua=1>. Acesso em: 10 mar. 2021.

JERMAIN et al. Development of a Minimal Physiologically-Based Pharmacokinetic Model to Simulate Lung Exposure in Humans Following Oral Administration of Ivermectin for COVID-19 Drug Repurposing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 109, v. 12, p. 3574-3578, 2020.

KHALIL, Mahmoud Lotfy. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Egito, v. 7, n. 1, p. 22–31, 2006.

KONISHI et al. Absorption and Bioavailability of Artepillin C in Rats after Oral Administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 9928-9933, 2005.

KHOT et al. Development of a Translational Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Antibody-Drug Conjugates: a Case Study with T-DM1. **The AAPS Journal**, v. 19, n. 6, p. 1715-1734, 2017.

KOVAR et al. Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling of Buprenorphine in Adults, Children and Preterm Neonates. **Pharmaceutics**, n.12 v. 6, 2020.

KUEPFER et al. Applied Concepts in PBPK Modeling: How to Build a PBPK/PD Model. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 5, n. 10, p. 516-531, 2016.

KUJUMGIEV et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographical origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

LEAHY, D. Progress in Simulation Modelling for Pharmacokinetics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 1257–1268, 2005.

LINDBERGER, M.; TOMSON, T.; STAHL, L. Microdialysis Sampling of Carbamazepine, Phenytoin and Phenobarbital in Subcutaneous Extracellular Fluid and Subdural Cerebrospinal Fluid in Humans: An in vitro and in vivo Study of Adsorption to the Sampling Device. **Pharmacology & Toxicology**, Suécia, v. 91, n. 4, p. 158-165, 2002.

LULIU P. Patente n. RO 48101, 1965.

MACHADO et al. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012.

MARCUCCI et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.

MARÓSTICA JUNIOR et al. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 178-181, 2008.

MARQUELE et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of**

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, São Paulo, v. 39, n. 3-4, p. 455–462, 2005.

MASSARO et al. Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera ligustica*) propolis from subtropical eastern Australia. **Naturwissenschaften**, v. 102, n. 68, 2015.

MISHIMA et al. Two related cinnamic Acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma S-180 in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n.6, p.1025-1030, 2005.

MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development. **CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 1–14, 2012.

MOUTON, Johan W. et al. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, United Kingdom, v.55, n. 5, p. 601-607, 2005.

NAKANISHI et al. Efficient Radical Scavenging Ability of Artepillin C, a Major Component of Brazilian Propolis, and the Mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Japão, n, 1, v. 9, p. 1452-1454, 2003.

NASCIMENTO et al. Methodologies for the evaluation of the antibacterial activity of propolis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 20, p. 2344-2350, 2013.

NESTOROV, I. Whole-body physiologically based pharmacokinetic models. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 3, n. 2, p. 235–249, 2007.

NIRALDO et al. Anti-Inflammatory Effects of a Bioavailable Compound, Artepillin C, in Brazilian Propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 3, p. 296–301, 2008.

NISHIKAWA et al. Artepillin C, a Typical Brazilian Propolis-Derived Component, Induces Brown-Like Adipocyte Formation in C3H10T1/2 Cells, Primary Inguinal White Adipose Tissue-Derived Adipocytes, and Mice. **PLoS One**, v. 11, n. 9, 2016.

NUNES et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

OLIVEIRA, Lucas Pires Garcia. **Possível ação citotóxica e imunomoduladora da geoprópolis associada à doxorubicina sobre monócitos humanos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia geral e aplicada) - Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biomoléculas - Estrutura e Função, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu. 2018.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *The World Traditional Medicines Situation 2011, Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges*.

ORSATTI et al. Propolis immunomodulatory action *in vivo* on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice.

Phytotherapy Research, v. 24, n. 8, p. 1141-1146, 2010.

ORSOLIĆ et al. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 307-315, 2004.

OWEN, J. S.; FIEDLER-KELLY, J. Introduction to Population Pharmacokinetics/pharmacodynamic Analysis with Nonlinear Mixed Effects Models. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 1 ed. 2014.

PALMA, Eduardo Celia. **Modelagem farmacocinética populacional para avaliação da dose profilática de cefazolina em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica e em ratos com obesidade induzida**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2018.

PARK Y. K.; ALENCAR S. M.; AGUIAR C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, São Paulo, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PAULINO et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008.

PAZIN et al. Interaction of Artepillin C with model membranes. **European Biophysical Societies**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 383-393, 2017.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, n. 25, v. 2, p. 321-326, 2002.

PLOCK, N; KLOFT, C. Microdialysis--theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Alemanha, v. 25, n. 1, p. 1-24, 2005.

REDDY et al. **Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling: A Tool for Understanding ADMET Properties and Extrapolating to Human**. BoD - Books on Demand: EUA, 2013. E-book. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/new-insights-into-toxicity-and-drug-testing/physiologically-based-pharmacokinetic-modeling-a-tool-for-understanding-admet-properties-and-extrapo>>. Acesso em: 10 mar. 2021.

RIGHI et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363-2370. 2011.

ROCHA et al. Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy and Safety Characterization. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, São Paulo, v. 2013, n. 4, 2013.

ROSENBLOOM, A.; SIPE, D.; WEEDN, V. Microdialysis of Proteins: Performance of the CMA/20 Probe. **Journal of Neuroscience Methods**, Pittsburgho, v. 148, n. 2, p. 147-153, 2005.

ROWLAND, M., PECK, C., TUCKER, G. Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, p. 45-73, 2011.

SALATINO et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n.1, p. 33–38, 2005.

SALATINO et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, São Paulo, n. 5, p. 928-925, 2011.

SANTOS et al. Propolis: Types, Composition, Biological Activities, and Veterinary Product Patent Prospecting. **Journal of the science of Food and Agriculture**, Salvador, v. 100, n. 4, p. 1369-1382, 2020.

SAWAYA et al. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Journal Chemistry Central**, São Paulo, v. 5, n. 27, p. 2-10, 2011.

SAWAYA et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of Propolis. **Analyst**, v. 129, n. 8, p. 739-744, 2004.

SCHUK, V; RINAS, I; DERENDORF, H. *In vitro* microdialysis sampling of docetaxel. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Flórida, v. 36, n. 4, p. 807-813, 2004.

SHARGEL, L., WU-PONG, S., YU, A. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. 6 ed, 2012.

SHARMA et al. Development and evaluation of a harmonized whole body physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for flutamide in rats and its extrapolation to humans. **Environmental Research**, v. 182, 2020.

SHIMIZU et al. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Japão, v. 424, n. 2, p. 181-188, 2004.

SHIN, H. K.; KANG, Y. M.; TAI NO, K. Predicting ADME Properties of Chemicals. Handbook of Computational Chemistry, Springer Science+Business Media Dordrecht, Coreia, 2016.

SILVA et al. Propolis reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. **Parasitology Research**, Londrina, v. 115, n. 4, p. 1557-1566, 2016.

SOUSA et al., 2007. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, São Paulo, v. 30, n. 16, p. 2656-2665, 2007.

SOUZA et al. 2018. Artepillin C Induces Selective Oxidative Stress and Inhibits Migration and Invasion in a Comprehensive Panel of Human Cervical Cancer Cell Lines. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents)**, v. 18, n. 12, p. 1750-1760, 2018.

SZLISZKA et al. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, Athenas, v. 41, n. 3, p. 818-828, 2012.

SZLISZKA et al. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 38, n. 4, p. 941-953, 2011.

TASSO, Leandro. **Modelagem farmacocinética**- farmacodinâmica das fluorquinolonas levofloxacino e gatifloxacino. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2008. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/13727/000652984.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

THIEL et al. A systematic evaluation of the use of physiologically based pharmacokinetic modeling for cross-species extrapolation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, p. 191–206, 2015.

TORETI et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Campinas, v. 2013, n. 697390, 2013.

TRAUNMÜLLER et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the determination of caspofungin with amperometric detection and its application to in vitro microdialysis experiments. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Austria, v. 843, n. 2, p. 142-146, 2006.

URSO, R.; BLARDI, P.; GIORGI, G. A short introduction to pharmacokinetics. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Itália, n. 6, p. 33-44, 2002.

URUSHISAKI et al. Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in Brazilian green propolis water extract. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

ZHAO et al. Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.13, n. 5, p. 498, 2016.

ZHUANG, L. et al. Theory and Application of Microdialysis in Pharmacokinetic Studies. **Current Drug Metabolism**, China, v. 16, n. 10, p. 919-931, 2015.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37453

Título: PERFIL FARMACOCINÉTICO DE COMPOSTO ISOLADO DA PRÓPOLIS E POSSÍVEL CANDIDATO A FÁRMACO: ARTEPELINA C

Vigência: 01/07/2019 à 30/06/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - coordenador desde 01/07/2019
Schaiane Ferri - Aluno de Mestrado desde 01/07/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 19/08/2019 - Auditório Plenarinho - Andar térreo do Prédio da Reitoria- Bairro Farroupilha - Campus Farroupilha- Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 16 ratos Wistar machos com 7 semanas de vida provenientes de CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 30 de Agosto de 2018.

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS APÓS ADENDO



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

CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO

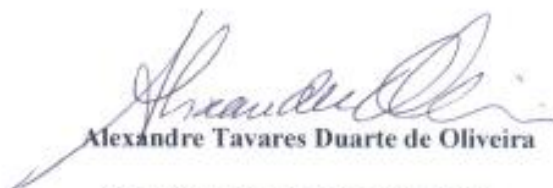
Número: 37453

Título: PERFIL FARMACOCINETICO DE COMPOSTO ISOLADO DA PROPOLIS E POSSIVEL CANDIDATO A FARMACO: ARTEPELINA C

Pesquisador Responsável: BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Adendo ao mesmo, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 60 ratos wistar, machos adultos; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa. **Este documento revoga a Carta de Aprovação emitida anteriormente.**

Porto Alegre, 10 de fevereiro de 2019.


Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Coordenador da CEUA/UFRGS