



UFRJ

Universidade Federal do Rio de Janeiro- Campus Macaé
Curso de Farmácia



Identificação dos possíveis metabólitos da aminochalcona antimicobacteriana LC04 por LC-MS a partir da biotransformação por microssomas hepáticos de rato.

BIANCA SANTOS DO NASCIMENTO

MACAÉ
Julho de 2021

Identificação dos possíveis metabólitos da aminochalcona antimicobacteriana LC04 por LC-MS a partir da biotransformação por microssomas hepáticos de rato.

BIANCA SANTOS DO NASCIMENTO

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Barth

MACAÉ
Julho de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

N244i Nascimento, Bianca Santos do
Identificação dos possíveis metabólitos da
aminochalcona antimicobacteriana LC04 por LC-MS a
partir da biotransformação por microssomas hepáticos
de rato. / Bianca Santos do Nascimento. -- Rio de
Janeiro, 2021.
79 f.

Orientador: Thiago Barth.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em
Farmácia, 2021.

1. chalconas. 2. biotransformação in vitro. I.
Barth, Thiago , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu quero agradecer ao grande amor da minha vida, Deus, sem ele nada da minha vida seria realizado, muito menos esse projeto, muito obrigada por em tudo pensar em mim, até mesmo quando eu não fui capaz de perceber.

Aos meus pais, Gilson e Denildes, por todo o apoio, seja ele pessoal, financeiro e psicológico, sem vocês nada poderia sequer ter começado, nunca poderei ser capaz de retribuir ou até mesmo agradecer o suficiente. Igualmente, ao meu irmão, Junior, por ter me ajudado altas horas da noite com questões como o PC e impressão. Eu realmente sou muito grata à essa minha família, por tudo que abdicaram e abdicam para que eu possa me tornar uma pessoa melhor e realizar os meus sonhos.

Ao meu orientador, Thiago Barth, por todos esses anos me ajudando a alcançar meus sonhos, com todo o respeito e uma humildade invejável, compartilhando do tempo e conhecimentos que tornam não só esse projeto possível, mas me torna uma melhor profissional e pessoa.

A professora Michelle Muzitano, por ter cedido gentilmente a chalcona LC04.

Aos técnicos e colegas de laboratório, muito obrigada por serem sempre solícitos e apoiarem a todos os alunos que passam pelo IMMT, em especial ao Marcos e a Arielly por todo o suporte nos experimentos e palavras de ânimo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) por terem financiado meu projeto.

Aos meus amigos, Juliana, Carol, Mara e Daiana, eu sou muito grata por tê-los me ajudando nesses 5 anos a não desistir ou mesmo terem ouvido minhas reclamações nas madrugadas. Também agradeço a Gabi, Amanda e Marlon por terem me ajudado não só no processo do projeto, mas por todo o suporte emocional.

A todas as pessoas que lutam todos os dias para que a ciência tenha voz e cresça no Brasil com a importância que lhe é devida, em especial a UFRJ, que orgulha a todo o Brasil nessa luta apesar de todas as adversidades que teve desde a sua criação.

A todos que mesmo sem serem citados nominalmente, me ajudaram a tornar tudo isso possível.

Por fim, mas não redundantemente, a Deus novamente, por todos citados e não citados, pela minha vida e por existir. Sua palavra diz que tudo começa em ti e tudo termina em ti, e assim seja.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação de países prioritários para o período de 2016 a 2020.....	15
Figura 2: Visão global do progresso de alvos de tuberculose no mundo.....	16
Figura 3: Coeficiente de incidência de casos de Tuberculose no Brasil por estado.....	17
Figura 4: Representação da transmissão da tuberculose.....	18
Figura 5: Núcleo fundamental das chalconas.....	23
Figura 6: Fases da descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	29
Figura 7: Sistema mono-oxigenase P-450.....	35
Figura 8: Esquema de preparação de modelos de cultura in vitro hepático.....	37
Figura 9: Esquema de equipamento básico do CLAE.....	38
Figura 10: Tipos de analisadores utilizados na técnica de CLAE-EM.	39
Figura 11: Cromatogramas representativos da análise de chalcona LC 04 em diferentes proporções da fase móvel (acetonitrila: água ultrapura).....	47
Figura 12: Cromatogramas representativos da análise de chalcona LC 04 em diferentes proporções da fase móvel (metanol: água ultrapura)	48
Figura 13: Influência do percentual de metanol sobre o parâmetro cromatográfico da eficiência medida em pratos teóricos (n=3).....	49
Figura 14: Influência do percentual de metanol sobre o parâmetro cromatográfico fator de assimetria (n=3).....	50
Figura 15: Influência do percentual de metanol sobre o parâmetro cromatográfico da resolução (n=3).....	52
Figura 16: Influência do percentual de metanol sobre o parâmetro cromatográfico de tempo de retenção (n=3).....	52

Figura 17: Otimização do parâmetro de extração líquido-líquido da seleção do solvente extrator da chalcona LC 04 a partir de meio de incubação microsomal ($n= 5$).....	54
Figura 18: Cromatograma representativo da análise da solução de chalcona LC 04 na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$	54
Figura 19: Otimização do parâmetro de extração líquido-líquido da razão volumétrica entre a fase aquosa e orgânica da chalcona LC 04 a partir de meio de incubação microsomal ($n= 5$)...	55
Figura 20: Otimização do parâmetro de extração líquido-líquido tempo de agitação para extração da chalcona LC 04 a partir de meio de incubação microsomal ($n= 5$).....	56
Figura 21: Cromatograma representativo das amostras submetidas à biotransformação <i>in vitro</i> . Em 428 nm.....	58
Figura 22: Cromatograma representativo das amostras submetidas à biotransformação <i>in vitro</i> . Em 254 nm.....	59
Figura 23: Espectro de absorção no ultravioleta da chalcona LC 04 (A) e de seus prováveis metabólitos (B, C, D, E, F e G).....	60
Figura 24: Estrutura básica de chalconas e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.....	61
Figura 25: Cromatograma representativo do metabolismo da chalcona LC04 em microsomas hepáticos de ratos.	63
Figura 26: Espectro de massas da chalcona LC04.....	64
Figura 27: Proposta de fragmentação da chalcona LC04, por ESI +.....	64
Figura 28: Espectro de massas de M1.....	65
Figura 29: Proposta de fragmentação do metabólito M1, por ESI +.....	66
Figura 30: Espectro de massas de M2.	67
Figura 31: Estrutura química proposta para o metabólito M2 a partir da análise por LC-MS após biotransformação por microsomas hepáticos de rato.....	68

Figura 32: Espectro de massas de M3.....	68
Figura 33: Estrutura química proposta para o metabólito M3 a partir da análise por LC-MS após biotransformação por microsomas hepáticos de rato.....	69
Figura 34: Espectro de massas de M4.....	70
Figura 35: Estrutura química proposta para o metabólito M4 a partir da análise por LC-MS após biotransformação por microsomas hepáticos de rato.....	70
Figura 36: Espectro de massas de M5.....	71
Figura 37: Estrutura química proposta para o metabólito M5 a partir da análise por LC-MS após biotransformação por microsomas hepáticos de rato.....	71
Figura 38: Estrutura química da chalcona LC04 e seus possíveis metabólitos (M1-M5).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições cromatográficas otimizadas.	53
Tabela 2: Condições otimizadas para o procedimento de extração líquido-líquido.....	56
Tabela 3: Porcentagem relativa de formação dos prováveis metabólitos da chalcona LC 04....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Lista de fármacos de primeira escolha no tratamento da tuberculose.....	21
Quadro 2: Lista de fármacos de segunda escolha no tratamento da tuberculose.....	22
Quadro 3: Lista de derivados de chalconas com ação antimicobacteriana.....	25
Quadro 4: Exemplos de reações de metabolização de Fase I.....	31
Quadro 5: Exemplos de reações de metabolização de Fase II.....	33

LISTA DE ABREVIÇÕES

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
a.C.	Antes de Cristo
CAN	Acetonitrila
ADMET	Absorção-Distribuição-Metabolização-Eliminação-Toxicidade
antiTB	Anti tuberculose
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CG	Cromatografia gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CYP	Citocromo
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
DOTS	Em Inglês, <i>Directly Observed Treatment Short-course</i> (Tratamento diretamente observado de curto prazo)
EM	Espectrometria de massas
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
G	Grama
g/mol	Gramas por mol
HIV	Em inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
IFA	Insumo farmacêutico ativo
KCL	Cloreto de potássio
LDH	Enzima lactato desidrogenase
m/z	Relação massa carga

MeOH	Metanol
Min	Minutos
MTBE	Éter metil terc-butílico
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
RHZE	Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol
rpm	Rotações por minute
SAR	Em Inglês, <i>specific absorption rate</i> (Taxa de absorção de radiações)
TB	Tuberculose
TOF	Em Inglês, <i>Time-of-flight</i> (Tempo de voo)
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Tuberculose	14
1.1.1. Quimioterapia da tuberculose	19
1.2 Chalconas	23
1.2.1. Ação antimicrobacteriana das chalconas	23
1.3. Desenvolvimento de fármacos.	28
1.4. Metabolismo de fármacos	29
1.5. Citocromo P-450	35
1.6. Biotransformação <i>in vitro</i>	36
1.7. Técnicas analíticas aplicadas em estudos de biotransformação <i>in vitro</i>	37
1.7.1. Cromatografia líquida de alta eficiência	37
1.7.2. Espectrometria de massas	38
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVO	42
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos específicos	42
4.MATERIAIS E METÓDOS	43
4.1. Desenvolvimento da separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	43
4.1.1. Materiais	43
4.1.1.1. Reagentes e solventes	43
4.1.1.2. Soluções de referência da chalcona LC 04	43
4.1.1.3. Coluna cromatográfica	43
4.1.1.4. Equipamentos	43
4.1.1.4.1. Sistema cromatográfico	43
4.1.2. Métodos	44
4.2. Otimização do método da extração líquido-líquido da chalcona LC04 a partir de meio de incubação microsomal.	44
4.2.1. Materiais	44
4.2.1.1. Reagente e solventes	44
4.2.2. Métodos	44
4.3. Procedimento geral de incubação para o estudo de biotransformação <i>in vitro</i>	45
4.3.1. Materiais	45
4.3.1.1. Reagentes e solventes	45
4.3.1.3 Equipamentos	45

4.3.2 Método	46
4.4 Análise estrutural da chalcona LC04 e de seus prováveis metabólitos	46
4.4.1. Análises por CLUE-DAD-EM	46
5.RESULTADOS E DISCURSSÃO	46
5.1. Separação cromatográfica	46
5.2 Otimização da extração líquido-líquido da chalcona LC04	53
5.3. Estudo da biotransformação <i>in vitro</i> da chalcona LC04 empregando microsomas hepáticos de ratos	57
5.3.1. Análise por CLAE-DAD	58
5.3.2. Análise por CLUE-DAD-EM	62
5.3.2.1 Análise estrutural da chalcona LC04	63
5.3.2.2 Análise estrutural do metabólito M1	65
5.3.2.3 Análise estrutural do metabólito M2	67
5.3.2.4 Análise estrutural do metabólito M3	69
5.3.2.5 Análise estrutural do metabólito M4	70
5.3.2.6 Análise estrutural do metabólito M5	71
6.CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	73
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

RESUMO

As chalconas são produtos naturais da classe dos flavonoides e juntamente com seus derivados sintéticos têm recebido grande atenção em virtude de diversas atividades farmacológicas apresentadas. Entre estas atividades destacam-se, antifúngica, antinociceptiva, antileishmania e antibacteriana. A chalcona LC04 (massa molar 251), quimicamente (*E*)-3-(4-(dimetilamino)fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona, é um derivado sintético de chalcona, que apresenta atividade antimicobacteriana. Esta substância apresenta concentração inibitória mínima 50 (CIM₅₀) e CIM₉₀, de 14,3 e 137,3 µM, respectivamente frente a cultura de macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* e CIM₅₀ e CIM₉₀ 19,7 e 320,1 µM, respectivamente, em culturas de macrófagos infectados com a cepa *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Nesse sentido, considerando a importante atividade biológica da chalcona LC04 é necessária a condução de estudos de metabolismo no estágio inicial de descoberta de um candidato a fármaco para a avaliação da sua segurança, eficácia, e identificação da estrutura química dos prováveis metabólitos formados. Assim, o presente trabalho objetiva avaliar o metabolismo da chalcona LC04 empregando o modelo *in vitro* de microssomas hepáticos de ratos e identificar os prováveis metabólitos formados por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos a espectrometria de massas (LC-DAD-MS-MS). Para tanto, o procedimento de biotransformação empregou 1 mg de microssomas hepáticos de rato por mL de meio de incubação. A temperatura empregada foi de 37 °C durante 60 min. A concentração de chalcona empregada foi de 39,8 µM. A amostra oriunda do metabolismo foi submetida a análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. As análises por espectrometria de massas foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida acoplado a espectrômetro de massas com analisador híbrido quadrupolo-ion trap. O método cromatográfico empregou uma coluna Ascentis Express C₁₈ (100 x 4,6 mm; 2,7 µm) e fase móvel composta de solução de ácido fórmico 0,1% e metanol, com eluição no modo gradiente, na vazão de 0,5 mL/min. O espectrômetro de massas operou no modo positivo de ionização empregando os seguintes parâmetros: energia do capilar 36 V, vazão do gás de secagem 10 L/min, temperatura de secagem 250 °C e energia de colisão de 35 eV. Através da análise por espectrometria de massas foi possível observar a formação de cinco prováveis metabólitos. Estes metabólitos apresentaram perda de 14 (M1), 28 (M2), e 12 daltons (Da) (M3), sugerindo tratar de metabólitos provenientes de uma reação de desmetilação, bidesmetilação, e desmetilação mais redução da função alceno, respectivamente. Outros dois metabólitos apresentaram ganho de 2 (M4) e 4 Da (M5) sugerindo ser resultado de redução da função alceno e redução do alceno mais redução da cetona. Conclusão: Dois possíveis metabólitos são descritos na literatura, os de massa 254 (M3) e 224 Da (M4), em estudo frente as patologias com a inibição da transglutaminase e com deficiência de enterocinase, as demais substâncias não tiveram sua descrição encontrada na literatura.

Palavras-chaves: Antimicobacterianos, Chalconas, CLAE, Espectrometria de massas, Microssomas hepáticos de fígado de rato, Metabolismo *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria, tipo bacilo, *Mycobacterium tuberculosis*, estando entre as 10 doenças que mais causam mortes no mundo e a primeira com apenas um agente infeccioso (OMS, 2020). A TB é conhecida também como peste branca, acerca de suas primeiras evidências no mundo é possível identificar anormalidades decorrentes da TB em múmias egípcias de até 5000 anos a. C., entretanto, também existem relatos de seus ancestrais africanos de 35000-15000 a. C. Já no Brasil, a doença já era relatada desde o seu “descobrimento”, quando colonos infectados com a peste branca se alojaram na então, colônia, acometendo no adoecimento e morte de muitos nativos (DE SOUZA MACIEL et al., 2012).

No fim do século XX, a OMS declarou a tuberculose como uma emergência de saúde pública global, sucedendo uma série de eventos nacionais e internacionais, que em 2014, dá origem ao plano mundial de estratégia do fim da tuberculose. Durante esses 21 anos podemos destacar a lançamento da estratégia do tratamento supervisionado (DOTS) pela OMS; a criação da resolução n° 284, que evidencia a necessidade de priorização da TB pelo ministério da saúde no Brasil (BRASIL, 1998); a criação do plano “Objetivos de Desenvolvimento do Milênio”, no qual os estados-membros da ONU assumem como meta, uma série de atitudes contra doenças como aids, malária e tuberculose; e a entrada da TB na agenda de prioridade de políticas públicas no Brasil. No ano de 2015, o Brasil se encontrava na 20° e 19° posição dentro de duas listas prioritárias segundo características epidemiológicas, para os anos de 2016-2020, do grupo composto por 48 países (**Figura 1**) (BRASIL, 2017).

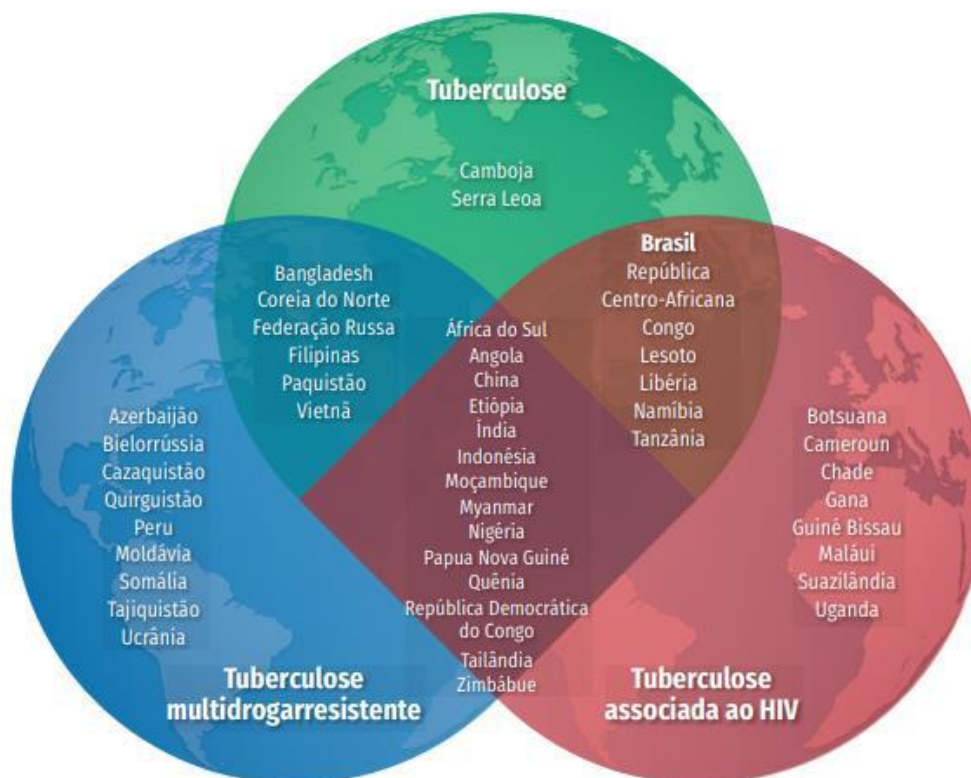
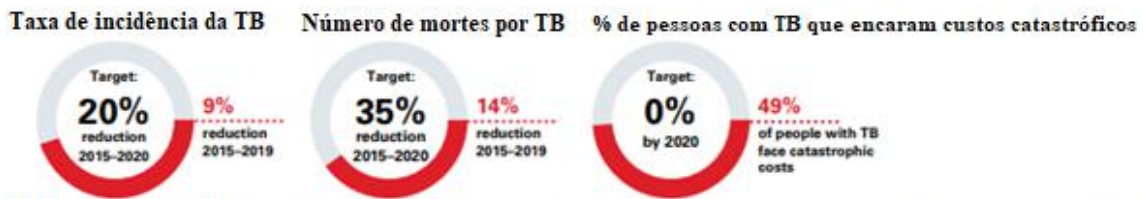


Figura 1: Classificação de países prioritários na busca do fim da tuberculose para o período de 2016 a 2020. **Fonte:** BRASIL, 2017.

A tuberculose pode ser correlacionada direta e indiretamente a indicadores socioeconômicos coletivos e individuais, influenciada pela agregação espacial e características particulares das áreas geográficas, destacando-se a coinfeção pelo vírus HIV e a pobreza. Além destes indicadores, também é importante destacar o sexo, no qual cerca de 56% dos casos de TB no mundo, são homens (SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013; OMS, 2020).

Atualmente, segundo o relatório global de tuberculose de 2020, cerca de 10 milhões de pessoas adoeceram com TB no mundo, sendo as regiões do sudeste da Ásia, África e Pacífico Ocidental os mais afetados. Entretanto, apesar da indicação de declínio de casos, as metas de estratégias administradas pelo OMS no mundo no período de 2015-2019 não foram alcançadas (**Figura 2**). O relatório também alerta acerca do possível aumento da incidência de casos de TB em 2020, decorrente da pandemia por COVID 19, devido a uma redução na identificação da incidência desses casos (OMS, 2020).

a)Objetivos de desenvolvimentos sustentáveis (SDGs) e as estratégias do fim da tuberculose: metas para a redução nas taxas de incidência de TB, mortes por TB e custos castatráficos.



b)Reunião da alta cúpula das nações unidas sobre a TB: Metas para o n° de pessoas com acesso aos tratamentos da TB e o tratamento preventivo.



c)Reunião da alta cúpula das Nações Unidas sobre a TB: Metas para aumento de fundos.



Figura 2: Visão global do progresso de alvos de tuberculose no mundo. **Fonte:** Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2020). *Global tuberculosis report 2020*.

Segundo o boletim epidemiológico especial, disposto pelo Ministério da saúde, o Brasil notificou no ano de 2020, a incidência de cerca de 66819 casos, com um coeficiente de incidência 31,6% casos por 100 mil habitantes, sendo 69% homens. Já a taxa de mortalidade foi de 2,2%, com 4,5 mil óbitos, quanto ao sucesso de tratamento, foram identificados cerca 70,1% de cura nos casos de tuberculose pulmonar com confirmação laboratorial e no retratamento foi de 51,2% no ano de 2019. Além disso, foi observado cerca de 12% de abandono do tratamento em TB sensível, isto é, de pessoas no tratamento da TB sensível aos antimicrobianos. Assim, foi identificado que os maiores números de casos de incidência de TB no Brasil foram nos estados do Amazonas, Acre e Rio de Janeiro (**Figura 3**), entretanto, o número de casos de incidência no Brasil diminuiu, creditando-se este fato a pandemia de COVID-19. Outro dado importante é que os casos de cura, no retratamento de TB, foram abaixo do recomendado pela OMS, enquanto, os casos de abandono do tratamento da TB confirmada laboratorialmente foi superior a 2x o recomendado (BRASIL, 2021).

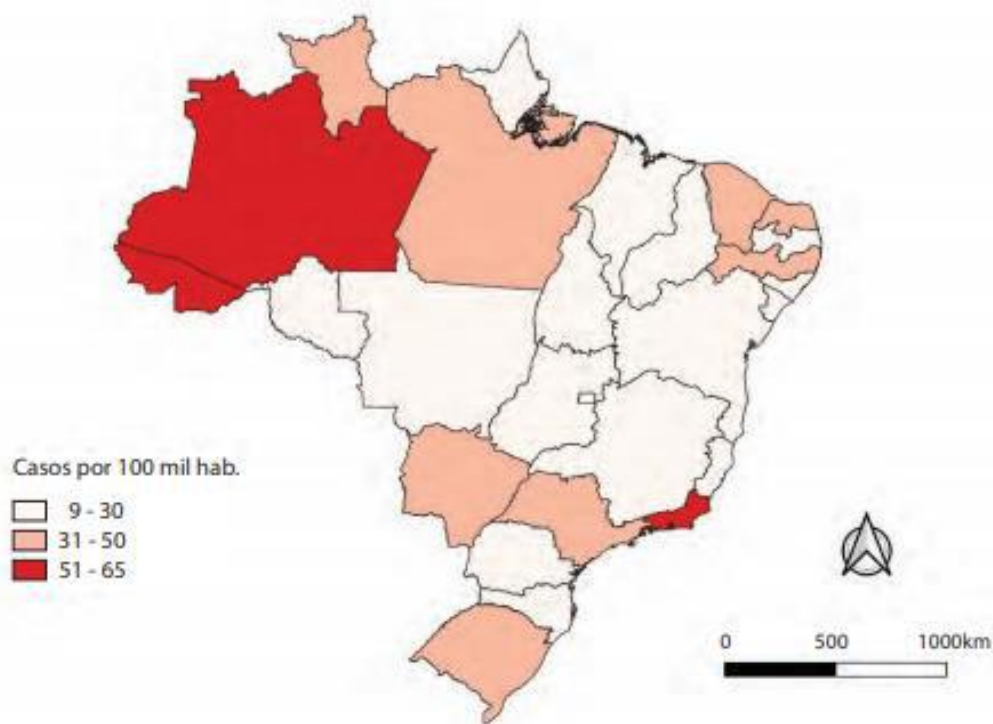


Figura 3: Coeficiente de incidência de casos de Tuberculose no Brasil por estado*. **Fonte:** BRASIL, 2021.

*Dados preliminares, sujeito a modificações.

Para entender a cadeia de transmissão da tuberculose, é importante ter em mente que os fatores externos são decisivos para a proliferação da *M. tuberculosis*, isto porque as pessoas infectadas, que são a maior fonte de contágio, mesmo com tosses excessivas não eliminam, na maioria das vezes, bacilos o suficiente para contaminar outras pessoas. Assim, locais aglomerados, fechados e não ventilados são uma grande fonte de contaminação. Resumidamente, o contágio ocorre de forma direta (liberação de aerossóis), quando um indivíduo infectado elimina (tosse, espirros) gotículas infectadas por bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*. Essas gotículas podem ficar suspensas no ar (leves) ou caírem no chão (pesadas), as suspensas são absorvidas pelo outro indivíduo até chegarem aos bronquíolos e alvéolos e começarem o processo de multiplicação (**Figura 4**) (NOGUEIRA et al., 2012).

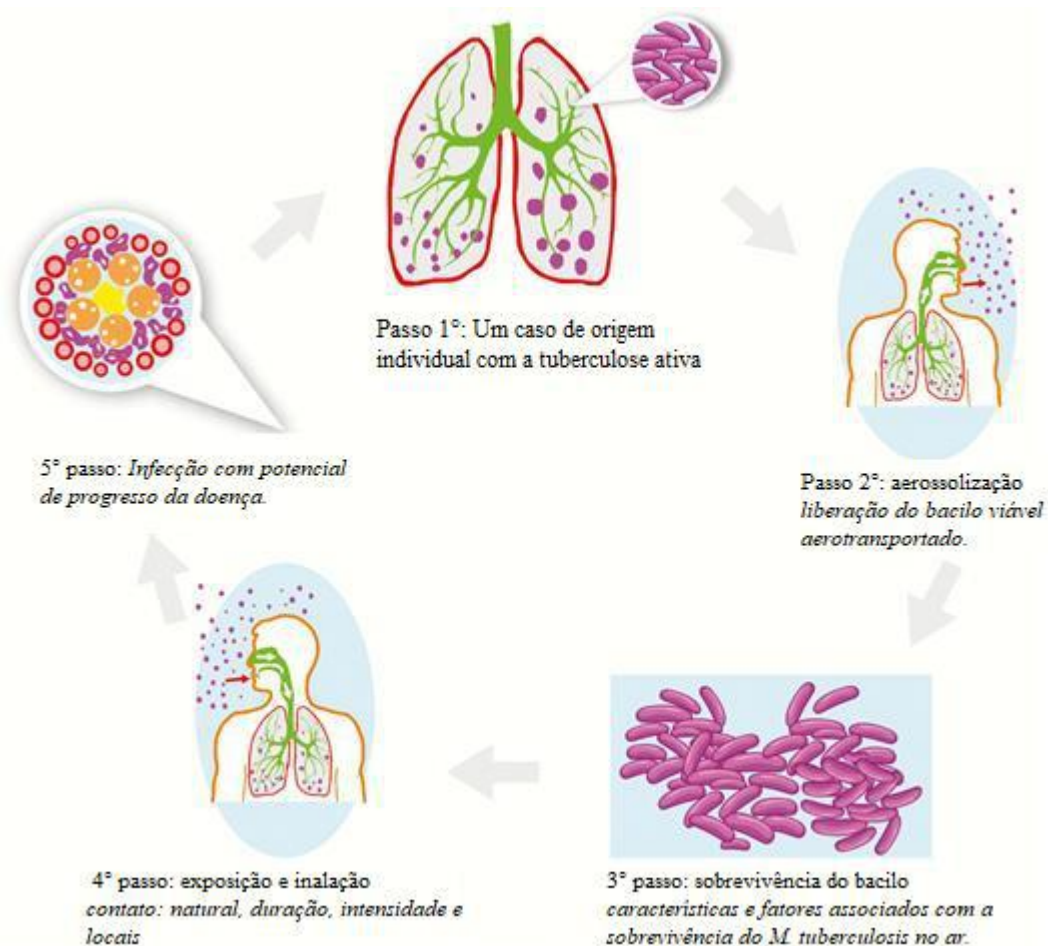


Figura 4: Representação da transmissão da tuberculose. **Fonte:** Adaptado de Churchyard et al. (2017).

A imunidade é um importante conceito quando se trata de TB, devido as duas possíveis infecções decorrentes da bactéria, infecção primária e secundária. A infecção primária, em indivíduos sadios infectados, geralmente causa fibrose, devido a necrose dos macrófagos, gerando lesões locais que controlam a proliferação das bactérias, evento definido como imunidade ao bacilo. Entretanto, com a influência de fatores como a baixa imunidade (má alimentação, infecção do HIV, reinfecção da TB) ocorre o impedimento do controle da proliferação das bactérias, gerando uma infecção pulmonar (infecção secundária) que pode acometer todo o pulmão (NOGUEIRA et al., 2012).

Para a detecção da patologia, podem ser realizados baciloscopia, teste rápido molecular para tuberculose e cultura para micobactéria. A sintomatologia da TB inclui tosse persistente, seca ou produtiva, além de febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento (BRASIL, 2020).

Existem dois tipos de tratamento para a tuberculose, o preventivo e o farmacológico, ambos fornecidos gratuitamente, pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O preventivo consiste na

administração da vacina BCG (bacilo Calmette-Guérin) em crianças de até 12 anos, para a prevenção contra as formas mais graves da doença. Enquanto o farmacológico é realizado em pessoas com a infecção ativa, o tratamento tem duração de 6 meses com a administração de quatro medicamentos (RHZE- Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol). No Brasil, esse tratamento utiliza a metodologia de DOTS, no qual o profissional de saúde supervisiona a administração da medicação no mínimo 3 vezes por semana (BRASIL, 2020).

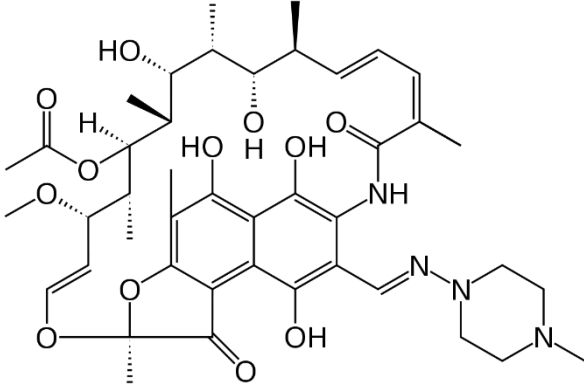
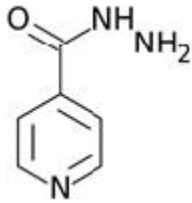
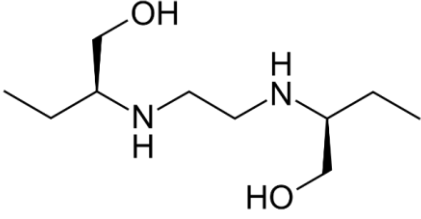
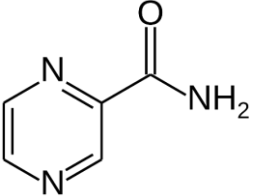
1.1.1. Quimioterapia da tuberculose

A tuberculose é considerada curável na maioria das vezes, quando seguido o tratamento farmacológico de maneira adequada e se a pessoa infectada tem bacilos sensíveis aos medicamentos antiTB. As eventuais intercorrências (esquema equivocado da medicação, parada de tratamento, uso de maneira irregular, entre outras situações) que podem acontecer durante o tratamento podem originar a resistência bacteriana adquirida, isto é, resistência aos medicamentos antiTB (BRASIL, 2019).

Sabe-se que os bacilos da TB necessitam de oxigênio para sua proliferação, assim, a localização (intracelular, nos macrófagos; lesão caseosa, fechada; e cavidade pulmonar) destes é imprescindível para a escolha do medicamento. Essa escolha deve atender a três objetivos principais: atividade bactericida precoce (a eliminação dos bacilos no menor tempo possível), prevenção a bacilos resistentes e atividade esterilizante (capacidade de eliminar os bacilos em todas as possíveis regiões em que este se encontra). Essas são avaliadas a partir do número de recidivas após o término do tratamento (BRASIL, 2019).

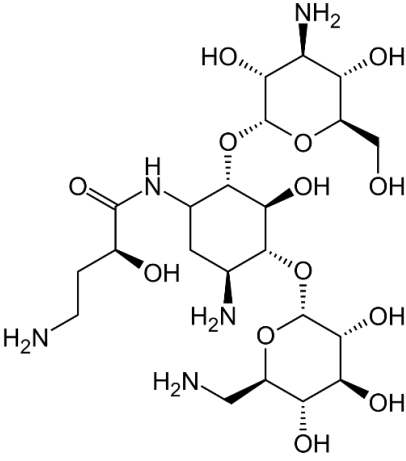
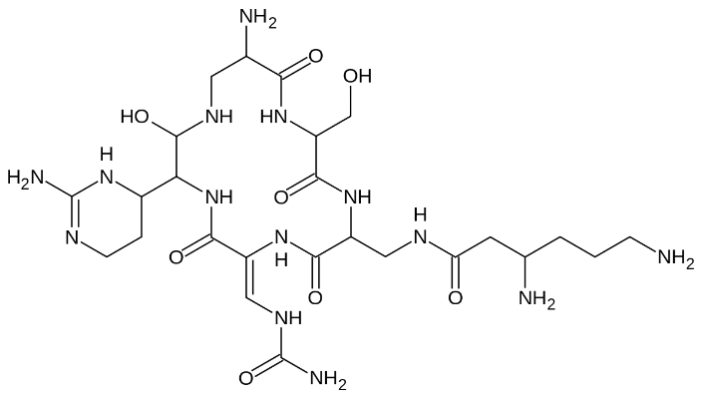
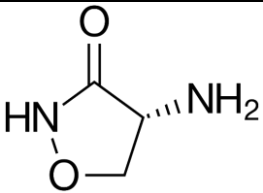
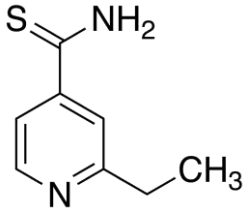
Assim, o plano farmacoterapêutico básico é dividido em duas fases, intensiva/ataque e manutenção/continuação, respectivamente. Na primeira fase, são administrados quatro medicamentos de primeira escolha (**Quadro 1**), geralmente o RHZE, seguidos da fase de manutenção com administração do RH (Rifampicina e Isoniazida). A fase inicial do tratamento objetiva a eliminação de bacilos, enquanto a fase final objetiva a eliminação de todos os bacilos do organismo e uma prevenção a uma possível recidiva. Caso ocorra a resistência a esses medicamentos, é sugerido a utilização de quatro medicamentos de segunda escolha (**Quadro 2**) não utilizados pelo paciente previamente (BRASIL, 2019; NOGUEIRA et al., 2012).

Quadro 1: Lista de fármacos de primeira escolha para o tratamento da tuberculose.

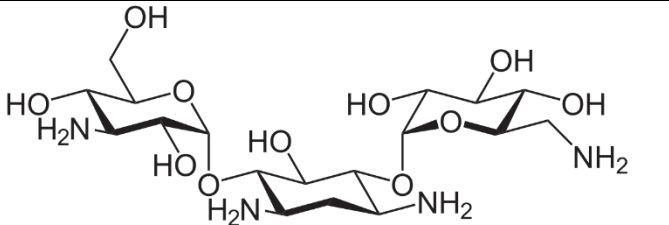
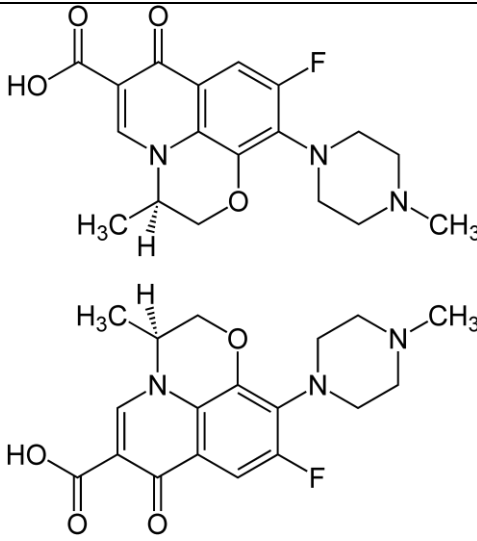
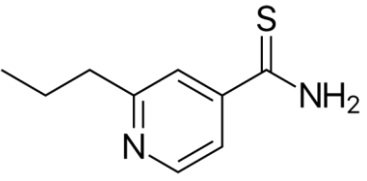
Fármaco	Estrutura química	Mecanismo de Ação
Rifampicina	 <p>The image shows the chemical structure of Rifampicin, a complex polycyclic molecule with multiple hydroxyl groups, a methyl group, and a piperazine ring attached to a side chain.</p>	Inibição da síntese de RNA.
Isoniazida	 <p>The image shows the chemical structure of Isoniazid, consisting of a pyridine ring with an isonicotinamide group (-CONHNH₂) attached at the 4-position.</p>	Biossíntese de Ácido micólico.
Etambutol	 <p>The image shows the chemical structure of Ethambutol, a symmetrical molecule with two ethyl groups and two hydroxyl groups attached to a central ethane-1,2-diamine backbone.</p>	Síntese da parede celular.
Pirazinamida	 <p>The image shows the chemical structure of Pyrazinamide, which is a pyrimidine ring with an amide group (-CONH₂) attached at the 4-position.</p>	Desconhecido.

Fonte: O quadro foi baseado em BRASIL, 2019 e NOGUEIRA et al., 2012.

Quadro 2: Lista de fármacos de segunda escolha para o tratamento da tuberculose.

Fármaco	Estrutura química	Mecanismo de Ação
Amicacina		Inibição da síntese proteica no Ribossomo.
Capreomicina		Inibição da síntese proteica no Ribossomo.
Cicloserina		Inibição da Síntese de peptideoglicano.
Etionamida		Biossíntese de Ácido micólico.

Quadro 2: Lista de fármacos de segunda escolha para o tratamento da tuberculose (Continuação).

Fármaco	Estrutura química	Mecanismo de Ação
Canamicina		Inibição da síntese proteica no Ribossomo.
Ofloxacino		Inibição da síntese de DNA
Protionamida		Biossíntese de Ácido micólico.

Fonte: O quadro foi baseado em BRASIL, 2019 e NOGUEIRA et al., 2012.

Assim, a adesão dos pacientes na quimioterapia da tuberculose, é um dos grandes problemas para o seu sucesso, isso se dá devido ao tempo de tratamento (6 meses) e os efeitos adversos dos medicamentos, entre os mais comuns temos: náuseas, vômitos, alterações visuais e cegueira (NOGUEIRA, et al., 2012).

Assim, considerando os problemas de adesão ao tratamento devido a sua longa duração e aos diversos efeitos adversos observados no tratamento com os fármacos empregados na terapêutica, grupos de pesquisa vêm investigando novos fármacos mais efetivos e com um menor tempo de tratamento e com menor toxicidade buscando a complementação ou substituição da quimioterapia atualmente empregada na terapêutica.

1.2 Chalconas

As chalconas são produtos naturais, abundante em plantas (frutas, folhas e flores), precursoras da classe dos flavonoides e isoflavonoides. Quimicamente, são caracterizadas pela presença de dois anéis aromáticos ligados por um carbonil $\alpha\beta$ insaturado (**Figura 5**) (SARBU et al., 2019). Estas, podem ser sintetizadas em laboratórios e seus derivados despertam interesses, devido as suas atividades farmacológicas (NOWAKOWSKA, 2007). Sua síntese, geralmente, é obtida por reações de condensação Claisen-Schmidt. Suas estruturas, podem variar, com substituições, geralmente de metilações, hidroxilações, também das dihidrochalconas e glicosídeos. São descritas na literatura, por suas aplicações medicinais, como, com atividade anti-câncer, anti-HIV, anti-inflamatória, antimicrobiana e antimicobacteriana (RAMMOHAN et al. 2020).

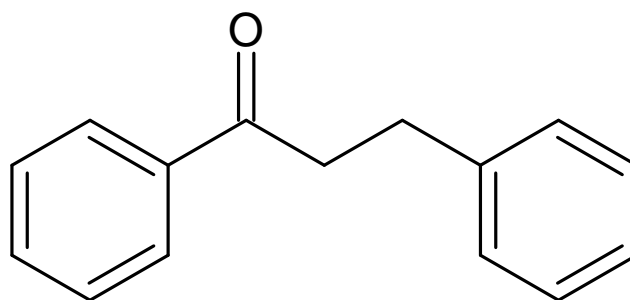
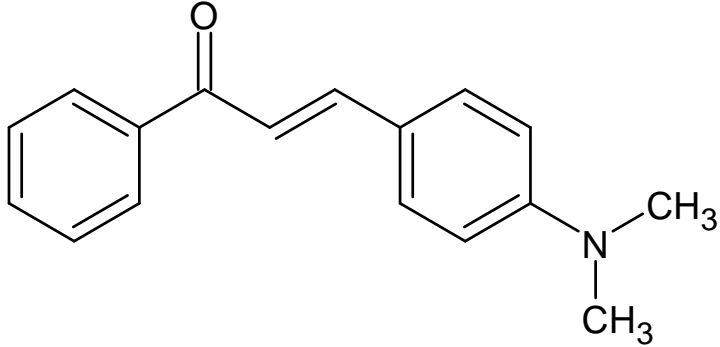
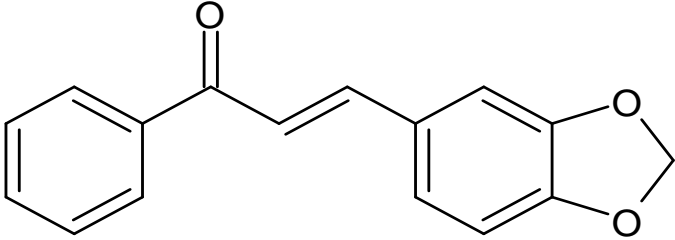
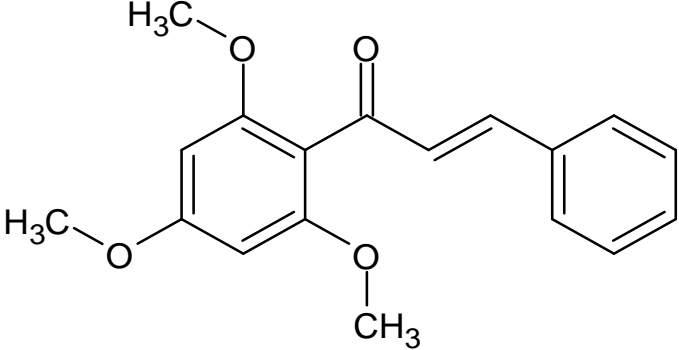


Figura 5: Núcleo fundamental das chalconas. **Fonte:** Autoria própria.

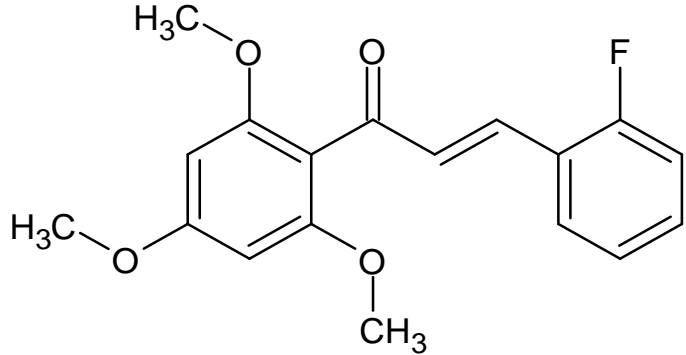
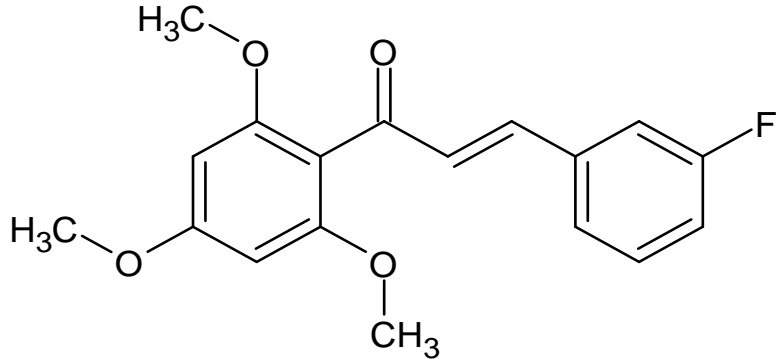
1.2.1. Ação antimicobacteriana das chalconas

As chalconas e seus derivados, se tornaram substâncias de grande interesse. Já que estudos vem apresentando atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana, inclusive contra cepas multirresistente e extensivamente resistente (VENTURA et al., 2015; RAMESH et al., 2020; SERDAR et al., 2017; CASTAÑO et al., 2019).

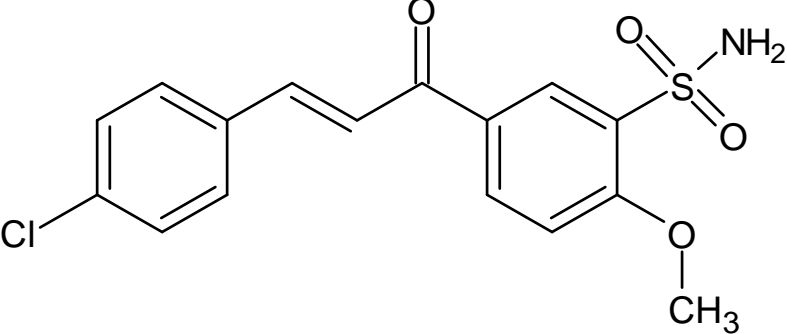
Quadro 3: Lista de exemplos de derivados de chalconas com ação antimicrobacteriana.

Código	Estrutura Química	CIM (μM)	Referências
LC04		19,7*	(VENTURA et al. 2015).
LC05		12,7*	(VENTURA et al. 2015).
C3		$\leq 16,7^*$	(SERDAR et al.; 2017)

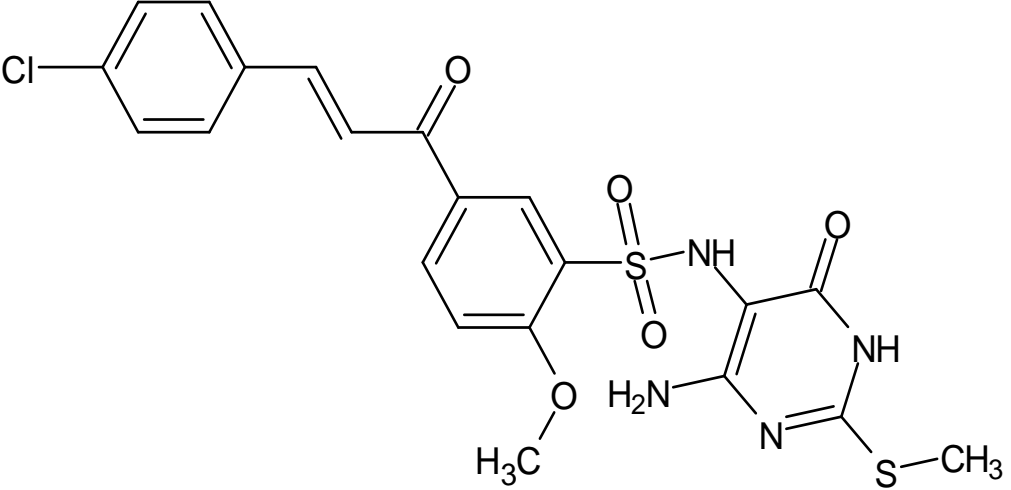
Quadro 3: Lista de exemplos de derivados de chalconas com ação antimicobacteriana (continuação).

Código	Estrutura Química	CIM (μM)	Referências
C4	 <p>The structure shows a chalcone core. The A-ring (left) is a benzene ring with methoxy groups (-OCH₃) at the 3, 4, and 5 positions. The B-ring (right) is a benzene ring with a fluorine atom (-F) at the 4-position. The two rings are connected via a propenoic acid side chain at the 2 and 7 positions.</p>	$\leq 16,7^*$	(SERDAR et al.; 2017)
C5	 <p>The structure is identical to C4, showing a chalcone core with a 3,4,5-trimethoxyphenyl ring at the 2-position and a 4-fluorophenyl ring at the 7-position.</p>	$\leq 16,760^*$	(SERDAR et al.; 2017)

Quadro 3: Lista de exemplos de derivados de chalconas com ação antimicrobacteriana (continuação).

Código	Estrutura Química	CIM (μM)	Referências
C6	 <chem>COc1ccc(cc1C(=O)C=Cc2ccc(Cl)cc2)S(=O)(=O)N</chem>	14*	(CASTAÑO et al.; 2019)

Quadro 3: Lista de exemplos de derivados de chalconas com ação antimicobacteriana (continuação).

Código	Estrutura Química	CIM (μM)	Referências
C7	 <p>The chemical structure shows a chalcone core. The A-ring is substituted with a chlorine atom at the para position and a methoxy group at the meta position. The B-ring is substituted with a methoxy group at the meta position and a 2-amino-4-methyl-5-methylsulfanylimidazole-3-sulfonyl group at the para position.</p>	20*	(CASTAÑO et al.; 2019)

CIM: Concentração Inibitória Mínima.

*CIM 50: Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% do crescimento bacteriano.

**CIM60: Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 60% do crescimento bacteriano.

***CIM 85: Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 85% do crescimento bacteriano.

Dentre os derivados sintéticos de chalcona listados no **Quadro 3** temos as chalconas LC04 e LC05 que são destaques por suas atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias, no estudo realizado pelo grupo de Ventura et al. (2015). Nesse estudo, foram sintetizados cerca de 40 diferentes derivados de chalcona. Foram avaliadas as atividades imunomoduladoras dessas substâncias e sua atividade antimicrobiana frente a cepas não virulentas e virulentas. Foi realizado um estudo *in silico* das propriedades ADMET (absorção-distribuição-metabolismo-excreção-toxicidade) para a escolha das substâncias candidatas a fármaco e por fim, SAR (relação atividade-estrutura) para um melhor entendimento acerca da atividade antimicrobiana dessas substâncias. A chalcona LC04, apresentou valores consideráveis de IC50 de $14,3 \pm 5,8$ frente a cepa de macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* (BCG), e frente a cepa de macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, obteve uma CIM50 de $19,7 \pm 1,9$. Sendo considerado um bom candidato a estudo *in vivo*, considerando a citotoxicidade observada pelo teste de liberação LDH, que é um dos marcadores que indica lesões nas células, considerando que são liberadas até mesmo por células mortas (VENTURA, 2015).

1.3. Desenvolvimento de fármacos.

Os fármacos são sinônimos de IFA (insumo farmacêutico ativo), que são substâncias químicas com propriedades farmacológicas com finalidade medicamentosa, que, influenciam no sistema fisiológico do usuário, objetivando o benefício do paciente, seja no tratamento, no diagnóstico ou até no alívio de sintomas (FB 6ª ed. 2019).

O desenvolvimento de um fármaco pode ser dividido em pesquisa básica, testes pré-clínicos, testes clínicos e farmacovigilância (**Figura 6**). A pesquisa básica é composta de todo o estudo acerca da substância e do alvo terapêutico, tal como sua identificação, como sua validação. Seguida dos estudos pré-clínicos, que objetivam comprovar a eficácia e segurança da molécula, a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos animais. Os testes clínicos objetivam a avaliação da segurança e eficácia em humanos, são divididos em 3 fases, que se aprovadas, seguem ao registro e por fim a fase da farmacovigilância. A farmacovigilância, é a fase no qual a agência reguladora monitora o uso do medicamento na população, focando no controle das notificações de efeitos adversos (DELUCIA; PLANETA; LEPSCH, 2016).

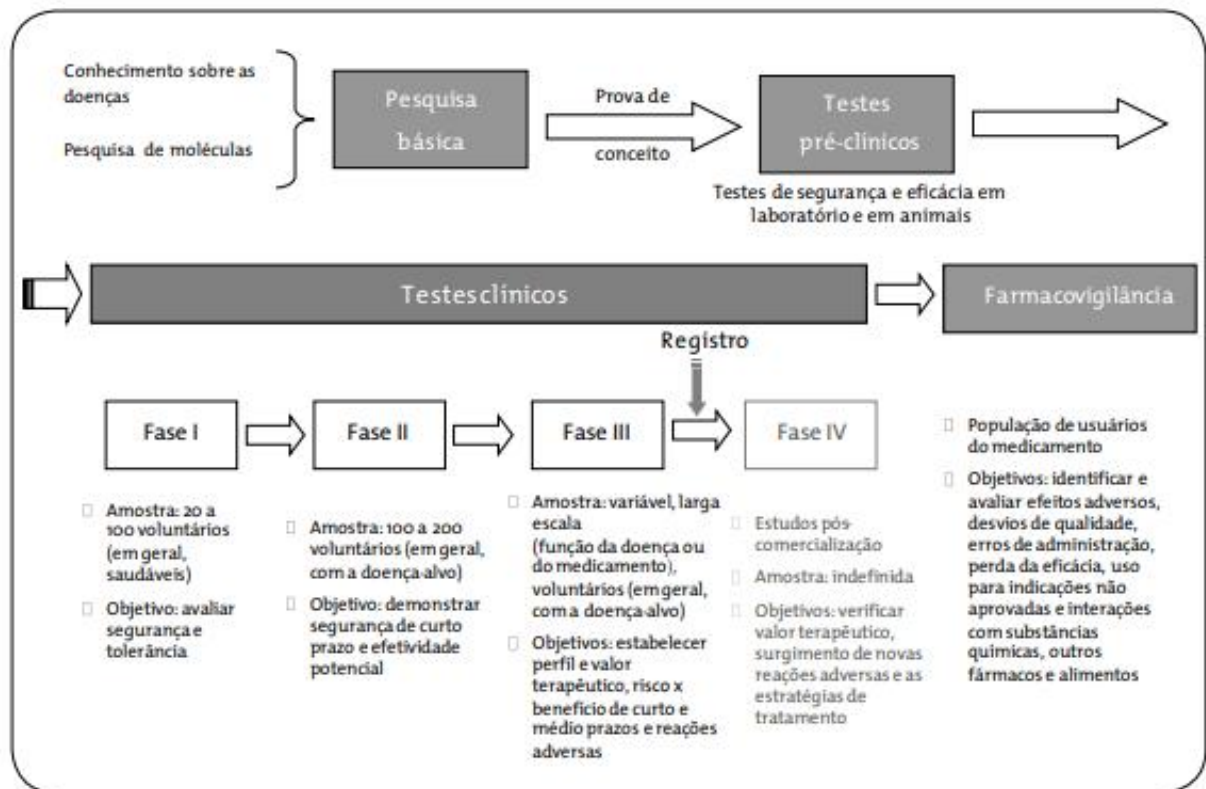
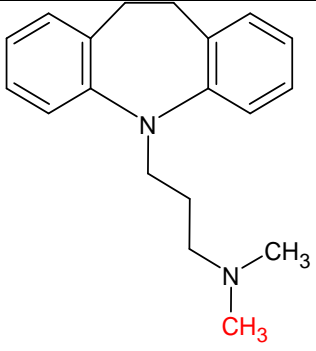
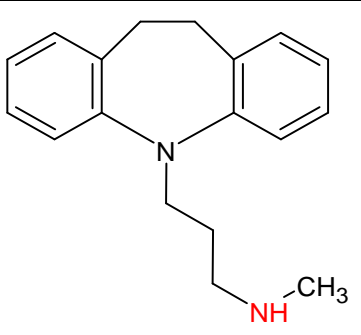
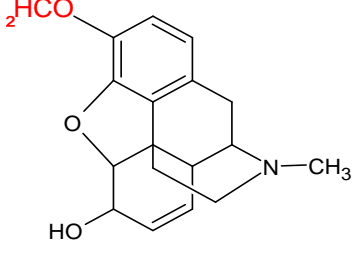
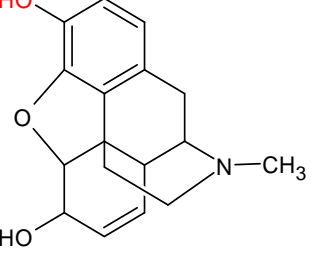
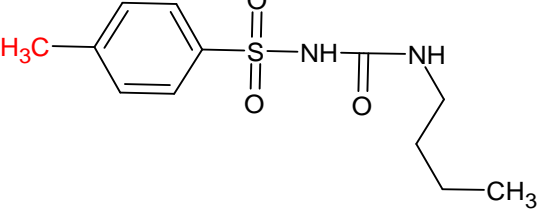
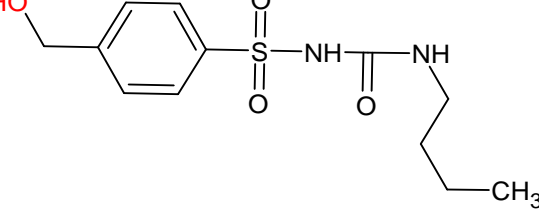


Figura 6: Fases da descoberta e desenvolvimento de fármacos. **Fonte:** BNDES, 2012.

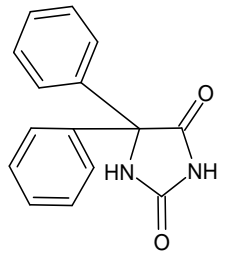
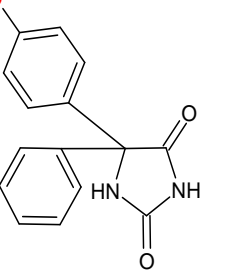
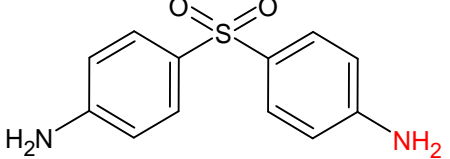
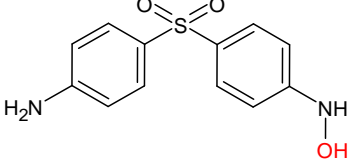
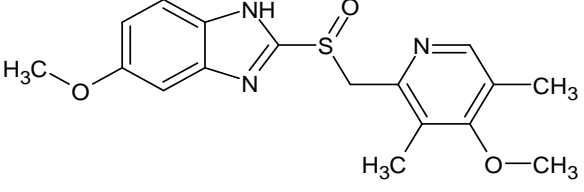
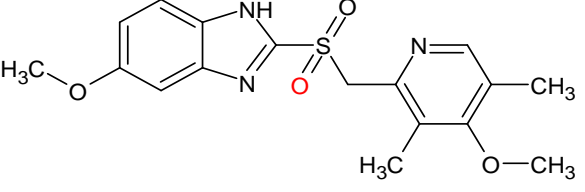
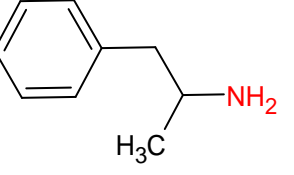
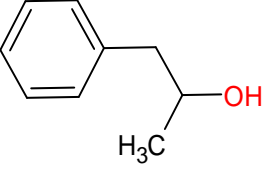
1.4. Metabolismo de fármacos

O metabolismo hepático é dividido em fase I e II (WILLIANS, 1959) (**Quadro 4 e 5**). Sendo a fase I, a fase de funcionalização, onde as substâncias são biotransformadas a partir de reações de oxidação, redução, desalquilação, desaminação e hidrólise, enquanto na fase II, os fármacos ou substâncias inalteradas e/ou seus metabólitos, produzidos nas reações de fase I, sofrem reações de conjugação com ácido glicurônico, sulfato, glutatona, metilação e acetilação (RANG; DALE, 2016). Ambas com a finalidade de tornar as substâncias mais hidrofílicas e serem excretadas pelo sistema renal ou biliar.

Quadro 4: Exemplos de reações de metabolização de Fase I.

Reação de Fase I	Estrutura do fármaco	Estrutura do Metabólito	Nome do fármaco
N-Desalquilação			Imipramina
O-Desalquilação			Codeína
Hidroxilação alifática			Tolbutamida

Quadro 4: Exemplos de reações de metabolização de Fase I (continuação).

Reação de Fase I	Estrutura do fármaco	Estrutura do Metabólito	Nome do fármaco
Hidroxilação aromática			Fenitoina
N-Oxidação			Dapsona
S-Oxidação			Omeprazol
Desaminação			Anfetamina

Quadro 4: Exemplos de reações de metabolização de Fase I (continuação).

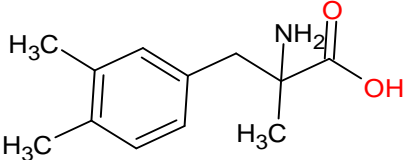
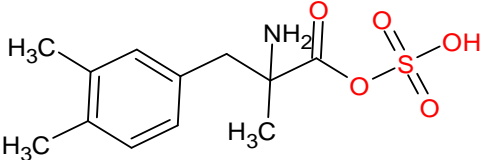
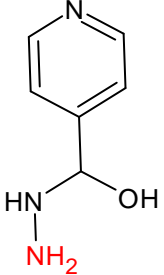
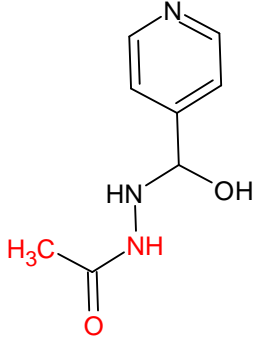
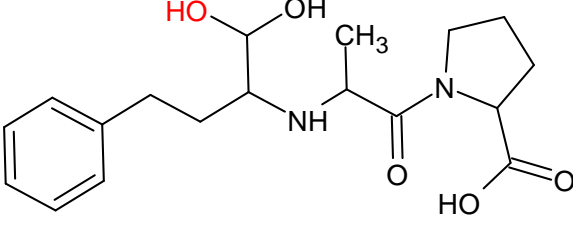
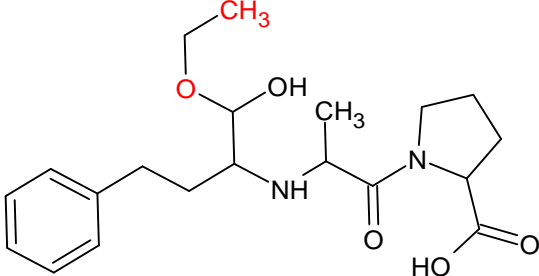
Reação de Fase I	Estrutura do fármaco	Estrutura do Metabólito	Nome do fármaco
Hidrólise			Ácido Acetilsalicílico

Fonte: BRUNTON, et al. 2010

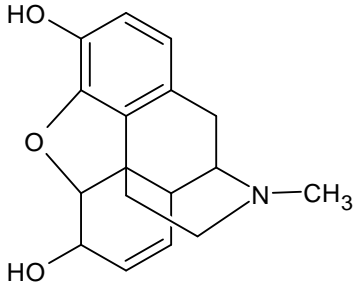
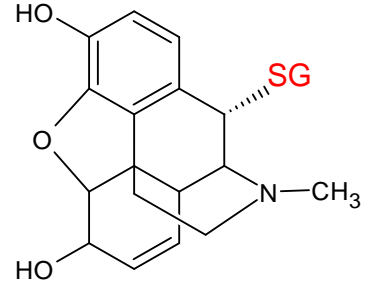
Quadro 5: Exemplos de reações de metabolização de Fase II.

Reação de Fase II	Estrutura do fármaco	Estrutura do metabólito	Nome do fármaco
Glicuronidação			Paracetamol

Quadro 5: Exemplos de reações de metabolização de Fase II (continuação).

Reação de Fase II	Estrutura do fármaco	Estrutura do metabólito	Nome do fármaco
Sulfatação			Metildopa
Acetilação			Isoniazida
Metilação			Ácido enalaprílico

Quadro 5: Exemplos de reações de metabolização de Fase II (continuação).

Reação de Fase II	Estrutura do fármaco	Estrutura do metabólito	Nome do fármaco
Conjugação com glutathiona	 <p>The image shows the chemical structure of morphine, a pentacyclic alkaloid. It features a morphine skeleton with two hydroxyl groups (HO) at the 3 and 6 positions and a methyl group (CH₃) attached to the nitrogen atom.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of the morphine-glutathione conjugate. The morphine skeleton is identical to the parent drug, but a glutathione (SG) molecule is attached to the 3-position carbon via a disulfide bond, indicated by a red 'SG' label and a dashed line.</p> <p>SG= Glutathiona (C₁₀H₁₇N₃O₆S)</p>	Morfina

Fonte: BRUNTON; et al., 2010

1.5. Citocromo P-450

As enzimas do citocromo P-450, são uma superfamília de hemoproteínas que se relacionam por metabolizar a grande parte dos fármacos ingeridos no organismo, entretanto se diferenciam pela sequência de aminoácidos, a sensibilidade de inibidores e agentes indutores. Esse grupo de enzimas, são responsáveis por geralmente ativar ou desativar fármacos, através da biotransformação no fígado, por reações de fase I, com um mecanismo conhecido como sistema mono-oxigenase P-450 (**Figura 7**). Por ser um complexo envolvido na maioria das reações de metabolização, o estudo da interação fármaco e citocromo P-450, é essencial. Considerando a relação de alguns agentes xenobióticos, que induzem ou inibem essas enzimas, afetando no organismo e as demais reações ADMET (MANIKANDAN; NAGINI, 2018; GUENGERICH, 1999).

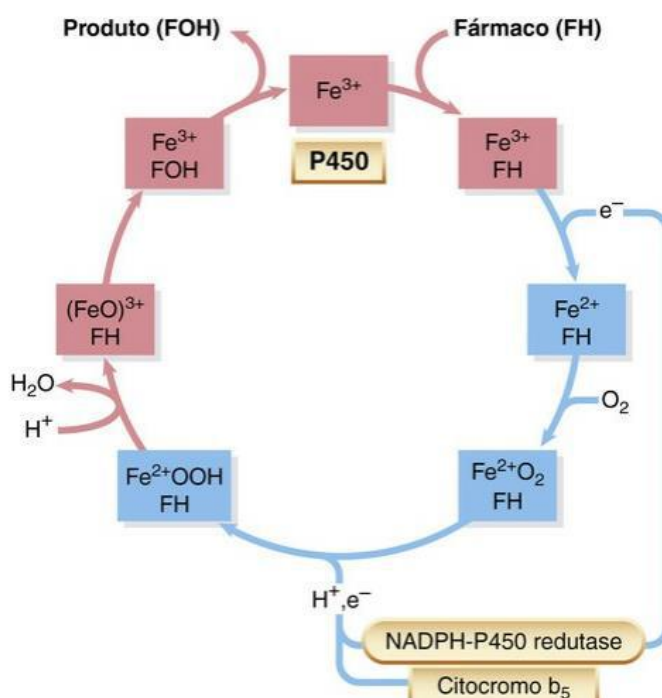


Figura 7: Sistema mono-oxigenase P-450. **Legenda:** Uma molécula do citocromo P-450 no ciclo catalítico. Sendo os retângulos rosas, o ferro, no estado férrico e no azul, no estado ferroso. Essas reações culminam na oxidação do fármaco e na regeneração do complexo P-450. **Fonte:** (RANG; DALE, 2016).

Essa superfamília de enzimas é composta por 18 diferentes famílias e 44 subfamílias, com cerca de no mínimo 57 diferentes genes. Entretanto, as principais famílias envolvidas no metabolismo de xenobióticos são CYP1, CYP2 e CYP3, destacando as subfamílias CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4 (MANIKANDAN & NAGINI, 2018).

1.6. Biotransformação *in vitro*

Os ensaios não clínicos ou pré-clínicos são responsáveis por realizar a análise dos efeitos toxicológicos e a segurança do candidato a fármaco em mamíferos. Dentre estes, o ensaio de metabolismo *in vitro* faz parte dos testes que preveem informações acerca da farmacocinética e possíveis metabólitos que influenciam nas reações ADMET em mamíferos (ANVISA, 2013). O animal escolhido deve ter características semelhantes ao do ser humano, como a patologia, tecido ou proteínas. Os ratos, por exemplo, dispõem da enzima CYP3A4, a principal enzima metabolizadora participante do CYP450 (RANG; DALE, 2016).

Como já abordado anteriormente, acerca da importância do fígado na metabolização dos fármacos. Dentre os modelos de metabolismo *in vitro*, destacam-se: porções do fígado, linhagem de células hepáticas imortalizadas, suspensão, cultura e cultura-sanduíche primária de hepatócitos (SOLDATOW et al., 2013). Dentre essas metodologias, os principais modelos de cultura desenvolvidos são hepatócitos, fração S9 e microsomas hepáticos (WANG et al., 2010).

Pode-se observar na **Figura 8** o procedimento de preparação desses principais modelos, dentre estes, dos microsomas hepáticos. Os microsomas são formados por frações subcelulares do retículo endoplasmático liso do fígado, estrutura essencial na eliminação hepática, devido a presença das CYPs e devido a algumas reações de fase I realizadas. A fração citosólica é enriquecida de enzimas atuantes nas reações de fase II, enquanto que a fração S9 é composta pela mistura de microsomas e fração citosólica (JIA; LIU 2007). Assim, os microsomas são modelos interessantes por sua simplicidade de uso e uma boa correlação *in vitro-in vivo*. (JIA; LIU 2007; WANG et al., 2010; SOLDATOW et al., 2013).



Figura 8: Esquema de preparação de modelos de cultura in vitro hepático. **Fonte:** Adaptado de Biopredic - Liver. <https://www.biopredic.com/rubrique-liver>. Acessado 5 de maio de 2021.

1.7. Técnicas analíticas aplicadas em estudos de biotransformação *in vitro*

As técnicas cromatográficas têm sido utilizadas eficientemente na análise toxicológica de substâncias e de seus metabólitos. A associação das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas (CLAE-EM-EM) tem a possibilidade de aumentar o alcance de dados, quando em comparação com as técnicas isoladas, como a proposta de estruturas. A CLAE-EM-EM é muito utilizada no processo de descoberta de novos fármacos, tanto no estágio inicial, garantindo a pureza da substância, quanto na seguinte, que é na análise das reações ADME (KORFMACHER 2005; PRAGST et al., 2004).

1.7.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida tem como princípio a separação de substâncias entre duas fases imiscíveis, conhecidas como a fase estacionária e móvel. Uma de suas técnicas, conhecida como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), consiste na eluição da fase móvel, a partir de bombas de alta pressão. Resultando assim, no aumento da velocidade da análise e permitindo o

uso de partículas de fase estacionária de menor tamanho e conseqüentemente mais eficientes (AQUINO-NETO, NUNES; 2003).

O sistema de CLAE é composto por seis compartimentos: o reservatório da fase móvel, bomba de alta pressão, válvula de injeção (automática ou manual), coluna (fase estacionária, pode ser de fase normal ou reversa), detector (Detector de arranjo de diodos (DAD), fluorescência, índice de refração, entre outros) e sistema de dados (**Figura 9**). Acerca das vantagens da CLAE, pode-se destacar a sensibilidade, alta resolução, robustez e como desvantagem: treinamento dos analistas e alto custo (PRAGST et al., 2004; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

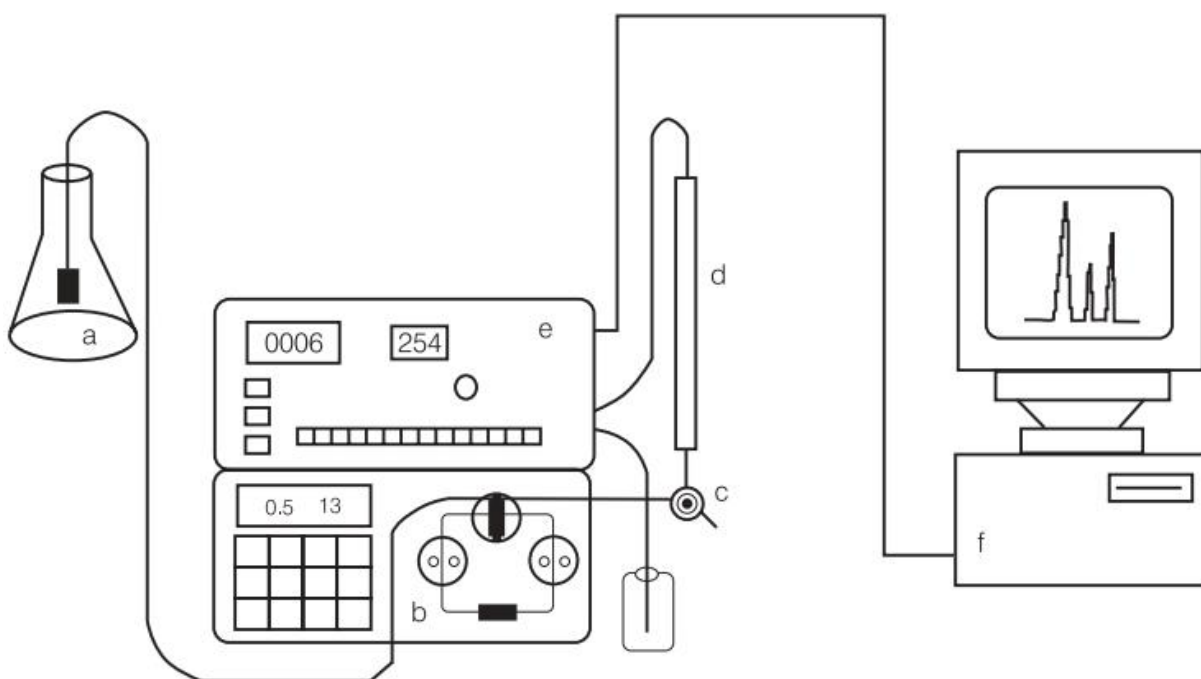


Figura 9: Esquema de equipamento básico do CLAE. **Legenda:** Esquema de equipamento básico de cromatografia líquida de alta eficiência. a) reservatório de fase móvel, b) bomba de alta pressão, c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador. **Fonte:** FIRMINO et al., 2020.

1.7.2. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas objetiva identificar a composição química de substâncias isoladas ou em uma mistura, através da massa molecular na forma iônica. Esse equipamento pode ser utilizado em sequência com outros equipamentos, como a cromatografia gasosa (CG), CLAE e cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). O espectrômetro de massas é composto por 3 módulos principais: fonte de ionização, analisador de massas e detector. As fontes de ionização mais comumente empregadas em sistemas de CLAE-EM são eletrospray-ESI (possibilita a análise de íons positivos e negativos, dependendo da voltagem, além de

possibilitar a análise de moléculas de alto peso molecular), ionização química à pressão atmosférica-APCI (utilizado de forma complementar ao ESI e têm uma menor interação com a matriz) e ionização por fótons à pressão atmosférica-APPI (criado a partir do APCI, possibilita a análise de íons não detectáveis por ESI e APCI, além de substâncias não polares) (HANAN et al., 2015).

Já o analisador de massas separa os íons e os direciona ao detector de acordo com sua massa/ carga (HANAN et al., 2015; GLISH; VACHET, 2003; PAVIA et al., 2013).

Com relação aos analisadores de massas empregados em espectrômetros de massas acoplados a cromatografia líquida temos o quadrupolo, tempo de voo (TOF), triplo quadrupolo e armadilha de íons (**Figura 10**). O quadrupolo fornece um pico para cada substância na análise, o TOF promove espectros com uma alta resolução, o quadrupolo triplo, devido a sua performance é utilizado geralmente para análises bioanalíticas, na identificação de metabolitos e a armadilha de íons tem a capacidade única de gerar dados nos espectros que são importantes para a elucidação estrutural (KORFMACHER, 2005).

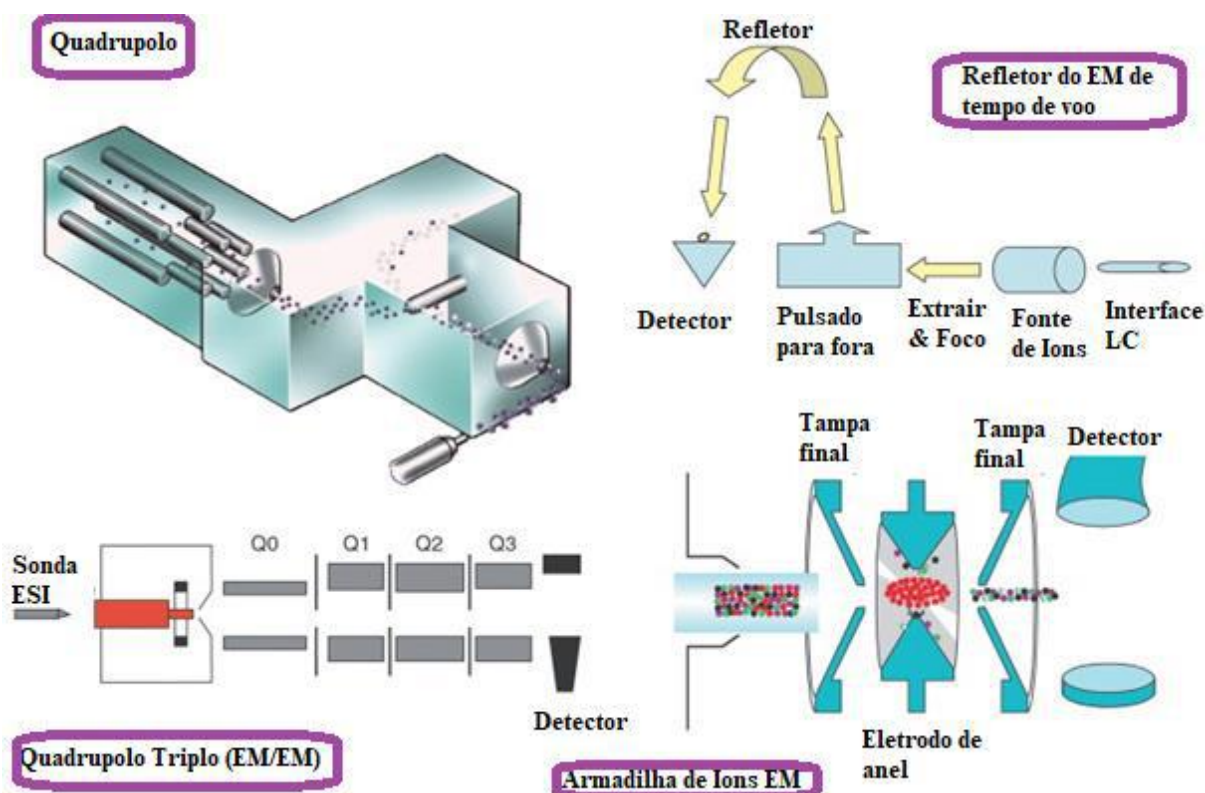


Figura 10: Tipos de analisadores utilizados na técnica de CLAE-EM. **Fonte:** Adaptado de KORFMACHER, 2005.

Os dados coletados nos analisadores são transformados em sinais utilizáveis pelo detector, através da transformação de íons incidentes em correntes elétricas proporcionais as suas abundâncias. Existem vários tipos de detectores, destacando-se a placa fotográfica, copo

de Faraday, múltiplos elétrons e detectores de íons eletro-ópticos. A placa fotográfica é denominada como obsoleta nos dias de hoje, foi utilizada nos primeiros espectrômetros e possibilitava a detecção simultânea de um grande intervalo de massa carga. Já o copo de Faraday, apesar da robustez e simplicidade deste detector, ele somente é usado em espectrometria de massa de razão isotópica ou em espectrometria de massa de acelerador, isto, por causa da baixa sensibilidade e tempo de resposta. O detector de múltiplos elétrons é o detector mais utilizado na EM e é conhecido por seu rápido tempo de resposta. Por fim, os detectores de íons eletro-ópticos combinam a detecção de íons e fótons, têm um tempo de vida maior e têm sensibilidade e tempo de resposta similar ao de múltiplos elétrons, entretanto, são relativamente complexos, devido as suas conversões (íon-elétron-fóton-elétron) (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Como pode ser observado, a tuberculose é uma doença que pode acometer indivíduos de idade, sexo e comportamentos sociais e econômicos diferentes em todo o mundo (SAN PEDRO; OLIVEIRA, 2013), com a incidência de 31,6 por 100 mil habitantes no Brasil (BRASIL, 2021). Apesar da existência de tratamento farmacoterapêutico, ele é longo e os medicamentos empregados apresentam diversos efeitos adversos (NOGUEIRA et al., 2012; BRASIL, 2020). Tais problemas, levam muitas vezes, a redução da adesão dos pacientes ao tratamento.

Assim, existe a necessidade da descoberta e desenvolvimento de novos fármacos que possam contribuir com o aumento da adesão: pela redução do número de fármacos empregados na terapia, obtenção de fármacos com menores efeitos adversos e maior eficácia terapêutica quando comparadas as terapias farmacológicas atualmente empregadas. Logo, devido a interessante atividade biológica, destacando-se a atividade anti-inflamatória e os resultados de CIM50 de 19,7 da chalcona LC04 frente ao *Mycobacterium tuberculosis*, realizado por Ventura et al. (2015), justifica-se a necessidade da realização de estudos acerca do metabolismo desta substância.

Dessa forma, o desenvolvimento de um método analítico para determinação da chalcona LC04 em meio de incubação microssomal e a caracterização estrutural dos possíveis metabólitos formados contribuirá com os estudos toxicológicos que compõem a fase pré-clínica. Pois, uma vez identificados, os metabólitos formados, podem ser, por exemplo sintetizados quimicamente, e empregados em estudos para avaliação de sua toxidez e mesmo atividade biológica e na seleção da melhor espécie animal para realização dos estudos toxicológicos, quando comparados aos estudos de biotransformação realizado em humanos.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Estudar a biotransformação *in vitro* da chalcona LC04 empregando microsomas hepáticos de ratos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Desenvolver método por CLAE-UV para determinação da chalcona LC 04 em meio de incubação com microsomas hepáticos de ratos;

3.2.2. Desenvolver procedimento de preparo de amostras por extração líquido-líquido (ELL) para extração da chalcona LC 04 a partir de meio de incubação com microsomas hepáticos de ratos;

3.2.3. Aplicar o método desenvolvido na determinação da chalcona LC 04 em meio de incubação microsomal;

3.2.3. Identificar os possíveis metabólitos da chalcona LC04, formados a partir da biotransformação por microsomas hepáticos de ratos, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM).

4.MATERIAIS E METÓDOS

4.1. Desenvolvimento da separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.1.1. Materiais

4.1.1.1. Reagentes e solventes

O metanol e a acetonitrila empregados na preparação da fase móvel e soluções de referência foram obtidos da Tedia (FAIRFIELD, OH, EUA). A água ultrapura empregada no preparo das fases móveis foi preparada em purificador modelo Purelab da marca ELGA (High Wycombe, Inglaterra).

4.1.1.2. Soluções de referência da chalcona LC 04

A chalcona LC 04 (**Quadro 3**), peso molecular 251g/mol, foi gentilmente cedida pelo grupo da Profa. Michelle Frazão Muzitano. A solução estoque de chalcona LC 04 foi preparada na concentração de 1 mg/mL e a solução de trabalho preparada na concentração de 200 µg/mL, ambas empregando como solvente acetonitrila: água ultrapura (50:50, v/v).

4.1.1.3. Coluna cromatográfica

Para o desenvolvimento do método cromatográfico para a determinação da chalcona LC 04 foi empregada à coluna Synergi® C18 (150 x 4,6 mm; 4 µm) da marca Phenomenex (Torrance, CA, EUA).

4.1.1.4. Equipamentos

4.1.1.4.1. Sistema cromatográfico

Foi empregado o equipamento para cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), localizado no Laboratório de Produtos Bioativos (LPBio), composto de uma bomba de gradiente quaternário LC-20AT, um auto injetor modelo SIL-20A, um detector de arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, uma controladora modelo CBM-20A, forno modelo CTO-20A, um desgaseificador, modelo DGU-20A5 (Schimadzu, Kyoto, Japão) e um sistema de aquisição de dados com software LCsolution® versão 1.25 SP1.

4.1.2. Métodos

As análises foram realizadas por fase reversa empregando inicialmente misturas de solução de acetonitrila e água. Posteriormente, foram utilizadas misturas de metanol e água. Nestas etapas foi empregada solução de chalcona LC04 na concentração de 200 µg/mL. Além disso, foi empregado o modo isocrático de eluição. Os parâmetros de performance cromatográficos empregados para a seleção da melhor condição foram: fator de assimetria(A), número de pratos (N), resolução (Rs) e tempo de retenção (t_R) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAND, 2010).

4.2. Otimização do método da extração líquido-líquido da chalcona LC04 a partir de meio de incubação microssomal.

4.2.1. Materiais

4.2.1.1. Reagente e solventes

Os materiais utilizados nesta etapa foram acetato de etila, hexano, MTBE (Éter metil-terc-butílico), tris-KCl todos adquiridos da Tedia (FAIRFIELD, OH, EUA) e fosfato de potássio dibásico obtido da Vetec (Duque de Caxias, Brasil).

4.2.2. Métodos

Para otimizar os parâmetros de extração líquido-líquido, o método se divide em 3 etapas. A primeira etapa consiste da seleção do solvente extrator. Para tanto, foi preparado o meio de incubação microssomal, contendo 100 µL de tampão fosfato de potássio dibásico, 125 µL de tampão tris- KCl, volume de microssomas a fim de se obter concentração final de 1 mg/mL e volume de água ultrapura necessário para se atingir volume final de 500 µL.

Após o preparo do meio microssomal foram adicionados 475 µL deste e 25 µL da chalcona LC04 na concentração de 200 µg/mL dissolvida em ACN: água ultrapura (1: 1), em tubo de extração de vidro. Posteriormente, a mistura (meio microssomal + solução da LC04) foi agitada em vortex por 15 s e 2 mL dos solventes extratores testados (acetato de etila, hexano e MTBE) foram adicionados. Por seguinte, a mistura foi agitada em vortéx durante 1 min. Na sequência a mistura foi centrifugada durante 5 min /3000 rpm. Após centrifugação foram transferidos 750 µL do sobrenadante para tubos de vidro cônico, e por fim, o extrato foi seco em fluxo de ar comprimido e posteriormente redissolvido em 500 µL de fase móvel e analisados por CLAE.

A segunda etapa consistiu na seleção da razão entre as fases aquosa e solvente orgânico. Nesta etapa foi realizado o mesmo procedimento de preparo do meio microsomal e da solução da etapa anterior, exceto que o volume do solvente, selecionado na etapa anterior, foram de 2, 1,5 e 1 mL.

A última etapa da otimização do procedimento de extração líquido-líquido consistiu na seleção do tempo de agitação. Nesta etapa foram fixados o solvente extrator e seu volume, definidos, respectivamente, na primeira e segunda etapa do procedimento de otimização da extração líquido-líquido. Os tempos de agitação, em vórtex, testados nesta etapa foram 60, 45 e 30 s.

Todos os procedimentos foram realizados em quintuplicata. Paralelamente foram realizadas amostras controle substituindo o volume da solução de chalcona LC04 por água ultrapura.

4.3. Procedimento geral de incubação para o estudo de biotransformação *in vitro*

4.3.1. Materiais

4.3.1.1. Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados nessa etapa foram os componentes do sistema de regeneração de NADPH, fosfato de dinucleotídeo de β -nicotinamida e adenina (NADP), glicose-6-fosfato, a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase adquiridos da (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e fosfato de potássio dibásico anidro Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

4.3.1.2 Preparação microsomal

A preparação microsomal de fígado de ratos foi adquirida da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) composta por um *pool* de ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, número de catálogo M9066, na concentração proteica de 20 mg/mL.

4.3.1.3 Equipamentos

Foi empregado para essa análise um banho metabólico do tipo Dubnoff, modelo NT232, da marca Nova técnica (Piracicaba, SP, Brasil).

4.3.2 Método

Primeiramente, foi preparado em um béquer uma mistura de cofatores para ser acrescentado em cada solução: adicionaram-se 50 µL de NADP (0,25 mM), 50 µL de glicose-6-fosfato (5 mM), 25 µL da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (0,5 unidades/mL), 100 µL do tampão fosfato 0,5 M (pH 7,4) e 225 µL de água ultrapura. Após isso, em um tubo cônico, colocaram-se 450 µL da mistura de cofatores, 25 µL da solução da chalcona LC 04 na concentração de 200 µg/mL e levou-se para incubar durante 5 minutos, a 37 °C, no banho metabólico. Em seguida, adicionaram-se os 25 µL de microsomas e deixou-se sobre agitação 60 minutos no banho metabólico, na mesma temperatura.

Posteriormente, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração líquido-líquido, redissolvidas e cromatografadas. Foram preparados 10 tubos testes e 3 tubos controles, onde estes últimos seguiu-se o mesmo procedimento, exceto pela substituição dos microsomas por água ultrapura.

4.4 Análise estrutural da chalcona LC04 e de seus prováveis metabólitos

4.4.1. Análises por CLUE-DAD-EM

As análises por CLUE-DAD-EM foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos, da Faculdade de Farmácia da UFRJ – Campus Fundão, pelo técnico de laboratório, Mestre Marcos Vinícius Toledo e Silva. Para tanto, foi empregado um cromatógrafo de ultra eficiência Dionex Focused Ultimate 3000 equipado com um detector de arranjo de diodos e um espectrômetro de massas LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer ThermoFisher Scientific, (Waltham, MA, USA). O método cromatográfico empregou uma coluna Ascentis Express C18 (100 mm x 4,6 mm; 2,7 µm) da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA) e fase móvel composta de solução de ácido fórmico 0,1% e metanol, com eluição no modo gradiente, que iniciava com 5% MeOH (5 min) e após esse tempo o gradiente atingia linearmente 100% em 30 minutos na vazão de 0,5 mL/min. O tempo de análise foi de 60 minutos, com temperatura a 35 °C, volume de injeção: 3 µL, detecção em dois comprimentos de onda, 254 e 428 nm. O modo de ionização utilizado foi o eletrospray positivo, com energia do capilar de 36 V, vazão do gás de secagem de 10 L/min, temperatura de secagem: 250 °C e energia de colisão de 35 eV.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Separação cromatográfica

No desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência foi empregada a coluna Synergi® C₁₈, no mecanismo de separação cromatográfico fase reversa.

O uso da CLAE com coluna de fase reversa é largamente utilizado pela sua alta versatilidade e baixos custos operacionais, a água é o solvente geralmente majoritário, empregada na maioria das vezes em mistura com acetonitrila e metanol (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; LANÇAS, 2009; SADEK, 2002).

A fim de avaliar a seletividade da fase móvel, ou seja, as interações físico-químicas da chalcona LC04 com a fase móvel na separação da chalcona LC04 foram testadas a mistura acetonitrila/ água em três proporções, assim como a mistura metanol/ água, também em três proporções).

Testaram-se inicialmente três proporções da mistura de acetonitrila/água: (50:50, v/v); (55:45, v/v) e (60:40, v/v) **Figura 11**.

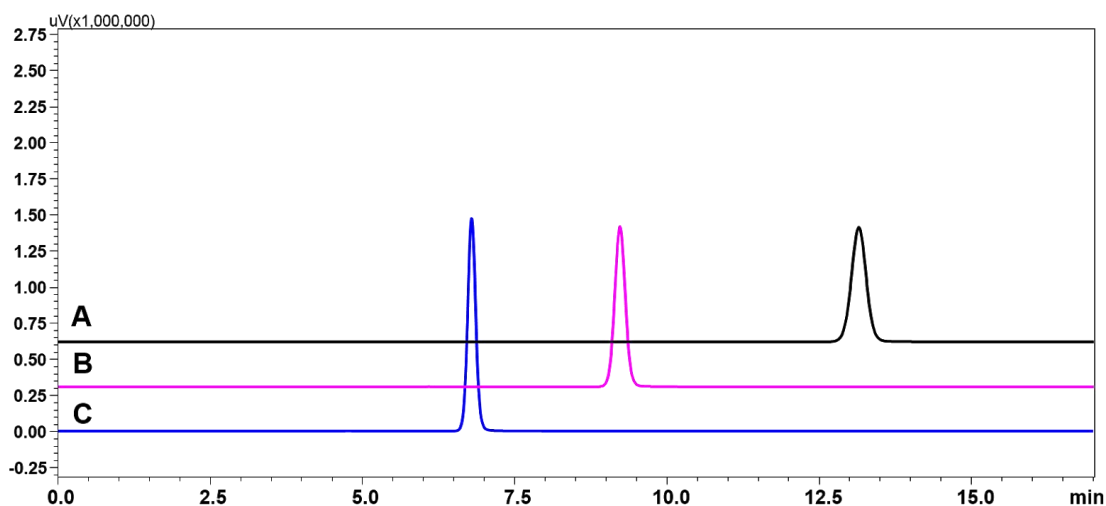


Figura 11: Cromatogramas representativos da análise de chalcona LC 04 em diferentes proporções da fase móvel (acetonitrila: água ultrapura), sendo (A) 50:50; (B) 55:45 e (C) 60:40. Demais condições cromatográficas foram vazão de 1 mL/min, detecção a 428 nm, temperatura de 35 °C e volume de injeção de 10 µL.

Para avaliar a seletividade de fases móveis que empregam a mistura metanol: água e no intuito de manter a mesma força cromatográfica, foram realizados cálculos empregando a equação da força total do solvente na mistura (**Equação 1**).

$$S_T = S_{\text{met}}\phi_{\text{met}} + S_{\text{agua}}\phi_{\text{agua}}$$

Equação 1 Equação da força total do solvente na mistura, na qual S_T = força total do solvente de uma mistura, S_i = fator de peso da força do solvente, ϕ_i = fração volumétrica do solvente i , $S_{\text{ACN}} = 3,2$; $S_{\text{MeOH}} = 2,6$; $S_{\text{água}} = 0$ (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Os cálculos, empregando a **equação 1**, revelaram que as proporções da mistura de acetonitrila/ água ultrapura, de 50:50; 55:45 e 60:40 (v/v), equivalem, em termos de força cromatográfica, as seguintes proporções da mistura metanol/água: 62:38; 68:32 e 74:26 (v/v). Estas proporções foram testadas e os resultados estão apresentados na **Figura 12**.

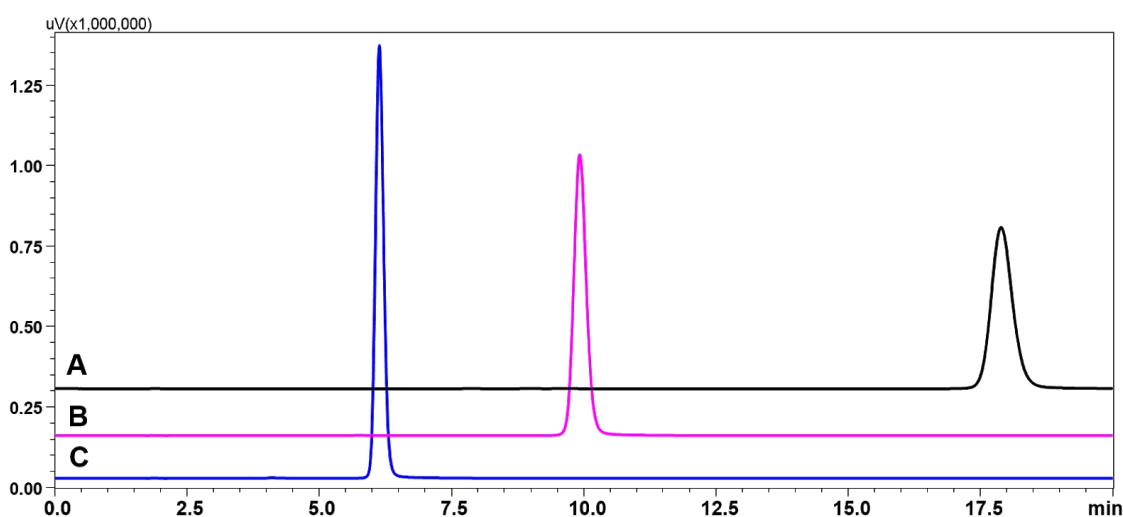


Figura 12: Cromatogramas representativos da análise de chalcona LC 04 em diferentes proporções da fase móvel (metanol: água ultrapura), sendo (A) 62:38; (B) 68:32 e (C) 74:26. Demais condições cromatográficas foram vazão de 1 mL/min, detecção a 428 nm, temperatura de 35 °C e volume de injeção de 10 μ L.

Após análise visual dos cromatogramas empregando mistura acetonitrila/ água (**Figura 11**) e empregando mistura metanol/ água (**Figura 12**) foi observado que com exceção da condição cromatográfica de menor força entre as testadas: acetonitrila/ água (50:50, v/v) e metanol:água (62:38, v/v), as demais apresentaram tempos de retenção semelhantes. E assim, devido ao perfil cromatográfico semelhante, nas duas demais condições e devido ao menor custo e toxidez o metanol foi selecionado para avaliação para definição da fase móvel que apresente parâmetros cromatográficos adequados (CASSINI, et al. 2013).

A fim de definir a condição adequada para o método cromatográfico foram avaliados os seguintes parâmetros de performance cromatográfica: número de pratos, fator de assimetria, resolução e tempo de retenção.

O número de pratos é responsável por medir a eficiência da coluna. O número de pratos é um indicativo de desempenho da coluna. É a medida da largura do pico em relação ao seu tempo de retenção. É o parâmetro que mais precisamente define a qualidade de um sistema cromatográfico. Portanto, quanto maior o número de pratos (N), **equação 2** maior é a eficiência (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Snyder, Kirkland, Doland (2010), definem como valor mínimo aceitável para esse parâmetro 2000 pratos.

O cálculo do número de pratos foi realizado através do *Software LC solution*[®] versão 1.25 SP1, que emprega a seguinte equação:

$$N = 16 (t_R/W_b)^2$$

Equação 2: t_R é o tempo de retenção do pico e W_b é a largura do pico na linha de base (SNYDER; KIRKLAND; DOLAND, 2010).

Para avaliar a influência de diferentes concentrações de metanol sobre o parâmetro número de pratos foi gerado um gráfico (**Figura 13**).

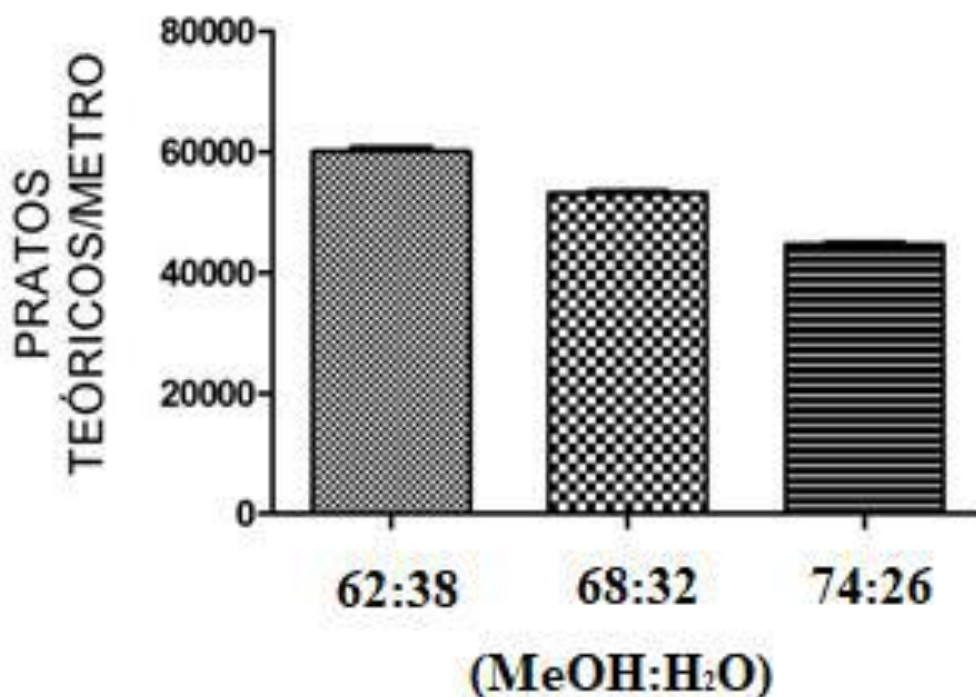


Figura 13: Influência do percentual de metanol sobre o parâmetro cromatográfico da eficiência medida em pratos teóricos ($n=3$). A barra denota o desvio padrão.

Ao avaliar a **figura 13** observamos uma melhor eficiência quando usamos 62% de metanol. Apesar, de todas as condições apresentar número de pratos superior ao mínimo sugerido de 2000 pratos.

Outro parâmetro cromatográfico avaliado foi a assimetria dos picos. A assimetria de picos não deve apresentar valores superiores a 2. Em situações onde o valor ultrapassa 2, pode ser fonte de erro, em integrações, de picos adjacentes, quando estes apresentarem diferentes intensidades de sinal (SNYDER; KIRKLAND; DOLAND, 2010). A simetria dos picos foi calculada pelo fator de assimetria, A_s , calculado a 10% da altura do pico (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

$$A_s = \frac{b}{a}$$

Equação 3: Onde a é a metade proximal do pico e b é a metade distal do pico.

Para avaliar este parâmetro foi gerado um gráfico que compara o valor de assimetria entre diferentes proporções de metanol (**Figura 14**).

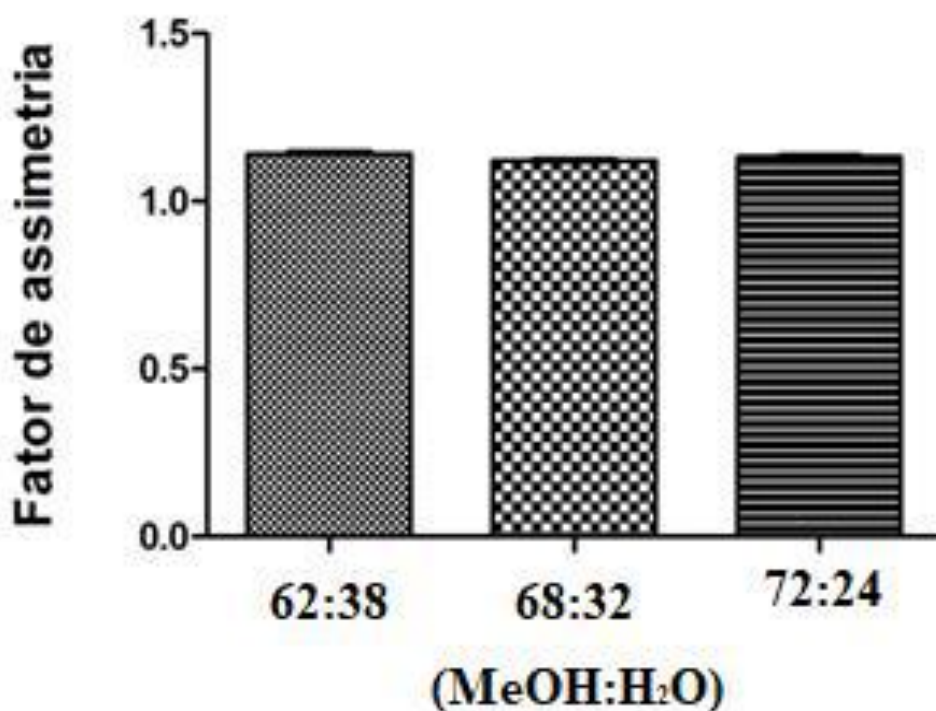


Figura 14: Influência do percentual de metanol sobre o parâmetro cromatográfico fator de assimetria ($n=3$). A barra denota o desvio padrão.

A análise da **figura 14** indica uma sutil, porém menor assimetria, quando empregados 68% de metanol quando comparado ao percentual de 62% e 74%. Em ambas as condições o fator de assimetria foi inferior a 2.

O último parâmetro apresentado é a resolução entre a chalcona LC 04 e uma impureza (**Figura 18A**) com tempo de retenção de aproximadamente 5,7 min. Esse parâmetro descreve a velocidade da análise e pode ser usado como critério de identificação de uma substância. São as forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases, fase móvel e fase estacionária, e são responsáveis pela retenção dos solutos na coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determinam a resolução e, portanto, a separação dos analitos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A literatura recomenda que os valores de resolução sejam superiores a 1,5; a fim de garantir exatidão e precisão na integração e quantificação dos picos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAND, 2010). O cálculo da R_s foi realizado pelo emprego da equação 4:

$$R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{(wb_1 + wb_2)}$$

Equação 4: De acordo com esse parâmetro foi gerado um gráfico para avaliar diferentes concentrações de metanol (**Figura 15**).

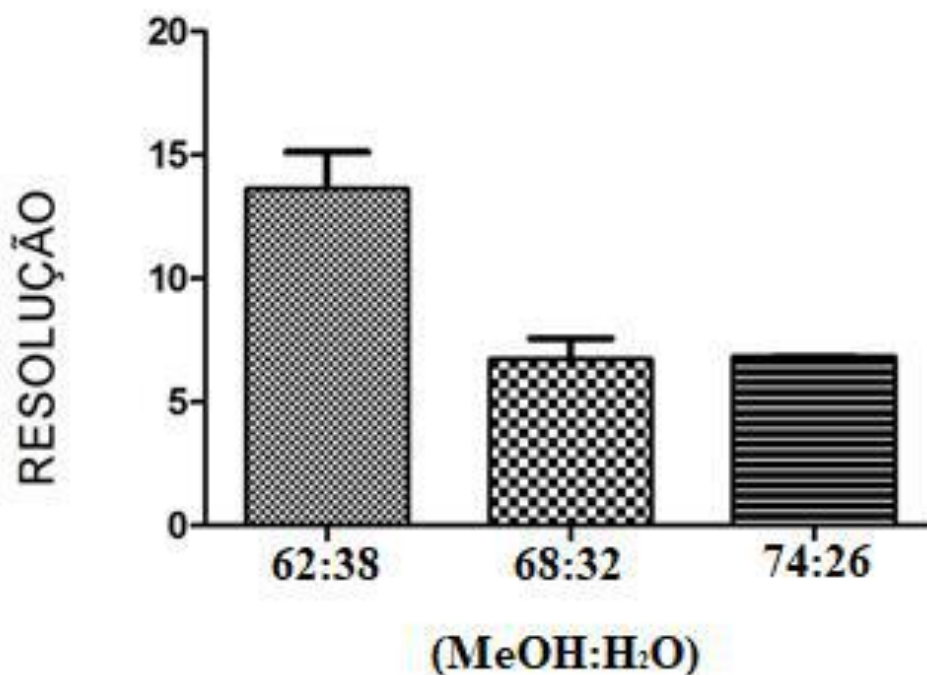


Figura 15: Influência do percentual de metanol sobre o parâmetro cromatográfico da resolução ($n=3$). A barra denota o desvio padrão.

Diante dos resultados apresentados na **figura 15**, observou-se que a proporção de metanol/água ultrapura (62:38) foi a que obteve os melhores valores do parâmetro apresentado. Para desenvolver um método para ser aplicado em estudos de metabolismo, quando se emprega o mecanismo de fase reversa é necessário o desenvolvimento de métodos que apresentem tempos de retenção bastante superiores ao tempo de volume morto. A fim de permitir a separação dos prováveis metabólitos que na maioria das vezes são mais polares e apresentam menor retenção que o substrato (Chalcona LC04). Sabendo disso, como podemos observar na **figura 16**, a condição com 74% de metanol, tem menor tempo de retenção, porém a mais próxima do volume morto. Em contrapartida, a condição de 62% tem tempo de retenção muito longo, o que pode ser inconveniente pois aumenta o tempo de máquina e consumo de solventes. E por fim, a proporção metanol: água ultrapura (68:32, v/v) foi a condição selecionada.

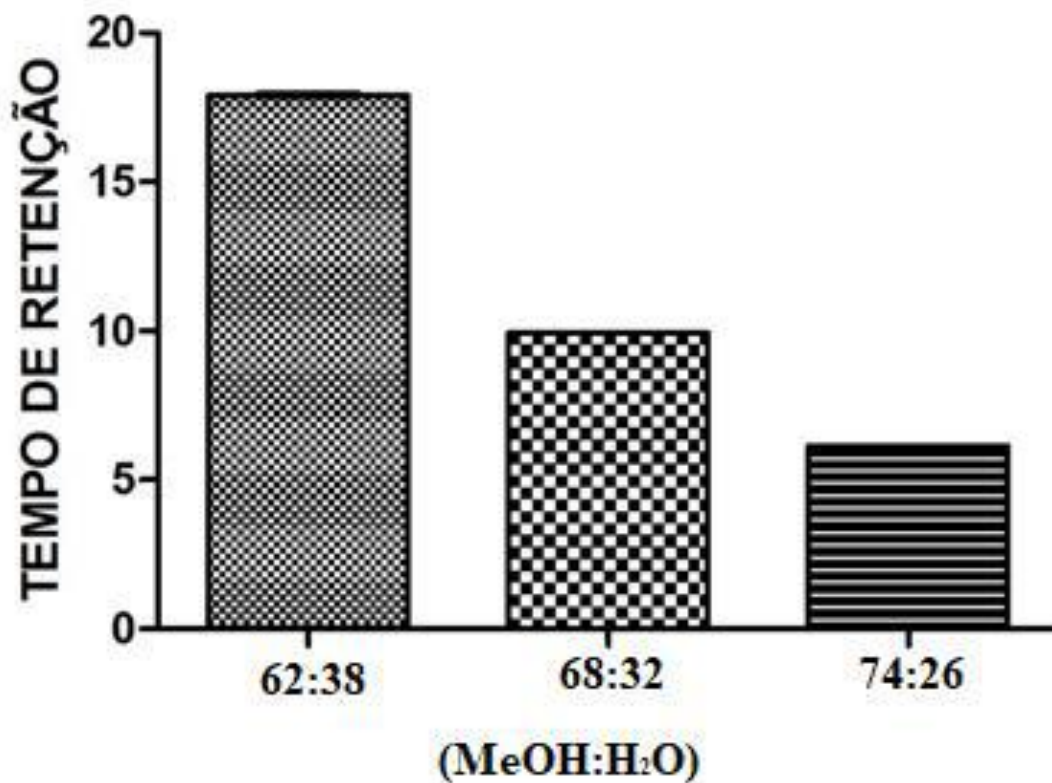


Figura 16: Influência do percentual de metanol sobre o parâmetro cromatográfico de tempo de retenção ($n=3$). A barra denota o desvio padrão.

Assim, as condições cromatográficas otimizadas estão apresentadas na **tabela 1**.

Tabela 1. Condições cromatográficas otimizadas.

Parâmetro	Condições de análise
Coluna	Synergi® C18 (150 x 4,6 mm; 4 μ m)
Fase móvel (FM)	68:32 (v/v)
Vazão	1 mL/min
Volume de injeção	10 μ L
Temperatura de análise	35°C
Deteção UV	254 e 428 nm

5.2 Otimização da extração líquido-líquido da chalcona LC04

Uma vez otimizado o método cromatográfico, partiu-se à otimização da extração da chalcona LC04 a partir do meio de incubação com microsomas hepáticos de ratos. A fim de obter uma melhor recuperação do analito livre de interferentes da matriz (meio de incubação microsomal) pela técnica de extração líquido-líquido, se faz necessário avaliar parâmetros, tais como: tipo de solvente extrator, razão de fases e tempo de agitação (BARTH et al., 2014).

O primeiro parâmetro avaliado foi a escolha do solvente extrator. Para isso foram testados três diferentes solventes: acetato de etila, éter metil terc-butílico (MTBE) e *n*-hexano (Figura 17).

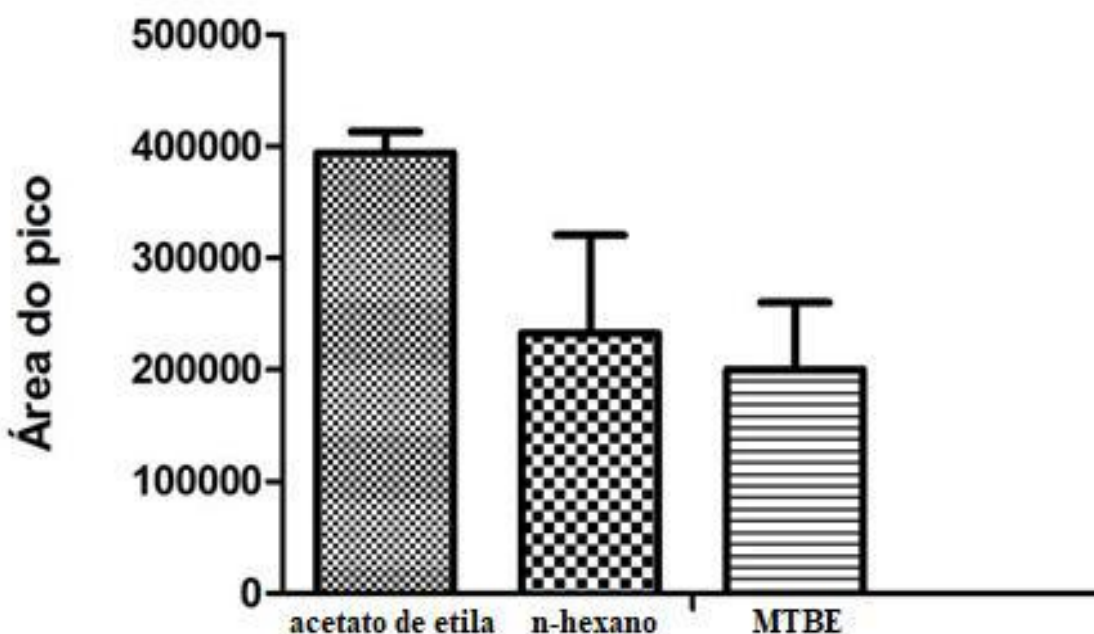


Figura 17: Otimização do parâmetro de extração líquido-líquido da seleção do solvente extrator da chalcona LC 04 a partir de meio de incubação microsomal ($n= 5$). A barra denota o desvio padrão.

Além de recuperar a maior quantidade possível do analito é importante que o solvente não extraia componentes endógenos com o mesmo tempo de retenção do analito (chalcona LC04), ou seja, apresente seletividade para o analito. Na figura 18 podemos observar que os solventes acetato de etila (B) e MTBE (D) apresentaram cromatogramas livre de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito. Já o solvente *n*-hexano (C) apresentou interferente no mesmo tempo de retenção do analito. Dessa forma, por apresentar a maior recuperação e ser seletivo, o solvente selecionado para a seguinte etapa foi o acetato de etila.

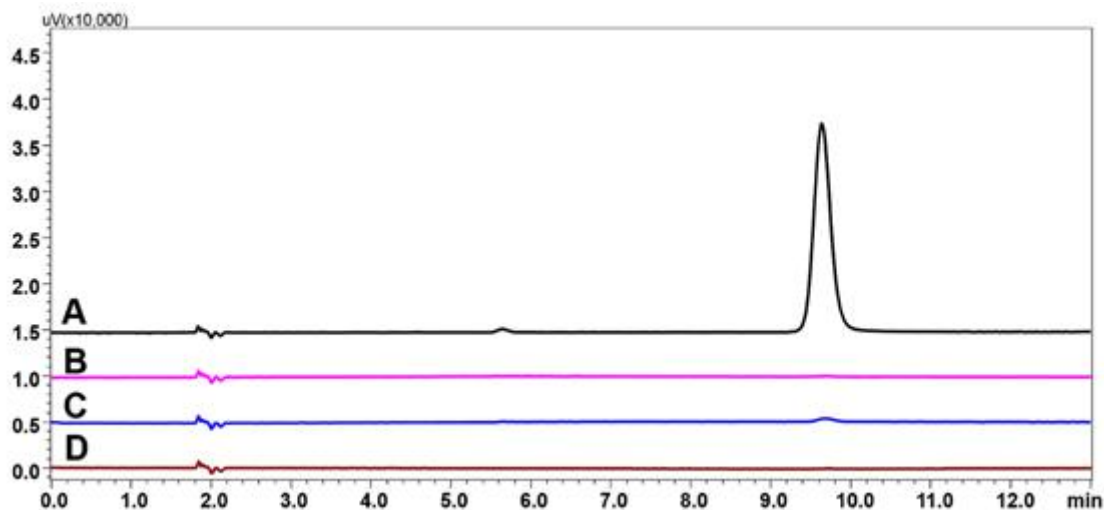


Figura 18: (A) Cromatograma representativo da análise da solução de chalcona LC 04 na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Amostra branco, não fortificada com a chalcona LC 04, extraída com (B) acetato de etila; (C) n-hexano; (D) MTBE.

O segundo parâmetro avaliado foi a razão de fases, na qual, se avalia a recuperação do analito, com diferentes proporções de volume entre a fase aquosa e orgânica, isto porque a quantidade extraída é influenciada pelo volume do solvente (BARTH et al., 2014). As razões de fases testadas foram de 4:1, 3:1 e 2:1. Sendo, 4:1, 2 mL de acetato de etila para 500 μL da amostra; 3:1, 1,5 mL de acetato de etila para 500 μL da amostra; 2:1, 1 mL de acetato de etila para 500 μL da amostra (**Figura 19**).

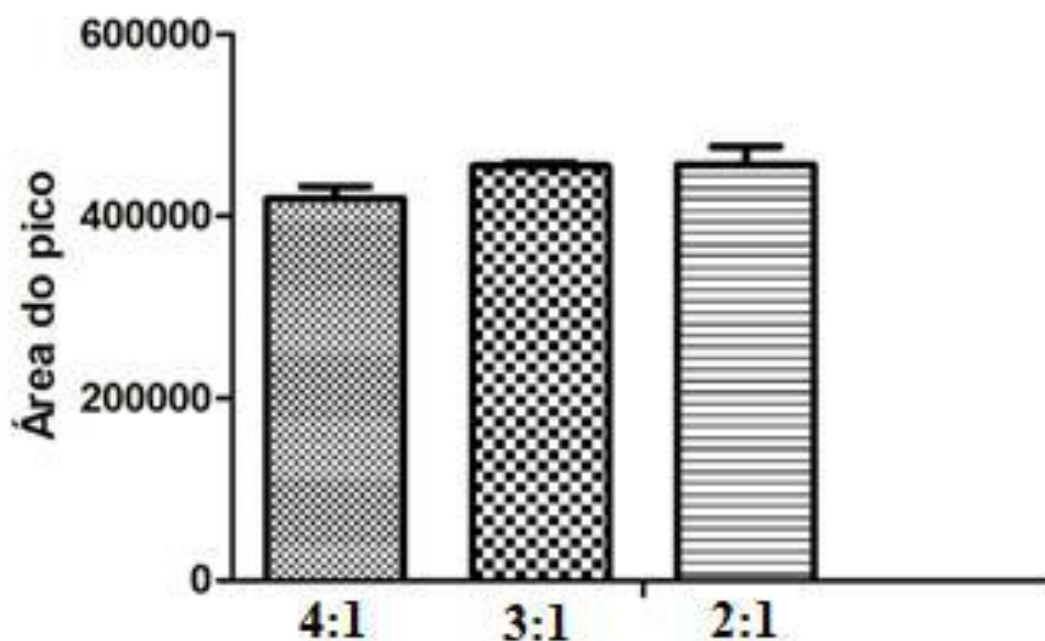


Figura 19: Otimização do parâmetro de extração líquido-líquido da razão volumétrica entre a fase aquosa e orgânica da chalcona LC 04 a partir de meio de incubação microsomal ($n= 5$). A barra denota o desvio padrão.

A razão de fases selecionada foi de 3:1. Apesar de a razão 2:1 ter apresentado resultado de recuperação semelhante, a precisão foi menor, o que pode ser observado ao analisar a barra que apresenta um desvio padrão maior (**Figura 19**). E dessa forma, a razão 3:1 foi selecionada e empregada na avaliação do parâmetro seguinte.

O último parâmetro avaliado foi o tempo de agitação em vórtex, este parâmetro é importante pois influencia a transferência de massa do analito de uma fase a outra (BARTH, et al., 2014). Na avaliação deste parâmetro foram testados os tempos de agitação de 60, 45 e 30 segundos (**Figura 20**).

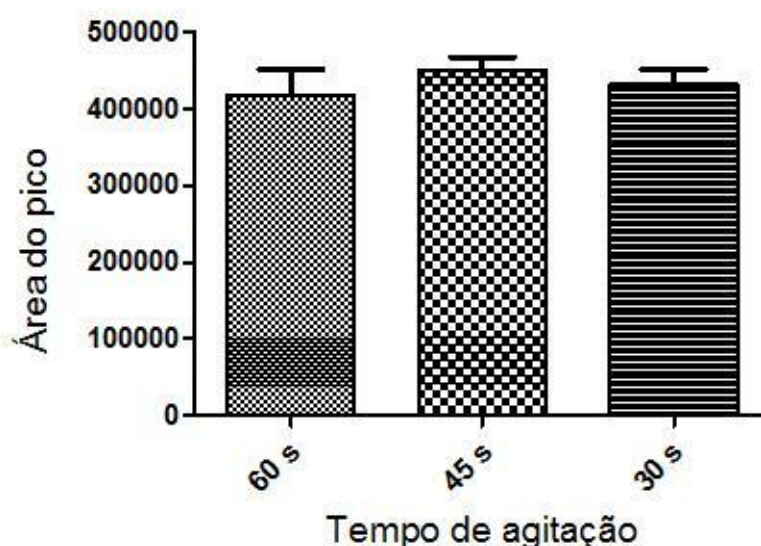


Figura 20: Otimização do parâmetro de extração líquido-líquido tempo de agitação para extração da chalcona LC 04 a partir de meio de incubação microsossomal ($n= 5$). A barra denota o desvio padrão.

Ao analisar a **figura 20** é possível observar que o tempo de agitação de 45 segundos apresentou a maior recuperação do analito e foi a condição selecionada para o parâmetro tempo de agitação.

Na **Tabela 2** estão apresentados os parâmetros otimizados para o método de extração líquido-líquido.

Tabela 2. Condições otimizadas para o procedimento de extração líquido-líquido.

Parâmetro	Condição otimizada
Solvente (volume)	Acetato de etila (1,5 mL)
Tempo de agitação	45 s
Rotação e tempo de centrifugação	3000 rpm/5 min
Procedimento de evaporação	Fluxo de ar comprimido
Volume recuperado	1,125 mL
Dissolução dos resíduos (Volume)	500 μ L de fase móvel – MeOH:H ₂ O (68:32, v/v)

Nas condições otimizadas, apresentadas na **tabela 2**, foi observada uma recuperação de 92,4 % com coeficiente de variação percentual de 7,6% ($n= 5$), livre de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito.

5.3. Estudo da biotransformação *in vitro* da chalcona LC04 empregando microsomas hepáticos de ratos

Os ensaios de metabolismo *in vitro* são realizados em meio aquoso contendo solução tampão fosfato, fração microsomal e cofatores preparados em tampão Tris. E para que as reações de biotransformação ocorram é necessário que o substrato (LC04) esteja em solução. Desta forma, com a finalidade de avaliar o solvente que seria empregado no preparo das soluções da chalcona LC04 foram avaliadas, visualmente, sua solubilidade em acetonitrila e sua mistura com água na proporção (50:50) e (25:75). Entre os solventes que podem ser empregados na solubilização de substâncias lipofílicas no meio de incubação microsomal temos o metanol, acetona, etanol, dimetilsulfóxido e acetonitrila (VENKATAKRISHNAN; Von MOLTKE; GREENBLATT, 2001). A ACN foi testada com base na avaliação do efeito inibitório dos solventes metanol, acetona, etanol, dimetilsulfóxido e acetonitrila sobre CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E e CYP3A empregando microsomas hepáticos de ratos realizada por Li e colaboradores (2010). Neste trabalho, os autores observaram, dentre os solventes testados, que a acetonitrila consiste na melhor escolha. Pois, a acetonitrila não apresenta inibição em concentrações < 1% (LI et al., 2010).

Com isso, foi verificado que a chalcona LC04 dissolveu em acetonitrila pura e na mistura acetonitrila: água (50:50), pois após período de 24 h não foi observada a formação de precipitado ou turbidez.

Nos procedimentos de biotransformação por microsomas hepáticos de ratos foram empregados um volume de 25 µL de solução de trabalho da chalcona LC04 (200 µg/mL), preparada em acetonitrila: água (50:50). Este volume (25 µL) foi adicionado ao meio de incubação microsomal (volume final de 0,5 mL), resultando em uma concentração de 2,5% de acetonitrila. Volumes inferiores de solução de trabalho não foram usados a fim de limitar erros analíticos no meio de incubação microsomal. Esta concentração de acetonitrila (2,5%) mantém respectivamente 75, 60, 90 e 100% de atividade catalítica das enzimas CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E e CYP3A, respectivamente (LI et al., 2010). Mesmo conhecendo que algumas CYP poderiam estar parcialmente inibidas, avaliou-se o custo-benefício, e deu-se continuidade aos experimentos nesta concentração de ACN, já que as reações somente se processam em solução aquosa. Sendo assim, soluções estoque e de trabalho da chalcona LC04 foram preparadas em ACN: água (50:50, v/v).

5.3.1. Análise por CLAE-DAD

As amostras provenientes do estudo de metabolismo e seus controles foram submetidas a análise cromatográfica empregando a técnica de CLAE-DAD a fim de monitorar a formação de metabólitos provenientes da biotransformação *in vitro* da chalcona LC04 empregando microsomas hepáticos de ratos.

O metabolismo da chalcona LC04 foi monitorado através da comparação entre o perfil cromatográfico da amostra controle (amostra sem microsomas hepáticos, portanto, não sofreram biotransformação) e biotransformada, adicionadas de microsomas hepáticos. Também foi avaliada a diminuição da área da chalcona LC04 biotransformada quando comparada a amostra controle (**Figuras 21 e 22**).

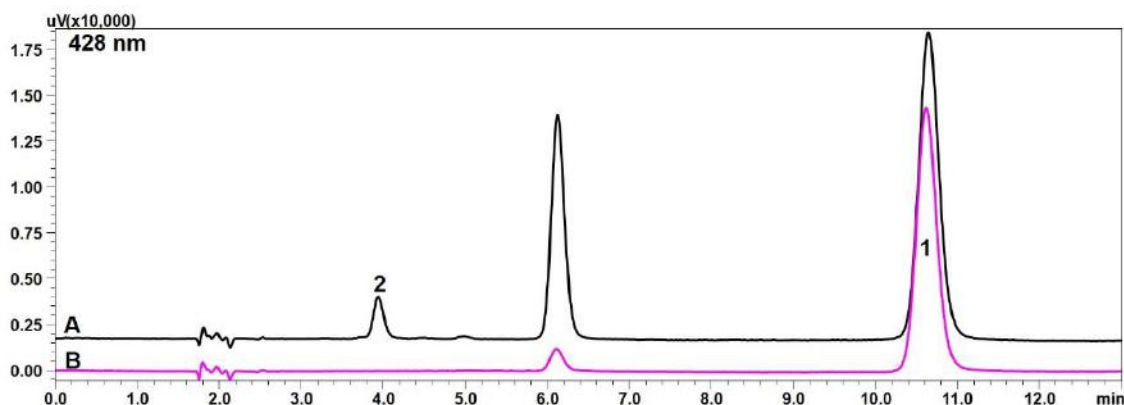


Figura 21: Cromatograma representativo das amostras submetidas à biotransformação *in vitro*. (A) representa a amostra biotransformada preparadas na presença de microsomas hepáticos de rato ($n= 10$) e (B) representa a amostra controle preparadas na ausência de microsoma hepáticos ($n= 3$) e, as quais foram analisadas por CLAE-DAD. Condições de incubação: concentração de proteínas microsossomais de 1 mg/mL e tempo de incubação 60 minutos. Condições de análise: Coluna Synergi C₁₈ (150 x 4,6 mm; 4 μ m) e fase móvel composta por metanol e água ultrapura (68:32, v/v); vazão de 1 mL/min; volume de injeção de 10 μ L e detecção no UV em 428 nm. Solvente extrator: acetato de etila. Pico 1: Chalcona LC04; Pico 2: Provável metabólito da chalcona LC04.

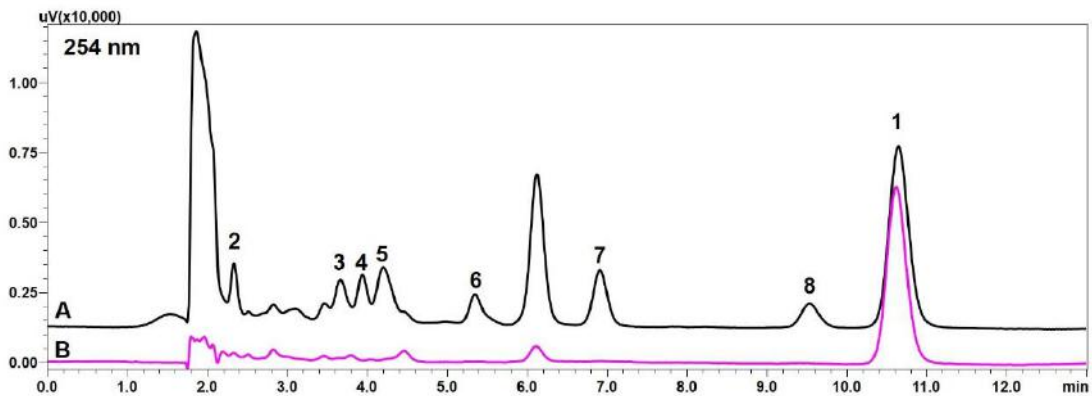


Figura 22- Cromatograma representativo das amostras submetidas à biotransformação *in vitro*. (A) representa a amostra biotransformada preparadas na presença de microsossomas hepáticos de rato ($n= 10$) e (B) representa a amostra controle preparadas na ausência de microsossoma hepáticos ($n= 3$) e, as quais foram analisadas por CLAE-DAD. Condições de incubação: concentração de proteínas microsossomais de 1 mg/mL e tempo de 60 minutos. Condições de análise: Coluna Synergi C₁₈ (150 x 4,6 mm; 4 μ m) e fase móvel composta por metanol e água ultrapura (68:32, v/v); vazão de 1 mL/min; volume de injeção de 10 μ L e detecção no UV em 254 nm. Solvente extrator: acetato de etila. Pico 1: Chalcona LC04; Picos 2 a 8: Prováveis metabólitos da chalcona LC04.

Ao comparar o perfil cromatográfico notou-se a presença de sete (7) picos no cromatograma da amostra metabolizada, monitorado em 254 nm, que não foram observados na amostra controle, denominados de picos 2 a 8 (**Figura 22**). Ao analisar o mesmo cromatograma em 428 nm, comprimento de onda de máxima absorção da chalcona LC04, um único pico diferente aos do controle foram observados (**Figura 21**). Para corroborar com estas informações o espectro de absorção molecular no UV da chalcona LC04, bem como dos 7 prováveis metabólitos foram obtidos (**Figura 23**). Nela observamos, que somente o pico da chalcona LC04 e do provável metabólito com tempo de retenção de aproximadamente 4 min (**Figuras 21A e 22A**), apresenta banda com absorção em 428 nm (**Figura 23 A e D**).

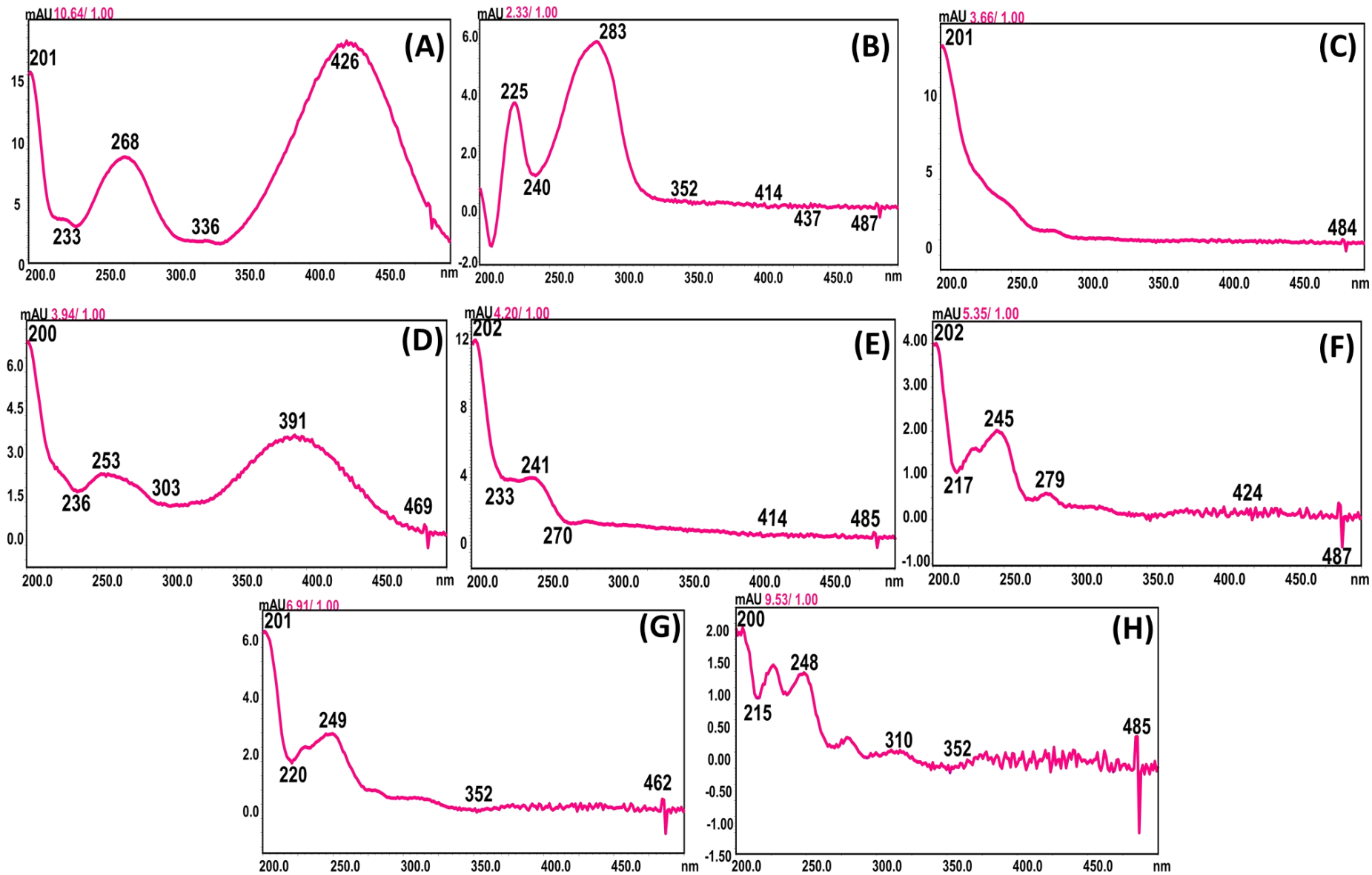


Figura 23: Espectro de absorção no ultravioleta da chalcona LC 04 (A) e de seus prováveis metabólitos (B- Pico 2, C- Pico 3, D- Pico 4, E- Pico 5, F- Pico 6 e G- Pico 7). Referentes a figura 22A.

As chalconas apresentam duas bandas de absorção características conhecidas como, banda I (300-380 nm), que está associada à absorção do sistema cinamoil do anel B, e a banda II (240-280 nm), ocasionada pela absorção do sistema benzoil do anel A (Figura 24) (CHAGAS et al., 2014).

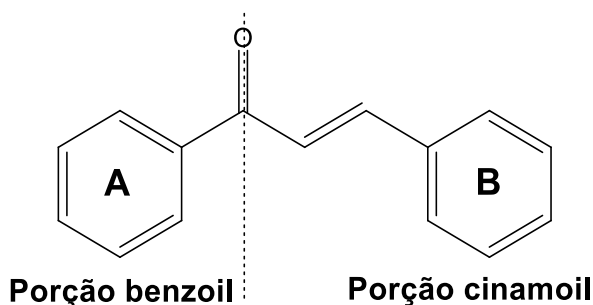


Figura 24: Estrutura básica de chalconas e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.

Ao analisarmos o cromatograma (Figuras 21A) observamos o surgimento de um único pico não detectado nos controles empregando a detecção em 428 nm. O que pode indicar, que a transformação da chalcona LC04 que resultou em sua formação manteve a insaturação da porção cinamoil da chalcona LC04 (Figura 24). Por outro lado, quando analisarmos o cromatograma (Figura 22A) cuja detecção foi em 254 nm, observamos a presença de sete prováveis metabólitos, destes com exceção do pico com t_R de aproximadamente 4 minutos, que também absorveu radiação em 428 nm, os demais somente foram monitorados em 254 nm. Além disso

Isto pode indicar, que a reação de transformação da chalcona LC04 que resultou em suas formações levou a modificações químicas na insaturação na porção cinamoil da molécula da chalcona LC04 e ausência da banda de absorção em 428 nm. Portanto, conforme apresentado na Figura 22 a incubação da chalcona LC04 com microssomas hepáticos de ratos levou a formação de 7 possíveis metabólitos, codificados como Pico 2 a 8, os quais não foram observados na amostra controle incubada sem a adição da fração microssomal.

Conforme pode ser observado os dados apresentados na Tabela 3 verificou-se a transformação de 6,96; 3,05; 7,82; 7,69; 5,65; 11,19 e 6,11%, para os metabólitos representados pelos picos 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente, a partir da substância precursora, chalcona LC04.

Após essas observações, prosseguiu-se para análise do espectro de massas da chalcona LC04 e seus metabólitos com o objetivo de propor a estrutura química dos prováveis metabólitos formados.

Tabela 3. Porcentagem relativa de formação dos prováveis metabólitos da chalcona LC 04.

Pico	t _R (min)	Área relativa (%)*
1 (LC04)	10,6	51,45
2	2,3	6,96
3	3,4	3,05
4	3,6	7,82
5	3,9	7,69
6	5,3	5,65
7	6,9	11,19
8	9,5	6,11

*Detecção em 254 nm.

5.3.2. Análise por CLUE-DAD-EM

Após a análise por CLAE-DAD as amostras da chalcona LC04 biotransformada e seu controle foram submetidas a análise por CLUE-DAD-EM e seus cromatogramas foram sobrepostos (**Figura 25**). Analisando os cromatogramas com detecção em 254 nm é possível observar 5 picos, não detectados no controle, os quais podem ser considerados possíveis metabólitos da chalcona LC04 e foram codificados como M1 a M5. Por sua vez, no comprimento de onda de 428 nm foram observados 2 picos (M4 e M5), os quais receberam códigos coincidentes àqueles detectados em 254 nm, pois apresentam os mesmos tempos de retenção e foram considerados os mesmos metabólitos.

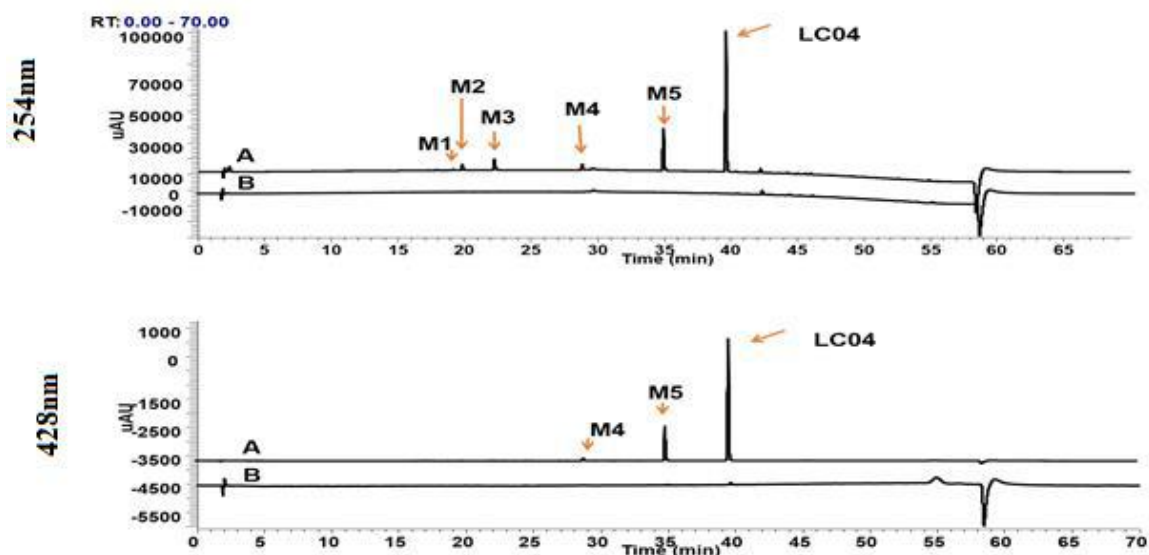


Figura 25: (A) Cromatograma representativo do metabolismo da chalcona LC04 em microsossomas hepáticos de ratos. (B) Controle do metabolismo (ausência de microsossomas). Detecção no UV em 254 nm (acima) e 428 nm (abaixo). No quadro em destaque o espectro de UV da chalcona LC04.

5.3.2.1 Análise estrutural da chalcona LC04

A fim de propor as estruturas para os possíveis picos de metabólitos observados nos cromatogramas, faz-se necessário um estudo acerca da estrutura da chalcona LC04 (substância precursora), uma vez que através desta, é possível identificar modificações nas estruturas dos possíveis metabólitos formados. A chalcona LC04 apresenta peso molecular de 251 g/mol. Consequentemente revelou, após ionização no modo eletrospray positivo, uma molécula protonada $[M + H]^+$ com m/z de 252 e íon fragmento majoritário com m/z 105 (**Figura 26**), que pode ser considerado como íon diagnóstico para chalconas não substituídas na porção benzóil (Anel A) (**Figura 24**).

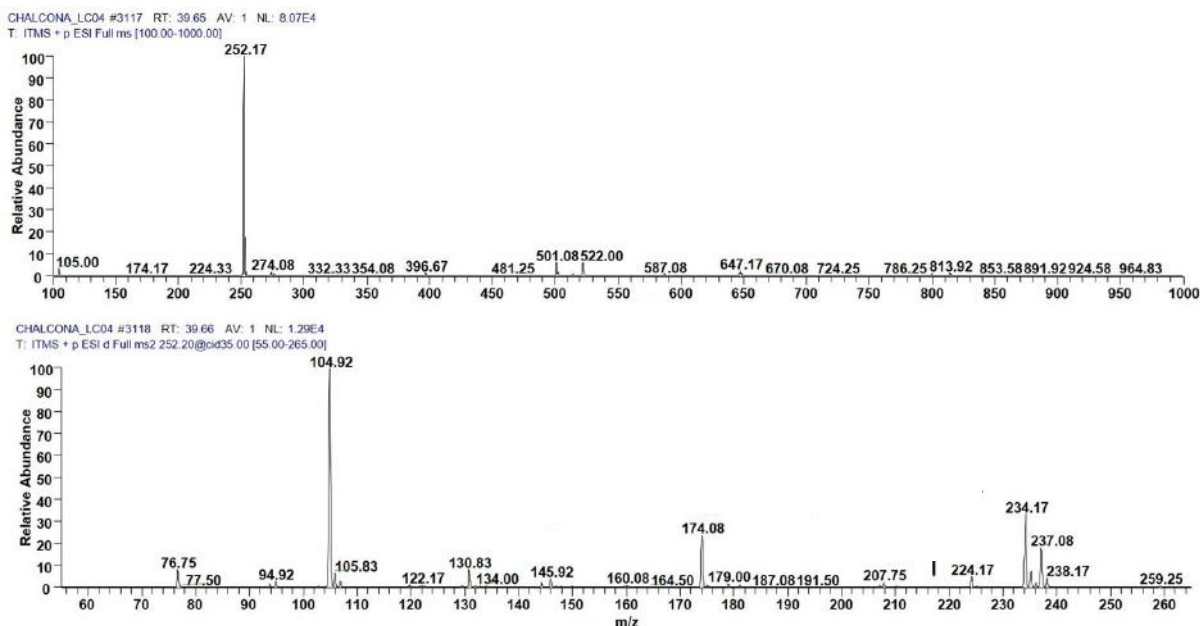


Figura 26: Espectro de massas da chalcona LC04; ms^1 (acima), ms^2 (abaixo) com t_R 39,6 min no modo de ionização positivo (ESI+).

Com o espectro de massa da chalcona LC04 apresentado na figura 25, destacam-se os íons fragmentos m/z 105 e 174, respectivamente em ordem de intensidade de sinal. A proposta de fragmentação para a formação destes íons segue ilustrada na **Figura 27**.

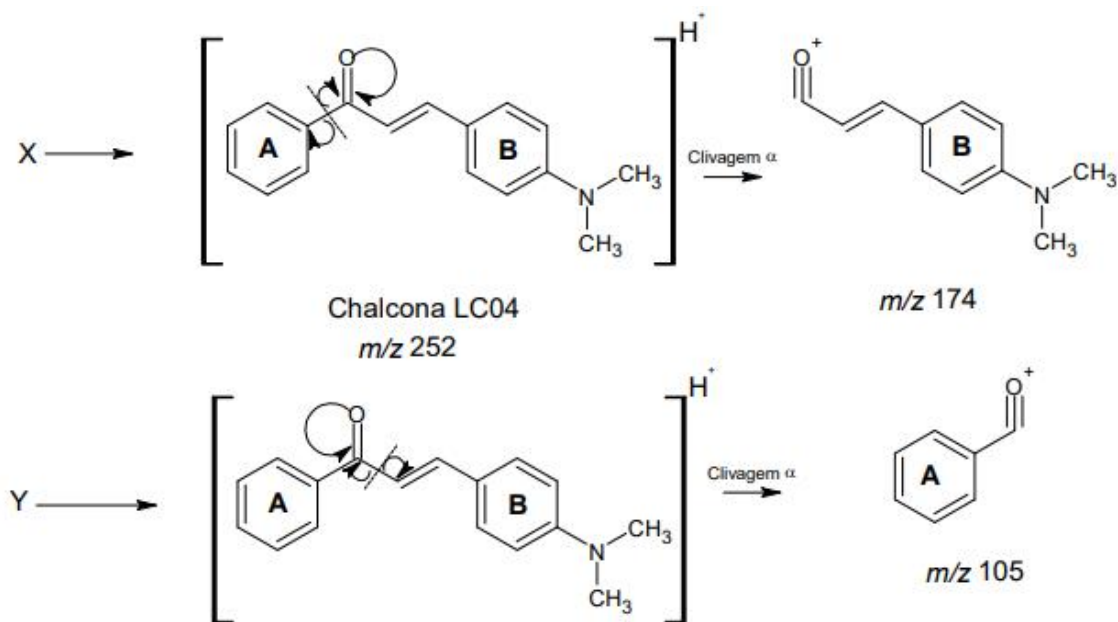


Figura 27: Proposta de fragmentação da chalcona LC04, por ESI +.

Através do mecanismo de fragmentação ilustrado na **figura 27** e admitindo os íons fragmentos citados anteriormente, pode-se observar as clivagens α , características de reações de fragmentação de chalconas (AKSÖZ & ERTAN, 2012; MABRY & MARKHAM, 1975).

5.3.2.2 Análise estrutural do metabólito M1

O metabólito M1, como já relatado anteriormente, absorve radiação UV somente no comprimento de onda de 254 nm. M1 apresentou um acréscimo de 4 Da de massa em relação a chalcona LC04, ou seja, molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z de 256 e íon fragmento majoritário m/z 134 (**Figura 28**), diferentemente da chalcona LC04 que apresenta íon fragmento majoritário com m/z 105.

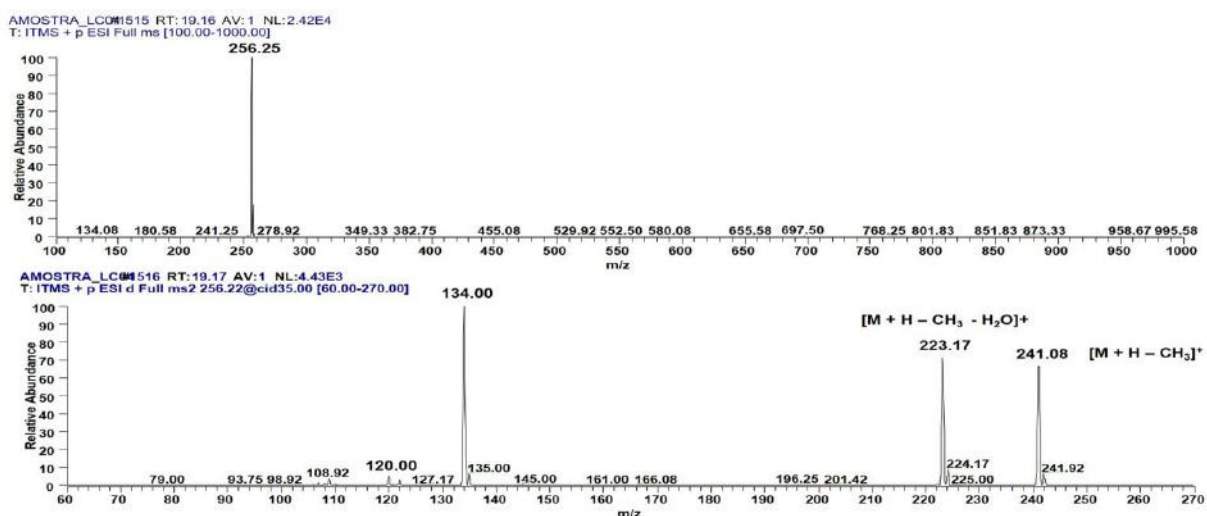


Figura 28: Espectro de massas de M1; ms^1 (acima), ms^2 (abaixo) com t_R 19,16 min no modo de ionização positivo.

Com o espectro de massa de M1 apresentado na **figura 28**, destacam-se os íons fragmentos 134, e 223, 241 e 120 respectivamente em ordem de intensidade de sinal. A proposta de fragmentação para a formação destes íons segue ilustrada na **figura 29**.

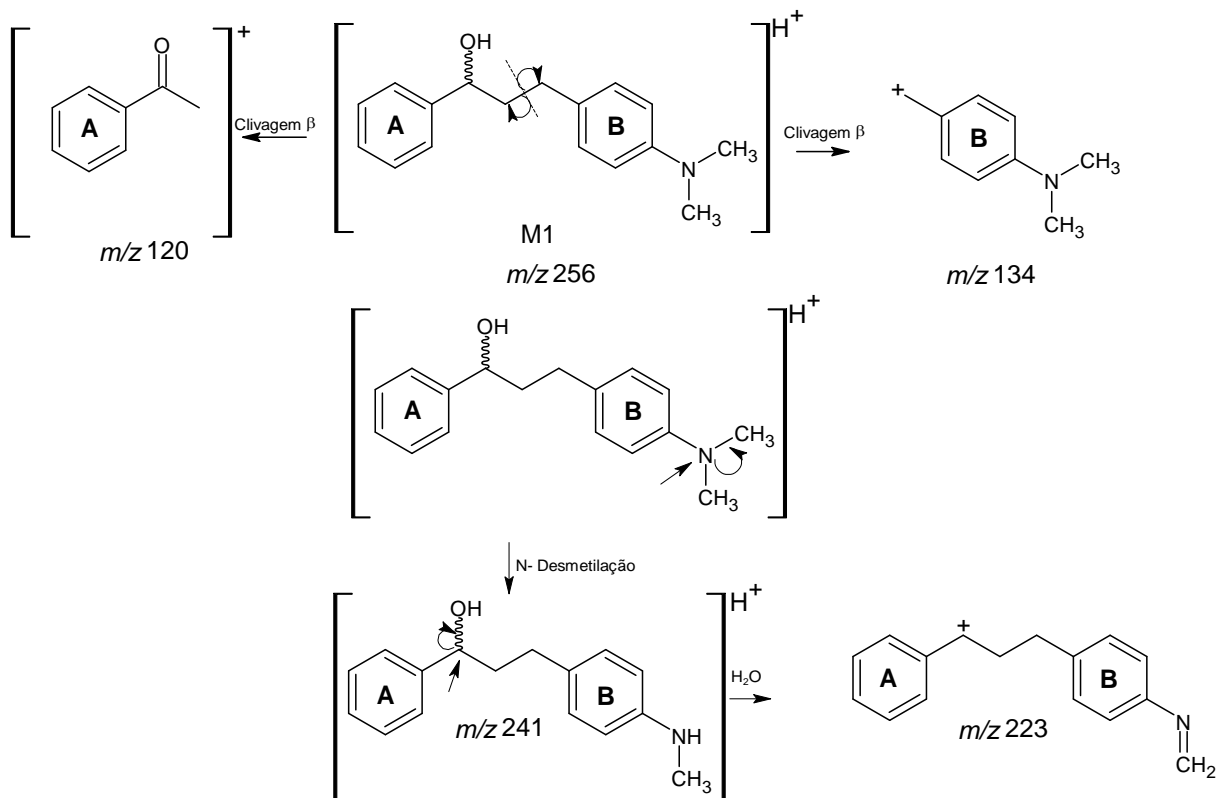


Figura 29: Proposta de fragmentação do metabólito M1, por ESI +.

Com base no espectro apresentado na **figura 28**, acredita-se que ocorreu a redução da dupla ligação (Ausência de absorção em 428 nm), acompanhado de uma redução da função cetona resultando em um álcool quiral (Perda neutra de água, ou seja 18 Da, entre os íons fragmento m/z 241 e 223) cuja conformação absoluta não foi possível confirmar por espectrometria de massas (**Figura 29**).

O possível metabólito M1 é denominado dihidrochalcona. As dihidrochalconas são uma classe de metabólitos secundários, obtidos através da redução regioselectiva da ligação dupla carbono-carbono em cetonas α , β -insaturadas das chalconas. Apesar de suas atividades biológicas, dentre estas: antimicrobiana e antidiabética, devido a escassez em fontes naturais e sua dificuldade por obtenção sintética, não são realizados muitos estudos sobre ela (STOMPOR, M., et al., 2019).

Através do mecanismo de fragmentação ilustrado na **figura 29** e admitindo os íons fragmentos citados anteriormente, observa-se a clivagem β , característico de reações em dihidrochalconas (KAZUNO, S., et al. 2005). Seguida por uma reação de N-desmetilação e a perda da molécula de água.

A estrutura da substância foi submetida a busca na base de dados Pubchem®, entretanto, a busca retornou nenhuma informação (PUBCHEM, 2020a).

5.3.2.3 Análise estrutural do metabólito M2

O metabólito M2, segundo o cromatograma apresentado na **figura 25**, não apresenta absorção de radiação UV em 422 nm. Apresenta molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z de 240, portanto com 12 Da a menos que chalcona LC04. Além disso, seu íon fragmento majoritário possui m/z 120. (**Figura 30**), diferentemente da chalcona LC04 que apresenta íon fragmento majoritário e diagnóstico com m/z 105.

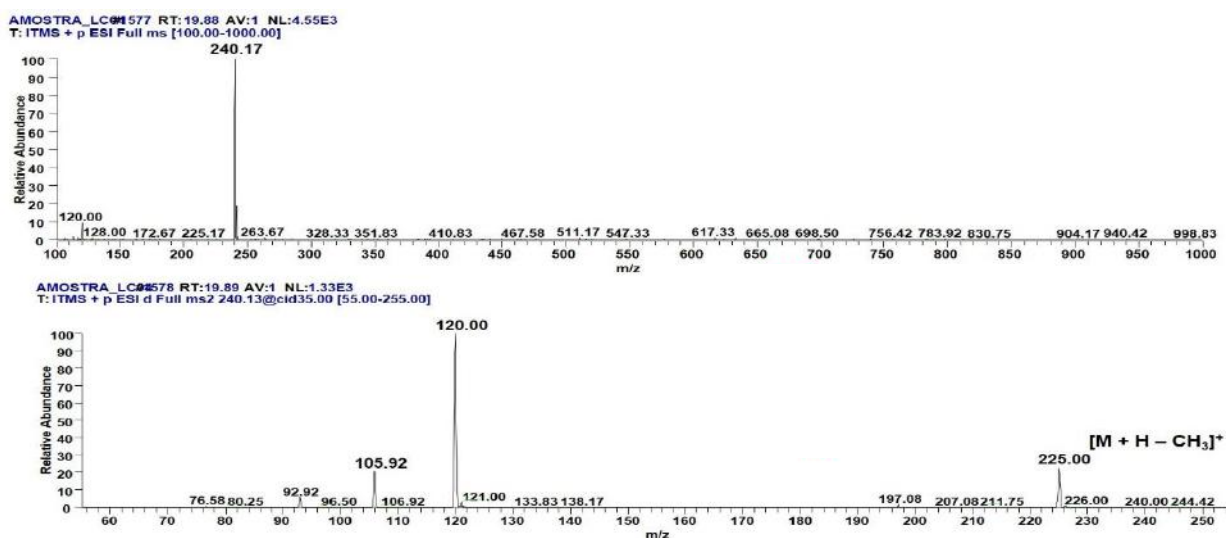


Figura 30: Espectro de massas de M2; ms^1 (acima), ms^2 (abaixo) com t_R 19,88 min no modo de ionização positivo.

O metabólito M2, também apresenta perfil de fragmentação de uma dihidrochalcona e segue o mesmo perfil de fragmentação de M1 (**Figura 29**).

Acredita-se, que a perda de 12 Da, é oriunda da redução da dupla (Ausência de absorção em 428 nm) que resulta na adição de 2 Da e a perda de 14 Da oriunda de uma N-desmetilação (**Figura 31**). Essa estrutura foi buscada na base de dados do site Pubchem®, entretanto, não foi encontrada nenhuma informação.

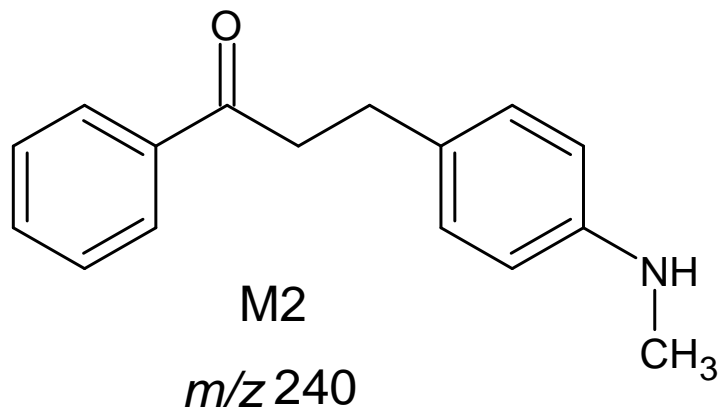


Figura 31: Estrutura química proposta para o metabólito M2 a partir da análise por LC-MS após biotransformação por microsomas hepáticos de rato.

5.3.2.4 Análise estrutural do metabólito M3

O metabólito M3, apresenta molécula protonada $[M+H]^+$ com *m/z* de 254, portanto com um ganho de 2 unidades de massa, comparado a chalcona LC04. M3 não apresenta absorção de UV em 422 nm e possui como íon fragmento majoritário *m/z* 120 também observado em M2 (**Figura 32**), assim seguindo a mesma proposta de fragmentação (**Figura 29**).

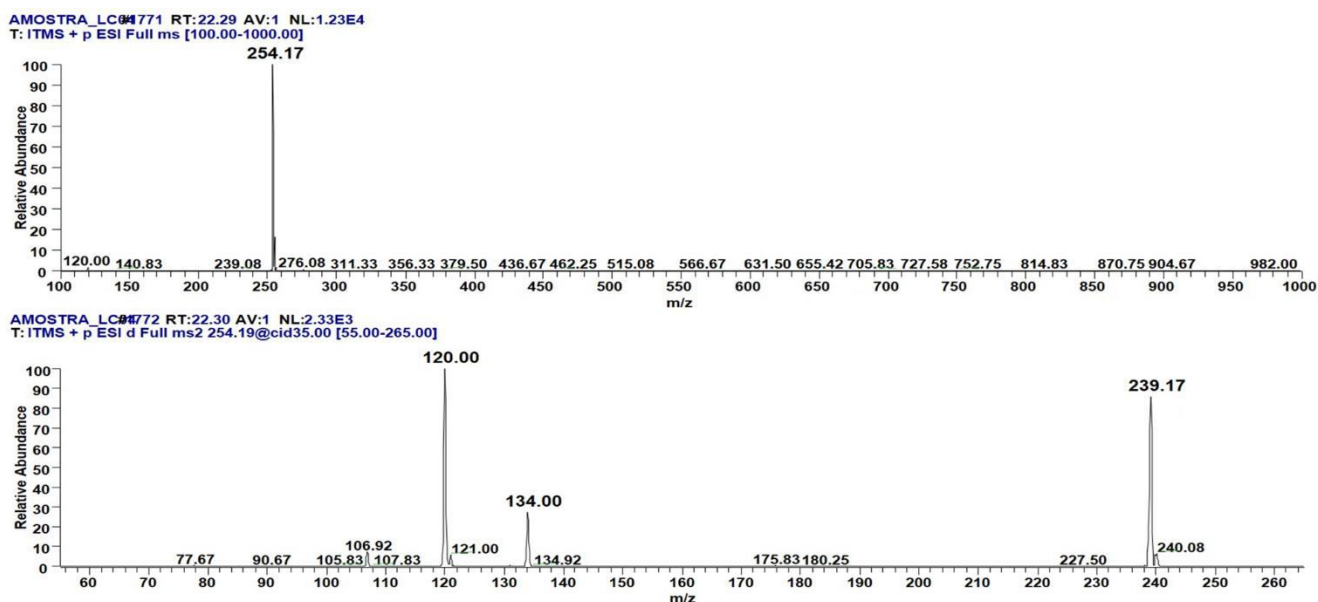


Figura 32: Espectro de massas de M3; ms^1 (acima), ms^2 (abaixo) com t_R 22,3 min no modo de ionização positivo.

Na sugestão da estrutura para M3 atribui-se o ganho de 2 Da decorrentes da redução da dupla ligação, pelo incremento de 2 hidrogênios em sua estrutura quando comparado a chalcona

LC04 (**Figura 33**). Essa estrutura foi buscada na base de dados do site Pubchem® e foi encontrado a descrição desta substância em uma patente dos Estados Unidos. Esta patente trata de estudos sobre inibidores cinamoil da enzima transglutaminase, frente a doença celíaca, que é uma patologia com reação imunológica à ingestão de glúten (PARDIN; KEILLOR; LUBELL, 2010; PUBCHEM, 2020b).

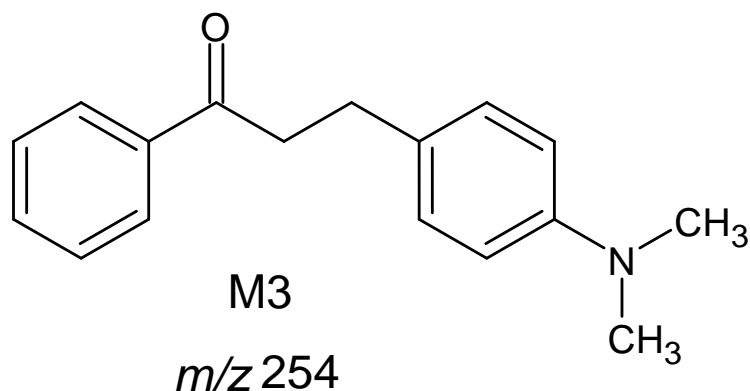


Figura 33: Estrutura química proposta para o metabólito M3 a partir da análise por LC-MS após biotransformação por microsomas hepáticos de rato.

5.3.2.5 Análise estrutural do metabólito M4

O metabólito M4, faz parte dos possíveis metabólitos que aparecem em ambos os cromatogramas (254 e 422 nm), ilustrados na **figura 25**. M4 apresenta redução de 28 Da, comparado com a chalcona LC04. M3, apresenta, portanto, molécula protonada $[M+H]^+$ com *m/z* de 224 (**Figura 34**). Seu íon fragmento majoritário apresenta relação *m/z* de 105, o mesmo observado no espectro da chalcona LC04, assim seguindo a mesma proposta de fragmentação da chalcona LC04 (**Figura 27**).

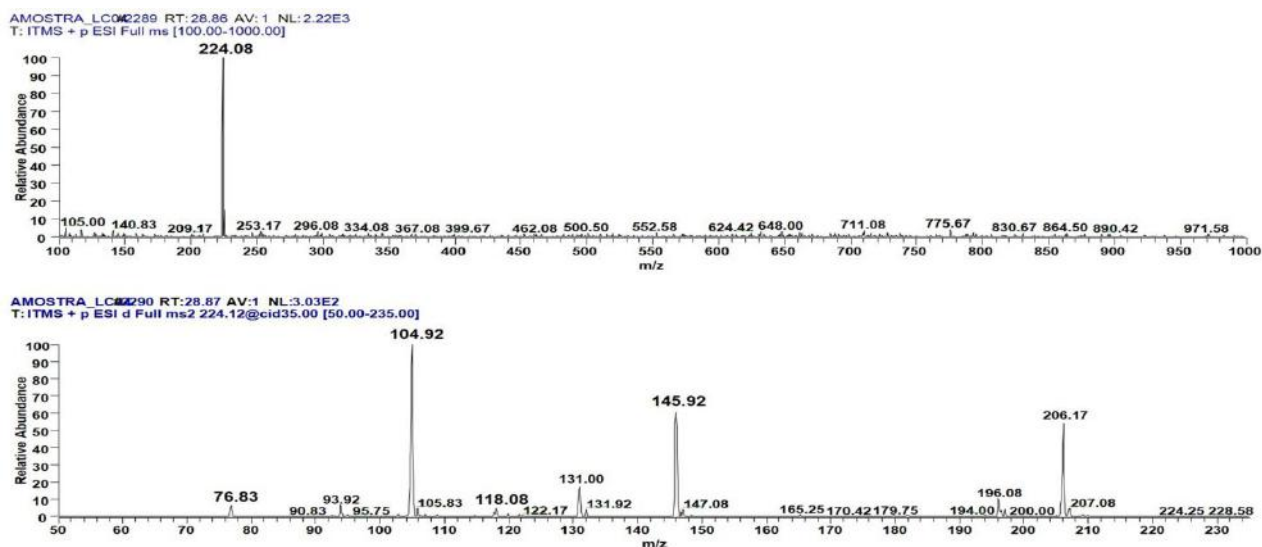


Figura 34: Espectro de massas de M4, ms^1 (acima), ms^2 (abaixo) com t_R 28,87 min no modo de ionização positivo.

A estrutura sugerida para metabólito M4, observada na **figura 35**, deve-se a perda dos 28 Da, provavelmente devido a duas *N*-desmetilações. Essa estrutura foi buscada na base de dados do site Pubchem® e foi encontrada em uma patente Japonesa, com estudos sobre derivados arilalcanos na deficiência de enterocinase, uma enzima do intestino delgado que atua na digestão e na absorção de proteínas (MASATOSHI, SUZUKI, et al., 2007; PUBCHEM, 2020c).

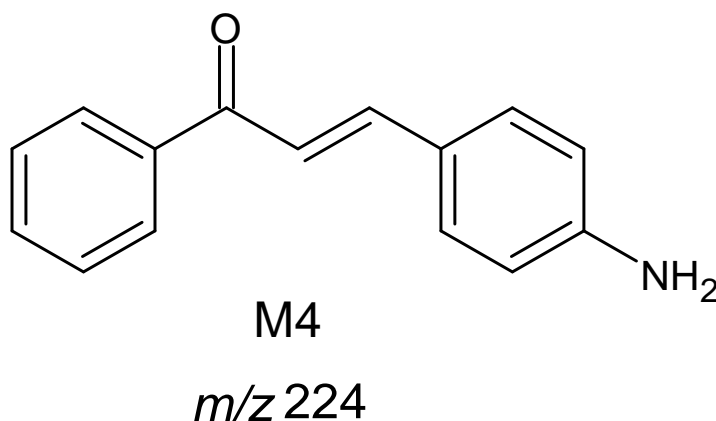


Figura 35: Estrutura química proposta para o metabólito M4 a partir da análise por LC-MS após biotransformação por microsomas hepáticos de rato.

5.3.2.6 Análise estrutural do metabólito M5

O metabólito M5, assim como o possível metabólito M4, absorvem radiação UV tanto em 254 como em 422 nm (**figura 25**). O metabólito M5 apresenta molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z de 238. Possui, portanto, perda de 14 Da em relação a chalcona LC04. M5 apresenta como íon fragmento majoritário o íon de relação m/z 105 (**Figura 36**), o mesmo observado na fragmentação da chalcona LC04 e do metabólito M4, assim seguindo a mesma proposta de fragmentação da chalcona LC04 (**Figura 27**).

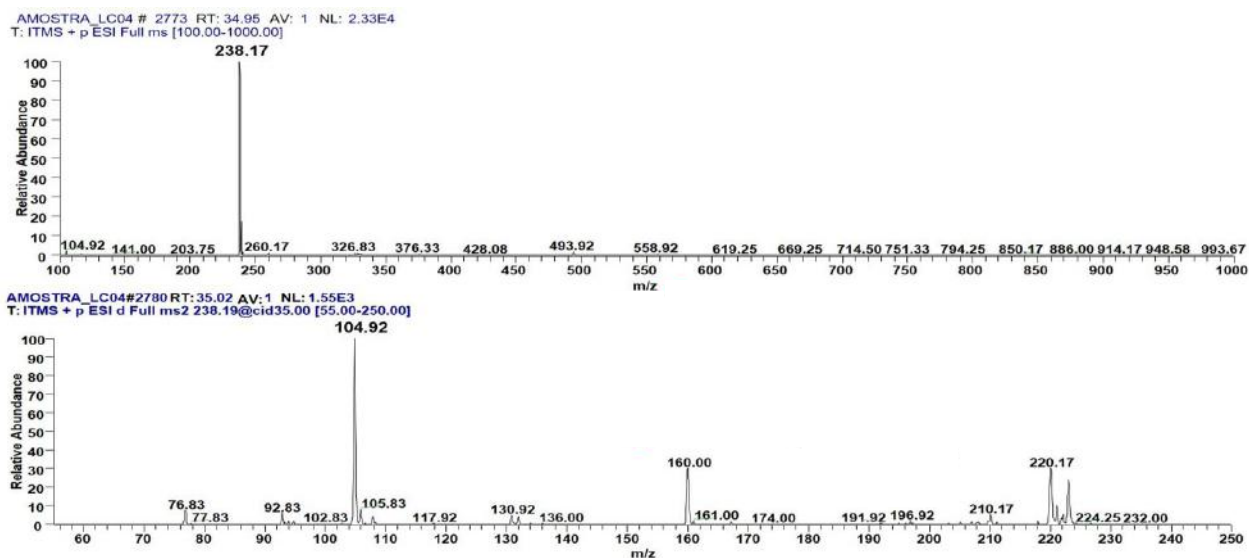


Figura 36: Espectro de massas de M5; ms^1 (acima), ms^2 (abaixo) com t_R 34,96 min no modo de ionização positivo.

Na **figura 37** é apresentada a relação entre a perda de 14 Da da Chalcona LC04 e a estrutura no metabólito M5, indicando a formação de M5 a partir de uma reação de *N*-desmetilação. Essa estrutura foi buscada na base de dados do site Pubchem®, entretanto, não foram encontrados nenhuma informação (PUBCHEM, 2020d).

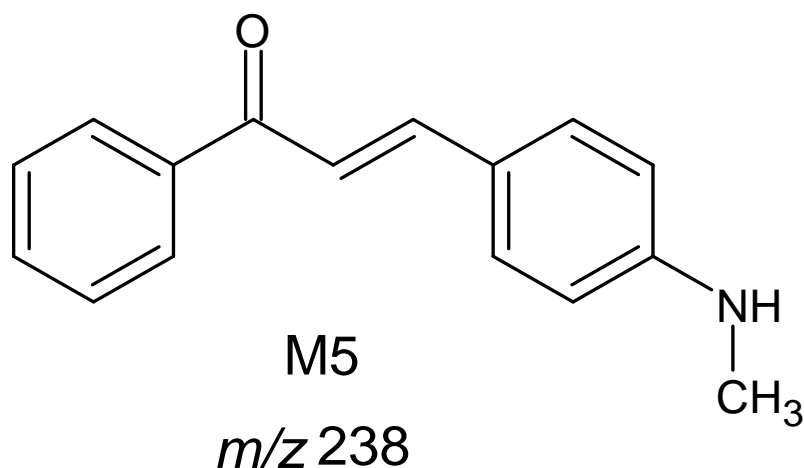


Figura 37: Estrutura química proposta para o metabólito M5 a partir da análise por LC-MS após biotransformação por microsomas hepáticos de rato.

Também é importante ressaltar que reações de *N*-desmetilação, redução de cetonas e isomerização são reações descritas em estudos de biotransformação *in vitro* (GUTTERIDGE, et al. 2011; ZENGER, et al 2015; HUANG, et al 2017). Segue abaixo a **figura 38** com a chalcona LC04 e seu possíveis metabólitos.

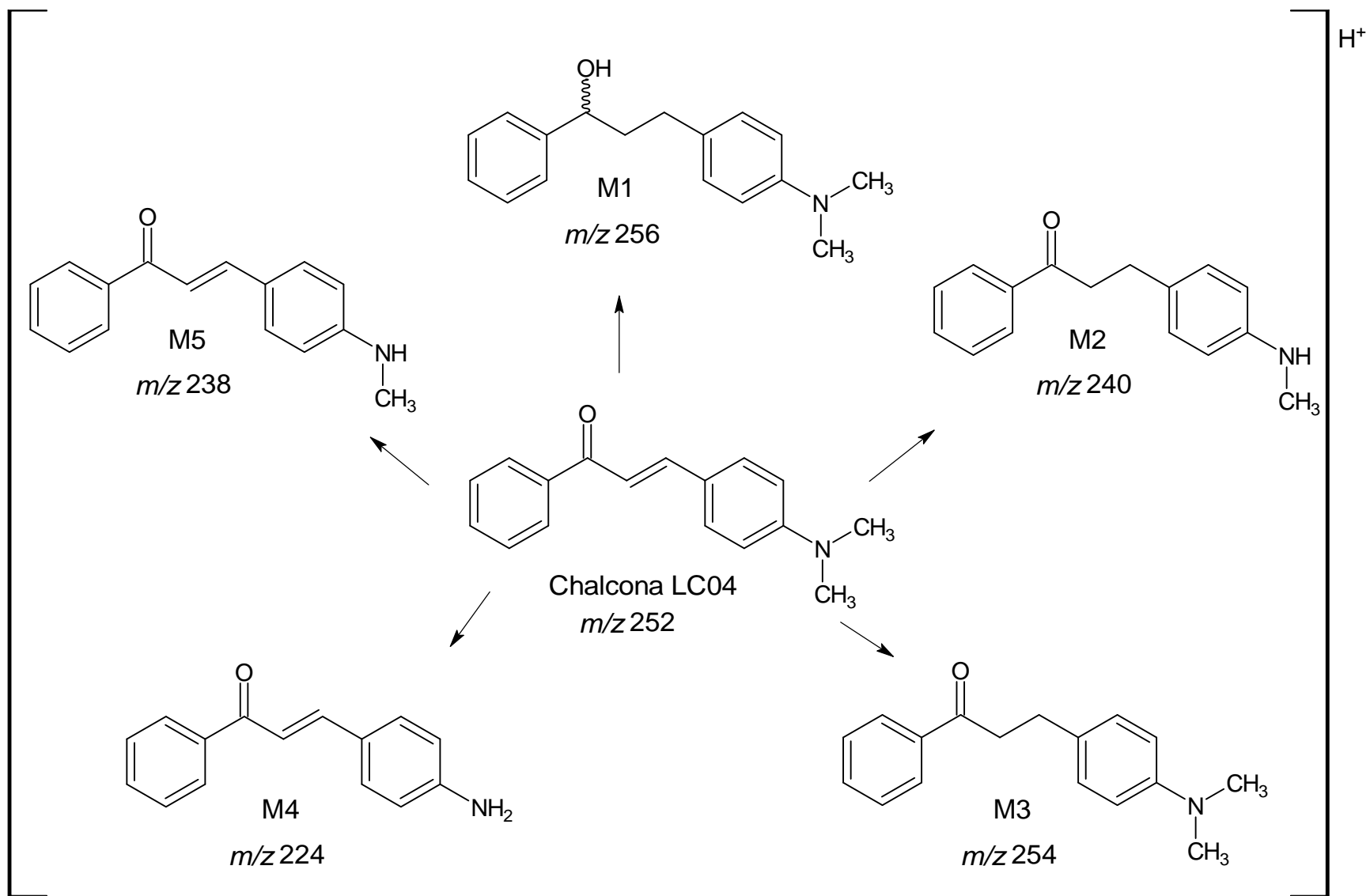


Figura 38: Estrutura química da chalcona LC04 e seus possíveis metabólitos (M1-M5).

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Foi desenvolvido um método cromatográfico empregando a coluna Synergi® C18 (150 x 4,6 mm; 4 µm); fase móvel metanol: água ultrapura (68:32; v/v), vazão de 1 mL/min, detecção no UV a 428 nm e temperatura de 35°C. Estas condições forneceram tempo de retenção de 9,8 min com adequados parâmetros de eficiência cromatográfica: número de pratos (> 2000), fator de assimetria (<2) e resolução (>1,5).

A extração líquido-líquido teve uma maior recuperação com os parâmetros de solvente extrator acetato de etila, com uma razão de 3:1 e tempo de agitação de 45s. Nessa condição otimizada foi observada uma recuperação de 92,4 % livre de interferentes no mesmo tempo de retenção do analito.

A biotransformação *in vitro* por microsomas hepáticos de ratos foi analisada por CLAE-DAD, e através da análise por CLUE-DAD-EM foi identificada a possível estrutura de 5 prováveis metabólitos. Os metabólitos codificados como M4 e M5 mantiveram a insaturação característica das chalconas. Por sua vez, os metabólitos codificados como M1, M2 e M3 resultaram de reações na função alceno da chalcona levando a formação de derivados dihidrochalcona. O metabólito M1 sofreu reduções das funções alceno e cetona, resultando em um composto provavelmente quiral, já M2 e M3 sofreram redução da função alceno e M2, adicionalmente, uma reação de *N*-desmetilação. As reações observadas em M1, M2 e M3 resultaram na transformação da chalcona em dihidrochalconas. Já M4 e M5 sofreram reações de *N*-desmetilação, mantendo a estrutura fundamental de chalcona. Entretanto, a fim de realizar a elucidação estrutural dos metabólitos, a técnica de CLAE-EM exclusivamente, não é suficiente. Ao todo, a chalcona LC04, apresentou 48,54% de biotransformação nas condições empregadas no teste de biotransformação *in vitro*.

Para a realização da elucidação estrutural, faz-se necessário uma maior quantidade em massa desses metabólitos, que permitam a análise por ressonância magnética nuclear, e também quantidade suficiente para estudo de toxicidade e avaliação de atividade biológica desses metabólitos. Pois, a literatura indica que ao menos os metabólitos M3 e M4 são biologicamente ativos. Uma estratégia para obtenção de maior quantidade de metabólitos poderia ser realizada pela biotransformação por fungos ou síntese química. Além disso, em etapa futura também seria necessária a realização de estudos de biotransformação *in vitro* com microsomas hepáticos de humanos.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília. 2013 – Versão 2.

AKSÖZ, B.E.; ERTAN, R. Spectral properties of chalcones II. **Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 4, p. 205-216, 2012.

AQUINO-NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2003, p.187.

BARTH, T.; CALIXTO, L. A.; JABOR, V. A. P.; BORGES, K. B. Extração Líquido-líquido. In: Keyller Bastos Borges; Eduardo Costa de Figueiredo; Maria Eugênia C. Queiroz (Org.). Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1ª ed. Rio de Janeiro: **Editora LTC**, v. 1, p.29-38, 2014.

BNDES. Complexo Industrial da Saúde. **Ensaio Clínicos no Brasil: competitividade internacional e desafios**. V. 36. 2012. p. 45-84.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 6.ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 2019a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública**. 2017. p.52.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose especial**. 2021. p.43.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil**- 2ª edição atualizada. 2019b. p. 364.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RESOLUÇÃO Nº 284 DE 06 DE AGOSTO DE 1998**. Disponível em: < https://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_98.htm>. Acesso em 6 de junho de 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/t/tuberculose>. Acessado 6 de junho de 2021.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J. S. & PARKER, K. L. Goodman & Gilman: As bases Farmacológicas da Terapêutica. 11ª ed. Porto Alegre: **McGraw-Hill**, 2010.

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1208-1213, 2013.

CASTAÑO, L. F.; CUARTAS, V.; BERNAL, A.; INSUASTY, A.; GUZMAN, J.; VIDAL, O.; RUBIO, V.; PUERTO, G.; LUKÁČ, P.; VIMBERG, V.; BALÍKOVÁ-NOVTONÁ, G.; VANNUCCI, L.; JANATA, J.; QUIROGA, J.; ABONIA, R.; NOGUERAS, M.; COBO, J.; INSUASTY, B. "New Chalcone-Sulfonamide Hybrids Exhibiting Anticancer and Antituberculosis Activity". **European Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 176, 2019, p. 50–60.

CHAGAS, F.N.J.; FILHO-VIANA, M.D.M.; PESSÔA, L.M.; COSTA, S.S.; Aspectos químicos e ecológicos de espécimes masculinos e femininos de *Cecropia Loefl.* (Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 6, nº 2, 2014.

CHURCHYARD, G.; KIM, P.; SHAH, N. S.; RUSTOMJEE, R.; GANDHI, N.; MATHEMA, B.; DOWDY D.; KASMAR A.; CARDENAS, V. What we know about tuberculosis transmission: an overview. **The Journal of infectious diseases**, 216, 2017.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas. **Editora da UNICAMP**, 2006. 452p.

DELUCIA, R.; PLANETA, C.S.; LEPSCH, L. "Capítulo 4 Farmacoterapêutica. Desenvolvimento de Fármacos Farmacovigilância." **Farmacologia Integrada**, 2016, 52.

DE SOUZA MACIEL, M.; MENDES, P. D.; GOMES, A. P.; SIQUEIRA-BATISTA, R. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, 10(3), 2012226-30.

FIRMINO, E.; SAMPAIO, C.; NOJOSA, A.; GUERRA, M.; SALDANHA, G.; VASCONCELOS, A.; BARROSO, M. Uso do Software Avogadro no Ensino de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Revista ENCITEC**, 2020.

GLISH, G.; VACHET, R. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery** 2, 2003, 140–150.

GUENGERICH, F.P. "Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism." **Annual review of pharmacology and toxicology** 39.1, 1999, 1-17.

GUTTERIDGE, CE; THOTA, DS; CURTIS, SM; KOZAR, MP; LI, Q; XIE, L; ZHANG, J; MELENDEZ, V; ASHER, CO; LUONG, TT; GERENA, L; NICHOLS, DA; MONTIP, G. In vitro biotransformation, in vivo efficacy and pharmacokinetics of antimalarial chalcones. **Pharmacology**. 2011;87(1-2):96-104.

HANNAN, A.; KHAMIS, M.M.; EL-ANEED, A. **Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization, Applied Spectroscopy Reviews**, 2015, 50:2, 158-175.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3rd ed, **John Wiley & Sons**, 2007.

HUANG, L.; NIKOLIC, D.; VAN BREEMEN, R. B.. Hepatic metabolism of licochalcone A, a potential chemopreventive chalcone from licorice (*Glycyrrhiza inflata*), determined using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2017. 409(30), 6937–6948.

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

KAZUNO, S.; YANAGIDA, M.; SHINDO, N.; MURAYAMA, K. (2005). Mass spectrometric identification and quantification of glycosyl flavonoids, including dihydrochalcones with neutral loss scan mode. **Analytical Biochemistry**, 347(2), 182-192.

KAZAKEVICH, Y.; LoBRUTTO, R. **HPLC For pharmaceutical scientists**. New Jersey, A Wiley-Interscience Publication, **John Wiley & Sons**, Ltd., p. 1135, 2007.

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

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, São Paulo: **Editora Átomo**, 2009.

LI, D.; HAN, Y; MENG, X.; SUN, X.; YU, Q.; LI, Y., WAN, L.; WAN, L.; HUO, Y; GUO, C.; Effect of regular organic solvents on cytochrome P450-mediated metabolic activities in rat liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 38, n° 11, p. 1922-1925, 2010.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K. R. Mass spectrometry of flavonoids. In: The flavonoids. **Springer**, Boston, MA, 1975. p. 78-126.

MANIKANDAN, P., NAGINI, S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. **Current drug targets**, v. 19, n. 1, 2018, p. 38-54.

MASATOSHI, S.; YUTAKA, O. **ARYLALKANE DERIVATIVE**. JP. Número da patente: JP19960056167 19960313. 04 de abril de 2007. Disponível em:<https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?FT=D&locale=en_EP&CC=JP&NR=3901239B2&KC=B2>. Acesso em: 16 de dezembro de 2020.

NOGUEIRA, AF.; FACCHINETTI, V.; DE SOUZA, M.V.R.; VASCONCELOS, T. "Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos." **Revista Brasileira de Farmácia** 93, no. 1, 2012, p. 3-9.

NOWAKOWSKA, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.42, Issue 2, 2007, p. 125-137.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2020). **Global tuberculosis report 2020**. Geneva.

PARDIN, C.; KEILLOR, J.W.; LUBELL, W.D. **CINNAMOYL INHIBITORS OF TRANSGLUTAMINASE**. EUA. Número da patente: 20100204280. 12 de agosto de 2010. Disponível em: <<https://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahtml/PTO/srchnum.html&r=1&f=G&l=50&d=PG01&s1=20100204280.PG NR>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2020

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; James R. VYVYAN, J.R. Introduction to Spectroscopy. 5ª edição. Washington, **Cengage Learning**, 2013, p. 605.

PRAGST, F.; HERZLER, M.; ERXLEBEN, B.T. Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, 2004 42(11).

PUBCHEM. 3-[4-(dimethylamino)phenyl]-1-phenylpropan-1-ol. Disponível em:<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24834693#section=Computed-Descriptors>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2020. (2020a)

PUBCHEM. 3-[4-(dimethylamino)phenyl]-1-phenylpropan-1-one. Disponível em:<
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3528073>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2020.
(2020b)

PUBCHEM. 3-(4-aminophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one. Disponível em: <
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/227773#section=IUPAC-Name>>. Acesso em: 16
de dezembro de 2020. (2020c)

PUBCHEM. 4-methylaminochalcone, Disponível em: <
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/85980021>>. Acesso em: 16 de dezembro de
2020. (2020d)

RAMESH, D.; JOJI, A.; VIJAYAKUMAR, B. G.; SETHUMADHAVAN, A.; MANI, M;
KANNAN, T. Indole chalcones: Design, synthesis, in vitro and in silico evaluation against
Mycobacterium tuberculosis. **European journal of medicinal chemistry**, 2020, v. 198.

RAMMOHAN, A.; REDDY, J. S.; SRAVYA, G.; RAO, C. N.; ZYRYANOV, G. V. Chalcone
synthesis, properties and medicinal applications: a review. **Environmental Chemistry
Letters**, 2020, 18(2), p.433-458.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Rang &
Dale. Farmacologia. 8ª edição. Rio de Janeiro, **Elsevier**, 2016, p.724.

SADEK, P. C. The HPLC solvente guide. 2º Ed., New York-NY, A Wiley-Interscience
Publication, **John Wiley & Sons**, Ltd, 2002 p. 334.

SAN PEDRO, A.; DE OLIVEIRA, R.M. Tuberculosis and socioeconomic indicators:
systematic review of the literature/Tuberculose e indicadores socioeconomicos: revisao
sistemica da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 33, n. 4, 2013, p. 294-
302.

SARBU, L.G.; BAHRIN, L.G.; BABII, C.; STEFAN, M.; BIRSA, M. L. Synthetic flavonoids
with antimicrobial activity: a review. **Journal of applied Microbiology** 127, 1282-1290
(2019).

SERDAR, B.; OZTEKIN, A.; ARZU, G.; AKTAS, A.; MAHMUT, U.; BUSRA, E.; ENGIN
K., AYLIN D.; GÖNÜL A. Design of potent fluoro-substituted chalcones as antimicrobial
agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, Issue 1, Janeiro de
2017, 490-495.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC Method Development. 2. ed. Nova York, NY: **Wiley-Interscience**, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3 ed. Hoboken, **John Wiley and Sons**, 2010, 912p.

SOLDATOW, V.Y., LECLUYSE, E., GRIFFITH, L., RUSYN, I. *In vitro* models for liver toxicity testing. **Toxicology Research**, v. 2, Issue 1, 2013, p. 23–39.

STOMPOR, M., BRODA, D., BAJEK-BIL, A. 2019. Dihydrochalcones: Methods of Acquisition and Pharmacological Properties—A First Systematic Review, **Molecules** 24, no. 24: 4468.

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

VENTURA, T.L.B.; CALIXTO, S.D.; VIEIRA, B.A.A.; SOUSA, A.M.T.; MELLO, M.V.P.; RODRIGUES, C.R.; MIRANDA, L.S.M.; SOUSA, R.O.M.A.; LEAL, I.C.R.; LASUNSKAIA, E.B.; MUZITANO, M.F.; Antimycobacterial and anti-Inflammatory activities of substituted chalcones focusing on an anti-Tuberculosis dual treatment approach. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8072-8093, 2015.

WANG, W. W.; KHETANI, S. R; KRZYZEWSKI, S.; DUGNAN, D. B.; OBACH, R. S. Assessment of a Micropatterned Hepatocyte Coculture System to Generate Major Human Excretory and Circulating Drug Metabolites. **Drug Metabolism and Disposition**, 38, 2010, p.1900–1905.

WILLIAMS, R.T. Detoxification mechanisms. 2 ed., **John Wiley and Sons**, Inc., New York, 1959.

ZENGER, K., AGNOLET, S., SCHNEIDER, B., KRAUS, B. (2015). Biotransformation of Flavokawains A, B, and C, Chalcones from Kava (*Piper methysticum*), by Human Liver Microsomes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63(28), 6376–6385.