

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**“Avaliação do perfil farmacocinético do flavonóide avicularina em  
ratos”**

Gabriela Amaral Buqui

**Ribeirão Preto**  
**2013**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**“Avaliação do perfil farmacocinético do flavonóide avicularina em  
ratos”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Gabriela Amaral Buqui

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 23/08/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

**Ribeirão Preto**  
**2013**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Buqui, Gabriela Amaral

Avaliação do perfil farmacocinético do flavonóide avicularina em ratos. Ribeirão Preto, 2013. 119p: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia  
Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

1. Avicularina. 2. Perfusão Intestinal. 3. Farmacocinética

Observação: A foto utilizada na capa deste trabalho é de autoria de José Pires.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Gabriela Amaral Buqui**

**“Avaliação do perfil farmacocinético do flavonóide avicularina em ratos”.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.**

**Área de Concentração: Toxicologia**

**Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes**

**Aprovado em:**

**Banca examinadora**

**Prof. Dr. \_\_\_\_\_**

**Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_**

**Prof. Dr. \_\_\_\_\_**

**Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_**

**Prof. Dr. \_\_\_\_\_**

**Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_**

**Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela fé que me motiva todos os dias. Dedico também aos meus pais Marco e Rosicler pelo apoio e dedicação em minha educação e por sempre acreditarem em minha capacidade, não medindo esforços para que fosse possível a realização dos meus sonhos.**

# Agradecimentos

*Gostaria de agradecer em primeiro lugar ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pela oportunidade de realizar este trabalho e por fazer sempre despertar o melhor de nós. Seu apoio foi fundamental para a realização de cada etapa. Com certeza aprendi muito e cresci muito profissional e pessoalmente com sua orientação.*

*Gostaria de fazer um agradecimento especial a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréa Diniz, co-orientadora deste trabalho. Amiga, mestre e profissional é uma pessoa que me inspira e me ajudou de tantas maneiras que nem tenho como agradecê-la. Obrigada por todos esses anos de ensinamentos e amizade.*

*Agradeço também a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Brentam Silva pelos ensinamentos e ajuda na realização deste trabalho, muito importantes para a conclusão do mesmo. Uma pessoa admirável que aprendi a respeitar e aprender cada dia algo novo. Obrigada pela amizade, carinho e atenção.*

*Durante o mestrado fui amparada por um anjinho chamado Dayana Rubio Gouvea que não poupou esforços para me ensinar e me auxiliar sempre que precisei. Obrigada por sempre acreditar na minha capacidade e por estar ali sempre que precisei. Sua amizade e respeito são muito importantes para mim.*

*Gostaria de agradecer a minha irmã Ana Carolina por estar sempre ao meu lado, por tudo que já dividimos juntas e ainda temos para dividir. Estou muito feliz de tê-la por perto novamente.*

*Agradeço também aos meus irmãos Netto e Bia por fazer meus dias mais felizes, pelo carinho, amizade e companheirismo sempre.*

*Agradeço aos membros do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) por cada idéia compartilhada, pelos momentos de boas risadas e por muitos cafés juntos. Sem vocês esse trabalho não seria possível, pois cada um teve sua participação significativa em cada etapa. Muito obrigada.*

*Muito obrigada também aos técnicos Tomaz e Cristina pelo carinho e atenção sempre que precisei. Vocês são exemplo de dedicação, amor ao trabalho e ao próximo.*

*A secretária do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia Rosemary Ioshimine Gerolineto pela atenção, carinho e dedicação aos alunos de pós-graduação.*

*A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - funcionários, professores de disciplinas, colegas de pós-graduação.*

*Aos funcionários do biotério da FCFRP-USP por toda ajuda na realização do trabalho com os animais.*

*A Vanessa Cristina de Oliveira Souza pelas análises de ICP-MS realizadas.*

*A Ana Paula Garcia Ferreira pelas análises de TG realizadas.*

*Ao CNPQ pela bolsa de estudos concedida.*

*“O importante é não parar de se questionar; curiosidade tem sua razão própria de existir.”*

*Albert Einstein*



## RESUMO

Buqui, G. A. **Avaliação do perfil farmacocinético do flavonóide avicularina em ratos**. 119f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, 2013.

A substância 3-O- $\alpha$ -arabinofuranosil-quercetina (avicularina) é um flavonol já relatado em uma grande variedade de espécies vegetais, podendo ser encontrada em diversas frutas e plantas medicinais. Neste trabalho o flavonóide foi isolado da espécie *Bidens sulphurea*, popularmente conhecida como cosmo-amarelo, picão-grande e áster-do-méxico, com pureza de 93,27%. O flavonóide avicularina apresenta diversas propriedades biológicas descritas na literatura, e estudos científicos que comprovam a eficácia deste composto. No entanto não há estudos que avaliem os mecanismos que envolvem a farmacocinética (ADME) deste flavonóide, bem como sua biodisponibilidade. Sendo assim este trabalho teve como objetivo a determinação dos perfis farmacocinéticos de absorção da avicularina em ratos na presença e ausência de sais biliares e inibidor da glicoproteína-P, pelo ensaio de perfusão intestinal *in situ*. Neste trabalho também foi realizada a avaliação do perfil farmacocinético de distribuição e eliminação através de administração intravascular do flavonóide avicularina na dose de 1mg/kg em ratos. Para ambos os ensaios um método analítico sensível por CLUE-DAD-EM/EM foi desenvolvido e validado obedecendo às diretrizes do guia para validação de métodos bioanalíticos da ANVISA. Os ensaios de absorção com este flavonóide revelaram que sua taxa de absorção intestinal é baixa, em torno de 30% para as duas doses testadas (1 e 5 mg/kg), sugerindo uma baixa biodisponibilidade para este flavonóide. No entanto na presença do inibidor de glicoproteína-P, verapamil, o percentual absorvido final de avicularina foi de aproximadamente 80%, o que sugere o envolvimento de proteínas de efluxo em sua absorção. Através do estudo de farmacocinética com administração intravascular de avicularina pudemos concluir que o perfil farmacocinético do flavonóide em questão é bicompartimental, e possui rápida distribuição e eliminação do organismo, sendo o  $t_{1/2\alpha}$  de 8 minutos e  $t_{1/2\beta}$  de 45 minutos, e, portanto baixa afinidade por tecidos, sendo baixa ou numa sua acumulação tecidual.

**Palavras-chave:** Avicularina, perfusão intestinal, farmacocinética, P-gp.

## ABSTRACT

Buqui, G. A. **Evaluation of the pharmacokinetic profile of the flavonoid avicularin in rats.** 119f. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The compound 3-O- $\alpha$ -arabinofuranosyl-quercetin (avicularin) is a flavonol already reported in a wide variety of plant species and can be found in many fruits and medicinal plants. In this work the flavonoid was isolated from the species *Bidens sulphurea*, popularly known as yellow cosmos and aster of Mexico, with 93.27% of purity. The flavonoid avicularin has several biological properties described in the literature, and several scientific studies that prove the efficacy of this compound. However there are no studies that evaluate the mechanisms involving the pharmacokinetics (ADME) of this flavonoid as well as its bioavailability. Thus, this study aimed to determine the pharmacokinetic profiles of avicularin absorption in rats in the presence and absence of bile salts and inhibitor of P-glycoprotein by *in situ* intestinal perfusion technique. This work was also performed to evaluate the pharmacokinetic profile of distribution and elimination through intravascular administration of the flavonoid avicularina at the dose of 1mg/kg in rats. For both studies a sensitive analytical UPLC-DAD/MS/MS method was developed and validated following the guidelines of the Guide for the validation of bioanalytical methods of ANVISA. The absorption assays have shown that with this flavonoid its intestinal absorption rate is low, around 30% for both tested doses (1 and 5 mg / kg), suggesting a low bioavailability of this flavonoid. However in the presence of P-glycoprotein inhibitors, verapamil, the percentage of absorbed avicularina was approximately 80%, suggesting the involvement of protein efflux in the absorption. Through pharmacokinetic study with intravascular administration of avicularin we could conclude that the pharmacokinetic profile of the flavonoid in question is two-compartmental model, and has quickly distribution and elimination of the organism, being the  $t_{1/2\alpha}$  of 8 minutes, and  $t_{1/2\beta}$  of 45 minutes, thus this compound has low affinity for tissues, with low or none tissue accumulation.

**Keywords:** Avicularin, *in situ* intestinal perfusion, pharmacokinetics, P-gp.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Estrutura química do flavonóide O-glicosilado avicularina.....	3
Figura 2. Partes aéreas (caules, folhas e flores) de <i>Bidens sulphurea</i> .....	4
Figura 3. Mecanismos envolvidos no processo de transferência de fármacos do lúmen do TGI para a circulação sanguínea.....	6
Figura 4. Coluna cromatográfica clássica Sephadex LH20 em fase de separação das frações.....	21
Figura 5. Esquema das etapas envolvidas no isolamento da avicularina.....	22
Figura 6. Constituintes químicos da fração de BsfcEt/AC com suas estruturas químicas.....	47
Figura 7. Cromatograma da fração de BsfcEt/AC em CLAE-DAD semi-preparativo.....	48
Figura 8. Espectro de UV em 40,58 minutos.....	48
Figura 9. Gráfico da curva média de avicularina (n=3). cujo coeficiente de correlação linear (r) obtido foi de 0,999; B) Gráfico de resíduos.....	50
Figura 10. A) Gráfico da curva média de vermelho de fenol (n=3). cujo coeficiente de correlação linear (r) obtido foi de 0,999; B) Gráfico de resíduos.....	50
Figura 11. Seletividade da avicularina.....	52
Figura 12. Seletividade do vermelho de fenol.....	52
Figura 13. Efeito residual da avicularina.....	53
Figura 14. Efeito residual do vermelho de fenol.....	53
Figura 15. Análise de uma amostra em branco no modo SCAN negativo com infusão combinada de padrões.....	54
Figura 16. Análise de quercetina em amostras de perfusão intestinal no modo MRM.....	57
Figura 17. Comparação entre o perfil de absorção de um rato na dose de 1mg/kg por dois métodos de correção de concentração.....	58
Figura 18. Comparação dos perfis de absorção entre AV1 e AV5.....	61
Figura 19. Comparação dos perfis de absorção entre AV1 e DB.....	62
Figura 20. Comparação dos perfis de absorção entre AV1 e VP.....	64
Figura 21. Estrutura química da cumarina.....	64

Figura 22. Cromatograma de plasma de rato contendo avicularina na concentração de 0,5 ng/ml.....	65
Figura 23. Gráfico da curva média de avicularina (n=3). cujo coeficiente de correlação linear (r) obtido foi de 0,999.....	66
Figura 24. Seletividade. A) Cromatograma de solução aquosa de cumarina (250ng/ml); B) Cromatograma de solução aquosa de avicularina (25ng/ml); C) Cromatograma de amostra de plasma branco.....	67
Figura 25. Efeito residual. A) cromatograma de avicularina (25 ng/ml); B) Cromatograma de amostra branco antes da curva; C) e D) Cromatogramas de amostra branco depois do último ponto da curva (LSQ).....	68
Figura 26. Cromatogramas obtidos no estudo de efeito de matriz.....	69
Figura 27. Perfil farmacocinético de concentração plasmática <i>versus</i> tempo ( $C_p \times t$ ).....	72
Figura 28. Modelo mamilário bicompartimental.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado na purificação de avicularina a partir das frações de BsfEt/Ac por CLAE- DAD.....	23
Tabela 2. Gradiente de fase móvel utilizado no método CLUE-DAD-EM/EM.....	25
Tabela 3. Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação de avicularina e vermelho fenol.....	25
Tabela 4. Parâmetros do método MRM para quantificação simultânea de avicularina e vermelho de fenol (modo negativo de ionização).....	26
Tabela 5. Resumo dos modelos farmacocinéticos testados nos dados obtidos nos ensaios de absorção intestinal.....	33
Tabela 6. Gradiente de fase móvel utilizado no método por CLUE-DAD-EM/EM para análise de avicularina em plasma.....	35
Tabela 7. Parâmetros do tune do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação da avicularina em plasma.....	35
Tabela 8. Parâmetros do método MRM para quantificação de avicularina e seu padrão interno cumarina.....	36
Tabela 9. Resultados obtidos na caracterização do padrão isolado avicularina.....	49
Tabela 10. Resultados de precisão e exatidão obtidos para avicularina na concentração de 0,1 µg/ml.....	51
Tabela 11. Resultados de precisão e exatidão obtidos para vermelho de fenol na concentração de 0,5 µg/ml.....	51
Tabela 12. Precisão e Exatidão intracorrida. Resultados de concentração média ± desvio padrão de avicularina nas (0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 2 µg/ml e 6 µg/ml).....	54
Tabela 13. Precisão e Exatidão intercorrida. Resultados de concentração média ± desvio padrão de avicularina (0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 2 µg/ml e 6 µg/ml) .....	55
Tabela 14. Precisão e Exatidão intracorrida. Resultados de concentração média ± desvio padrão de vermelho de fenol (0,5 µg/ml, 0,7 µg/ml, 5 µg/ml e 9 µg/ml) .....	55

Tabela 15. Precisão e Exatidão intercorrida. Resultados de concentração média $\pm$ desvio padrão de vermelho de fenol (0,5 $\mu\text{g/ml}$ , 0,7 $\mu\text{g/ml}$ , 5 $\mu\text{g/ml}$ e 9 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	55
Tabela 16. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade em auto-injetor e ciclo de descongelamento. Dados das amostras de avicularina nas concentrações 0,2 $\mu\text{g/ml}$ , 2 $\mu\text{g/ml}$ e 6 $\mu\text{g/ml}$ (n=3).....	56
Tabela 17. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade em auto-injetor e ciclo de descongelamento. Dados das amostras de vermelho de fenol nas concentrações 0,7 $\mu\text{g/ml}$ , 5 $\mu\text{g/ml}$ e 9 $\mu\text{g/ml}$ (n=3).....	56
Tabela 18. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade da solução estoque em 0h, 6h em temperatura ambiente e sete dias sob refrigeração. Dados de avicularina (6 $\mu\text{g/ml}$ ) e vermelho de fenol (9 $\mu\text{g/ml}$ ) (n=3).....	56
Tabela 19. Fração absorvida de avicularina após 30 minutos ( $F_{\text{abs}}$ (%)).....	59
Tabela 20. Comparação entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos ( $k_a$ , $V_{\text{ms}}$ e $K_{\text{ms}}$ ) obtidos pelo modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa para os grupos AV1 e AV5.....	60
Tabela 21. Comparação entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos ( $k_a$ , $V_{\text{ms}}$ e $K_{\text{ms}}$ ) obtidas pelo modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa para os grupos AV1 e DB.....	61
Tabela 22. Resultados dos parâmetros farmacocinéticos obtidas pelo modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa para o grupo AV1 e absorção de Michaelis-Menten e secreção ativa para o grupo VP.....	62
Tabela 23. Resultados de precisão e exatidão obtidos para avicularina na concentração de 25 ng/ml.....	66
Tabela 24. Precisão e Exatidão intracorrida. Resultados de concentração média $\pm$ desvio padrão de avicularina nas concentrações de 25 ng/ml, 50 ng/ml, 750 ng/ml e 1500 ng/ml.....	69
Tabela 25. Precisão e Exatidão intercorrida. Resultados de concentração média $\pm$ desvio padrão de avicularina nas concentrações de 25 ng/ml, 50 ng/ml, 750 ng/ml e 1500 ng/ml.....	70
Tabela 26. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade em auto-injetor e ciclo de descongelamento.....	70

---

Tabela 27. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade da solução estoque em 0h, 6h em temperatura ambiente e sete dias sob refrigeração. Dados de avicularina (2000 ng/ml) e cumarina (250 ng/ml) .....	70
Tabela 28. Resultados para as taxas de ligação da avicularina a proteínas plasmáticas totais nas concentrações 50, 750 e 1500 ng/mL.....	71
Tabela 29. Parâmetros farmacocinéticos de distribuição e eliminação da avicularina após a administração intravenosa (1mg/kg) em ratos (n=2).....	74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACN: Acetonitrila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC: área sob a curva

AV: Avicularina

BsFcEt: Fração Acetato de Etila

CD: espectrometria de Dicroísmo Circular

CID: collision-induced dissociation

Cl: *clearance*

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo Diodo

CLUE: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

CLUE-DAD-EM/EM: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Detector de Arranjo Diodo e Espectrômetro de Massas Seqüencial

CQB: Controle de Qualidade Baixo

CQM: Controle de Qualidade Médio

CQA: Controle de Qualidade Alto

CV: Coeficiente de Variação

DB: Ducto Biliar

DCM: Diclorometano

DAD: Detector de Arranjo Diodos

DC: corrente elétrica do tipo Direct Current

DMSO: Dimetilsulfóxido

dp: desvio padrão

EM: Espectrometria de Massas

EM/EM: Espectrometria de Massas Seqüencial

ESI: Ionização por *electrospray*

Fabs: Fração absorvida

HAc: Ácido Acético

HM: High Mass

ICP-MS: Plasma Acoplado Indutivamente com Espectrômetro de Massas



i.v.: intravascular  
Ka: constante de absorção  
LD: Limite de Detecção  
LLC: Líquido de Lavado Curto  
LIQ: Limite Inferior de Quantificação  
LSQ: Limite Superior de Quantificação  
LM: Low Mass  
MRM: Multiple Reaction Monitoring (monitoramento de múltiplas reações)  
MRT: Tempo de Residência Média  
MeOH: Metanol  
m/z: razão massa/carga  
MRM: multiple reaction monitoring mode  
MDR1: Multidrug Resistance Protein  
P-gp: glicoproteína-P  
PTFE: Politetrafluoretileno  
r: coeficiente de correlação  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA)  
RF: Rádio Frequência  
RMN: Ressonância Magnética Nuclear  
RMN <sup>1</sup>H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
RMN <sup>13</sup>C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono  
SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica  
TGI: Trato Gastrointestinal  
TG: Termogravimetria  
t<sub>1/2</sub> : meia-vida eliminação  
t<sub>1/2</sub>abs: meia-vida de absorção  
TFA: Ácido Trifluoroacético  
TOF: Time Of Flight (analisador de tempo de voo)  
TQD: Detector Triplo Quadrupolo  
TG: Termogravimetria  
UV: Ultravioleta  
Vd: Volume de Distribuição  
VF: Vermelho de Fenol  
VP: Verapamil

## SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas.....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Espécie vegetal e composto químico.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Isolamento e caracterização.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Estudos farmacocinéticos.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 Modelos farmacocinéticos.....	9
1.3.2 Ensaios de absorção intestinal.....	10
<b>1.4 Ensaios analíticos.....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Métodos analíticos de quantificação.....	12
1.4.2 Desenvolvimento e validação de metodologia.....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Isolamento e caracterização estrutural do flavonóide avicularina.....</b>	<b>21</b>
3.1.1 Obtenção de espécimes de <i>Bidens sulphurea</i> .....	21
3.1.2 Obtenção do flavonóide isolado avicularina.....	21
3.1.3 Caracterização estrutural e determinação de pureza .....	23
<b>3.2 Avaliação do perfil farmacocinético de absorção em ratos.....</b>	<b>24</b>
3.2.1 Desenvolvimento e Validação de metodologia analítica para doseamento de avicularina e vermelho de fenol em perfundido intestinal de rato.....	24
3.2.1.1 Preparo das amostras para desenvolvimento e validação.....	26
3.2.1.2 Parâmetros para desenvolvimento e validação.....	26
3.2.1.2.1 Limite de Detecção.....	26
3.2.1.2.2 Linearidade.....	26
3.2.1.2.3 Limite de Quantificação.....	27

3.2.1.2.4 Seletividade.....	27
3.3.1.2.5 Efeito Residual entre corridas.....	27
3.3.1.2.6 Efeito de Matriz.....	27
3.3.1.2.7 Precisão e Exatidão.....	28
3.3.1.2.8 Estabilidade de curta duração.....	28
3.3.1.2.9 Análise de quercetina em perfundido intestinal.....	29
3.2.1 Estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> da avicularina em ratos.....	29
3.2.2.1 Preparo dos animais.....	29
3.2.2.2 Preparo das soluções de perfusão.....	30
3.2.2.3 Ensaio de absorção intestinal <i>in situ</i> .....	30
3.2.2.4 Procedimentos analíticos para quantificação de avicularina e vermelho de fenol em perfundido intestinal.....	31
3.2.2.5 Avaliação comparativa da correção dos valores de reabsorção de água no intestino por dois métodos.....	31
3.2.2.6 Cálculo do percentual absorvido de avicularina <i>in vivo</i> .....	32
3.2.3 Análise da influência da glicoproteína-P na absorção da avicularina.....	33
3.2.4 Análise da influência da bile sobre a absorção intestinal da avicularina.....	33
3.2.5 Avaliação do perfil farmacocinético de absorção da avicularina.....	33
<b>3.3 Avaliação do perfil farmacocinético de distribuição e eliminação em ratos.....</b>	<b>35</b>
3.3.1 Desenvolvimento e Validação de metodologia analítica para doseamento de avicularina em plasma de ratos.....	35
3.3.1.1 Preparo das amostras para desenvolvimento e validação do método Analítico.....	37
3.3.1.2 Parâmetros para desenvolvimento da validação.....	37
3.3.1.2.1 Limite de Detecção.....	37
3.3.1.2.2 Linearidade.....	37
3.3.1.2.3 Limite de Quantificação.....	37
3.3.1.2.4 Seletividade.....	38
3.3.1.2.5 Efeito Residual entre corridas.....	38
3.3.1.2.6 Efeito de Matriz.....	38
3.3.1.2.7 Precisão e Exatidão.....	38
3.3.1.2.8 Estabilidade de curta duração.....	39

<b>3.4 Avaliação da interação da avicularina com as proteínas plasmáticas totais.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5 Estudo piloto de perfil farmacocinético de distribuição e eliminação de avicularina após administração intravascular (i.v.).....</b>	<b>41</b>
3.5.1 Administração i.v. de avicularina.....	41
3.5.2 Preparo da amostra.....	42
3.5.3 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos não compartimentais.....	42
3.5.4 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos compartimentais.....	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Isolamento e caracterização estrutural do flavonóide avicularina</b>	<b>47</b>
4.1.1 Obtenção de espécimes de <i>Bidens sulphurea</i> .....	47
4.1.2 Obtenção do flavonóide isolado avicularina.....	47
4.1.3 Caracterização estrutural e determinação de pureza.....	48
<b>4.2 Avaliação do perfil farmacocinético de absorção em ratos.....</b>	<b>49</b>
4.2.1 <i>Parâmetros de validação</i> .....	49
4.2.1.1 <i>Limite de detecção</i> .....	49
4.2.1.2 <i>Linearidade</i> .....	49
4.2.1.3 <i>Limite de Quantificação</i> .....	50
4.2.1.4 <i>Seletividade</i> .....	51
4.2.1.5 <i>Efeito Residual entre corridas</i> .....	53
4.2.1.6 <i>Efeito de Matriz</i> .....	54
4.2.1.7 <i>Precisão e Exatidão</i> .....	55
4.2.1.8 <i>Estabilidade</i> .....	55
4.2.1.9 <i>Análise de quercetina em perfundido intestinal</i> .....	56
4.2.2 Estudos de perfusão intestinal <i>in situ</i> da avicularina em ratos.....	57
4.2.2.1 <i>Avaliação comparativa da correção dos valores de reabsorção de água no intestino por dois métodos</i> .....	57
4.2.2.2 <i>Avaliação da fração absorvida de avicularina</i> .....	58
4.2.2.3 <i>Avaliação do perfil farmacocinético de absorção da avicularina</i> .....	60
<b>4.3 Avaliação do perfil farmacocinético de distribuição e eliminação em ratos.....</b>	<b>64</b>
4.3.1 <i>Parâmetros para desenvolvimento da validação</i> .....	64

4.3.1.1 Limite de detecção.....	65
4.3.1.2 Linearidade.....	65
4.3.1.3 Limite de Quantificação.....	66
4.3.1.4 Seletividade.....	67
4.3.1.5 Efeito Residual entre corridas.....	67
4.3.1.6 Efeito de Matriz.....	68
4.3.1.7 Precisão e Exatidão.....	69
4.3.1.8 Estabilidade.....	70
<b>4.4 Avaliação da interação da avicularina com as proteínas plasmáticas Totais.....</b>	<b>71</b>
<b>4.5 Estudo piloto de perfil farmacocinético de distribuição e eliminação da avicularina após administração intravascular (i.v.).....</b>	<b>71</b>
<b>5.CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>93</b>

# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar de todo o avanço da medicina moderna, os produtos de origem vegetal ainda possuem uma importante colaboração para a melhora no estado de saúde das pessoas, sendo que, o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais pode ser utilizado para nortear o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos produzidos a partir de partes da planta.

No Brasil diversas plantas medicinais encontram-se ainda sem total comprovação científica de sua atividade biológica e/ou toxicológica, bem como a definição dos parâmetros farmacocinéticos de seus ativos. Neste contexto, este trabalho apresenta o estudo farmacocinético de um flavonóide isolado de uma espécie de picão, a *Bidens sulphurea*, já conhecida no Brasil por seu amplo uso popular. Os compostos presentes nesta espécie vegetal já foram objetivo de diversos estudos fitoquímicos e farmacológicos os quais fundamentam desenvolvimento dessa proposta.

Na seqüência será apresentada revisão bibliográfica sobre a espécie estudada, bem como o estado da arte de temas relevantes à discussão deste trabalho.

### 1.1 Espécie vegetal e composto químico

Polifenóis é uma das classes de compostos de origem vegetal de grande interesse farmacêutico devido a sua ampla ocorrência na dieta humana e devido as suas atividades biológicas. A classificação química desses compostos os divide em muitas subclasses. Entre eles estão os flavonóides, taninos e antraquinonas. Os flavonóides possuem muitas variações estruturais no anel flavonoídico, e são subdivididos em antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavanas, flavanonas, flavananas, flavonóis, chalconas, diidroflavonóis, auronas e isoflavonas, (FARIAS *et al.*, 1999).

A substância 3-O- $\alpha$ -arabinofuranosil-quercetina ou avicularina (Figura 1), substância de escolha para a realização deste trabalho, é um flavonol já relatado em uma grande variedade de espécies vegetais e apresenta diversas propriedades biológicas descritas na literatura. Podemos destacar as atividades antioxidante (AN *et al.*, 2005), antiinflamatória (VO *et al.*, 2012), antibacteriana (GREGOIRE *et al.*,

2007), antimutagênica (CHOI *et al.*, 1994), antiobesidade (FUJIMORI *et al.*, 2013), antialérgica (YAMADA *et al.*, 1999), hepatoprotetora (AN *et al.*, 2005), ação inibitória sobre algumas enzimas do vírus HIV (transcriptase reversa e proteases) (YU *et al.*, 2007) e sobre o fator III da coagulação sanguínea (LEE *et al.*, 2002). O flavonóide avicularina pode ser encontrado em frutas, como a maçã (HE; LIU, 2008), no suco de cranberry (HE; LIU, 2006) e em diversas plantas medicinais, entre as quais estão espécies pertencentes ao gênero *Bidens*.

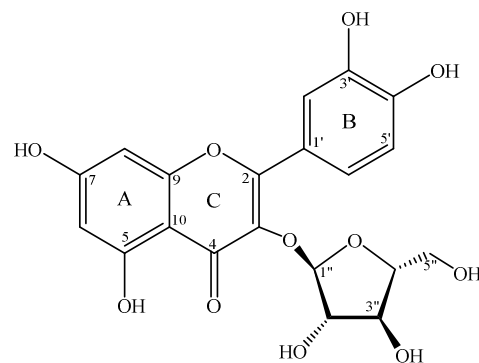


Figura 1. Estrutura química do flavonóide *O*-glicosilado avicularina.

O primeiro relato da presença de avicularina no gênero *Bidens* ocorreu em 2009, sendo a espécie do referido estudo a *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. (SILVA, 2009), pertencente à família Asteraceae. É uma herbácea anual, ereta e muito ramificada (Figura 2). Originária do México é uma espécie intensamente disseminada e naturalizada no território brasileiro, sendo encontrada nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Popularmente é conhecida como cosmo-amarelo, picão-grande e áster-do-méxico, e é considerada uma planta invasora (LORENZI; SOUZA, 2001). Cientificamente, seus sinônimos são *Cosmos sulphureus* Cav. e *Cosmos asthemisioefolius* Jacq.

O uso popular desta espécie é bastante disseminado, sendo principalmente para a o tratamento da icterícia, febre intermitente (malária), esplenomegalia e como hepatoprotetora (BOTSARIS, 2007). Há também o relato de pesquisas mais avançadas utilizando a mistura dos extratos de *B. sulphurea* com de outras espécies em formulações dermatológicas com resultados promissores de inibição de proteases e tratamento do câncer (BEHR *et al.*, 2006; CYR, 2002). Também vale ressaltar a citotoxicidade apresentada pelo extrato apolar das folhas de *B. sulphurea* (ZEID *et al.*, 2009).





Figura 2. Partes aéreas (caules, folhas e flores) de *Bidens sulphurea*.  
(Fonte: SILVA, B.D.)

## 1.2 Isolamento e caracterização

Um passo fundamental no desenvolvimento de estudos envolvendo produtos vegetais é a caracterização química dos extratos para a obtenção de seu perfil fitoquímico, visando o estabelecimento e obtenção de marcadores químicos e seus padrões de referência.

De acordo com a RDC 14/2010 – ANVISA, um marcador é um “composto ou classe de compostos químicos presentes na matéria prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade”. Este composto deve ser completamente caracterizado e com a mais alta pureza, determinada por técnicas absolutas de análise e sem referência a outros padrões. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999) define uma substância química de referência primária como uma substância reconhecida pelas suas qualidades dentro de um contexto especificado e cujo conteúdo atribuído quando utilizado como um padrão de teste é aceito sem exigir comparação com outra substância química.

Esses padrões de referência nem sempre estão disponíveis oficialmente pela Farmacopéia Brasileira ou outros códigos autorizados pela legislação vigente, embora sejam fundamentais para a realização dos ensaios pré-clínicos e clínicos,

bem como os estudos de estabilidade e desenvolvimento analítico. Nesses casos, os padrões podem ser isolados da matéria prima vegetal, desde sejam submetidos às análises que garantam sua identidade, teor, qualidade, pureza e potência adequadas (RDC 17/2010 – ANVISA).

Para a determinação qualitativa de uma substância, técnicas como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) e hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectrofotometria de ultravioleta (UV), espectrometria de dicroísmo circular (CD) e de massas (EM) tem sido empregadas em função de sua precisão. Isso possibilita ao pesquisador a caracterização de um dado composto de origem vegetal desconhecido, por meio da combinação dos resultados obtidos por essas técnicas.

A determinação de pureza de uma substância, por sua vez, pode ser mensurada pela quantificação de suas impurezas orgânicas e inorgânicas, além de solventes residuais, teor de água e análises cromatográficas. Esses resultados são tratados matematicamente para o cálculo da pureza ajustada. Para isso, técnicas como cromatografia, análise termogravimétrica e espectrometria de massas com plasma acoplado Indutivamente (ICP-MS) são comumente empregadas (WHO, 1999).

### 1.3 Estudos Farmacocinéticos

A farmacocinética pode ser compreendida como o estudo dos processos de absorção (A), distribuição (D), biotransformação (B) ou metabolismo (M) e excreção (E) de um fármaco e o modo pelo qual esses processos determinam seu destino no organismo (SCHELLACK, 2005).

A absorção, principal processo que vamos avaliar neste estudo, é definida como a transferência da substância do local da administração para a circulação (líquido circulante do organismo; normalmente o sangue). Para que ocorra a absorção de uma substância são requeridas duas etapas:

- atravessar a membrana do epitélio gastrointestinal, geralmente por via transcelular ou paracelular (Figura 3), acessando a circulação sistêmica por meio dos capilares sanguíneos;
- passar pelo sistema porta-hepático intacto, alcançando a circulação sistêmica.

A absorção de uma substância por via oral está relacionada à sua capacidade de permeação através das membranas do trato gastrointestinal (TGI). As três principais propriedades moleculares que afetam, e muitas vezes limitam a passagem de um fármaco através da membrana são: tamanho molecular, lipofilicidade, e carga ou grau de ionização (TOZER; ROWLAND, 2006).

O transporte passivo transcelular é o mecanismo mais comum e corresponde a um fenômeno passivo, sem gasto de energia, que ocorre em função do gradiente de concentração. Entretanto, substâncias muito hidrossolúveis e de tamanho molecular reduzido podem ser absorvidos por meio do transporte paracelular (TOZER; ROWLAND, 2006). Na Figura 3 pode ser visto o esquema dos processos de transporte celular.

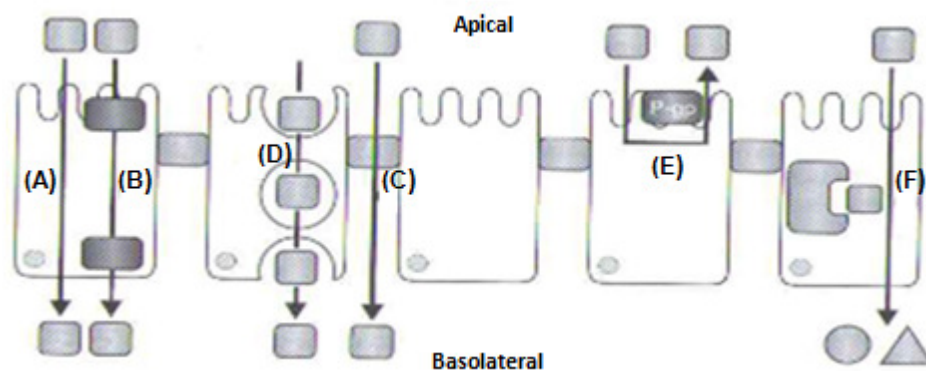


Figura 3. Mecanismos envolvidos no processo de transferência de fármacos do lúmen do TGI para a circulação sanguínea. (A) transporte celular passivo ou difusão passiva; (B) transporte mediado por carreadores de membrana; (C) transporte passivo paracelular; (D) transporte vesicular; (E) efluxo intermediado pela glicoproteína-P; (F) eliminação pré-sistêmica no epitélio gastrintestinal (Adaptado de STORPIRTS *et al.*, 2011).

Por outro lado, há moléculas que são absorvidas por meio de um transporte ativo mediado por carreadores de membrana, com gasto de energia. Os transportadores de membrana também estão associados ao processo de efluxo de certas substâncias, ou seja, a molécula entra na célula do epitélio gastrointestinal, mas é secretada por intermédio de transportadores específicos, voltando para o lúmen do TGI. O mais conhecido sistema de efluxo de fármacos é aquele que envolve a glicoproteína de permeabilidade ou glicoproteína-P (P-gp), que atua sobre fármacos catiônicos ou neutros. Ela também é conhecida como receptor de

resistência a múltiplos fármacos, principalmente quimioterápicos, e também é chamada, em algumas situações, de MDR1 (TOZER; ROWLAND, 2009).

Muitos são os fatores que determinam o tipo de processo envolvido na absorção de uma molécula. Storpirtis e colaboradores (2011) relataram que os principais deles podem ser:

- Grau de solubilidade: para serem bem absorvidas, as substâncias devem ser hidrossolúveis para se difundirem nos líquidos do organismo (suco gástrico, líquido intestinal). Entretanto, devem também possuir certa lipossolubilidade para serem capazes de atravessar as membranas biológicas que tem constituição lipoproteica;
- Área da superfície do sítio de absorção: determina a velocidade do processo de absorção e depende da via de administração da substância;
- Circulação local: afeta a passagem da substância para os líquidos de distribuição no organismo;
- pH no sítio de absorção: uma substância que corresponde a um ácido fraco será melhor absorvida em locais com pH mais baixos, enquanto a absorção de uma base fraca será favorecida em pH's mais elevados;
- pKa da substância: valor do pH em que 50% das moléculas encontram-se na forma não ionizada, mais lipossolúvel e capaz de atravessar a membrana;
- Concentração da substância: o gradiente de concentração da substância é um fator importante, uma vez que, na maioria dos casos, a absorção ocorre por difusão passiva (transcelular). No caso de uma substância ser absorvida por meio desse mecanismo, com uma cinética de primeira ordem, diz-se que o aumento da dose administrada corresponde ao aumento da absorção da substância;
- Formação cristalina ou amorfa: a ocorrência de polimorfismo estrutural pode levar a estruturas cristalinas com distintas características de solubilidade, assim como, a ocorrência de estruturas amorfas pode facilitar a solubilidade.

A principal prerrogativa físico-química relacionada à absorção é que qualquer substância para ser absorvida deve primeiramente estar solubilizada no local de absorção. Sendo assim, todos os fatores acima discutidos, influenciam,

principalmente, a etapa que antecede a absorção propriamente dita, ou seja, a solubilização da molécula (STORPIRTIS *et al.*, 2011).

Além da relação solubilidade-absorção, outras relações como a absorção, permeabilidade e biodisponibilidade foram estudadas por Amidon e seus colaboradores ao longo de décadas. O resultado desses estudos foi a proposição de uma classificação de fármacos de acordo com seu grau de solubilidade e de permeabilidade. Esse sistema classificatório foi denominado Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON *et al.*, 1995), e é adotado no mundo todo, até mesmo pelas agências regulatórias em saúde, para a determinação ou exclusão de estudos comprobatórios em função das classes a que pertencem as moléculas.

Nesse trabalho os autores classificam os compostos em quatro classes. São elas:

- Classe 1: compostos de alta solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 2: compostos de baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 3: compostos de alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- Classe 4: compostos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

Recentemente, esse grupo de pesquisadores publicou um trabalho sobre a classificação biofarmacêutica para alguns compostos oriundos de plantas medicinais em sistema *in vitro* e que são utilizados como marcadores químicos. Nesse estudo os autores ressaltaram a dificuldade na realização dos ensaios propostos, uma vez que a composição de extratos e produtos de origem natural é altamente complexa e variável (AMIDON *et al.*, 2012).

Entre as diversas classes de compostos apresentadas no referido estudo, alguns compostos flavonoídicos foram avaliados e classificados de acordo com o SCB: silibina A e B (classe 3), biochanina A (classe 4), daidzeína (classe 4), formononetina (classe 2), genistéína (classe 4), quercetina-3-*O*-coumaroil-glicosilramnosídeo (classe 3), quercetina (classe 4) e apigenina (classe 4). Esses dados indicam que, com exceção da formononetina, todos os outros compostos flavonoídicos testados foram agrupados em classes de baixa permeabilidade, o que leva a grande variação no parâmetro da biodisponibilidade.

Sendo assim estudos farmacocinéticos com flavonóides que tenham como objetivo determinar os parâmetros que caracterizam a absorção e a disposição

(distribuição e eliminação) e metabolismo do flavonóide no organismo tornam-se muito importantes para essa classe de compostos.

Os estudos farmacocinéticos resultam na determinação de modelos matemáticos complexos (modelos farmacocinéticos) que sejam capazes de explicar a movimentação de uma dada molécula no organismo vivo. No caso de estudos pré-clínicos, os organismos de escolha são, inicialmente, os roedores (STORPIRTIS *et al.*, 2011; TOZER; ROWLAND, 2009).

### 1.3.1 Modelos Farmacocinéticos

Segundo os modelos compartimentais, o organismo é concebido como compartimentos que o representam do ponto de vista da cinética dos fármacos. Esses modelos podem ser classificados em: monocompartimental (um compartimento) ou multicompartimentais (mais que um compartimento). Por meio desses modelos matemáticos, simulam-se os processos de absorção, distribuição e eliminação de uma substância no organismo. Os modelos compartimentais têm como premissa a homogeneidade de distribuição e o equilíbrio instantâneo das concentrações do fármaco dentro de cada compartimento.

Desse modo é possível obter uma simplificação das equações que descrevem o modelo. Para a definição do modelo compartimental que melhor se ajusta a disposição cinética de um fármaco, é necessária a transformação dos dados de concentração em logaritmo natural ("ln") da concentração e então plotar esses dados *versus* tempo utilizando um software de regressão não linear, que fornece estimativas de incerteza dos parâmetros em análise através de desvio-padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança, sendo que desvios sistemáticos indicam a não adequação do modelo (GIBALDI *et al.*, 1982; STORPIRTS *et al.*, 2011).

Após administração intravascular (i.v.) de um medicamento, em uma única dose, e a seleção do melhor modelo, torna-se possível definir e calcular os principais parâmetros farmacocinéticos relacionados à etapa de distribuição e eliminação. Os parâmetros farmacocinéticos podem ser definidos como constantes biológicas ou relações de proporcionalidade obtidas por meio da aplicação de um modelo farmacocinético na interpretação do destino de uma substância no organismo. Os principais parâmetros farmacocinéticos são: volume aparente de distribuição (Vd),

*clearance* ( $C_l$ ), meia-vida de eliminação ( $t_{1/2}$ ) e área sob a curva (ASC) (STORPIRTS *et al.*, 2011).

Já para a determinação dos parâmetros relacionados à fase de absorção estudos que utilizando a via oral de administração ou a avaliação da absorção diretamente no intestino delgado por perfusão intestinal, por exemplo, podem ser utilizados (Muñoz *et al.*, 2005). Os parâmetros farmacocinéticos que explicam essa fase são a constante de absorção ( $k_a$ ) que pode ser de ordens cinéticas distintas (zero ou primeira ordem), meia-vida de absorção ( $t_{1/2abs}$ ), fração absorvida ( $F_{abs}$ ) e a biodisponibilidade (BD).

Muitos são os métodos que podem ser utilizados para estudos de absorção intestinal de uma dada molécula. A seguir, explicaremos um pouco sobre essas técnicas.

### 1.3.2 Ensaio de absorção intestinal

Um dos pré-requisitos para a extrapolação de propriedades biológicas verificadas *in vitro* para os efeitos farmacodinâmicos esperados *in vivo* é o conhecimento do comportamento farmacocinético e da biodisponibilidade após administração oral, sendo essas informações essenciais para a etapa pré-clínica de desenvolvimento de um novo produto (GRAEFE *et al.*, 1999).

Modelos de absorção *in vitro* e *in situ*, como o uso de células Caco-2, e perfusão intestinal em animais são amplamente utilizados para investigar mecanismos de transporte, classificar a permeabilidade do composto e prever sua absorção *in vivo* em humanos (AMIDON *et al.*, 1995; LENNERNÄS *et al.*, 1997). Tem sido relatado que esses modelos se correspondem muito bem à permeabilidade obtida *in vivo* e a fração de dose absorvida em humanos tendo, portanto, uma previsão adequada de valores (FAGERHOLM *et al.*, 1996). Uma das principais vantagens da técnica de perfusão intestinal *in situ* é a presença de um sistema sanguíneo e nervoso intacto dos animais durante a realização do experimento. Essa técnica nos permite calcular a permeabilidade intestinal da substância, sua constante de absorção, e avaliar seu mecanismo de transporte, bem como utilizar os dados obtidos para correlações com modelos farmacocinéticos. Nos ensaios de perfusão intestinal é possível associar outras técnicas que possibilitam a elucidação de mecanismos de inibição da absorção, utilizando, por exemplo, um inibidor de

glicoproteína-P (P-gp) (XU *et al.*, 2008) ou técnicas de obstrução do ducto biliar, que permitem avaliar a reabsorção enterohepática da substância em estudo (ROBERTS *et al.*, 2002).

A P-gp é uma proteína transmembrana que funciona como uma bomba de efluxo ATP - dependente, promovendo ativamente a retirada de xenobióticos da célula. Ela está expressa na superfície celular de todo trato gastrointestinal, além de outros tecidos como o cérebro, agindo como uma barreira bioquímica importante para a biodisponibilidade de fármacos. Ela também desempenha um papel significativo na distribuição, metabolismo e eliminação de muitos substratos terapêuticos clinicamente importantes (VARMA *et al.*, 2003).

Mesmo sendo a difusão passiva o mecanismo de absorção predominante de muitos fármacos, tem sido relatado que o efluxo mediado pela P-gp e outras proteínas podem afetar a taxa e a extensão de absorção e metabolismo de primeira-passage em intestino de humanos e ratos (GAN *et al.*, 1996; KRUIJTZER *et al.*, 2002). Uma melhor compreensão da regulação fisiológica da P-gp é a chave para delinear estratégias para a melhoria na eficácia terapêutica destes fármacos. Os fármacos verapamil e digoxina são conhecidos substratos da P-gp e são amplamente utilizados para a compreensão mecanismos da ação dessa proteína (XU *et al.*, 2008). Neste trabalho utilizamos o verapamil nos ensaios de absorção intestinal como inibidor da P-gp para avaliação do seu envolvimento na absorção do flavonóide.

A recirculação enterohepática é outro fator fisiológico que pode alterar a extensão e taxa de absorção de um dado composto. Ocorre através da excreção biliar e reabsorção intestinal de uma substância, às vezes com conjugação hepática e desconjugação intestinal. Essa recirculação é observada no aparecimento de múltiplos picos de concentração plasmática máxima, em estudos *in vivo*, tendo como consequência um aumento no tempo de meia vida de eliminação.

Fatores que influenciam a excreção biliar incluem as características da substância como sua estrutura química, polaridade e tamanho molecular, seu transporte através de membranas, sua biotransformação e possíveis reabsorções nos ductos biliares intra-hepáticos. A biodisponibilidade de uma substância pode ser afetada pela sua taxa de absorção intestinal, influência da P-gp e o metabolismo que pode ocorrer na parede intestinal (ARIAS *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.*, 2002).



Sem sombra de dúvidas, entre os compostos polifenólicos, a classe dos flavonóides é a que possui mais estudos sobre suas etapas farmacocinéticas e, entre os flavonóides, a quercetina é o composto mais estudado. Esse interesse pelo flavonóide quercetina ocorre devido a sua ampla distribuição em plantas medicinais e alimentos, por sua fácil obtenção e por suas propriedades farmacológicas amplamente estudadas. A quercetina é a aglicona do flavonóide em estudo nesse trabalho, a avicularina. Sendo assim, os ensaios realizados com a quercetina aglicona foram significativos para delineamento dos ensaios propostos com o flavonóide glicosilado avicularina.

As extensões da absorção de uma substância assim como sua biodisponibilidade sistêmica dependem de vários fatores: estabilidade química do composto a partir do momento de sua administração até o local da absorção; taxa de degradação devido ao pH e microorganismos intestinais; mecanismos do processo de absorção; taxa de ligação a proteínas plasmáticas e finalmente, da extensão do efeito de primeira passagem (MESKIN *et al.*, 2004).

Para a avaliação do perfil farmacocinético de uma substância e a determinação dos seus parâmetros farmacocinéticos faz-se necessário o planejamento de um estudo com animais saudáveis e a disposição de um método bioanalítico sensível, seletivo, preciso e corretamente validado para a quantificação da substância e de seus produtos de biotransformação na matriz biológica, de acordo com guias e protocolos disponíveis (ANVISA, 2012; PAIVA *et al.*, 2005).

## **1.4 Ensaios Analíticos**

### *1.4.1 Métodos analíticos de quantificação*

Métodos como a colorimetria, a cromatografia planar e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são utilizados para quantificação de flavonóides (MAGNANI *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2002, NIRANJAN *et al.*, 2009; CINTIA *et al.*, 2004). Com o avanço das técnicas de separação, desenvolveu-se a cromatografia de ultra eficiência (CLUE) que abrange os mesmos princípios da CLAE, porém com partículas menores (2 µm) na coluna e bombas mais potentes, com a pressão máxima até 15000 psi, aumentando assim a eficiência e diminuindo consideravelmente o tempo de análise (MALDANER *et al.*, 2009).

Tanto a CLAE como a CLUE podem ser acopladas a diferentes sistemas de detecção, dentre eles: detector de arranjos diodo (DAD), fluorescência, infravermelho, índice de refração, eletroquímicos e o espectrômetro de massas (EM). O acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade e sensibilidade) (VÉKEY, 2001).

Dentre as fontes de ionização disponíveis, a mais utilizada para acoplamento com CLAE é a ESI (ionização por *electrospray*). A transferência de espécies iônicas de uma solução para a fase gasosa na técnica de ESI envolve três passos: dispersão de um fino spray de gotas carregadas, positiva ou negativa, evaporação do solvente, e saída dos íons das gotículas altamente carregadas do capilar, mantido em alta voltagem (2,5 a 6 kv) (HO *et al.*, 2003).

Na técnica de ionização por *electrospray* o processo de ionização ocorre principalmente por reações ácido-base de Bronsted-Lowry, pela protonação ou desprotonação de moléculas (CECH; ENKE, 2001; CROTTI *et al.*, 2006). Assim, as substâncias que apresentam grupos funcionais básicos (aminas, amidas, ésteres, lactonas) tendem a ionizar melhor no modo de ionização positiva, dada a maior facilidade com que estes grupos são protonados em solução. Inversamente, moléculas contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, serão melhor ionizadas no modo de ionização negativa, produzindo moléculas desprotonadas relativamente estáveis (GOBBO-NETO, 2007).

Este método é considerado um método muito brando, e pouca energia residual é retida pelo analito após a ionização, normalmente acarretando baixa fragmentação. Para contornar este problema, foram desenvolvidos equipamentos de espectrometria de massas seqüencial (EM/EM), no qual as moléculas podem sofrer fragmentação. Em uma análise EM/EM, um íon do primeiro estágio, chamado íon precursor, é selecionado e transferido para uma célula de colisão. A fragmentação do íon precursor se dá através da dissociação induzida por colisão (CID) utilizando um gás inerte (Ar, N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>). Os íons resultantes (íons produto ou de segunda geração) são, de modo geral, altamente indicativos da estrutura do íon precursor (HO *et al.*, 2003).

Existem diversos tipos de analisadores de massas, dentre eles: analisador quadrupolar, analisador de tempo de voo (TOF) e o *ion-trap*, sendo que neste

trabalho foi utilizado um equipamento contendo três analisadores de massas quadrupolar ligados em série, constituindo um triplo quadrupolo (TQD).

O analisador quadrupolar é composto de quatro hastes metálicas paralelas onde é aplicado um potencial RF (rádio frequência) e uma corrente elétrica do tipo DC (Direct Current). Os íons gerados na fonte de ionização do instrumento são direcionados ao centro das quatro hastes, atravessando axialmente o quadrupolo, gerando uma trajetória dependente do campo elétrico produzido, sendo que somente íons de uma determinada razão  $m/z$  (massa/carga) chegarão ao detector por ter uma trajetória estável. A RF será alterada para que íons de  $m/z$  diferentes tenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo e possam ser detectados pelo detector, gerando um espectro de massas (ARDREY *et al.*, 2003).

O funcionamento de um espectrômetro de massas triplo quadrupolar (TQD) consiste em algumas etapas comuns a todos os equipamentos. Inicialmente, uma mistura de íons é inserida no quadrupolo 1 (Q1), liberando apenas um íon precursor. O segundo estágio quadrupolo 2 (Q2), o íon precursor colide com as moléculas de  $N_2$  ou Ar em uma pressão de aproximadamente  $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  bar e se fragmenta formando os íons filhos. O quadrupolo 3 (Q3) atua como um segundo filtro, permitindo que somente determinados íons filhos passem para o detector (HARRIS, 2003).

Existem diferentes modos de operação para a fragmentação (EM/EM) no espectrômetro de massas TQD. No modo MRM (multiple reaction monitoring) o primeiro (Q1) e o último (Q3) analisadores de massa são utilizados como filtros de massa para o isolamento do íon e seu fragmento correspondente. O sinal do fragmento do íon é monitorado ao longo do tempo de eluição cromatográfica, selecionado de acordo com seu tempo de retenção, o que confere uma alta sensibilidade e especificidade a essa análise. Este modo é indicado para análises quantitativas, permitindo que o íon de interesse seja analisado com a menor interferência associada a oscilações na linha de base (WATERS, 2006).

#### 1.4.2 Desenvolvimento e validação de metodologia

Para que um método analítico seja considerado confiável é fundamental sua validação para garantir, através de estudos experimentais, a eficácia e reprodução deste método, atendendo as exigências necessárias para sua aplicação analítica e assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI, *et al.*, 2004).

Os desenvolvimentos e validações das metodologias desenvolvidas nesse trabalho foram baseados na Resolução – RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que consiste em um guia para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Dentre os ensaios aplicados para validação de um método bioanalítico podemos destacar os ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração (linearidade), efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, conforme suas especificações, descritas abaixo (ANVISA, 2012).

#### Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado como um valor exato, sob as condições experimentais estabelecidas, produzindo um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

#### Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Esta faixa de variação deve ser linear e abranger a faixa de concentração da amostra a ser analisada.

#### Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser subdividido em:

- Limite Inferior de Quantificação (LIQ): menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão.
- Limite Superior de Quantificação (LSQ): maior quantidade do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão.

#### Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra

complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o sinal de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.

#### Efeito Residual

Caracteriza-se por um efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. São feitas injeções de uma amostra branco antes e depois da injeção do último ponto da curva, sendo que os resultados devem ser comparados com os obtidos do limite inferior de quantificação (LIQ). Os resultados de picos interferentes tempo de retenção do analito devem ser menores que 20% da resposta do LIQ, enquanto que os resultados de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser menores que 5% da resposta do padrão interno.

#### Efeito Matriz

O efeito matriz é determinado no intuito de averiguar possíveis interferências geradas pelas substâncias que constituem a matriz amostral, provocando fenômenos de diminuição ou ampliação de sinal ou resposta instrumental.

#### Precisão e Exatidão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas do método. Ela é caracterizada por uma estimativa da dispersão dos resultados entre ensaios independentes, por meio da repetitividade de amostras diferentes, em condições pré-determinadas. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

Estes parâmetros devem ser determinados em uma mesma corrida (intracorrída) e em corridas diferentes (intercorridas) em dias distintos. Em cada corrida devem ser realizadas cinco replicatas em quatro concentrações: CQB (Controle de Qualidade Baixo), CQM (Controle de Qualidade Médio) e CQA (Controle de Qualidade Alto) e LIQ (Limite Inferior de Quantificação), seguidas do

cálculo da média dos valores obtidos de cada concentração, avaliação do coeficiente de variação e do erro padrão relativo.

## ***OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi a determinação dos perfis farmacocinéticos de absorção da avicularina em ratos na presença e ausência de sais biliares e inibidor da glicoproteína-P, e a avaliação do seu perfil farmacocinético de distribuição e eliminação.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolamento do flavonóide *O*-glicosilado avicularina das partes aéreas de *Bidens sulphurea*
- Caracterização deste flavonóide quanto ao seu grau de pureza
- Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação da avicularina e vermelho de fenol em perfundido intestinal por CLUE-DAD-EM/EM
- Determinação do perfil de absorção intestinal de avicularina em ratos em duas doses distintas
- Determinação da influência dos sais biliares no perfil de absorção intestinal da avicularina em ratos
- Determinação da influência da glicoproteína-P sobre o efluxo da avicularina e no perfil da sua absorção intestinal em ratos
- Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de avicularina em plasma de ratos por CLUE-DAD-EM/EM
- Determinação da taxa de ligação da avicularina às proteínas plasmáticas totais de ratos
- Avaliação do perfil farmacocinético de distribuição e eliminação da avicularina após administração intravascular em ratos em estudo piloto



# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento e caracterização estrutural do flavonóide avicularina

##### 3.1.1 Obtenção de espécimes de *Bidens sulphurea*

As partes aéreas (folhas e caules) de *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. foram obtidas no cerrado do município de Campo Grande em Mato Grosso do Sul. Para tais estudos químicos, foi concedida a autorização de acesso ao patrimônio genético no CNPQ, sob o número 010174/2011-7 (ANEXO 1).

##### 3.1.2 Obtenção do flavonóide isolado avicularina (SILVA, 2009)

Após a coleta o material vegetal foi seco, triturado e submetido à extração por percolação utilizando etanol 90% e fluxo de 20 gotas por minuto para obtenção do extrato hidroalcolólico (BsFcEt). A partir deste extrato (BsfcEt) foi obtida uma solução hidrometanólica, que em seguida foi submetida ao processo de partição nos solventes: hexano, diclorometano (DCM) e acetato de etila (Ac). As partições BsfcEt/DCM e BsfcEt/Ac foram então submetidas à cromatografia em coluna clássica Sephadex LH20, com solvente de eluição MeOH, para obtenção de frações mais purificadas, como pode ser observado na figura 4.



Figura 4. Coluna cromatográfica clássica Sephadex LH20 em fase de separação das frações. Fonte: Arquivo pessoal

As frações obtidas por cromatografia clássica foram submetidas à cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC), utilizando fase móvel:

AcOEt:CHCl<sub>3</sub>:MeOH:HAc (12:4:6:1) e revelador: NP/PEG, e as que continham manchas referente a classe dos flavonóides de interesse foram reunidas e submetidas a nova fase de purificação, como esquematizado na figura 5.

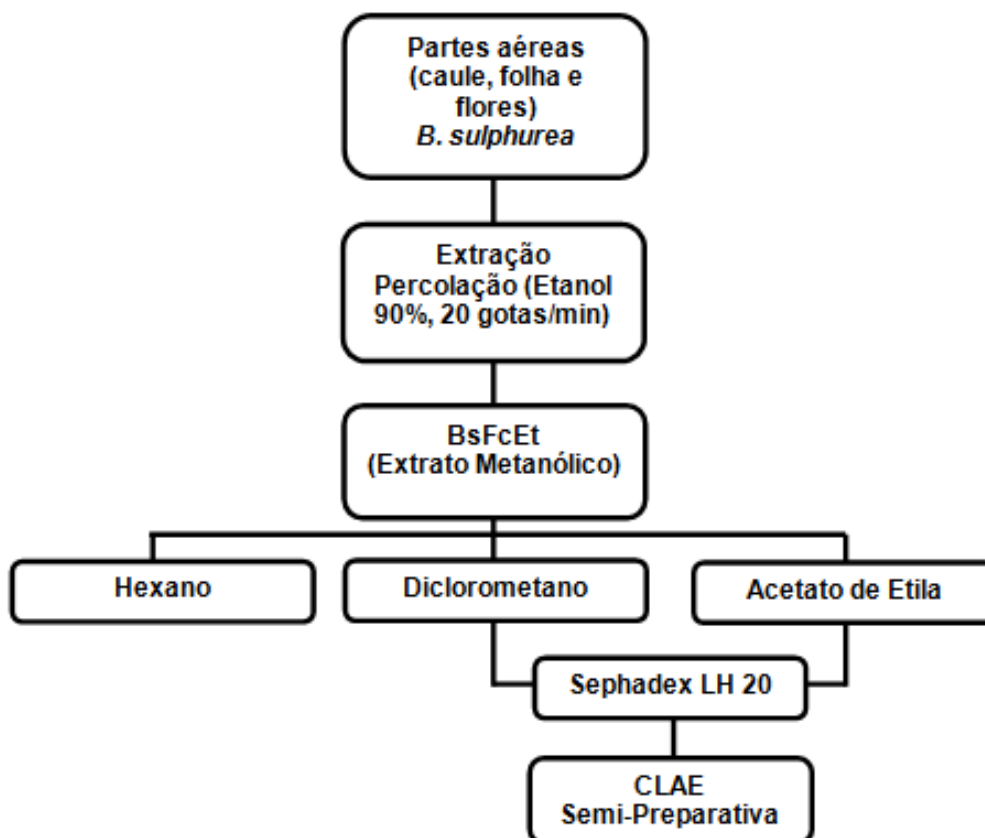


Figura 5. Esquema das etapas envolvidas no isolamento da avicularina.

As frações selecionadas obtidas pela cromatografia clássica foram então purificadas por CLAE-DAD semi-preparativa, em um equipamento da marca Shimadzu<sup>®</sup> composto pelo controlador SCL-10A VP, por duas bombas LC-6A e pelo detector espectrofotométrico SPD-6AV, utilizando coluna semi-preparativa C18, da marca Shimadzu, Shim-pack prep-ods (H) kit. A vazão da fase móvel foi de 9 mL/min, sendo utilizado um gradiente de água acidificada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e acetonitrila (ACN) também acidificada com 0,1% de TFA em bombas separadas. A tabela 1 apresenta o gradiente de eluição utilizado.

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado na purificação de avicularina a partir das frações de BsfEt/Ac por CLAE-DAD. Estão representados os tempos de eluição e os respectivos percentuais de acetonitrila acidificada.

Tempo (min)	ACN (%)
0,01	15
60	32
64	100
70	100
71	15
85	15

A avicularina foi identificada no cromatograma pelo seu tempo de retenção (40,5 minutos) e espectro de UV, como relatados por SILVA (2009), sendo posteriormente confirmado por espectrometria de massas. Os sinais cromatográficos foram coletados em frascos de acordo com seu tempo de eluição, o solvente orgânico foi evaporado e as amostras congeladas em freezer -80°C. As amostras foram então submetidas à liofilização em liofilizador da marca Labcongo® FreeZone, modelo 76705 e o produto isolado foi armazenado em dessecador, ao abrigo de luz, até o momento das análises de caracterização.

### 3.1.3 Caracterização estrutural e determinação de pureza

O flavonóide *O*-glicosilado avicularina foi caracterizado quanto a sua pureza ajustada, espectrometria de massas de alta resolução, ressonância magnética nuclear (RMN), porcentagem de água e solventes residuais e doseamento de metais.

Para a determinação da pureza em massa de alta resolução foi utilizado um espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupolo e tempo de voo (UltraTOF-Q Bruker- Daltonics) com ionização por *electrospray* (ESI) no modo negativo.

A pureza cromatográfica foi determinada por espectroscopia de ultravioleta (UV). O sistema utilizado foi ACQUITY TQD CLAE-DAD-EM Waters, a coluna empregada foi uma ACQUITY 1,7µm BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) C18, com dimensões de 2,1 x 50 mm, equipada com pré-coluna do mesmo material e fase móvel Água: MeOH (60:40). A detecção foi de 190 a 600 nm em UV e o modo de ionização negativo.

Foram realizadas análises de RMN para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , utilizando o equipamento espectrômetro Bruker-Advance modelo DRX 400, operando em 400 MHz para as análises de  $^1\text{H}$  e espectrômetro Bruker-Advance modelo DPX 300, operando em 75

MHz para as análises de  $^{13}\text{C}$ . As amostras foram preparadas no solvente deuterado-DMSO- $\text{d}_6$  ( $d = 99,9\%$ ).

A análise de resíduos minerais foi realizada pela técnica de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Equipamento Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo Elan DRC II. Os parâmetros utilizados foram: vazão do gás de nebulização (argônio) de 0,7 ml/min e potência da radiofrequência de 1100 W. As amostras e padrões foram preparados em tubo falcon de 15 mL com  $\text{HNO}_3$  de alta pureza. Os padrões de referência utilizados foram Perkin Elmer<sup>®</sup>.

Por fim, a determinação da porcentagem de água e solventes residuais foi realizada pelo equipamento de módulo simultâneo TG-DTG/DTA modelo Q600, marca TA Instruments do Instituto de Química de São Carlos. As condições de análise foram: atmosfera de nitrogênio a 100 mL/min e gradiente de aquecimento 10°C/min (0 a 1000°C).

### 3.2 Avaliação do perfil farmacocinético de absorção em ratos

#### 3.2.1 Desenvolvimento e Validação de metodologia analítica para doseamento de avicularina e vermelho de fenol em perfundido intestinal de rato

A metodologia analítica foi desenvolvida e validada seguindo as orientações do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Os parâmetros avaliados foram: limite de detecção e quantificação, linearidade, seletividade, efeito residual, efeito de matriz, estabilidade, precisão e exatidão. O padrão de avicularina foi obtido por isolamento a partir das partes aéreas da espécie *Bidens sulphurea*, e caracterizado, como apresentado na sessão 3.1, sendo considerada sua pureza de 93,27% nos cálculos e pesagem do padrão. O padrão de vermelho de fenol utilizado foi da marca Sigma<sup>®</sup>.

A metodologia analítica para quantificação de avicularina e vermelho de fenol foi desenvolvida por cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE) acoplada a detector de arranjo diodo (DAD) e espectrômetro de massas seqüencial (CLUE-DAD-EM/EM). O sistema utilizado foi ACQUITY TQD UPLC-DAD-MS Waters<sup>®</sup>, a coluna empregada foi uma ACQUITY 1,7  $\mu\text{m}$  BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) C18, com dimensões de 2,1 x 50 mm.

A fase móvel foi composta por metanol (MeOH) e água ambos contendo 0,1% de ácido acético (HAc). A temperatura da coluna foi mantida a 30°C e as amostras

aconditionadas a 10 °C no injetor automático. O fluxo de fase móvel foi de 0,3 ml/min e o volume de injeção foi de 5 µl. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 13 mm PTFE, 0,22 µm descartáveis. Os seguintes gradientes de fase móvel foram empregados (tabela 2), sendo que nos tempos de 0 a 1 minuto a fase móvel foi enviada para o descarte, não passando pelo detector de massas:

Tabela 2. Gradiente de fase móvel utilizado no método por CLUE-DAD-EM/EM para análise simultânea de avicularina e vermelho de fenol.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>% de MeOH (0,1% de ácido acético)</b>
0,01	40
3	40
3,2	100
3,6	100
3,7	40

Para quantificação tanto da avicularina como do vermelho de fenol foi otimizado um método MRM (*multiple reaction monitoring*) no modo negativo de ionização. As energias de cone e colisão foram ajustadas para cada analito.

Em seguida foram feitos ajustes no sistema cromatográfico para a escolha correta dos solventes de lavagem da agulha e ajuste do volume de injeção para garantir a ausência do efeito residual. Os parâmetros estão na tabela 3 e 4.

Tabela 3. Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação da avicularina e do vermelho de fenol.

<b>Parâmetros ajustados no MS TUNE</b>			
<b>Capilar</b>	2,5kV	<b>LM resolução 1</b>	2,7
<b>Cone:</b>	-	<b>HM resolução 1</b>	15,0
<b>Rf lentes</b>	0,1	<b>energia do íon 1</b>	0,5
<b>temperatura da fonte:</b>	150 °C	<b>Entrada</b>	50,0
<b>temperatura de dessolvatação</b>	350 °C	<b>Colisão</b>	-
<b>fluxo de gás de dessolvatação (nitrogênio)</b>	600 L/h	<b>Saída</b>	50,0
<b>fluxo de gás no cone (nitrogênio)</b>	0 L/h	<b>LM resolução 2</b>	9,3
<b>Fluxo do gás de colisão (argônio)</b>	0,15 L/h	<b>HM resolução 2</b>	14,9
<b>Pressão na cela de colisão</b>	3,02x10 <sup>-3</sup>	<b>energia do íon 2</b>	0,6

Tabela 4. Parâmetros do método MRM para quantificação simultânea de avicularina e vermelho de fenol (modo negativo de ionização).

Composto	Íons Monitorados	Energia no cone (kV)	Energia de colisão (eV)
Avicularina	Quantificação	433 > 300.8	32
	Confirmação	433 > 271	32
Vermelho de Fenol	Quantificação	353 > 92.92	44
	Confirmação	353 > 79.96	44

Todos os solventes utilizados tanto nas análises por CLAE como por CLUE-EM foram de grau HPLC (J.T. Baker<sup>®</sup>), além de água ultrapura (18,2 mΩ, Milli-Q, Millipore<sup>®</sup>).

### 3.2.1.1 Preparo das amostras para desenvolvimento e validação

Para o preparo das amostras foram adicionados 50 µL de solução de avicularina, 50 µL da solução contendo padrão de vermelho de fenol e 100 µL da solução de diluição (MeOH:H<sub>2</sub>O; 40:60). A avicularina foi avaliada na faixa linear de 0,1 a 4,0 µg/ml e o vermelho de fenol na faixa de 0,1 a 12 µg/ml. A amostra foi agitada em vórtex e em seguida filtrada para os vials utilizando filtros de 13 mm de PTFE, poro de 0,22 µm descartáveis. Devido ao preparo da amostra ser apenas uma diluição, pois a matriz não é complexa, não foi necessário o uso de padrão interno.

### 3.2.1.2 Parâmetros para desenvolvimento e validação

#### 3.2.1.2.1 Limite de Detecção

Foram analisadas concentrações decrescentes de avicularina e vermelho de fenol sendo o limite de detecção estabelecido pela menor concentração dos analitos detectada sem interferência do sinal ruído, gerando um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema.

#### 3.2.1.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de gráficos de calibração relacionando a resposta do equipamento em função das concentrações dos analitos

avicularina e vermelho de fenol. A análise de regressão e o gráfico de resíduos foram realizadas com auxílio do software QuanLynx®.

#### *3.2.1.2.3 Limite de Quantificação*

Foram estabelecidos os valores de limite inferior de quantificação (LIQ) e limite superior de quantificação (LSQ) de acordo com os percentuais de desvios estabelecidos. Para isso, foram realizadas análises de concentrações decrescentes dos analitos até o menor nível quantificável com precisão e exatidão adequadas para a análise (precisão 20% e exatidão 80 a 120%).

#### *3.2.1.2.4 Seletividade*

A seletividade foi determinada pela análise cromatográfica da amostra de perfundido intestinal branco (LLC perfundido) para identificar a presença de possíveis interferentes de matriz no tempo de retenção da avicularina e vermelho de fenol quando comparados a solução aquosa dos analitos na concentração do limite inferior de quantificação (LIQ). As respostas de sinais cromatográficos referentes a interferentes foram consideradas.

#### *3.3.1.2.5 Efeito Residual entre corridas*

Para análise de possível efeito residual entre corridas foram realizadas três injeções da mesma amostra de perfundido intestinal branco, sendo uma antes da curva de calibração e duas logo após a injeção do último ponto da curva, limite superior de quantificação (LSQ) e avaliado a presença de sinal dos analitos na amostra branco.

#### *3.3.1.2.6 Efeito de Matriz*

Para a avaliação do efeito de matriz foi preparada uma amostra de perfundido intestinal branco e uma solução de MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60) contendo os padrões (avicularina e vermelho de fenol) nas concentrações próximas ao limite inferior de quantificação da avicularina e do vermelho de fenol (0,1 µg/mL). As amostras foram analisadas no modo de infusão combinada, onde a amostra branco foi injetada e durante a corrida analítica a solução de padrões foi infundida constantemente (infusão direta). Foi avaliada a supressão dos íons referentes aos analitos no modo SCAN e MRM e no modo negativo de ionização.



### 3.3.1.2.7 Precisão e Exatidão

Para análise da precisão e exatidão do método foram realizadas cinco replicatas nas concentrações: CQB (0,2 µg/ml), CQM (2 µg/ml), CQA (6 µg/ml), e na concentração de LIQ (0,1 µg/ml) para avicularina e CQB (0,7 µg/ml), CQM (5 µg/ml), CQA (9 µg/ml) e na concentração de LIQ (0,5 µg/ml) para o vermelho de fenol.

Em seguida foi calculada a média dos valores obtidos de cada concentração, o desvio padrão relativo e seu coeficiente de variação. A precisão foi determinada em uma mesma corrida (intracorrída) e em três corridas diferentes (intercorridas) em dias distintos.

A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV), no qual não foram admitidos valores superiores a 15%, exceto para o LIQ que é permitido valores ≤ 20%. Tais valores foram obtidos segundo a fórmula a seguir:

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Experimental}} \times 100 \quad (1)$$

A exatidão foi calculada a partir das mesmas amostras utilizadas para a determinação de precisão, em porcentagem, pela equação 2. Os valores de ± 20% para o LIQ, e ± 15% para as demais concentrações (CQB, CQM, CQA e CQD) foram admitidos. A exatidão foi calculada mediante a seguinte equação:

$$E(\%) = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Valor Nominal}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.3.1.2.8 Estabilidade de curta duração

Foram validados os parâmetros: tempo de espera no injetor, ciclo de congelamento e descongelamento e estabilidade da solução estoque dos padrões avicularina e vermelho de fenol.

Tempo de espera no injetor: para este teste, as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) de avicularina e vermelho de fenol foram preparadas em triplicata e mantidas dentro do auto-injetor a 10°C e analisadas nos tempos de 0 e 24 horas.

Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo: para a avaliação da estabilidade da avicularina e do vermelho de fenol durante o congelamento e

descongelamento da amostra, foram analisadas três amostras de cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) da seguinte maneira: as amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e mantidas por 24 horas e sete dias. Foram então submetidas ao descongelamento natural à temperatura ambiente, em seguida procedeu-se o preparo da amostra padronizado e posteriormente análise.

Estabilidade de soluções padrão: para a estabilidade das soluções padrão, foram utilizadas as soluções mãe de 200  $\mu\text{g/ml}$  para a avicularina e 400  $\mu\text{g/ml}$  de vermelho de fenol em  $\text{MeOH:H}_2\text{O}$  (40:60). As soluções foram analisadas recém-preparadas, após seis horas à temperatura ambiente e depois de sete dias de preparo e armazenadas em geladeira. As áreas dos sinais cromatográficos da avicularina e vermelho de fenol foram comparados.

Para todos os ensaios, as amostras do tempo zero foram analisadas imediatamente após o preparo. Os critérios utilizados para a avaliação das estabilidades nas três condições testadas foram os mesmos aplicados à precisão e exatidão (CV e E).

#### 3.3.1.2.9 *Análise de quercetina em perfundido intestinal*

Foi desenvolvido um método no modo MRM para avaliar a presença de quercetina nas amostras de perfundido intestinal. Os parâmetros de tune foram os mesmos utilizados para a avicularina e vermelho de fenol, e os parâmetros desenvolvidos para a análise de quercetina foram: modo de ionização negativo, transição MRM 301 > 151, energia do cone 30 kV e energia de colisão 30 eV.

#### 3.2.2 Estudos de perfusão intestinal *in situ* da avicularina em ratos

Os estudos com animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais de Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, onde foram realizados os experimentos *in vivo*, protocolo nº058/2012 (ANEXO 2).

##### 3.2.2.1 *Preparo dos animais*

Os animais pertencentes ao biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Maringá, pesando entre 180 e 220g, foram colocados em jejum por cerca de 20 horas, com água *ad libitum*. Os animais foram subdivididos em dois grupos contendo oito animais em cada um. Os grupos receberam diferentes doses de avicularina,

sendo 1 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente. Cada grupo seguiu o mesmo procedimento descrito a seguir.

### 3.2.2.2 Preparo das soluções de perfusão

#### a) Líquido de lavado curto (DINIZ, 2007):

A solução denominada líquido de lavado curto (LLC), é constituída por solução fisiológica de NaCl 0,9% (p/v) em água destilada. O pH da solução foi medido e ajustado para 6,4, próximo ao valor encontrado no intestino delgado. A solução reguladora de pH é constituída por uma solução de tampão fosfato, 66 mM, pH 6,4. Para o preparo da LLC foi utilizado, portanto, 9g de NaCl, 10 mL da solução de tampão fosfato e água destilada q.s.p 1000 mL.

Em osmômetro devidamente calibrado, a solução teve sua osmolaridade medida e ajustada para que fosse isosmótico em relação ao sangue (282 – 297 mOsm/l).

#### b) Soluções de perfusão contendo avicularina isolada

As soluções de avicularina foram preparadas por dissolução do flavonóide em 10 ml do LLC com auxílio de DMSO (1% v/v). Foi garantida a osmolaridade entre 282 – 297 mOsm/l, bem como o pH entre 6,4 – 6,8 e a temperatura em 37°C. Foi adicionado a solução final o padrão vermelho de fenol na concentração 20 µg/mL, marcador de entrada e saída de água no lúmen intestinal (XU, Y *et al.*, 2008). A quantidade de avicularina dissolvida foi a necessária para a administração das doses de 1 mg/kg e 5 mg/kg.

### 3.2.2.3 Ensaio de absorção intestinal *in situ*

Os animais foram anestesiados com a mistura quetamina+ xilazina (75 + 10 mg/kg) intraperitoneal (PAIVA *et al.*, 2005). Após anestesia completa, foram abertos na cavidade abdominal para a canulação do intestino delgado, de acordo com a técnica de Dolouisio's, adaptada e descrita por Muñoz e colaboradores (2005). Os animais foram mantidos a cerca de 37°C durante todo o experimento com o auxílio de uma lâmpada incandescente. Dez mililitros das soluções de perfusão contendo o flavonóide avicularina e o marcador vermelho de fenol (VF) nas doses em estudo foram perfundidas, sendo que, a cada tempo pré-determinado durante 30 minutos, uma alíquota de 300 µl foi coletada para análise das concentrações remanescentes

de avicularina e vermelho de fenol no lúmen intestinal. Os tempos de coleta foram 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min. Ao final do experimento, todo o volume da solução de perfusão restante foi recolhido e medido e o animal foi sacrificado por sobrecarga anestésica (PAIVA *et al.*, 2005). As amostras coletadas foram centrifugadas para eliminação de possíveis resíduos sólidos e o sobrenadante foi congelado a -80 °C até o momento da análise.

#### *3.2.2.4 Procedimentos analíticos para quantificação de avicularina e vermelho de fenol em perfundido intestinal*

As amostras obtidas foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas por 5 segundos em agitador vórtex. As amostras foram preparadas adicionando 100 µl de perfundido intestinal, 100 µl de uma solução de MeOH:H<sub>2</sub>O (40:60) em microtubos tipo eppendorf e filtrada para vial através de membrana com porosidade de 0,22 µm. Em seguida procederam-se as análises por CLUE-DAD-EM/EM, em metodologia previamente validada (3.2.1). Os dados obtidos foram tratados com auxílio dos softwares MASSLYNX<sup>®</sup> e EXCEL<sup>®</sup>. Os valores de concentração em cada amostra analisada foram utilizados para posterior análise estatística e determinação dos parâmetros farmacocinéticos.

#### *3.2.2.5 Avaliação comparativa da correção dos valores de reabsorção de água no intestino por dois métodos*

Após as determinações das concentrações de avicularina em cada amostra do perfundido intestinal, os teores de avicularina remanescentes no lúmen intestinal foram corrigidos em relação ao possível fluxo de entrada e saída de água no intestino. Para tanto, foram testados o método de correção pelo volume final do perfundido e o método de correção utilizando as concentrações de vermelho de fenol.

Para o primeiro método foi avaliada a correção dos teores de avicularina em função do volume final residual no intestino, utilizando o volume final remanescente medido no intestino ao final do experimento. De posse da medida do volume final, determinou-se a constante de movimentação de água assumindo-se um modelo de cinética de ordem zero (Muñoz, *et al.*, 2005) como pode ser visto na equação 3.

$$V_t = V_0 - k \cdot t \quad (3)$$

onde,  $v_t$  é o volume no tempo  $t$ ,  $V_0$  é o volume inicial e  $k$  é a constante de movimentação de água.

O segundo método corrige a concentração de avicularina no líquido remanescente por meio das concentrações de um marcador de movimentação de água, o vermelho de fenol (Xu *et al.*, 2008). Neste segundo caso as concentrações de avicularina foram corrigidas em cada tempo de análise utilizando a equação 4:

$$C_{t(\text{corrigida})} = C_t \times \frac{VF_{in}}{VF_t} \quad (4)$$

onde  $VF_{in}$  e  $VF_t$  são as concentrações de vermelho de fenol inicial e no tempo  $t$ , respectivamente e  $C_t$  é a concentração de avicularina no tempo  $t$ .

Foram analisados os dados de todos os animais pelos dois métodos e os resultados foram comparados caso a caso.

### 3.2.2.6 Cálculo do percentual absorvido de avicularina *in vivo*

Após as correções das concentrações avicularina remanescentes no intestino pelo método escolhido, os dados de cada animal foram avaliados para a determinação do percentual absorvido a cada tempo (Muñoz *et al.*, 2005).

A fração absorvida ( $F_{abs}$ ) foi calculada pela equação 5, utilizando o software EXCEL<sup>®</sup>.

$$F_{abs} = \frac{C_{t30}}{C_{t0}} \cdot 100\% \quad (5)$$

onde  $C_{t30}$  é a concentração de avicularina no perfundido no último tempo coletado (30 minutos) e  $C_{t0}$  é a concentração inicial de avicularina na solução de perfusão.

A comparação entre as médias de cada parâmetro farmacocinético foi realizada por ANOVA com alfa de 0,05, com auxílio do software EXCEL<sup>®</sup>, assim como o cálculo dos valores médio e o desvio padrão da fração absorvida nas duas doses.

### 3.2.3 Análise da influência da glicoproteína-P (P-gP) na absorção da avicularina

Para avaliação da possível influência da P-gP sobre a absorção intestinal da avicularina, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima para permeação intestinal do flavonóide (3.2.2). Entretanto, à solução de perfusão foi acrescido o verapamil, na concentração de 0,05 mM (XU *et al.*, 2008). O padrão de verapamil foi obtido da marca SIGMA<sup>®</sup>. Esse experimento foi realizado com oito animais na dose de 1 mg/Kg de avicularina. As amostras obtidas foram analisadas e tratadas da mesma forma que as advindas dos grupos que foram perfundido somente a avicularina.

### 3.2.4 Análise da influência dos sais biliares sobre a absorção intestinal da avicularina

Para análise da influência da bile sobre a absorção intestinal da avicularina, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima para permeação intestinal do flavonóide (3.2.2). Entretanto, ao abrir o animal, o ducto biliar foi localizado e obstruído com o auxílio de uma linha de algodão, segundo o trabalho de ARIAS e colaboradores (2003), antes de iniciar a perfusão intestinal *in situ*. Esse experimento foi realizado com oito animais na dose de 1 mg/Kg de avicularina. As amostras obtidas foram analisadas e tratadas da mesma forma que as advindas dos grupos que foram perfundido somente a avicularina.

### 3.2.5 Avaliação do perfil farmacocinético de absorção da avicularina

Após a obtenção dos valores concentrações remanescentes de avicularina corrigidos, os dados foram submetidos à análise de regressão utilizando sete modelos farmacocinéticos, com auxílio do programa SCIENTIST<sup>®</sup>.

Os modelos testados podem estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resumo dos modelos farmacocinéticos testados nos dados obtidos nos ensaios de absorção intestinal.

Modelo de cinética absorção	Equação	Equação (nº)	Referência
Ordem zero	$\frac{dA}{dt} = -k_0$	6	Gibaldi <i>et al.</i> , 1982
Primeira ordem (1 velocidade de absorção)	$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A$	7	
Primeira ordem (2 velocidades de absorção)	$\frac{dA}{dt} = A \cdot e^{-ka1.t} + e^{-ka2.t}$	8	
Não linear	$\frac{dA}{dt} = -\frac{K_m \cdot A}{V_m + A}$	9	
Absorção de primeira ordem e secreção ativa	$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A + \frac{V_{m_s} + A_E}{K_{m_s} + A_E}$	10	Muñoz <i>et al.</i> , 2005
Absorção de Michaelis-Menten e secreção ativa	$\frac{dA}{dt} = -\frac{V_m \cdot A}{K_m + A} + \frac{V_{m_s} + A_E}{K_{m_s} + A_E}$	11	
Absorção de primeira ordem combinada com Michaelis-Menten e secreção ativa	$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A - \frac{V_m \cdot A}{K_m + A} + \frac{V_{m_s} + A_E}{K_{m_s} + A_E}$	12	

\* A= concentração remanescente de solução avicularina no lúmen intestinal a cada tempo (%); t é o tempo (min) referentes a cada concentração, dA/dt= taxa de absorção, A<sub>0</sub> = concentração no tempo 0, k<sub>0</sub> = constante de ordem zero; k<sub>a</sub>, k<sub>a1</sub> e k<sub>a2</sub> = constantes de primeira ordem, V<sub>m</sub> = taxa de absorção máxima, k<sub>m</sub> = concentração de avicularina no qual a taxa de absorção é a metade da máxima, V<sub>ms</sub> = velocidade de secreção máxima, k<sub>ms</sub> = concentração na qual a taxa de secreção é a metade da máxima e A<sub>E</sub> = concentração da avicularina no enterócito (onde assumiu-se que A<sub>E</sub>=A).

Os modelos farmacocinéticos foram aplicados para cada conjunto de dados e foi assumido o modelo que melhor se ajustou. As análises de regressão não linear foram realizadas com auxílio do software SCIENTIST<sup>®</sup> e a definição do melhor modelo foi estabelecida pelo critério de seleção do modelo (MSC) calculado pelo programa. No caso de haver mais de um modelo com ajuste adequado foi adotado o modelo mais simples.

De posse da definição do modelo, os parâmetros farmacocinéticos de cada grupo de animais em estudo foram determinados também com auxílio do software SCIENTIST<sup>®</sup>. Posteriormente, foi aplicado teste de comparação de médias ANOVA (α=0,05) para análise da diferença do comportamento farmacocinético em cada tratamento. Os testes de médias foram realizados com auxílio do software EXCEL<sup>®</sup>.

### 3.3 Avaliação do perfil farmacocinético de distribuição e eliminação em ratos

3.3.1 Desenvolvimento e Validação de metodologia analítica para doseamento de avicularina em plasma de ratos.

A metodologia analítica foi desenvolvida e validada seguindo as orientações do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). Os parâmetros avaliados foram: limite de detecção e quantificação, linearidade, seletividade, efeito residual, efeito de matriz, estabilidade, precisão e exatidão. O padrão de avicularina foi obtido por isolamento a partir das partes aéreas da espécie *Bidens sulphurea*, e caracterizado, como apresentado na sessão 3.1, sendo considerada sua pureza de 93,27% nos cálculos e pesagem do padrão. O padrão interno utilizado foi a cumarina (Sigma®).

A metodologia analítica para quantificação de avicularina foi desenvolvida por cromatografia líquida de ultra-eficiência (CLUE) acoplada a detector de arranjo diodo (DAD) e espectrômetro de massas seqüencial (CLUE-DAD-EM/EM). O sistema utilizado foi ACQUITY TQD UPLC-DAD-MS Waters®, a coluna empregada foi uma ACQUITY 1,7 µm BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) C18, com dimensões de 2,1 x 50 mm com pré-coluna do mesmo material.

A fase móvel foi otimizada e composta por acetonitrila (ACN) e água ambas contendo 0,1% de ácido acético (HAc), a fim de evitar a supressão de ionização, bem como a limpeza e preservação do sistema do detector de massas. A temperatura da coluna foi mantida a 40 °C e as amostras acondicionadas a 20 °C no injetor automático. O fluxo de fase móvel foi de 0,3 mL/min e o volume de injeção foi de 5 µL. Todas as amostras foram filtradas em membranas de 13 mm PTFE, com poro 0,22 µm descartáveis. O gradiente de fase móvel empregado encontra-se na tabela 6, sendo que nos tempos de 0 a 1 minuto a fase móvel foi enviada para o descarte, não passando pelo detector de massas.

Tabela 6. Gradiente de fase móvel utilizado no método por CLUE-DAD-EM/EM para análise de avicularina em plasma.

Tempo (minutos)	% de ACN (0,1% de ácido acético)
0,01	10
1,0	40
2,5	100



3,0	100
5,0	10

Para quantificação da avicularina foi utilizado o método MRM (*multiple reaction monitoring*) no modo negativo de ionização e para quantificação do padrão interno cumarina foi utilizado o modo positivo de ionização.

Os parâmetros utilizados no sistema cromatográfico encontram-se nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Parâmetros do tune do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação da avicularina em plasma.

<b>Parâmetros ajustados no MS TUNE</b>			
<b>Capilar</b>	2,5kV	<b>LM resolução 1</b>	2,7
<b>Cone:</b>	-	<b>HM resolução 1</b>	15,0
<b>Rf lentes</b>	0,1	<b>energia do íon 1</b>	0,5
<b>temperatura da fonte:</b>	150 °C	<b>Entrada</b>	50,0
<b>temperatura de dessolvatação</b>	350 °C	<b>Colisão</b>	-
<b>fluxo de gás de dessolvatação (nitrogênio)</b>	600 L/h	<b>Saída</b>	50,0
<b>fluxo de gás no cone (nitrogênio)</b>	50 L/h	<b>LM resolução 2</b>	9,3
<b>Fluxo do gás de colisão (argônio)</b>	0,15 L/h	<b>HM resolução 2</b>	14,9
<b>Pressão na cela de colisão</b>	3,02 x10 <sup>-3</sup>	<b>energia do íon 2</b>	0,6

Tabela 8. Parâmetros do método MRM para quantificação de avicularina e seu padrão interno cumarina.

<b>Composto</b>	<b>Íons Monitorados</b>	<b>Modo de Ionização</b>	<b>Energia no Cone (kV)</b>	<b>Energia de Colisão (eV)</b>	
<b>Avicularina</b>	Quantificação	433> 301	32	18	
	Confirmação	433> 271	Negativo	32	46
<b>Cumarina (PI)</b>	Quantificação	147 > 91	Positivo	20	25

Todos os solventes utilizados tanto nas análises por CLAE-DAD como por CLUE-EM foram de grau HPLC (J.T. Baker<sup>®</sup>), além de água ultrapura (18,2 mΩ, Milli-Q, Millipore<sup>®</sup>).

### 3.3.1.1 Preparo das amostras para desenvolvimento e validação do método analítico

Para a validação da metodologia analítica coletou-se sangue total de ratos Wistar machos em tubos heparinizados BD Vacutainer<sup>®</sup>, centrifugando-os a 2000 x g na temperatura de 15 °C por 15 minutos em centrífuga da marca Boeco<sup>®</sup>, modelo M-240R. O plasma foi separado, acondicionado em microtubos tipo eppendorf e armazenado em freezer -80 °C até o momento de sua utilização.

Para o preparo das amostras foram adicionados a 100 µL de plasma, 50 µL da solução contendo padrão avicularina em acetonitrila e 50 µL da solução contendo padrão interno cumarina em acetonitrila. A concentração final do padrão interno nas amostras foi de 250 ng/mL. A avicularina foi avaliada na faixa de 25 a 2.000 ng/ml. Posteriormente foi adicionado 100 µL de hexano. A amostra foi agitada em vórtex e em seguida centrifugada a 4 °C, por 15 minutos a 21.380 x g em centrífuga refrigerada. A fase ACN:H<sub>2</sub>O foi filtrada para os vials utilizando filtros de 13 mm de PTFE, poro de 0,22 µm descartáveis.

### 3.3.1.2 Parâmetros para desenvolvimento da validação

#### 3.3.1.2.1 Limite de Detecção

Foram analisadas concentrações decrescentes de avicularina sendo o limite de detecção estabelecido pela menor concentração do analito detectada sem interferência do sinal ruído, gerando um sinal três vezes maior do que o ruído do sistema.

#### 3.3.1.2.2 Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de gráficos de calibração relacionando a resposta do equipamento em função de concentrações do analito. A faixa linear de trabalho foi determinada através de um estudo piloto com três animais. A análise de regressão foi realizada com auxílio do software QuanLynx<sup>®</sup>.

#### 3.3.1.2.3 Limite de Quantificação

Foram estabelecidos os valores de limite inferior de quantificação (LIQ) e limite superior de quantificação (LSQ) de acordo com os percentuais de desvios estabelecidos (ANVISA, 2012). Para isso, foram realizadas análises de

concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão adequadas para a análise (precisão 20% e exatidão 80 a 120%).

#### *3.3.1.2.4 Seletividade*

A seletividade foi determinada pela análise cromatográfica da amostra de plasma branco (*pool* de plasma) submetida à extração padronizada (item 3.3.1.1) para identificar a presença de possíveis interferentes de matriz no tempo de retenção da avicularina e cumarina quando comparados a solução aquosa dos analitos na concentração do limite inferior de quantificação e do padrão interno na sua concentração final. As respostas de sinais cromatográficos referentes a interferentes foram consideradas.

#### *3.3.1.2.5 Efeito Residual entre corridas*

Para análise de possível efeito residual entre corridas foram realizadas três injeções da mesma amostra de plasma branco após extração, sendo uma antes da curva de calibração e duas logo após a injeção do ultimo ponto da curva, limite superior de quantificação (LSQ) e avaliado a presença de sinal do analito na amostra branco.

#### *3.3.1.2.6 Efeito de Matriz*

Para a avaliação do efeito de matriz foi preparada uma amostra de plasma branco e uma solução de ACN contendo os padrões (avicularina e cumarina) nas concentrações próximas ao limite inferior de quantificação da avicularina (25 ng/mL) e a concentração de 250 ng/mL para o padrão interno. As amostras foram analisadas no modo de infusão combinada, onde a amostra branco foi injetada e durante a corrida analítica a solução de padrões foi infundida constantemente (infusão direta). Foi avaliada a supressão dos íons referentes aos analitos no modo SCAN e MRM e nos modos negativo e positivo de ionização.

#### *3.3.1.2.7 Precisão e Exatidão*

Para análise da precisão e exatidão do método foram realizadas cinco replicatas nas concentrações: CQB (50 ng/mL), CQM (750 ng/mL) e CQA (1500 ng/mL) e na concentração de LIQ (25 ng/mL) de avicularina. Em seguida foi

calculada a média dos valores obtidos de cada concentração, o desvio padrão relativo e seu coeficiente de variação. A precisão foi determinada em uma mesma corrida (intracorrída) e em três corridas diferentes (intercorrídas) em dias distintos.

A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV), no qual não foram admitidos valores superiores a 15%, exceto para o LIQ que é permitido valores  $\leq$  20%. Tais valores foram obtidos segundo a equação 13:

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Experimental}} \times 100 \quad (13)$$

A exatidão foi calculada a partir das mesmas amostras utilizadas para a determinação de precisão, sendo expressa em porcentagem e calculada pela equação 14. Os valores de  $\pm$  20% para o LIQ, e  $\pm$  15% para as demais concentrações (CQB, CQM e CQA) foram admitidos.

$$E(\%) = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Valor Nominal}} \times 100 \quad (14)$$

#### 3.3.1.2.8 Estabilidade de curta duração

Foram validados os parâmetros: tempo de espera no injetor, ciclo de congelamento e descongelamento e estabilidade da solução estoque dos padrões avicularina e cumarina.

Tempo de espera no injetor: para este teste, as amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) foram preparadas em triplicata e mantidas dentro do auto-injetor a 20°C e analisadas nos tempos de 0 e 24 horas.

Estabilidade do fármaco em ciclos de congelamento e degelo: para a avaliação da estabilidade da avicularina durante o congelamento e descongelamento da amostra, foram analisadas três amostras de cada controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) da seguinte maneira: as amostras foram congeladas a -80°C e mantidas por 24 horas. Foram então submetidas ao descongelamento natural à temperatura ambiente, em seguida procedeu-se o preparo da amostra padronizado e posteriormente analisadas.

Estabilidade de soluções padrão: para a estabilidade das soluções padrão, foram utilizadas as soluções mãe de 400 µg/ml para a avicularina e 2 mg/ml de cumarina em ACN. As soluções foram analisadas recém-preparadas, após seis horas à temperatura ambiente e depois de sete dias de preparo e armazenadas em geladeira. As áreas dos sinais cromatográficos da avicularina e cumarina foram comparadas.

Os critérios utilizados para a avaliação das estabilidades nas três condições testadas foram os mesmos aplicados à precisão e exatidão (CV e E).

### 3.4 Avaliação da interação da avicularina com as proteínas plasmáticas totais

Para este ensaio, amostras de plasma contendo avicularina nas concentrações de 50 ng/mL (CQB), 750 ng/mL (CQM) e 1500 ng/mL (CQA) foram preparadas em triplicata, utilizando 450 µL de plasma branco e 50 µL de solução contendo avicularina em água. Foram também preparadas triplicatas de amostras na mesma concentração de avicularina em água e submetidas a ultrafiltração, em solução sem submissão ao procedimento de ultrafiltração pelo dispositivo e um controle branco. Essas amostras foram preparadas e incubadas a 37°C por 20 minutos, e então submetidas à ultrafiltração em membrana de celulose utilizando o dispositivo Centrifree® da marca Millipore®. Os dispositivos contendo a amostra foram centrifugados nas condições de 2000 x g, 25°C por 25 minutos em centrífuga da marca Eppendorf, modelo 5810R (DINIZ, A. *et al*, 2008; TASSO, L. *et al*, 2005). O ultrafiltrado foi transferido para vial e analisado pela metodologia desenvolvida em CLUE-DAD-EM/EM. O percentual de ligação da avicularina à proteínas plasmáticas foi determinado pela equação 15.

$$F_{ligada} = 100 - \left( \frac{C_{plasma}}{C_{solução}} \right) \times 100 \quad (15)$$

onde  $F_{ligada}$  é a fração ligada de avicularina à proteínas plasmática;  $C_{plasma}$  é a concentração da avicularina no ultrafiltrado plasmático;  $C_{sol}$  é a concentração de avicularina na solução aquosa de mesma concentração teórica do plasma e submetida ao mesmo tratamento.

### 3.5 Estudo piloto de perfil farmacocinético de distribuição e eliminação de avicularina após administração intravascular (i.v.)

#### 3.5.1 Administração i.v. de avicularina

Os estudos com animais foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais de Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, protocolo nº058/2012 (ANEXO 2).

Para o ensaio piloto de farmacocinética com administração i.v. foram utilizados dois ratos Wistar macho, pesando entre 220 a 250 g e com aproximadamente sete semanas de vida. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da USP-RP e transferidos para o Biotério da FCFRP-USP, onde foram ambientados e mantidos com água e comida *ad libitum*.

Para a administração i.v. da avicularina (1 mg/kg) o animal foi colocado em uma caixa de madeira (dimensões: 35 x 19,5 x 30 cm) com uma lâmpada incandescente de 100 W aquecida favorecendo a dilatação das veias caudais (VANHOUTTE, *et al.*, 1995) por aproximadamente 1 minuto. Em seguida foi imobilizado com auxílio de uma flanela e administrou-se a avicularina utilizando um cateter intravenoso (SAFELET NIPRO, amarelo, modelo 24G x 3/4”), o qual foi inserido em uma das veias caudais laterais do animal. A avicularina foi preparada soro fisiológico (solução de 0,9% de NaCl em água destilada) contendo 5% de DMSO (BUGGINS, T.R *et al.*, 2007). A dose administrada foi ajustada para cada animal de acordo com seu peso, respeitando o volume máximo de injeção i.v. caudal, 0,5 ml (PAIVA, *et al.*, 2005).

Aproximadamente 200 µl de sangue nos tempos de 3, 6, 10, 15, 25, 35, 45 e 60 minutos foram coletados em microtubos heparinizados utilizando-se o mesmo tipo de cateter, por veia caudal diferente daquela utilizada para a administração intravenosa.

O sangue coletado em microtubos foi centrifugado imediatamente após as coletas, nas condições de 2000 x g, por 5 minutos a temperatura ambiente, em mini-centrífuga da marca Ministar<sup>®</sup>, sendo o plasma separado e armazenado em freezer - 80 °C até o momento da análise. Os animais foram sacrificados por sobredose anestésica, utilizando a mistura quetamina+ xilazina na proporção de três vezes sua dose anestésica (quetamina/xilazina 225 + 30 mg/kg) por via i.v., pelo mesmo

acesso venoso utilizado para coletar a amostra de sangue do último tempo (PAIVA, *et al.*, 2005).

### 3.5.2 Preparo da amostra

A extração de avicularina do plasma foi realizada por precipitação de proteínas plasmáticas, utilizando acetonitrila a baixa temperatura (cerca de 4°C) e hexano (a temperatura ambiente) para remoção de lipídeos presentes na amostra. Para tanto, foi adicionado a 100 µL do plasma coletado em cada tempo, 100 µL da solução contendo o padrão interno cumarina em acetonitrila e posteriormente 100µL de hexano. A amostra foi agitada em vórtex e centrifugada a 4°C, por 15 minutos a 2140 x g da marca Boeco<sup>®</sup>, modelo M-240R. A fase ACN:H<sub>2</sub>O foi filtrada utilizando filtros de 13 mm de PTFE, poro de 0,22 µm descartáveis para vial e prosseguiu-se com a análise para quantificação de avicularina em CLUE-DAD-EM/EM.

### 3.5.3 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos não compartimentais

A partir das curvas de concentração plasmática de avicularina em função do tempo, calculou-se os parâmetros farmacocinéticos não compartimentais: *clearance* total ( $Cl_{tot}$ ) (eq. 16), área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta ( $ASC_{0-t}$ ) (eq. 17), área sob a curva extrapolada ( $ASC_{t-\infty}$ ) (eq. 18), área sob a curva do tempo zero ao infinito ( $ASC_{0-\infty}$ ) (eq. 19), área sob a curva no primeiro momento ( $ASMC_{0-\infty}$ ) (eq. 20), e tempo de residência média (MRT) (eq. 23) processados utilizando o software EXCEL<sup>®</sup>.

As equações utilizadas para os cálculos não compartimentais estão descritas a seguir (GIBALDI; PERRIER, 1989):

$$Cl_{tot} = \frac{D}{ASC_{(0-\infty)}} \quad (16)$$

onde  $Cl_{tot}$  é o *clearance* total do fármaco, D é a dose administrada e  $ASC_{0-\infty}$  é a área sob a curva plasmática do tempo zero ao infinito;

$$ASC_{0-t} = \left(\frac{Cp_0+Cp_1}{2}\right) \times \Delta t + \left(\frac{Cp_1+Cp_2}{2}\right) \times \Delta t + \left(\frac{Cp_x+Cp_t}{2}\right) \times \Delta t \quad (17)$$

onde  $ASC_{0-t}$  é a área sob a curva no tempo zero ao último tempo de coleta,  $Cp_0$ ,  $Cp_1$ ,  $Cp_2$  são as concentrações plasmáticas no tempo zero e nos tempos das coletas subsequentes, sendo  $Cp_x$  a concentração no penúltimo tempo de coleta e  $Cp_t$  a

concentração no último tempo de coleta;  $\Delta t$  é a variação do intervalo de tempo de coleta das amostras de plasma.

$$ASC_{t-\infty} = \frac{C_{pt}}{k_e} \quad (18)$$

onde  $ASC_{t-\infty}$  é a área sob a curva extrapolada,  $C_{pt}$  a concentração no último tempo de coleta e  $k_e$  a constante de eliminação calculada como a equação 16.

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + ASC_{t-\infty} \quad (19)$$

onde a área sob a curva do tempo zero ao infinito ( $ASC_{0-\infty}$ ) foi calculada pela soma de  $ASC_{0-t}$  e  $ASC_{t-\infty}$ , calculadas como as equações 17 e 18.

$$ASMC_{0-t} = \left(\frac{C_{p0}+C_{p1}}{2}\right) \times \Delta t + \left(\frac{C_{p1}+C_{p2}}{2}\right) \times \Delta t + \left(\frac{C_{px}+C_{pt}}{2}\right) \times \Delta t \quad (20)$$

onde  $ASMC_{0-t}$  é a área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao último tempo de coleta,  $C_{p0}$ ,  $C_{p1}$ ,  $C_{p2}$  são as concentrações plasmáticas no tempo zero e nos tempos das coletas subseqüentes, sendo  $C_{px}$  a concentração no penúltimo tempo de coleta e  $C_{pt}$  a concentração no último tempo de coleta;  $\Delta t$  é a variação do intervalo de tempo de coleta das amostras de plasma.

$$ASMC_{t-\infty} = \frac{C_{pt} \cdot t}{\lambda} + \frac{C_{pt}}{\lambda^2} \quad (21)$$

onde  $ASMC_{t-\infty}$  é a área sob a curva do último tempo de coleta ao infinito,  $t$  é o último tempo de coleta,  $\lambda$  é a inclinação dos 3 últimos pontos do gráfico em escala monologaritmica  $C_{pt} \cdot t$  versus tempo.

$$ASMC_{0-\infty} = ASMC_{0-t} + ASMC_{t-\infty} \quad (22)$$

onde  $ASMC_{0-\infty}$  é área sob a curva do tempo zero ao infinito,  $ASMC_{0-t}$  é a área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao último tempo de coleta, calculado de acordo com a equação 20,  $ASMC_{t-\infty}$  é a área sob a curva no primeiro momento do último tempo de coleta ao infinito, claculado de acordo com a equação 21.

$$MRT = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad (23)$$



onde MRT é o tempo de residência média,  $ASMC_{0-\infty}$  é área sob a curva do tempo zero ao infinito, calculado de acordo com a equação 22,  $ASC_{0-\infty}$  é a área sob a curva do tempo zero ao infinito, calculado de acordo com a equação 19.

### 3.5.4 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos compartimentais

A análise farmacocinética compartimental foi desenvolvida com auxílio do programa de regressão não linear SCIENTIST<sup>®</sup>. O critério de seleção do modelo (MSC) do programa SCIENTIST<sup>®</sup> foi utilizado para avaliar a adequação do modelo aos dados experimentais.

Os dados de concentração plasmática por tempo foram ajustados ao modelo de dois compartimentos corporais, pela equação 24 (GIBALDI; PERRIER, 1989):

$$Cp = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (24)$$

onde Cp é a concentração plasmática a cada tempo t,  $\alpha$  e  $\beta$  são as constantes híbridas da fase de distribuição e eliminação, respectivamente, e A e B são os interceptos correspondentes no tempo zero.

$$t_{1/2\alpha} = \frac{0,693}{\alpha} \quad (25)$$

onde,  $t_{1/2\alpha}$  é o tempo de meia-vida de distribuição do fármaco e  $\alpha$  é a constante de distribuição obtida pela regressão não linear do programa SCIENTIST<sup>®</sup>;

$$t_{1/2\beta} = \frac{0,693}{\beta} \quad (26)$$

onde,  $t_{1/2\beta}$  é o tempo de meia-vida de eliminação do fármaco e  $\beta$  é a constante de eliminação obtida pela regressão não linear do programa SCIENTIST<sup>®</sup>;

As microconstantes  $k_{10}$ ,  $k_{21}$  e  $k_{12}$  foram calculadas de acordo com Gibaldi e Perrier (1989) e estão apresentadas nas equações 27, 28 e 29, respectivamente.

$$k_{10} = \frac{\alpha \cdot \beta}{k_{21}} \quad (27)$$

onde  $\alpha$  e  $\beta$  são as macroconstantes das fases de distribuição e eliminação, respectivamente,  $k_{21}$  é a microconstante calculada de acordo com a equação 29.

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10} \quad (28)$$

onde  $\alpha$  e  $\beta$  são as macroconstantes das fases de distribuição e eliminação, respectivamente, obtidos pela regressão não linear,  $k_{10}$  e  $k_{21}$  são as microconstante obtidas pelas equações 27 e 29.

$$k_{21} = \frac{(A.\beta + B.\alpha)}{(A+B)} \quad (29)$$

onde  $\alpha$  e  $\beta$  são as macroconstantes das fases de distribuição e eliminação, respectivamente, A e B são os interceptos das retas de distribuição e eliminação, correspondentes no tempo zero.

$$Vd_c = \frac{D}{Cp_0} \quad (30)$$

onde  $Vd_c$  é o volume de distribuição do fármaco no compartimento central e D é a dose administrada do fármaco no organismo e  $Cp_0$  é a concentração plasmático no tempo zero;

$$Vd_p = \frac{k_{12}}{k_{21}} \cdot Vd_c \quad (31)$$

onde  $Vd_p$  é o volume de distribuição do fármaco no compartimento periférico,  $k_{12}$  e  $k_{21}$  são as microconstantes calculadas de acordo com as equações 28 e 29, respectivamente e  $Vd_c$  é o volume de distribuição do fármaco no compartimento central, calculado de acordo com a equação 30;

$$Vd_{ss} = Vd_c + Vd_p \quad (32)$$

onde  $Vd_{ss}$  é o volume de distribuição do fármaco no *steady state* (estado de equilíbrio),  $Vd_c$  é o volume de distribuição do fármaco no compartimento central e  $Vd_p$  é o volume de distribuição do fármaco no compartimento periférico, calculados de acordo com as equações 30 e 31, respectivamente.

# ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento e caracterização estrutural do flavonóide avicularina

#### 4.1.1 Obtenção de espécimes de *Bidens sulphurea*

A coleta do material vegetal, bem como a obtenção e fracionamento do extrato hidroalcoólico de *B. sulphurea* foram realizados pela prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Brentam Silva, como parte de seu doutoramento em Ciências Farmacêuticas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

#### 4.1.2 Obtenção do flavonóide isolado avicularina

Os constituintes das frações principais obtidos por cromatografia clássica encontram-se abaixo na figura 6, sendo a terceira estrutura, 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosilquercetina, nossa substância de interesse, a avicularina.

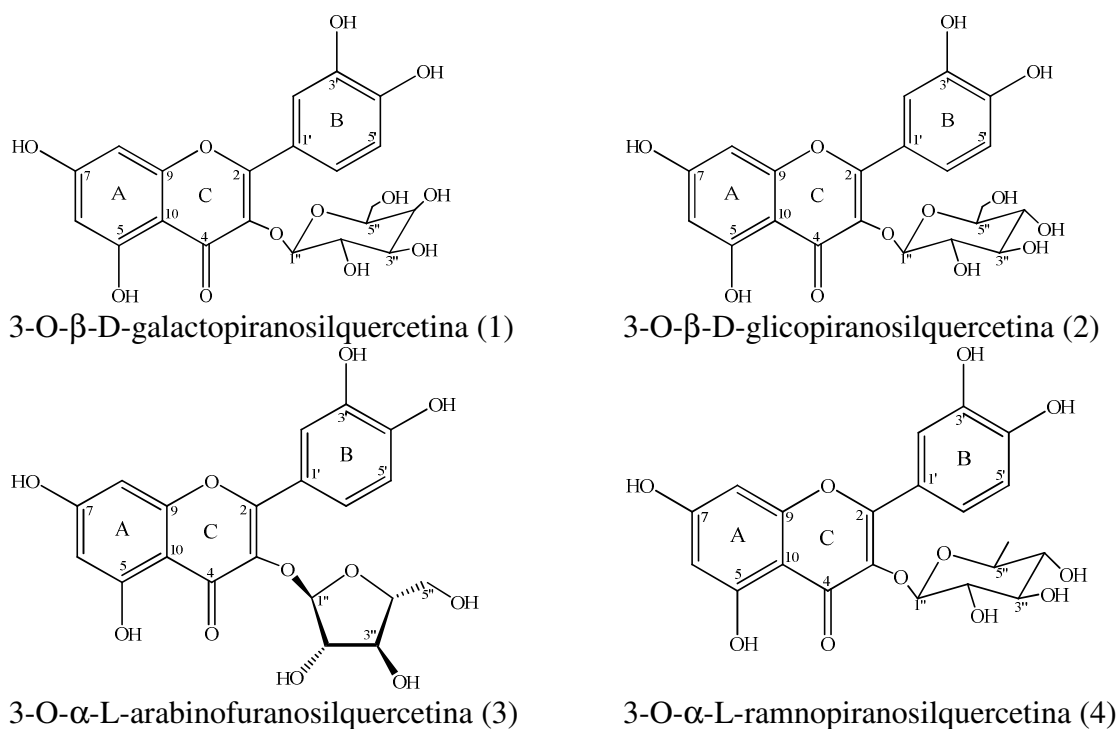


Figura 6. Constituintes químicos da fração de BsfEt/AC com suas estruturas químicas.

A avicularina e os demais componentes em mistura na fração foram identificados no cromatograma (figura 7) em função dos seus respectivos tempos de retenção, sendo que o pico da avicularina está evidenciado pela seta no tempo de retenção de 40,58 minutos. Na figura 8 podemos observar o espectro de UV

evidenciando o pico de absorção em 270 nm, característico do flavonóide avicularina.

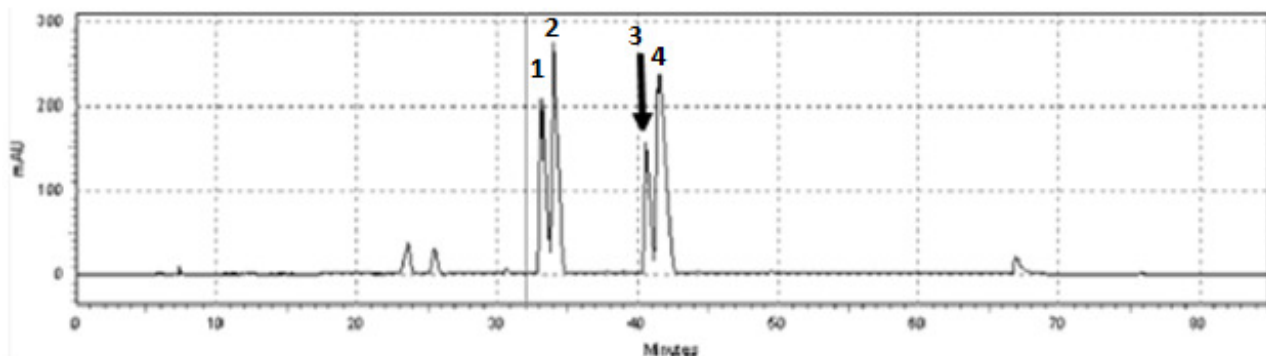


Figura 7. Cromatograma da fração de BsfEt/Ac em CLAE-DAD semi-preparativo. (1) 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosilquercetina, (2) 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosilquercetina, (3) 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranosilquercetina, (4) 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosilquercetina.

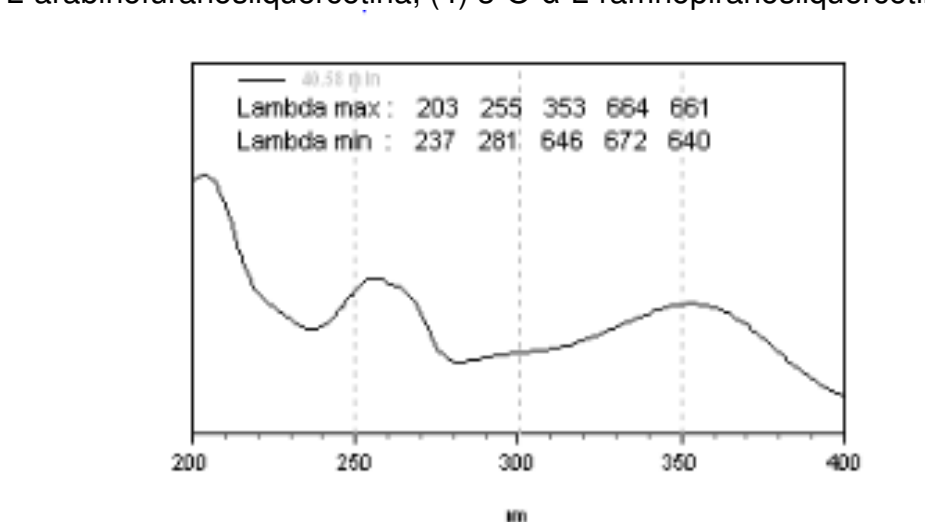


Figura 8. Espectro de UV em 40,58 minutos.

#### 4.1.3 Caracterização estrutural e determinação de pureza

O flavonóide *O*-glicosilado avicularina foi caracterizado quanto a sua pureza ajustada, espectrometria de massas de alta resolução, ressonância magnética nuclear (RMN), porcentagem de água e solventes residuais e doseamento de minerais. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 9 abaixo, e no APÊNDICE encontram-se os resultados íntegros de cada ensaio.

Tabela 9. Resultados obtidos na caracterização do padrão isolado avicularina.

Teste	Resultado
Pureza por HPLC	98,54%
Pureza ajustada**	93,27%
RMN	Conforme*
EM Alta Resolução	Conforme*
Água e solventes residuais	5,34 %
Resíduo Mineral	0,01%
Aspecto visual	Sólido amarelo

\*resultados comparados a dados da literatura (SILVA, 2009)

\*\*Cálculo da pureza ajustada:  $[(100\% - (\text{água e solvente residual \%} + \text{resíduo mineral\%})] \times \text{pureza no HPLC\%/100}$

Esses resultados foram satisfatórios para comprovação da pureza do padrão de avicularina obtido. Ainda foram buscados dados da literatura sobre a substância e encontrou-se o valor de solubilidade como 1,15g/l e  $pka = 6,43$  (HMDB). As informações obtidas sobre a molécula nos permitiram utilizá-la com mais segurança nos ensaios propostos neste trabalho.

## 4.2 Avaliação do perfil farmacocinético de absorção em ratos

### 4.2.1 Parâmetros de validação

#### 4.2.1.1 Limite de detecção

Após a realização das análises de concentrações decrescentes de avicularina e vermelho de fenol, constatou-se que o limite de detecção (LD), menor concentração do analito detectada sem interferência do sinal ruído, foi de 0,001 µg/ml para avicularina e vermelho de fenol.

#### 4.2.1.2 Linearidade

Gráficos de áreas de sinais cromatográficos em função das concentrações de avicularina e vermelho de fenol foram construídos (FIGURAS 11 e 12, respectivamente) após análise das amostras em triplicata. A linearidade foi estabelecida na faixa de 0,1 µg/mL (LIQ) a 4 µg/mL (LSQ) para a avicularina e na

faixa de 0,5 a 12  $\mu\text{g/ml}$  para o vermelho de fenol. O valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) para o gráfico foi superior a 0,99, confirmando a resposta linear do método no intervalo proposto.

Os gráficos de calibração foram construídos em triplicata, atendendo aos seguintes critérios:

1. Desvio menor ou igual a 20% em relação ao limite inferior de quantificação (25 ng/mL);
2. Desvio menor ou igual a 15% para os demais pontos da curva

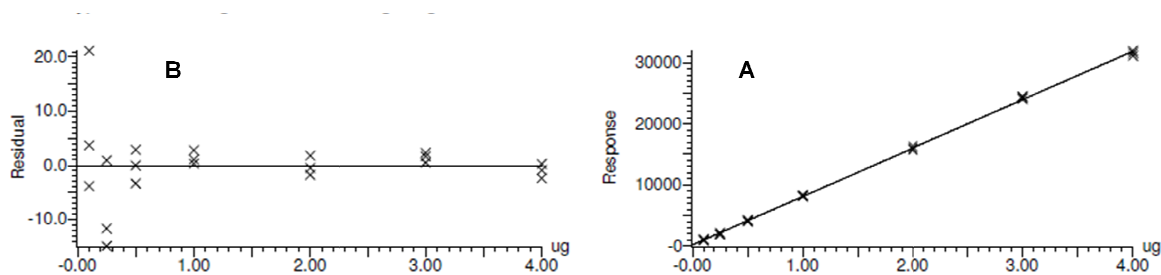


Figura 9. A) Gráfico da curva média de avicularina ( $n=3$ ). cujo coeficiente de correlação linear ( $r$ ) obtido foi de 0,999; B) Gráfico de resíduos.

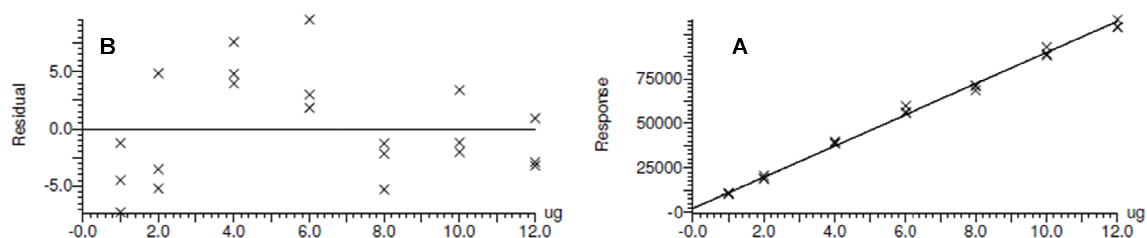


Figura 10. A) Gráfico da curva média de vermelho de fenol ( $n=3$ ). cujo coeficiente de correlação linear ( $r$ ) obtido foi de 0,999; B) Gráfico de resíduos.

Os gráficos de resíduos e o coeficiente de correlação linear obtidos foram satisfatórios, sendo assim conclui-se que o método analítico está adequado para o parâmetro linearidade.

#### 4.2.1.3 Limite de Quantificação

As concentrações de avicularina e vermelho de fenol foram analisados em quintuplicada e os valores de precisão e exatidão foram calculados. A concentração de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  foi a menor delas para a avicularina e 0,5  $\mu\text{g/ml}$  foi a menor para o VF.

Ambos apresentaram valores satisfatórios para precisão e exatidão (precisão 20% e exatidão 80 a 120%) e foram selecionadas como nosso limite inferior de quantificação (LIQ). Os dados obtidos para o LIQ de ambos os analitos estão apresentados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Resultados de precisão e exatidão obtidos para avicularina na concentração de 0,1 µg/ml.

<b>Concentração de avicularina (µg/mL)</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
0,12 0,09 0,12 0,11 0,19	0,108 ± 0,01	12,07	108,0

Tabela 11. Resultados de precisão e exatidão obtidos para vermelho de fenol na concentração de 0,5 µg/ml.

<b>Concentração de vermelho de fenol (µg/mL)</b>	<b>Média ± dp</b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
0,51 0,57 0,58 0,53 0,54	0,542 ± 0,03	5,75	108,4

Os resultados mostraram que o método analítico possui LIQ de 0,1 µg/ml para ambos os analitos com precisão e exatidão aceitáveis.

#### 4.2.1.4 Seletividade

Podemos observar pelos cromatogramas demonstrados abaixo (Figura 11 e 12), que o método foi capaz de distinguir a resposta dos analitos avicularina e vermelho de fenol de outros componentes da matriz do perfundido intestinal, comprovando ser um método seletivo. Portanto, o parâmetro seletividade está adequado para o método analítico empregado.



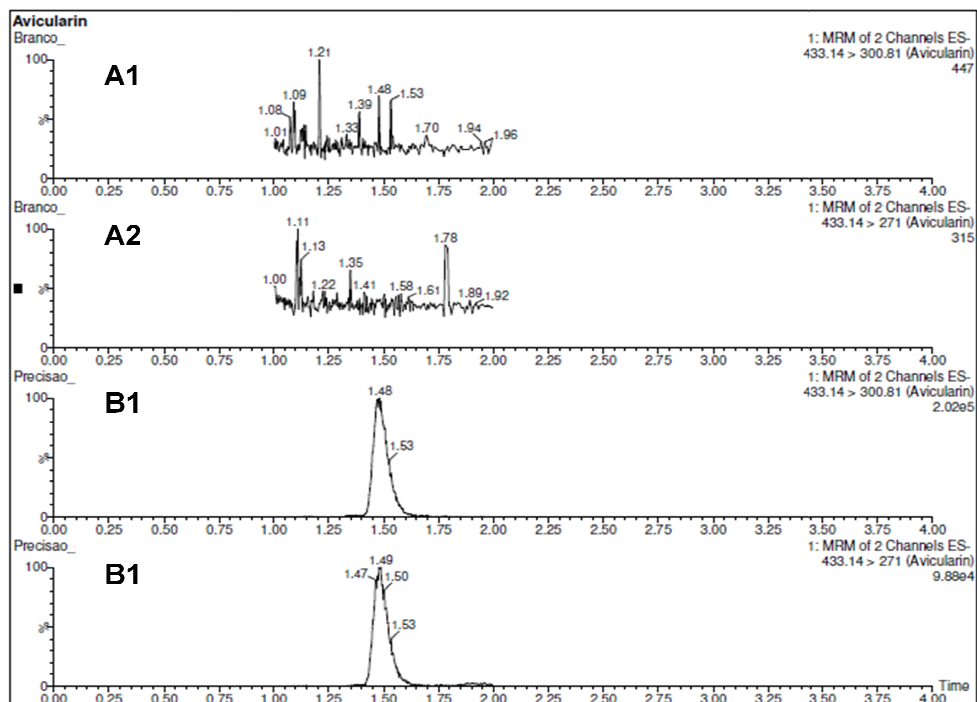


Figura 11. Seletividade Avicularina. A1 e A2) Cromatograma de amostra de perfundido branco em MRM de quantificação e confirmação respectivamente; B1) e B2) Cromatograma de solução aquosa de avicularina (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) em MRM de quantificação e confirmação respectivamente.

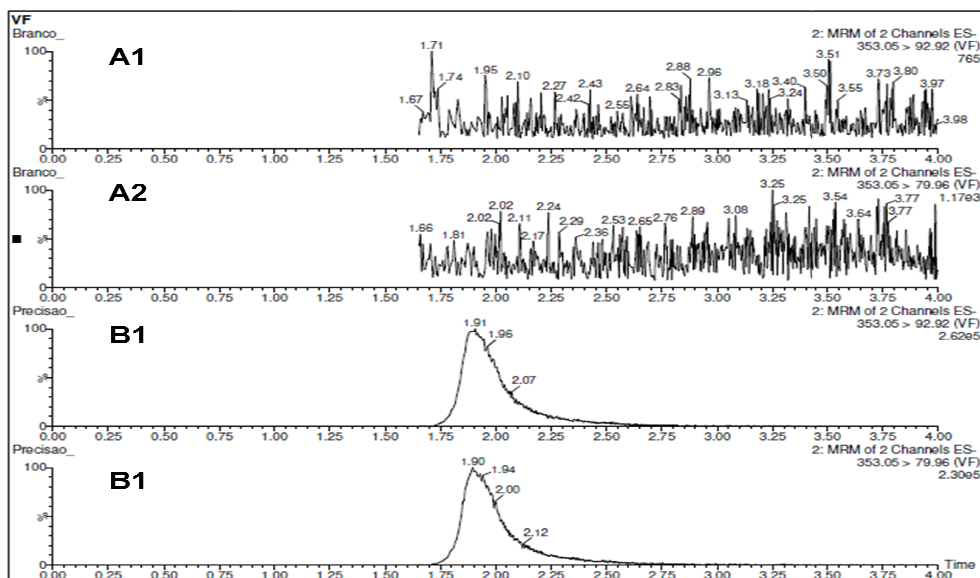


Figura 12. A1 e A2) Cromatograma de amostra de perfundido branco em MRM de quantificação e confirmação respectivamente; B1) e B2) Cromatograma de solução aquosa de vermelho de fenol (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) em MRM de quantificação e confirmação respectivamente.

O método foi considerado seletivo para a quantificação de avicularina e vermelho fenol, pois não houve interferência dos componentes da matriz na quantificação e identificação dos analitos de interesse.

## 4.2.1.5 Efeito Residual entre corridas

Os cromatogramas de perfundido branco analisados demonstraram que não houve efeito residual na análise tanto de avicularina quanto para vermelho de fenol, como se pode observar nas figuras 13 e 14. Sendo assim, o parâmetro foi considerado adequado.

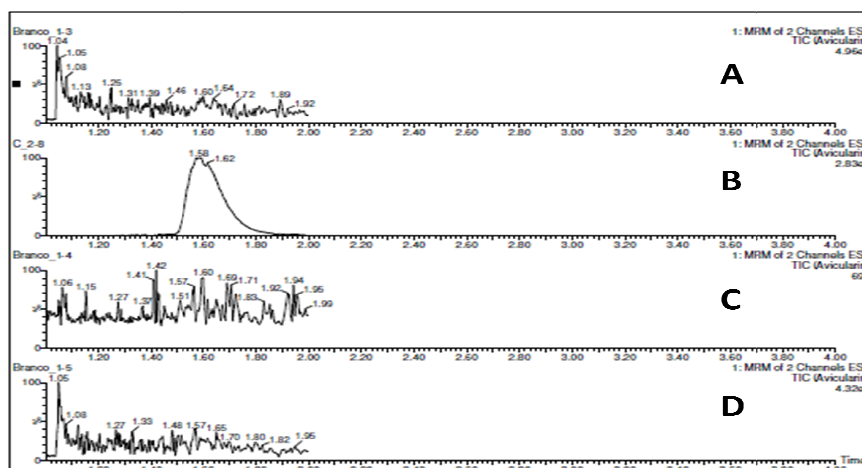


Figura 13. Efeito residual da avicularina. A) Cromatograma de amostra de perfundido intestinal branco antes da curva de avicularina; B) Cromatograma de avicularina na concentração do LIQ (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ); C e D) Cromatogramas de amostras de perfundido branco depois do último ponto da curva (LSQ).

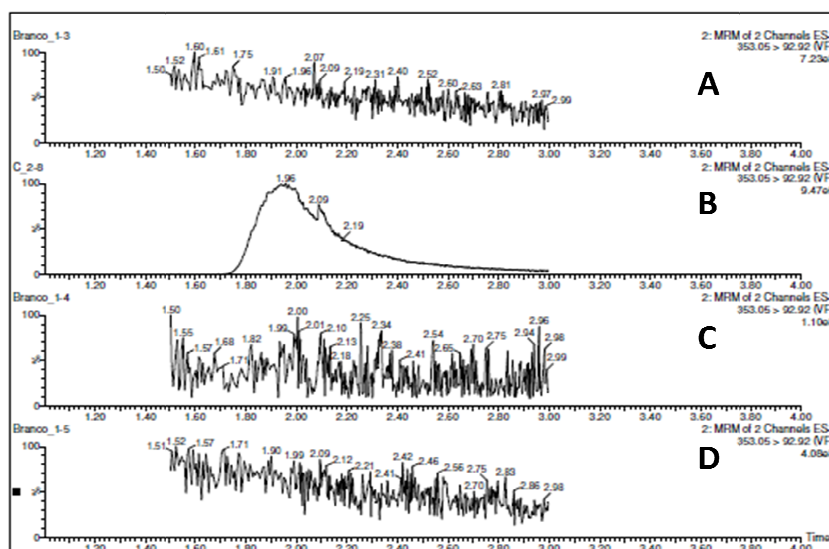


Figura 14. Efeito residual vermelho de fenol. A) Cromatograma de amostra de perfundido intestinal branco antes da curva de avicularina; B) Cromatograma de vermelho de fenol na concentração do LIQ (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ); C e D) Cromatogramas de amostras de perfundido branco depois do último ponto da curva (LSQ).

#### 4.2.1.6 Efeito de Matriz

As amostras foram analisadas utilizando o método de Infusão Combinada, onde a uma amostra branco foi injetada e durante a corrida analítica a solução de padrões foi infundida (infusão direta). Foi avaliada a supressão dos íons referentes aos analitos no espectro no modo SCAN e MRM. Na figura 17 podemos observar que não há efeito de supressão de ionização.

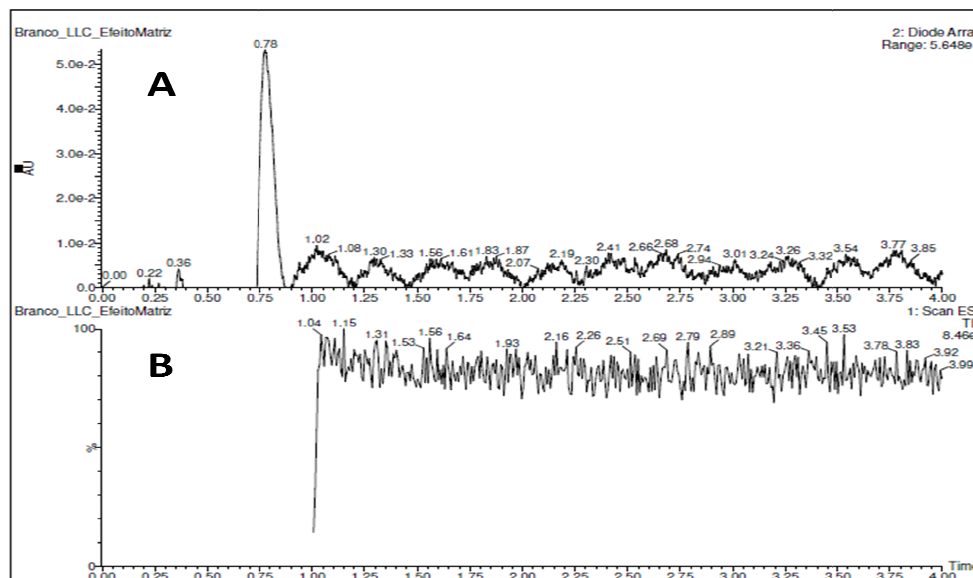


Figura 15. Análise de uma amostra em branco no modo SCAN negativo com infusão combinada de padrões. A) Cromatograma de UV; B) Espectro de massas no modo SCAN negativo sem supressão de ionização.

#### 4.2.1.7 Precisão e Exatidão

Após a análise de cinco replicatas em três concentrações: CQB (50 ng/ml), CQM (750 ng/ml) e CQA (1500 ng/ml) e na concentração de LIQ (25 ng/ml) em dias diferentes, a média dos valores obtidos de cada concentração, o desvio padrão relativo, seu coeficiente de variação e o erro padrão relativo foram calculados. Os resultados encontram-se nas tabelas 12, 13, 14 e 15.

Tabela 12. Precisão e Exatidão intracorrida. Resultados de concentração média  $\pm$  desvio padrão de avicularina nas (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  e 6  $\mu\text{g/ml}$ ) com os respectivos valores de precisão e exatidão no mesmo dia de análise.

CQ Avicularina	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média $\pm$ dp	Precisão Intracorrida (%)	Exatidão Intracorrida (%)
LIQ	0,1	0,11 $\pm$ 0,01	12,1	106,2
CQB	0,2	0,23 $\pm$ 0,02	9,6	111,2
CQM	2	2,16 $\pm$ 0,11	3,9	108,3
CQA	6	6,3 $\pm$ 0,16	2,5	105,0

Tabela 13. Precisão e Exatidão intercorrida. Resultados de concentração média  $\pm$  desvio padrão de avicularina (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  e 6  $\mu\text{g/ml}$ ) com os respectivos valores de precisão e exatidão em três dias alternados de análise.

<b>CQ Vermelho de Fenol</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>Precisão Intercorrida (CV,%)</b>	<b>Exatidão Intercorrida (EPR,%)</b>
<b>LIQ</b>	0,1	0,11 $\pm$ 0,01	13,2	112,0
<b>CQB</b>	0,2	0,22 $\pm$ 0,02	10,2	110,1
<b>CQM</b>	2	2,21 $\pm$ 0,08	3,7	110,4
<b>CQA</b>	6	5,7 $\pm$ 0,03	2,8	95,0

Tabela 14. Precisão e Exatidão intracorrida. Resultados de concentração média  $\pm$  desvio padrão de vermelho de fenol (0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 0,7  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  e 9  $\mu\text{g/ml}$ ) com os respectivos valores de precisão e exatidão no mesmo dia de análise.

<b>CQ Avicularina</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>Precisão Intracorrida (%)</b>	<b>Exatidão Intracorrida (%)</b>
<b>LIQ</b>	0,5	0,536 $\pm$ 0,02	4,5	107,2
<b>CQB</b>	0,7	0,73 $\pm$ 0,02	2,2	104,3
<b>CQM</b>	5	4,93 $\pm$ 0,13	2,6	98,7
<b>CQA</b>	9	9,04 $\pm$ 0,18	2,0	100,5

Tabela 15. Precisão e Exatidão intercorrida. Resultados de concentração média  $\pm$  desvio padrão de vermelho de fenol (0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 0,7  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  e 9  $\mu\text{g/ml}$ ) com os respectivos valores de precisão e exatidão em três dias alternados de análise.

<b>CQ Vermelho de Fenol</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>Precisão Intercorrida (%)</b>	<b>Exatidão Intercorrida (%)</b>
<b>LIQ</b>	0,5	0,542 $\pm$ 0,03	5,7	108,4
<b>CQB</b>	0,7	0,72 $\pm$ 0,03	3,7	103,7
<b>CQM</b>	5	5,2 $\pm$ 0,19	3,6	104,1
<b>CQA</b>	9	9,52 $\pm$ 0,18	1,9	105,7

Os dados mostram que o método analítico em questão apresenta adequada precisão e exatidão para ambos os analitos em estudo.

#### 4.2.1.8 Estabilidade

Os critérios utilizados para a avaliação da estabilidade nos ensaios de curta duração (tempo de espera no injetor, ciclo de congelamento e descongelamento e estabilidade da solução estoque) dos padrões avicularina e vermelho de fenol foram os mesmos aplicados para precisão e exatidão (CV e EPR). A variação encontrada

nos controles de qualidade após esses três ensaios está representada nas tabelas 16, 17 e 18 abaixo.

Tabela 16. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade em auto-injetor e ciclo de descongelamento. Dados das amostras de avicularina nas concentrações 0,2 µg/ml, 2 µg/ml e 6 µg/ml (n=3).

CQ Avicularina	Concentração (ng/ml)	Auto-injetor (0h e 24h)		Ciclo degelo (0h, 24h, 7 dias)	
		Precisão (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)	Exatidão (%)
CQB	0,2	7,5	109,1	3,8	105,3
CQM	2	5,9	101,5	2,2	94,1
CQA	6	3,5	93,7	5,4	101,3

Tabela 17. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade em auto-injetor e ciclo de descongelamento. Dados das amostras de vermelho de fenol nas concentrações 0,7 µg/ml, 5 µg/ml e 9 µg/ml (n=3).

CQ Vermelho de Fenol	Concentração (ng/ml)	Auto-injetor (0h e 24h)		Ciclo degelo (0h, 24h, 7 dias)	
		Precisão (%)	Exatidão (%)	Precisão (%)	Exatidão (%)
CQB	0,7	9,5	103,5	7,6	102,1
CQM	5	4,7	104,2	3,2	95,7
CQA	9	1,5	95,1	3,4	102,8

Tabela 18. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade da solução estoque em 0h, 6h em temperatura ambiente e sete dias sob refrigeração. Dados de avicularina (6 µg/ml) e vermelho de fenol (9 µg/ml) (n=3).

Solução Estoque	Concentração (µg/mL)	0h, 6h e 7 dias	
		Precisão (%)	Exatidão (%)
Avicularina	6	4,7	109,6
Vermelho de fenol	9	3,2	102,5

Os resultados encontrados para os ensaios de estabilidade da amostra de perfundido intestinal mostraram que a amostra possui estabilidade nos tempos avaliados e sua análise nessas condições pode ser considerada confiável.

#### 4.2.1.9 Análise de quercetina em perfundido intestinal

A quercetina por ser a forma aglicona da avicularina poderia estar presente no lúmen intestinal se caso ocorresse a hidrólise do flavonóide avicularina. Sendo assim fizemos uma busca por MRM, modo de detecção mais sensível, para avaliar se

houve a possível hidrólise. Esta hipótese mostrou-se ser negativa devido à ausência de quercetina nas amostras analisadas de cada grupo estudado, o que pode ser evidenciado na figura 16 abaixo.

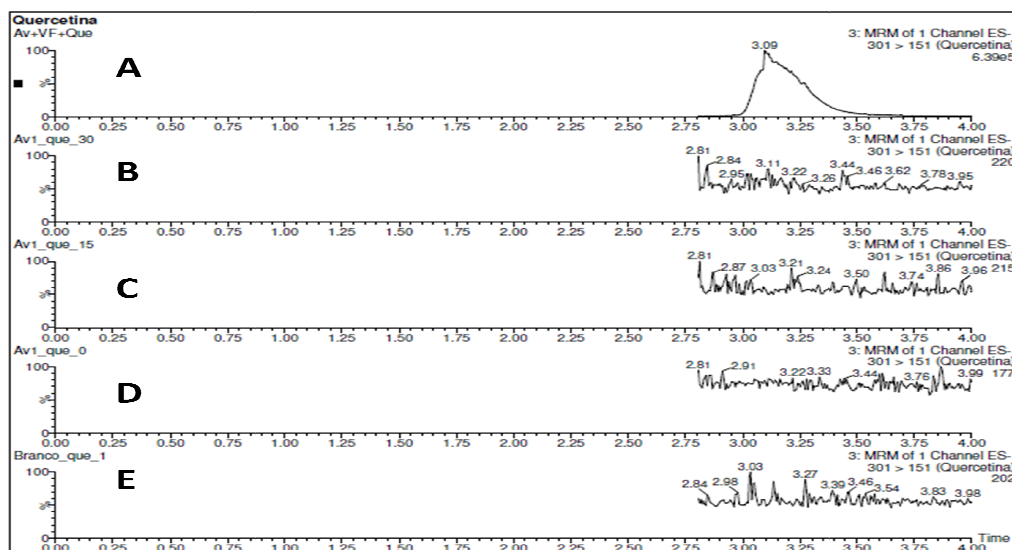


Figura 16. Análise de quercetina em amostras de perfusão intestinal no modo MRM. A) Padrão de quercetina; B), C) e D) Amostra nos tempo 30, 15 e 0 minutos, respectivamente; E) Amostra branco.

Com essa análise, podemos afirmar que nas condições experimentais deste trabalho o flavonóide *O*- glicosilado avicularina mostrou-se resistente ao processo de hidrólise.

#### 4.2.2 Estudos de perfusão intestinal *in situ* da avicularina em ratos

##### 4.2.2.1 Avaliação comparativa da correção dos valores de reabsorção de água no intestino por dois métodos

As amostras de perfundido intestinal foram quantificadas em relação a avicularina e vermelho fenol remanescentes no lúmen intestinal por CLUE-DAD-EM/EM e as concentrações de avicularina remanescente no lúmen intestinal foram corrigidas para absorção de água pelos dois modelos propostos.

Analisando o perfil de absorção de avicularina pelos dois modelos (FIGURA 19) podemos observar que o modelo de correção do movimento de entrada e saída de água pelo vermelho de fenol foi mais satisfatório, pois o mesmo permitiu a melhor visualização do perfil de absorção da avicularina a cada tempo, mostrando que o

movimento de entrada e saída de água não segue uma cinética de ordem zero, variando ao longo do experimento (0 a 30 minutos).

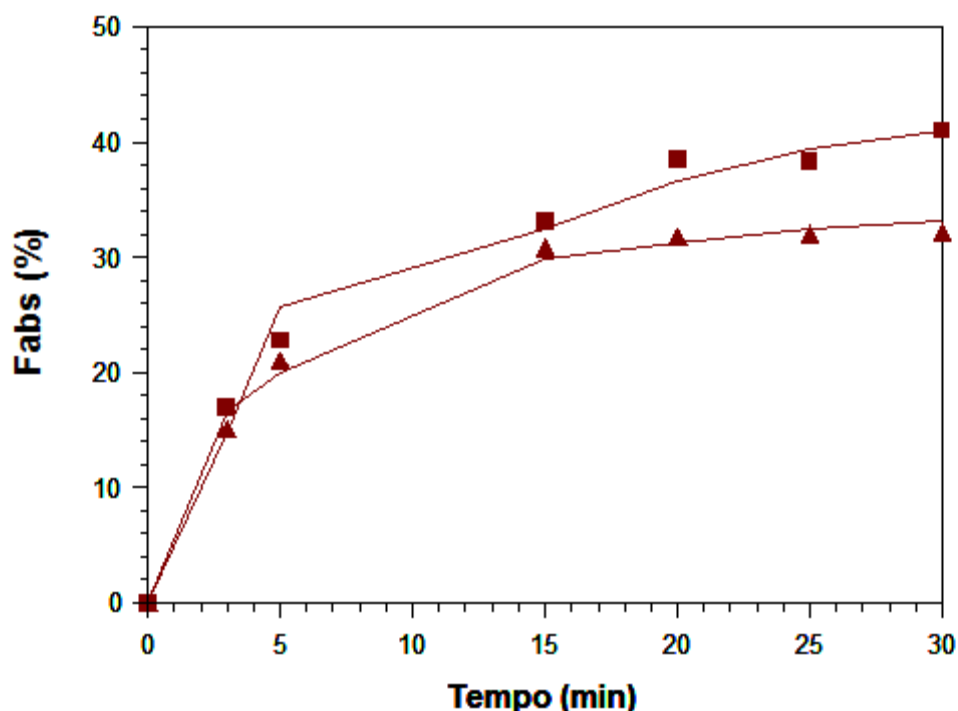


Figura 17. Comparação entre o perfil de absorção de um rato na dose de 1mg/kg por dois métodos de correção de concentração (▲ vermelho de fenol e ■ volume final).

Pode-se observar na figura 17 que a correção das concentrações de avicularina pelo método do volume final superestimou os valores de concentração absorvida ao longo dos tempos testados, alterando significativamente os percentuais absorvidos do flavonóide em estudo.

Considerando que o método que emprega o vermelho de fenol é capaz de medir as diluições fisiológicas da avicularina em cada tempo de análise com maior exatidão, este se mostrou mais fidedigno.

Sendo assim, adotou-se para este trabalho a correção das concentrações remanescentes de avicularina pelo método do vermelho de fenol.

#### 4.2.2.2 Avaliação da fração absorvida de avicularina

A partir das concentrações corrigidas de avicularina, determinaram-se os percentuais absorvidos em cada tempo, até os 30 minutos para os grupos avicularina 1mg/kg (AV1), avicularina 5mg/kg (AV5), avicularina 1mg/kg com obstrução do ducto biliar (DB) e avicularina 1mg/kg com inibidor de P-gp verapamil

(VP). Os dados referentes a fração absorvida no tempo final (30 minutos) podem ser observados na tabela 19.

Tabela 19. Fração absorvida de avicularina após 30 minutos ( $F_{abs}$  (%)). Os grupos de animais receberam Avicularina (1mg/kg) (AV1), Avicularina (5mg/kg) (AV5), Avicularina com ducto biliar obstruído (1mg/kg) (DB) e Avicularina com Verapamil (1mg/kg) (VP).

<b>Grupo</b>	<b><math>F_{abs}</math> (%) (média <math>\pm</math> dp)</b>
AV1	30,56 $\pm$ 10,5
AV5	39,49 $\pm$ 7,7
DB	24,81 $\pm$ 10,5
VP	87,43 $\pm$ 9,4*

\* Comparação entre VP x AV1,  $p=2,11 \times 10^{-6}$

Os resultados apresentados na tabela 19 mostraram que o aumento na dose não alterou os percentuais absorvidos finais para os grupos que receberam 1mg/kg e 5mg/kg. Também não foi vista diferença entre grupos AV 1 e DB, indicando que a ausência dos sais biliares não alterou os percentuais absorvidos finais de avicularina.

Entretanto, o grupo VP teve percentual absorvido de avicularina significativamente maior (87%) do que o grupo AV1 (31%), indicando que a presença do substrato da P-gp (verapamil) atuou de modo competitivo com a avicularina, diminuindo a atividade de efluxo exercida pela P-gp sobre a avicularina. Esse efeito competitivo favoreceu a absorção do flavonóide.

No trabalho de Pietro e colaboradores (2002) diferentes classes de flavonóides foram testadas quanto a sua afinidade de ligação a glicoproteína-P e concluiu-se que essa afinidade está diretamente relacionada aos substituintes presentes na estrutura do flavonóide e suas características, como por exemplo, hidrofobicidade e tamanho molecular. Dentre as classes testadas obteve-se a seguinte ordem de afinidade chalconas > flavonol > flavona > isoflavona > flavanona, e em relação aos substituintes dessas classes, o glicosil apresentou menor afinidade pela proteína de membrana. Sendo o flavonóide avicularina um flavonol glicosilado ele tende a apresentar de média a baixa afinidade pela P-gp. Na competição entre os substratos da P-gp, avicularina e verapamil, verificou-se que a maior afinidade do verapamil pela proteína permitiu que o flavonóide testado estivesse mais livre para ser absorvido. Sendo assim podemos observar também que a escolha do verapamil para o estudo de inibição de P-gp para flavonóide glicosilado foi adequada.



#### 4.2.2.3 Avaliação do perfil farmacocinético de absorção da avicularina

Os dados obtidos dos grupos AV1, AV5, DB e VP foram submetidos a sete modelos cinéticos de absorção, sendo que para os grupos AV1, AV5 e DB foi assumido o modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa, e para o grupo VP o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo de absorção de Michaelis-Menten (ativa) e secreção ativa.

Na tabela 20 estão apresentados os dados dos parâmetros farmacocinéticos comparativos entre AV1 e AV5.

Tabela 20. Comparação entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos ( $k_a$ ,  $V_{ms}$  e  $K_{ms}$ ) obtidos pelo modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa para os grupos AV1 e AV5.

Constante	AV 1mg/kg (n=5) (média ± dp)	AV 5mg/kg (n=4) (média ± dp)	p ( $\alpha=0,05$ )
$k_a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,13 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,01
$t_{1/2\text{abs}}$ (min)	5,33 ± 2,43	11,55 ± 3,23	0,01
$V_{ms}$ ( $F_{\text{abs}}(\%)/\text{min}$ )	3,85 ± 4,02	2,6 ± 0,55	0,14
$K_{ms}$ ( $F_{\text{abs}}(\%)$ )	0,02 ± 5,52	0,14 ± 0,13	0,06

\* $k_a$ = constante de absorção de primeira ordem;  $t_{1/2\text{abs}}$ = tempo de meia-vida de absorção;  $V_{ms}$  = velocidade máxima de secreção;  $K_{ms}$ =concentração na qual a taxa de secreção é a metade da máxima;  $F_{\text{abs}}(\%)$ = fração absorvida

Podemos observar que o valor de  $k_a$  para avicularina na dose de 1 mg/kg é significativamente maior em relação ao observado para a dose de 5 mg/kg. Esse dado sugere o envolvimento de transportadores na absorção intestinal da avicularina, pois o aumento da dose levou a um aumento do tempo de meia-vida de absorção, possivelmente por saturação nos transportadores.

Os valores de  $V_{ms}$  e  $K_{ms}$  não apresentaram diferenças estatísticas significativas, sendo provavelmente devido a não saturação dos transportadores de efluxo nas doses testadas. Na figura 18 pode-se observar o perfil de absorção ajustado pelo modelo nas doses de 1 e 5 mg/kg.

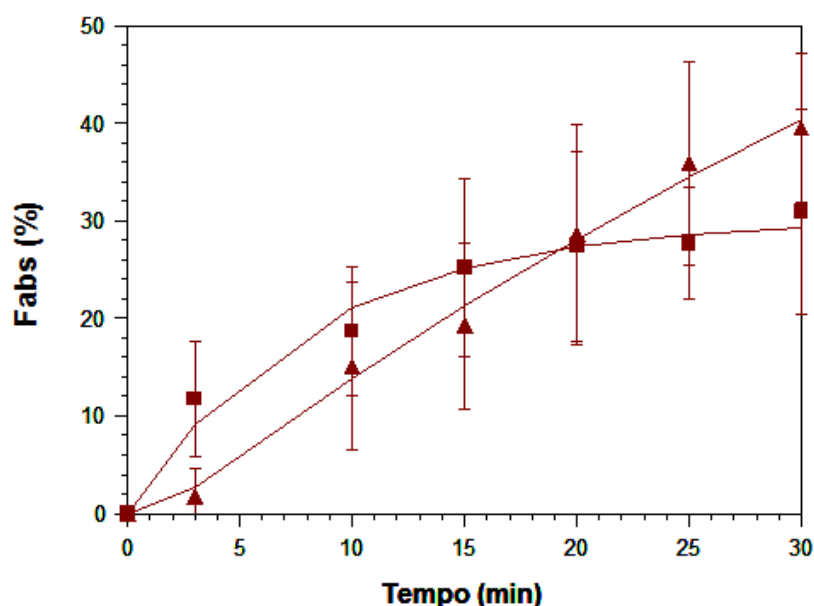


Figura 18. Comparação dos perfis de absorção entre AV1 e AV5 (■ AV1; ▲ AV5).

Pode-se observar na figura 18 que, embora não haja diferença significativa entre as  $F_{abs}$  no tempo final nas duas doses, os perfis das curvas são distintos, explicado pela diferença entre os valores de  $k_a$ . Para o grupo AV1, as  $F_{abs}$  nos tempos iniciais são maiores do que para o grupo AV5.

Na tabela 21, abaixo, podemos observar que os parâmetros farmacocinéticos obtidos para avicularina na dose de 1mg/kg e a mesma dose com obstrução do ducto biliar (DB) não apresentaram diferenças significativas entre eles. A semelhança entre os valores de  $t_{1/2abs}$  indicam que levou o mesmo tempo de absorção de avicularina com ou sem a presença de bile. Sendo assim, pode-se supor que os sais biliares não são determinantes para a absorção deste flavonóide, nas condições experimentais testadas.

Tabela 21. Comparação entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos ( $k_a$ ,  $V_{ms}$  e  $K_{ms}$ ) obtidas pelo modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa para os grupos AV1 e DB.

Constante	AV 1mg/kg (n=5) (média ± dp)	AV DB (n=4) (média ± dp)	p ( $\alpha=0,05$ )
$K_a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,13 ± 0,04	0,22 ± 0,21	0,2
$t_{1/2abs}$ (min)	5,33 ± 2,4	3,15 ± 11,34	0,08
$V_{ms}$ ( $F_{abs}(\%)/\text{min}$ )	3,85 ± 4,02	4,22 ± 3,55	0,84
$K_{ms}$ ( $F_{abs}(\%)$ )	0,02 ± 5,52	1,09 ± 1,89	0,25

\* $k_a$ = constante de absorção de primeira ordem;  $t_{1/2abs}$ = tempo de meia-vida de absorção;  $V_{ms}$  = velocidade máxima de secreção;  $K_{ms}$ = concentração na qual a taxa de secreção é a metade da máxima;  $F_{abs}(\%)$ = fração absorvida

Na figura 19 estão apresentados os perfis de absorção comparativos de AV1 e DB, evidenciando a semelhança entre os dois perfis analisados.

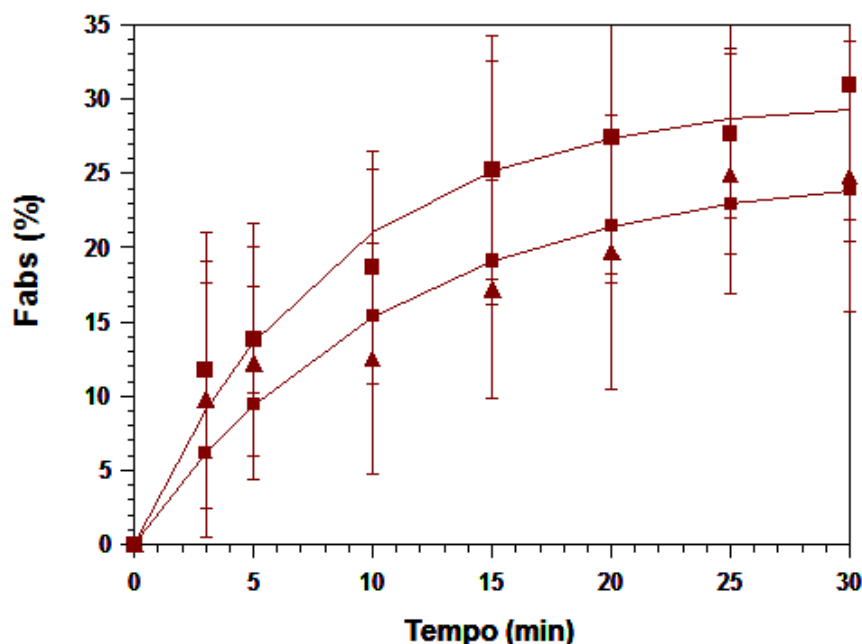


Figura 19. Comparação dos perfis de absorção entre AV1 e DB (▲AV1; ■DB).

Na tabela 22 estão apresentados os resultados dos parâmetros farmacocinéticos dos grupos AV1 e VP.

Tabela 22. Resultados dos parâmetros farmacocinéticos obtidas pelo modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa para o grupo AV1 e absorção de Michaelis-Menten e secreção ativa para o grupo VP.

Constante	AV 1mg/kg (n=5) (média ± dp)	AV VP (n=4) (média ± dp)	p (α=0,05)
V <sub>ms</sub> (F <sub>abs</sub> (%)/min)	3,85 ± 4,02	9,60 ± 2,74	0,002
K <sub>ms</sub> (%Abs)	0,02 ± 5,52	1,38 ± 0,85	0,003
V <sub>m</sub> (%Abs/min)		14,92 ± 5,84	
K <sub>m</sub> (%Abs)		51,60 ± 13,9	

\*V<sub>m</sub> = velocidade máxima de absorção; K<sub>m</sub> = concentração de avicularina no qual a taxa de absorção é a metade da máxima; V<sub>ms</sub> = velocidade máxima de secreção; K<sub>ms</sub> = concentração na qual a taxa de secreção é a metade da máxima; F<sub>abs</sub> (%) = fração absorvida.

O modelo que melhor se ajustou para o grupo VP foi o modelo de absorção de Michaelis-Menten com secreção ativa, diferentemente dos demais grupos estudados. Isso indica que, na presença do verapamil, inibidor da glicoproteína-P, a avicularina está mais livre para ser absorvida e evidenciou-se o processo ativo de transporte, conforme relatado para os flavonóides quercetina e flordizina.

Gee e colaboradores (2000) realizaram trabalho experimental com quercetinas mono e di-glicosilada (isoladas da cebola) e demonstraram que esses compostos foram capazes de entrar no enterócito, via transportador da glicose, e somente serem hidrolisadas dentro do enterócito.

Além da quercetina, o heterosídeo floridizina também foi submetido a estudo de absorção intestinal *in vitro*, com células Caco-2. Neste trabalho, os autores concluíram que o transportador SGLT1, responsável pelo transporte de estruturas glicosiladas, está envolvido no processo de transporte deste flavonóide (WALLE; WALLE, 2003).

Os dados acima corroboram a tese de que o processo de absorção ativa da avicularina pode, de fato, estar ocorrendo, e no caso dos dados aqui apresentados, tal processo pode ser evidenciado após o bloqueio do outro transporte ativo existente na etapa de absorção intestinal, a secreção pela P-gp.

A comparação entre as médias dos parâmetros  $V_{ms}$  e  $K_{ms}$  mostraram haver diferença significativa entre os valores obtidos. Tal diferença era esperada, uma vez que a P-gp, responsável pela secreção, está sendo disputada entre os dois compostos testados, avicularina e verapamil, no caso do grupo Vp, enquanto que para o grupo AV 1, tal competição não ocorre.

Não é possível analisar comparativamente os valores de  $K_m$  e  $V_m$  entre os grupos, pois os pesos considerados nas análises de regressão não linear para a obtenção dos parâmetros são distintos, gerando grandezas de valores distintos.

Na figura 20 podemos analisar os perfis comparativos de absorção entre a dose de AV1 e VP, mostrando claramente os perfis diferentes de absorção.

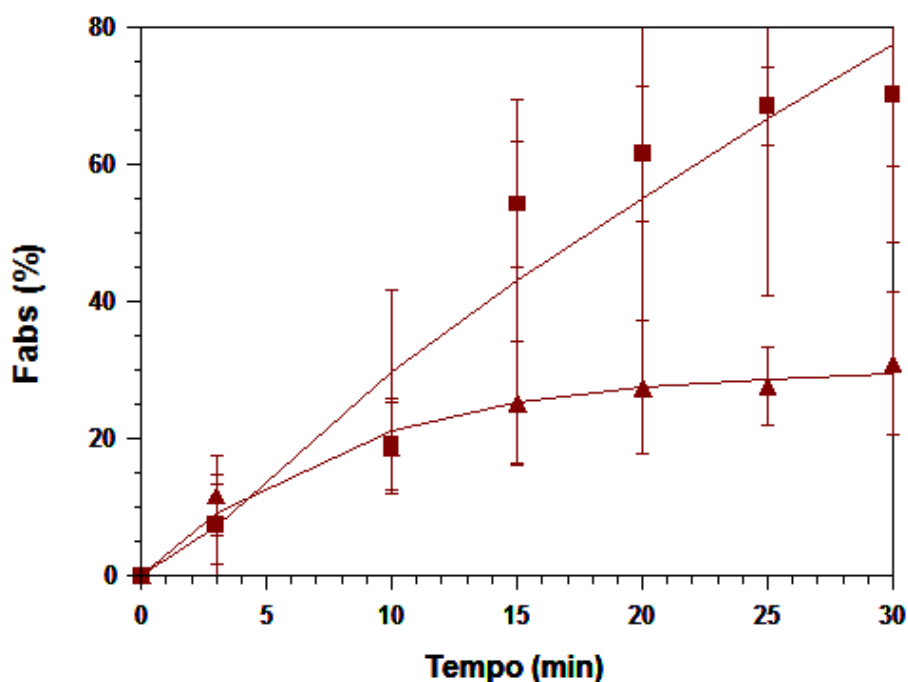


Figura 20. Comparação dos perfis de absorção entre AV1 e VP (▲AV1; ■VP).

Na figura 20 pode-se verificar que o grupo que não contém o inibidor de P-gP presente (AV 1) possui inclinação menor do que o grupo VP que contém o verapamil. Essa diferença na velocidade de transporte da avicularina demonstra visualmente que, quando a P-gP está inibida, a velocidade e a extensão da absorção aumentam significativamente. Portanto, a ação da P-gp sobre a avicularina se torna visualmente claro.

#### 4.3 Avaliação do perfil farmacocinético de distribuição e eliminação em ratos

De acordo com as características requeridas pela ANVISA, nas quais um padrão interno deve apresentar pureza, ser inerte e não fazer parte da amostra, bem como obter um sinal cromatográfico bem resolvido em relação ao analito de interesse, a cumarina foi escolhida como padrão interno para o método de quantificação de avicularina em plasma. É necessário também que o padrão interno apresente uma estrutura química similar ao do analito, sendo a cumarina uma escolha adequada para esse método. Abaixo na figura 23 a estrutura da cumarina.

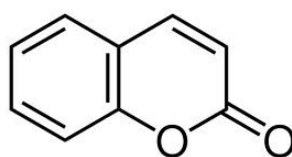


Figura 21. Estrutura química da cumarina.

### 4.3.1 Parâmetros para desenvolvimento da validação

#### 4.3.1.1 Limite de detecção

Após a realização das análises de concentrações decrescentes de avicularina, constatou-se que o limite de detecção (LD), menor concentração do analito detectada sem interferência do sinal ruído, foi de 0,5 ng/ml. Na figura 24 está apresentado um cromatograma evidenciando o sinal cromatográfico da avicularina no modo MRM negativo na concentração de 0,5 ng/mL.

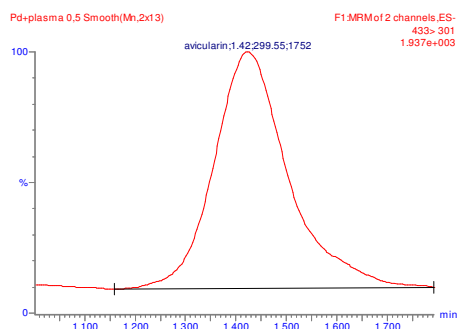


Figura 22. Cromatograma de plasma de rato contendo avicularina na concentração de 0,5 ng/ml.

#### 4.3.1.2 Linearidade

A linearidade foi estabelecida na faixa de 25 ng/mL (LIQ) a 2000 ng/mL (LSQ) para a avicularina. O padrão interno cumarina foi adicionado na concentração de 250 ng/mL a cada solução do padrão analítico de avicularina, de forma a corrigir desvios durante o procedimento analítico.

Um gráfico de áreas de sinais cromatográficos em função das concentrações de avicularina foi construído após análise das amostras em triplicata (figura 23). O valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) para o gráfico foi superior a 0,99, confirmando a resposta linear do método no intervalo proposto (25 ng a 2000 ng/mL), como exige o Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da ANVISA (2012).

Os gráficos de calibração foram construídos em triplicata, atendendo aos seguintes critérios:

1. Desvio menor ou igual a 20% em relação ao limite inferior de quantificação (25 ng/mL);
2. Desvio menor ou igual a 15% para os demais pontos da curva

Dentre as concentrações utilizadas para a construção do gráfico foi estabelecido que 25 ng/mL seria o LIQ, 50 ng/mL o CQB, 750 ng/mL o CQM e 1500

ng/mL o CQA, amostras controle de qualidade. Os demais pontos da curva foram utilizados para a construção das curvas de trabalho para doseamento da avicularina no plasma. As amostras controle de qualidade foram utilizadas para os ensaios de precisão e exatidão e estabilidade.

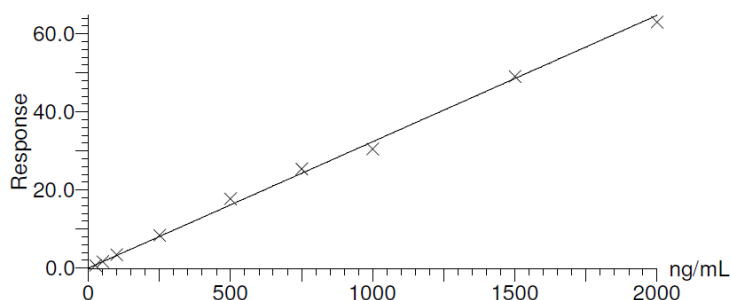


Figura 23. Gráfico da curva média de avicularina (n=3). cujo coeficiente de correlação linear (r) obtido foi de 0,999.

Os resultados mostraram que o método analítico está adequado para o parâmetro linearidade.

#### 4.3.1.3 Limite de Quantificação

As concentrações de avicularina foram analisadas em quintuplicada e os valores de precisão e exatidão foram calculados. A concentração de 25 ng/ml foi a menor delas que apresentou valores satisfatórios para precisão e exatidão (precisão 20% e exatidão 80 a 120%) e foi selecionada como nosso limite inferior de quantificação (LIQ). Na tabela 23 apresentada abaixo se pode observar os valores obtidos.

Tabela 23. Resultados de precisão e exatidão obtidos para avicularina na concentração de 25 ng/ml.

Concentração de avicularina (ng/mL)	Média ± dp	Precisão (%)	Exatidão (%)
25,9 25,4 23,1 26,2 24,7	25,06 ± 1,23	4,9	100,24

Os resultados mostraram que o método analítico possui LIQ de 25 ng/ml.

#### 4.3.1.4 Seletividade

Podemos observar pelos cromatogramas demonstrados abaixo (Figura 24), que o método foi capaz de distinguir a resposta do analito em questão, a avicularina, e do padrão interno, a cumarina, de outros componentes da matriz de plasma, comprovando ser um método seletivo. Portanto, o parâmetro seletividade está adequado para o método analítico empregado.

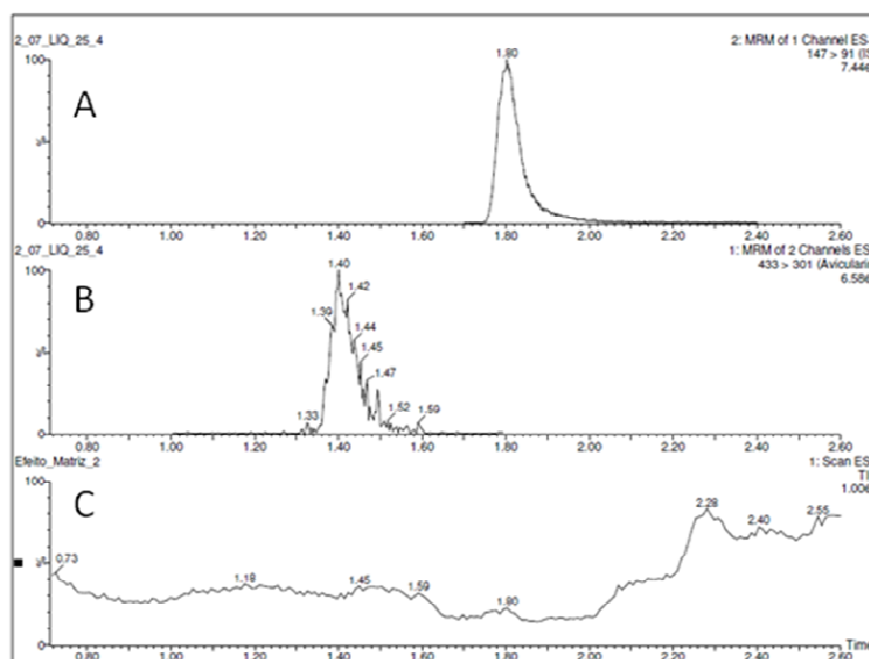


Figura 24. Seletividade. A) Cromatograma de solução aquosa de cumarina (250 ng/ml); B) Cromatograma de solução aquosa de avicularina no LIQ (25 ng/ml); C) Cromatograma de amostra de plasma branco.

#### 4.3.1.5 Efeito Residual entre corridas

Os cromatogramas de plasma branco analisados demonstraram a ocorrência de efeito residual. Para a diminuição desse efeito, o solvente de lavagem da agulha foi alterado para uma proporção maior de fase orgânica (MEOH: ÁGUA - 60:40). Assim foi possível observar uma diminuição satisfatória do efeito residual para a análise, sendo o sinal cromatográfico interferente inferior a 20% em relação ao LIQ. Para o padrão interno esse efeito não foi observado.

A figura 25 apresenta os cromatogramas das amostras de plasma branco após mudança do solvente de lavagem da agulha.



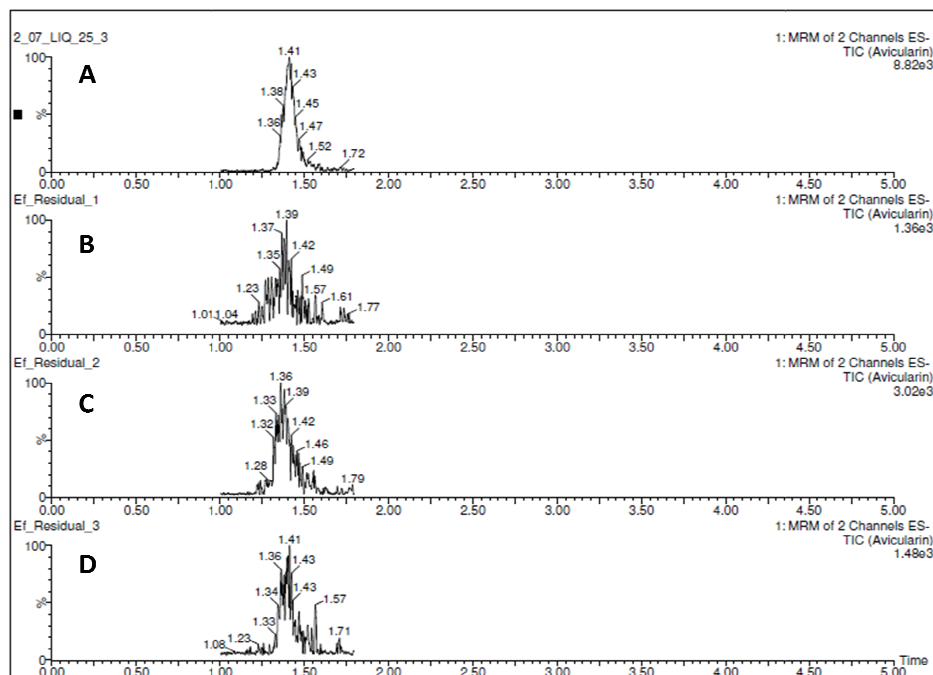


Figura 25. Efeito residual. A) Cromatograma de avicularina 25ng/ml; B) Cromatograma de amostra branco antes da curva; C e D) Cromatogramas de amostra branco depois do último ponto da curva (LSQ).

Os resultados mostram que, para o novo parâmetro de lavagem de agulhas, não há efeito residual significativo entre corridas e, portanto, o parâmetro foi considerado adequado.

#### 4.3.1.6 Efeito de Matriz

Os cromatogramas obtidos para essa análise encontram-se na figura 28. As amostras de plasma branco analisadas, tanto em modo SCAN negativo quanto positivo com infusão dos padrões de avicularina e cumarina mostraram-se isentas dos efeitos de supressão de ionização quando comparadas a amostra de plasma branco analisada sem infusão de padrões, pois não houve supressão do sinal cromatográfico nos tempos de retenção referentes aos analitos de interesse. Com esses resultados pode-se concluir que esta análise está isenta de efeito de matriz.

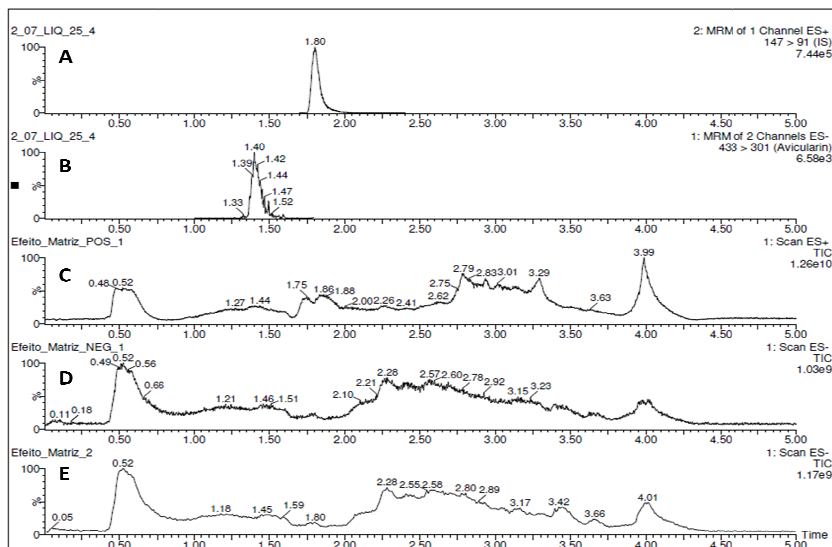


Figura 26. Cromatogramas obtidos no estudo de efeito de matriz. A) Sinal cromatográfico do padrão interno cumarina na concentração de 250 ng/ml analisado no modo positivo de ionização. B) Sinal cromatográfico da avicularina na concentração de 25 ng/ml analisado no modo negativo de ionização. C) Amostra de plasma branco no modo SCAN positivo com infusão combinada dos padrões D) Amostra de plasma branco no modo SCAN negativo com infusão combinada dos padrões. E) Amostra de plasma branco no modo SCAN negativo.

#### 4.3.1.7 Precisão e Exatidão

Após a análise de cinco replicatas em três concentrações: CQB (50 ng/ml), CQM (750 ng/ml) e CQA (1500 ng/ml) e na concentração de LIQ (25 ng/ml) em dias diferentes, a média dos valores obtidos de cada concentração, o desvio padrão relativo, seu coeficiente de variação e o erro padrão relativo foram calculados. Os resultados encontram-se nas tabelas 24 e 25.

Tabela 24. Precisão e Exatidão intracorrida. Resultados de concentração média  $\pm$  desvio padrão de avicularina nas concentrações de 25 ng/ml, 50 ng/ml, 750 ng/ml e 1500 ng/ml com os respectivos valores precisão e exatidão no mesmo dia de análise.

CQ Avicularina	Concentração (ng/mL)	Média $\pm$ dp	Precisão Intracorrida (%)	Exatidão Intracorrida (%)
LIQ	25	25,1 $\pm$ 1,23	4,9	100,2
CQB	50	48,2 $\pm$ 3,8	7,9	96,4
CQM	750	762,9 $\pm$ 6,5	0,8	101,7
CQA	1500	1401,6 $\pm$ 5,5	3,9	93,4

Tabela 25. Precisão e Exatidão intercorrida. Resultados de concentração média  $\pm$  desvio padrão de avicularina nas concentrações de 25 ng/ml, 50 ng/ml, 750 ng/ml e 1500 ng/ml com os respectivos valores precisão e exatidão em três dias alternados de análise.

<b>CQ Avicularina</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>	<b>Média <math>\pm</math> dp</b>	<b>Precisão Intercorrida (%)</b>	<b>Exatidão Intercorrida (%)</b>
<b>LIQ</b>	25	26,2 $\pm$ 2,12	8,1	105,0
<b>CQB</b>	50	49,3 $\pm$ 2,72	5,5	98,6
<b>CQM</b>	750	757,2 $\pm$ 9,7	1,3	100,9
<b>CQA</b>	1500	1435,6 $\pm$ 4,7	0,3	95,5

Os dados obtidos mostram que o método analítico em questão apresenta adequada precisão e exatidão para o analito avicularina.

#### 4.3.1.8 Estabilidade

Os critérios utilizados para a avaliação da estabilidade nos ensaios de curta duração (tempo de espera no injetor, ciclo de congelamento e descongelamento e estabilidade da solução estoque) dos padrões avicularina e cumarina foram os mesmos aplicados para precisão e exatidão. A variação encontrada nos controles de qualidade após esses três ensaios está representada nas tabelas 26 e 27 abaixo.

Tabela 26. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade em auto-injetor e ciclo de descongelamento. Dados das amostras de avicularina nas concentrações 50, 750 e 1500 ng/ml (n=3).

<b>CQ Avicularina</b>	<b>Concentração (ng/ml)</b>	<b>Auto-injetor (0h e 24h)</b>		<b>Ciclo degelo (0h e 24h)</b>	
		<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>CQB</b>	50	6,7	106,3	2,8	106,8
<b>CQM</b>	750	5,8	104,2	1,2	96,2
<b>CQA</b>	1500	2,5	99,5	3,4	103,9

Tabela 27. Resultados de precisão e exatidão para o ensaio de estabilidade da solução estoque em 0h, 6h em temperatura ambiente e sete dias sob refrigeração. Dados de avicularina (2000 ng/ml) e cumarina (250 ng/ml) (n=3).

<b>Solução Estoque</b>	<b>Concentração (ng/mL)</b>	<b>0h, 6h e 7 dias</b>	
		<b>Precisão (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>Avicularina</b>	2000	3,3	111,6
<b>Cumarina</b>	250	1,21	100,5

#### 4.4 Avaliação da interação da avicularina com as proteínas plasmáticas totais

Após a análise do ultrafiltrado das amostras de avicularina em plasma em três concentrações diferentes (CQB, CQM e CQA) comparados as mesmas amostras preparadas em água por CLUE-DAD-EM/EM, constatou-se que a taxa de ligação a proteína plasmática na concentração CBQ foi menor que a taxa nas concentrações obtidas para CQM e CQA, o que nos indica que a taxa de ligação a proteínas plasmáticas do flavonóide avicularina é dose-dependente, assim como apresentado em estudos com outros flavonóides como a quercetina e rutina no trabalho de Diniz e colaboradores (2008). Os dados da taxa de ligação da avicularina a proteínas plasmáticas nas três concentrações encontram-se na tabela 28 abaixo.

Tabela 28. Resultados para as taxas de ligação da avicularina a proteínas plasmáticas totais nas concentrações 50, 750 e 1500 ng/mL.

Concentração (ng/mL)	Taxa de ligação da avicularina a proteína plasmática total (%) (média ± dp)
50 *	53,2 ± 3,01
750	68,5 ± 0,57
1500	69,8 ± 0,95

\*Comparação entre CQB com CQM e CQA apresentou nível de significância (p) < 0, 019

#### 4.5 Estudo piloto de perfil farmacocinético de distribuição e eliminação da avicularina após administração intravascular (i.v.)

As concentrações obtidas no doseamento de avicularina no plasma foram corrigidas em relação ao peso de cada animal e esses dados foram submetidos a análise de regressão não linear com auxílio do software SCIENTIST® para determinação do modelo compartimental ao qual os dados melhor se ajustam (mono ou bicompartmental).

Como pode ser visualizado na figura 27 o modelo compartimental escolhido para a avicularina foi o bicompartmental. Os altos valores do critério de seleção do modelo (MSC) do programa SCIENTIST®, dos valores de coeficiente de correlação ( $r > 0,99$ ) e os baixos desvios padrão obtidos reforçaram a opção por este modelo.

Na figura 27 A podemos observar o ajuste dos dados pela regressão não linear e na figura 27 B os dados foram transferidos para a escala monologarítmica, onde é possível a visualização clara de duas inclinações no perfil, caracterizando o modelo de dois compartimentos.

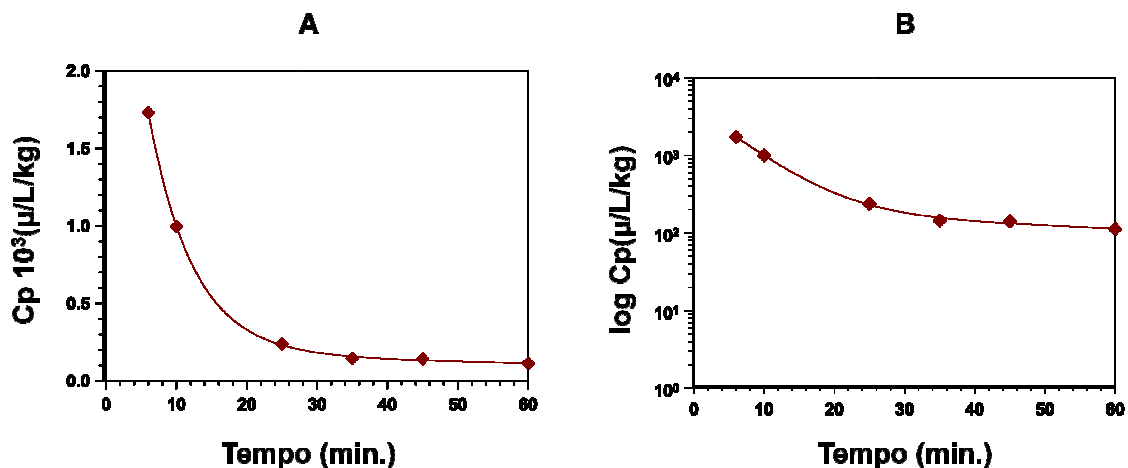


Figura 27. Perfil farmacocinético de concentração plasmática *versus* tempo ( $C_p \times t$ ) de um dos ratos estudados (dose 1mg/kg) após análise de regressão não linear utilizando modelo bi-compartimental . A) Perfil farmacocinético de  $C_p \times t$  em escala linear com a análise de regressão não linear ( $r=0,99$ ). B) Perfil farmacocinético de  $C_p \times t$  em escala monologarítmica com a análise de regressão não linear.

Considerando a análise compartimental, a movimentação caracterizada pelo modelo é explicada por meio do modelo mamilar apresentado na figura 30, onde podemos observar que a distribuição da dose administrada ocorre em dois compartimentos, o compartimento central e o periférico. Sendo assim, para que pudesse compreender melhor a movimentação da avicularina no organismo e para que fosse calculado o volume de distribuição da substância administrada fez-se necessário o cálculo das micro-constantes  $k_{10}$ ,  $k_{12}$  e  $k_{21}$ , que definem a taxa de eliminação a partir do compartimento central, a taxa de distribuição do compartimento central para o periférico e a redistribuição do compartimento periférico para o central, respectivamente.

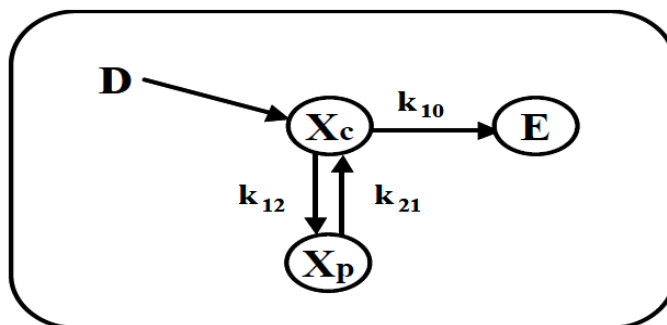


Figura 28. Modelo mamilário bicompartimental. D= Dose administrada,  $X_c$ = quantidade de fármaco no compartimento central;  $X_p$ = quantidade de fármaco no compartimento periférico; E= quantidade de fármaco eliminada;  $k_{10}$ = micro-constante de eliminação do compartimento central  $k_{12}$ =micro-constante de distribuição do compartimento central (1) para o periférico (2) e  $k_{21}$ = micro-constante de redistribuição do compartimento periférico para o central (Bourne, 1995).

Além dos parâmetros compartimentais, os parâmetros farmacocinéticos não compartimentais também foram calculados e estão apresentados na tabela 29.

De acordo com o valor da macroconstante  $\alpha$  ( $0,20 \pm 0,006 \text{ min}^{-1}$ ) pode-se observar que a etapa de distribuição é muito rápida, com  $t_{1/2 \alpha}$  de  $3,44 \pm 0,113$  minutos.

As microconstantes  $k_{12}$  e  $k_{21}$  ( $0,07 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  e  $0,02 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente) indicam que a velocidade de entrada no compartimento periférico é muito menor do que a velocidade de retorno do compartimento periférico para o central, sendo o  $t_{1/2}$  da primeira constante, cerca de 9,9 minutos, enquanto o da segunda é de cerca de 3,4 minutos. Sendo assim, espera-se que não ocorra acúmulo de avicularina nos tecidos que pertencem ao compartimento periférico.

A macroconstante  $\beta$  ( $0,015 \pm 0,005 \text{ min}^{-1}$ ) indica que os valores de  $t_{1/2 \beta}$  ficam em  $49,99 \pm 18,66$  minutos, o que demonstra uma rápida velocidade de eliminação do flavonóide avicularina esse dado é corroborado pelo valor obtido pelo parâmetro não compartimental MRT (tempo de residência média) da avicularina que ficou em  $19,44 \pm 1,301$  minutos, relativamente próximo aos valores obtidos de  $t_{1/2 \beta}$ .

A microconstante  $k_{10}$  possui valor médio de  $0,13 \pm 0,004 \text{ min}^{-1}$ , cujo tempo de meia-vida é de 5,3 minutos. Esse dado indica que a taxa de eliminação por metabolização e/ou excreção é bastante alta, ocorrendo muito rapidamente, o que reforça o valor obtido para a macroconstante  $\beta$ .

Tabela 29. Parâmetros farmacocinéticos de distribuição e eliminação da avicularina após a administração intravenosa (1mg/kg) em ratos (n=2).

Parâmetros	R1	R2	Média ± dp
<b>Parâmetros compartimentais</b>			
<b>A (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	6401,65	4942,01	5671,83 ± 1032
<b>B (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	323,5	213,4	268,43 ± 77,84
<b><math>\alpha</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	0,206	0,197	0,20 ± 0,006
<b><math>\beta</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	0,011	0,019	0,015 ± 0,005
<b><math>t_{1/2\alpha}</math> (min)</b>	3,36	3,52	3,44 ± 0,113
<b><math>t_{1/2\beta}</math> (min)</b>	63,19	36,79	49,99 ± 18,66
<b><math>k_{10}</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	0,13	0,12	0,13 ± 0,004
<b><math>k_{12}</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	0,06	0,07	0,07 ± 0,07
<b><math>k_{21}</math> (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>	0,03	0,02	0,02 ± 0,03
<b><math>V_{d_c}</math> (L/kg)</b>	0,15	0,19	0,17 ± 0,03
<b><math>V_{d_p}</math> (L/kg)</b>	0,6	0,39	0,50 ± 0,14
<b><math>V_{d_{ss}}</math> (L/kg)</b>	0,75	0,58	0,665 ± 0,120
<b>Parâmetros não compartimentais</b>			
<b><math>Cl_{tot}</math> (L/min/kg)</b>	0,10	0,21	0,155 ± 0,077
<b><math>ASC_{P_{0-\infty}}</math> (<math>\mu\text{g}\cdot\text{min}^2/\text{L}</math>)</b>	49213,36	55921,25	52567,31 ± 4743,2
<b><math>ASMC_{P_{0-\infty}}</math> (<math>\mu\text{g}\cdot\text{min}^2/\text{L}</math>)</b>	1001857,77	1035676,73	1018767 ± 23913,6
<b>MRT (min)</b>	20,36	18,52	19,44 ± 1,301

A e B= intercepto das fases de distribuição e eliminação, respectivamente;  $\alpha$  e  $\beta$ = macroconstantes de distribuição e eliminação, respectivamente;  $k_{10}$ = microconstante de eliminação do compartimento central;  $k_{12}$ = microconstante de transferência do compartimento central para o periférico;  $k_{21}$ = microconstante de transferência do compartimento periférico para o central;  $V_{d_c}$ = volume de distribuição no compartimento central;  $V_{d_p}$ = volume de distribuição no compartimento periférico;  $V_{d_{ss}}$ = volume de distribuição no estado de equilíbrio;  $Cl_{tot}$ = clearance total;  $ASC_{0-\infty}$ = área sob a curva de zero ao infinito;  $ASmC_{0-\infty}$ = área sob a o primeiro momento da curva de zero ao infinito; MRT= tempo de residência média.

Em um trabalho realizado por Ying e colaboradores (2007) utilizando o flavonóide heterosídeo vitexina-2-O-ramnosídeo na dose de 15 mg/kg com administração intravenosa em ratos, os autores também verificaram que o melhor modelo farmacocinético que se ajustou aos dados foi o bicompartimental, sendo os parâmetros encontrados:  $t_{1/2\alpha}$  de 8,1 minutos,  $t_{1/2\beta}$  de 45 minutos, microconstantes  $k_{10}$ ,  $k_{12}$  e  $k_{21}$  de  $0,08 \text{ min}^{-1}$ ,  $0,08 \text{ min}^{-1}$  e  $0,02 \text{ min}^{-1}$ , respectivamente.

Considerando que a vitexina é um flavonóide glicosilado como a avicularina, os dados obtidos por Ying e colaboradores (2007) indicam semelhança entre os parâmetros obtidos apresentados neste trabalho. A comparação dos dados obtidos para vitexina e para avicularina apóiam a tese da rápida eliminação de flavonóides glicosilados e do pouco ou nenhum acúmulo desse tipo de flavonóide no compartimento periférico.

Os valores dos parâmetros de volume de distribuição nos compartimentos central e periférico ( $V_{d_c}$  e  $V_{d_p}$ ) 0,17 e 0,50 L/kg, respectivamente reforçam a baixa concentração tecidual da avicularina. Para o flavonóide vitexina, o valor do  $V_{d_c}$  apresentado foi de 5,6 L/kg e os dados apresentados pelos autores permitiram calcular o valor do  $V_{d_p}$  que foi de 19,3 L/kg. Esses valores foram muito superiores ao apresentado pela avicularina.

O valor médio de *Clearance* obtidos para a avicularina foi de  $0,155 \pm 0,077$  L/min/kg e para a vitexina, os autores apresentaram o valor médio de 0,3 L/min/kg. Esses dados indicam que o processo de eliminação de ambos flavonóides glicosilados é da mesma magnitude, em volumes bastante altos.

O valor do *Clearance* da creatinina em ratos é de cerca de 0,67 L/min/kg (Ohta e Sasase, 2011), aproximadamente o dobro do valor obtido para os flavonóides glicosilados. Como o *clearance* de creatinina ocorre por difusão passiva, valores de *clearance* menores que o da creatinina sugere a ocorrência de reabsorção tubular ativa, por ação de transportadores de membrana.

Os parâmetros farmacocinéticos de absorção, distribuição e eliminação da avicularina obtidos neste trabalho indicam que este flavonóide deve apresentar baixa biodisponibilidade em função da sua baixa fração absorvida (30%), influenciada pela alta atividade da P-gp, baixa ligação às proteínas plasmáticas (cerca de 70%) o que faz com que a avicularina fique livre para sofrer os processos de metabolização e eliminação, assim como pela alta taxa de eliminação verificada principalmente pelo  $t_{1/2\beta}$  de 45 minutos. Dados encontrados na literatura sobre a biodisponibilidade de



outros flavonóides confirmam a baixa biodisponibilidade para essa classe de compostos (MESKIN *et al.*, 2004; WILLIANSO, 2004; WALLE *et al.*, 2003; GEE *et al.*, 2000).

Entretanto, considerando que o estudo realizado foi piloto (n=3), mais animais serão necessários para a confirmação dos resultados obtidos neste estudo.

***CONCLUSÃO***

## 5. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, foi possível concluir que:

A técnica de isolamento de avicularina das partes aéreas de *Bidens sulphurea* mostrou-se eficaz e específica, com a obtenção final de um padrão isolado de avicularina com alto teor de pureza ajustada (93,27%).

As metodologias desenvolvidas para a quantificação da avicularina e vermelho de fenol em perfundido intestinal e de avicularina em plasma por CLUEDAD-EM/EM foram satisfatórias, obedecendo aos critérios estabelecidos pelo Guia de Validação de métodos bioanalíticos da ANVISA.

Os perfis de absorção intestinal de avicularina em ratos nas doses de 1mg/kg e 5 mg/kg foram determinados sendo a fração absorvida final para os dois grupos de 30,56 e 39,49%, respectivamente. Pode-se observar também que apesar da fração final absorvida ser próxima para ambos os grupos, a constante de absorção para a dose de 1mg/kg foi significativamente maior que para 5 mg/kg, o que sugere o envolvimento de transportadores na absorção da avicularina.

Em relação à influência dos sais biliares no perfil de absorção da avicularina pudemos concluir que, na dose testada de 1mg/kg, não foi observado alteração no perfil, sendo a fração absorvida final de 24,81%.

Com a determinação da influência da glicoproteína-P no perfil de absorção intestinal da avicularina pudemos observar que o flavonóide em questão sofre influência da proteína de efluxo, sendo a fração final absorvida de 87,43%.

Em relação aos modelos de absorção testados, pudemos concluir que para os grupos AV1, AV5 e DB foi assumido o modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa, e para o grupo VP o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo de absorção de Michaelis-Menten (ativa) e secreção ativa.

O ensaio de taxa de ligação da avicularina as proteínas plasmáticas totais de ratos revelou os valores de 53,2%, 68,5% e 69,8% para as concentrações de 50, 750 e 1500 ng/mL respectivamente.

O modelo farmacocinético escolhido após administração intravascular de avicularina foi o modelo bicompartimental e de acordo com os valores encontrados nos parâmetros farmacocinéticos pode-se concluir que o flavonóide avicularina possui rápida distribuição e eliminação do organismo.

Os resultados obtidos de fração absorvida do flavonóide no intestino sugerem uma baixa biodisponibilidade da avicularina, assim como relatada para outros flavonóides.

## ***REFERÊNCIAS***

## 6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA BRASIL (ANVISA). **Guia para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos**. Brasília, DF, 2012

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Disponível em: <[http://www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/RDC17\\_2010c.pdf](http://www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/RDC17_2010c.pdf)>. Acesso em: 02 jan. 2013.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, A. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, p. 413–420, 1995.

AMIDON, et al. Provisional Biopharmaceutical Classification of Some Common Herbs Used in Western Medicine. **Mol Pharmaceutics**, v. 9, p. 815-822, 2012.

AN, R. B.; KIM, H.C.; TIAN, Y.H.; KIM, Y.C. Free radical scavenging and hepatoprotective constituents from the leaves of *Juglans sinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 529-533, 2005.

ARIAS, M.; SAUER-LEHNEN, S.; TREPTAU, J.; JANOSCHECK, N.; THEUERKAUF, I.; BUETTNER, R.; GRESSNER, A.; WEISKIRCHEN, R. Adenoviral expression of a transforming growth factor- $\beta$  I antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. **BMC Gastroenterology**, v.3, p.29, 2003.

AZSALOS, A. Role of ATP-Binding Cassete (ABC) Transporters in Interactions Between Natural Products and Drugs. **Current Drug Metabolism**, v.9, p. 1010-1018, 2008.

BARNES, S. The importance of *in vivo* metabolism polyphenols and their biological actions. In: Meskin, M. et al. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton :CR CombiPress, p. 51 – 60, 2004

BEHR, S.; DURET, P.; GENDRON, N.; GUAY, J.; LAVALLE, B.; PAGE, B. **Plant extract having matrix metalloprotease inhibiting activity and dermatological uses thereof**. Patente WO 2006053415, PCT Int. Appl., 2006,

BISCHOFF, S. C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Currente Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, p. 733-740, 2008.

BOTSARIS, A.S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of flora medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.3, p. 2007.

BOURNE, D.W.A. **Mathematical modeling of pharmacokinetic data**. College of pharmacy, health and sciences center. Oklahoma University. Lancaster: Technomic Publishing, 1995.

BRANDÃO, M. G. L.; KRETTLI, A. U.; SOARES, L. S. R.; NERY, C. G. C.; MARINUZZI, H. C. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteracea) correlated with the presence of acetylene and flavonoids compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 131-138, 1997.

BRANDÃO, M. G. L.; NERY, C. G. C.; MAMÃO, M. A. S.; KRETTLI, A. U. Two methoxylated flavones glycosides from *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v.48, p. 397-399, 1998.

BUGGINS, T.R.; DICKINSON, P.A.; TAYLOR, G. The effects oh pharmaceutical excipients on drug disposition. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.1482-1503, 2007.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CECH, N.B.; ENKE, C.G. Pratical implications of some recent studies in eletrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**, v.20, p. 362-387, 2001.

CHANG, S.; CHIANG, Y.; CHANG, C. L.; YEH, H.; SHYUR, L.; KUO,Y.; WU, T.; YANG, W. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN- $\gamma$  expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 232-236, 2007.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

CHOI, J.S.; PARK, K.Y. MOON, S.H., RHEE, S.H.; YOUNG, H.S. Antimutagenic effect of plant flavonoids in the *salmonella* assay system. **Archives of Pharmacal Research**, v.17, p.71-75, 1994.

CHOI, J.S.; SONG, J.H.; PARK, K.Y.; KWOM, D.H. Inhibitory effects of quercetina-3 rhamnoside on influenza A virus replication. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 329-333, 2009.

CRESPY, V.; MORAND, C.; BESSON, C.; MANACH, C.; DÉMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Comparison of the Intestinal Absorption of Quercetin, Phloretin and Their Glucosides in Rats. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2109-2114, 2001.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria De Massas Com Ionização Por “*Electrospray*”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.287-292, 2006.

CYR, B. **Plant extracts and composition containing extracellular protease inhibitors**. Patente WO 2002069992, 2002.

DAY, A.J.; CANADA, F.J.; DIAZ, C.J.; KROON, P.A.; MCLAUCHLAN, W.R.; FAULDS, C.B.; PLUMB, G.W.; MORGAN, M.R.A. and WILLIAMSON, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS Letters**, v.2, p.166-170, 2000.

DINIZ, A. **Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide**. 2008. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DINIZ, A.; ESCUDER-GILABERT, L.; LOPES, N.P.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; SAGRADO, S.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J. Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. **Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 625-632, 2008.

DOLUISIO, J.T. BILLUPS, N.F., DITTER, L.W. et al. Sugita and J.V. Swintosky, Drugs absorption I: an *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, n.10, p.1196–1199, 1969.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. **Pharmaceutical Research**, v.13, p.1336–1342, 1996.

FARIAS, M. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. ORG: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gossmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. e Petrovick, P.R. Santa Catarina: Editora UFRGS e UFSC, 1999.

FENN, J. B.; WHITEHOUSE, G. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M. H.; Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 675-679, 1984.

Food and Drug Administration. **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, 2001.

FUJIMORI, K.; SHIBANO, M. Avicularin, a plant flavonoid, suppresses lipid accumulation through repression of C/EBP $\alpha$ -activated GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, Osaka, v.61, p. 5139-5147, 2013.

GAN, L.-S. L.; MOSELEY, M. A.; KHOSLA, B.; AUGUSTIJNS, P. F.; BRADSHAW, T. P.; HENDREN, R.W.; et al. CYP3A-like cytochrome P450-mediated metabolism and polarized efflux of cyclosporin A in Caco-2 cells: Interaction between the two biochemical barriers to intestinal transport. **Drug and Metabolism Disposition**, v. 24, p. 344–349, 1996.



GEE, J.M.; DUPONT, M.S.; RHODES, M.J.C.; JOHNSON, I.T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, p.19-25, 1998.

GEE, J.M.; DUPONT, S.; DAY, A.J.; PLUMB, G.W.; WILLIAMSON, G.; JOHNSON, I.T. Intestinal Transporte of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 2765-2771, 2000.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. **Pharmacokinetics**. Segunda edição. New York: Marcel Dekker, 1989.

GOBBO-NETO, L. Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. 2007. 245 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

GRAEFE, E.U.; DERENDORF, H. and VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quecetin in humans. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.37, n.5, p. 219-233, 1999.

GRAF, B. A.; AMEHO, C.; DOLNIKOWSKI, G.G.; MILLBURRY, P.E.; CHEN, C.; BLUMBERG, J.B. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. **Journal of Nutrition**, v.136, p. 39-44, 2006.

GREGOIRE, S.; SINGH, A.P.; VORSA, N.; KOO, H. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferase and *Streptococcus mutans* acidogenicity. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1960-1968, 2007.

HARRIS, D.C.; **Análise Química Quantitativa**. Sexta Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HE, X.; LIU, R. H. Cranberry phytochemicals: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7069-7074, 2006.

HE, X.; LIU, R. H. Phytochemicals of apple peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 9905–9910, 2008.

HO, C.S.; LAM, CWK, CHAN, M.H.M; CHEUNG, R.C.K; LAW, L.K. LIT, L.C.W.; NG, K.F., SUEN, M.W.M; TAI, H.L. Electrospray ionization mass spectrometry: principles and clinical applications. **Clinical Biochemist Reviews**, v.24, p.3-12, 2003.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). AVICULARIN. Disponível em <<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB30860>>. Acessado em 05 de maio de 2012.

KRUIJTZER, C. M. F., BEIJNEN, J. H., ROSING, H., TEN BOKKEL HUIJINK, W. W., SCHOT, M., JEWELL, R.C., et al. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.2943–2950, 2002.

LEE, M.H.; SON, Y.K.; HAN, Y.N. Tissue factor inhibitory flavonoids from fruits of *Chaenomeles sinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v.25, p.842-850, 2002.

LENNERNÄS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A. L. Jejunal permeability: A comparison between the Ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans. *Pharmaceutical Research*, v.14, p. 667–671, 1997.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**, 3ª Edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001.

MARI, A.; TEDESCO, I.; NAPOO, A.; RUSSO, G.L.; MALORNI, A.; CARBONE, V. Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar. **Food Chemistry**, v.123, p.157-164, 2010.

MESKIN, M.; BIDLACK, W.R.; DAVIES, A.J.; LEWIS, D.S.; RANDOLPH, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p.21 – 33.

MUÑOZ, M. J. M. MERINO-SANJUÁN, R. LLEDÓ-GARCÍA, V.G. CASABÓ, F.J. MÁÑEZ-CASTILLEJO; A. NÁCHER.. Use of nonlinear mixed effect modeling for the intestinal absorption data: Application to ritonavir in the rat. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.61, p. 20-26, 2005.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

PAIVA, F.P.; MAFFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador: FIOCRUZ, 2005.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F. The interaction of anthocyanins with biliverdin reductase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.296, p.631-636, 2002.

PIETRO, A.D.; CONSEIL, G.; PEREZ-VITÓRIA, J.M.; DAYAN, G.; BAUBICHON-CORTAY, H.; TROMPIER, D.; STEIN-FELS, E.; JAULT, J.M.; WET, H.; MAITREJEAN, M.; COMTE, G.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A. M.; DUMONTET, C.; MELNTOSE, D.B.; GOFFEAU, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BARRON, D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. **Cellular and molecular life sciences**, v. 59, p. 307-322, 2002.

PRIOR, R.L. Absorption and metabolism of anthocyanins: Potential health effects. In: Meskin, M.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 1-20.

RASKIN I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; LLIC, N.; POULEY, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnoly**, v. 20, p. 522-531, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.

ROBERTS, M.S; MAGNUSSON, B.M; BURCZYNSKI, F.J. Enterohepatic circulation -Physiological, pharmacokinetic and clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v.41, p.751-790, 2002.

SCHELLACK, G. **Farmacologia. Uma abordagem didática**. São Paulo: Fundamento Educacional, 2005.

SILVA, D. B. **Atividade antialérgica e estudos químicos das espécies *Bidens gardneri* Bak. E *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. (Asteraceae)**. 2009. 408f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica De Compostos Orgânicos**. Sétima Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SONG, N.; LI, Q.; LIU, C. Intestinal permeability of metformin using single-pass intestinal perfusion in rats. **World Journal of Gastroenterology**. v. 12, n.25, p. 4064-4070, 2006.

STORPIRTS, S., GAI, M. N., CAMPOS, D. R., GONÇALVES, J.E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUTTON, S.C., RINALDI, M.T.S. Comparison of the Gravimetric, Phenol Red, and 14C-PEG-3350 Methods to Determine Water Absorption in the Rat Single-Pass Intestinal Perfusion Model. **AAPS Pharmaceutical Science**, v.3, p. 93-97, 2001.

TASSO, L.; NEVES, G; MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.; EIFLER-LIMA, V.; RATES, S.M.K.; COSTA, T.D. Pharmacokinetics and tissue distribution of a new heterocyclic N-phenylpiperazine derivative (LaSSBio-581) in rats. **Pharmaceuticals Sciences**, v. 26, p. 194-202, 2005.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução a Farmacocinética e a Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. São Paulo: Artmed; 2009.

VANHOUTTE, G.; VERHOYE, M.; RAMAN, E.; VAN DER LINDEN, A. In-vivo non-invasive study of the thermoregulatory function of the blood vessels in the rat tail using magnetic resonance angiography (MRA). **NMR in Biomedicine**, v.15, p.263-26, 1995.

VARMA, M. V. S., ASHOKRA, Y. J, DEY, C. S., & PANCHAGNULA, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: A perspective from bioavailability enhancement. **Pharmacology Research**, v. 48, p. 347–356, 2003.

VÉKEY, K; Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Cromatography A**, v.921, p.921, 227, 2001.

VO, A. V.; LEE, J.; KIM, J.; LEE, H.J.; KIM, S.; CHUN, W.; KWON, Y. Avicularin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by suppressing ERK phosphorylation in RAW 264.7 macrophages. **Biomolecules and Therapeutics**, v.20, n.6, p.532-537, 2012.

WALLE, T.; OTAKE, H.; WALLE, U.K.; WILSON, F.A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. **Journal of Nutrution**, Chuncheon, v.130, p. 2658-2661, 2000.

WILLIAMSON, G. Common features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids. In: Meskin, M.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton: CRC Press, p. 21 – 33, 2004.

WATERS. WATERS TQ DETECTOR: Operator's Guide: Revision F. 2006-2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical references substances**. WHO Technical Reports Series, n. 885, Part A, 5. Genebra: World Health Organization, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Bulletin of the World Health Organization (1998). **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review**. Geneva, p.1-43, 1998.

XU, Y.; FAN, G.; GAO, S.; HONG, Z. Assesment of intestinal absorption of vitexin-2''-O-Rhamnoside in hawthorn leaves flavonoids in rat using in situ and in vitro absorption models. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.34, p. 164-170, 2008.

YAMADA, K.; SHOJI, K.; MORI, M.; UHEYAMA, T.; MATSUO, N.; OKA, S.; NISHIYAMA, K.; SUGANO, M. Structure-activity relationship of polyphenols on inhibition of chemical mediator release from rat peritoneal exudate cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal**, v.35, p. 169-174, 1999.

YING, X.; GAO, S.; ZHU, W.; BI, Y.; QIN, F.; LI, X.; LI, F. High-performance liquid chromatographic determination and pharmacokinetic study of vitexin-2''-O-rhamnoside in rat plasma after intravenous administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.802-806, 2007.

YU, Y.B.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. PARK, J.C. Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from *Alnus firma* on HIV-1 viral enzymes. **Archives of Pharmacal Research**, v.30, p.820-826, 2007.

ZEID, A. H. S. A.; MOTAWA, H. M. Cytotoxic lipoidal constituents of *Cosmos sulphureus* (Cav.) leaves. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy**, v.40, p. 189-199, 2002.

***ANEXOS***

## **ANEXO A-** Acesso ao patrimônio genético

## **AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010174/2011-7**

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

**Instituição:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO - USP

**CNPJ:** 630.255.300/0001-04

**Representante Legal:** MARCO ANTONIO ZAGO

**Cargo/Função:** Pró-Reitor de Pesquisa

**CPF:** 348.967.088-49 **RG:** 3579713

**Projeto:** Desenvolvimento de uma plataforma para o estudo do metabolismo in vivo e in vitro de produtos naturais

**Coordenador do Projeto:** Norberto Peporine Lopes

**CPF:** 099.034.918-75 **RG:** 173554180 - SSP / SP

**Finalidade do projeto:** Estudo do metabolismo de produtos naturais: ferramenta para auxiliar na compreensão e definição de efeitos benéficos e tóxicos.

### **Amostras a serem acessadas:**

Espécie(s): *Actinocephalus aggregates*, *Actinocephalus bongardii*, *Actinocephalus cabralensis*, *Actinocephalus ciliatus*, *Actinocephalus denudatus*, *Actinocephalus divaricatus*, *Acritopappus longifolius*, *Actinocephalus herzogii*, *Actinocephalus polyanthus*, *Actinocephalus ramosus*, *Ageratum fastigiatum*, *Bidens* sp, *Blastocaulon prostratum*, *Blastocaulon scirpeum*, *Crotalaria micans*, *Crotalaria pallida*, *Eremanthus* sp, *Eupatorium* sp, *Eythrina mulungu*, *Ipomoea chiliantha*, *Indigofera truxillensis*, *Leiothrix schlechtendalii*, *Lychnophora* sp, *Mikania* sp, *Orquidaceae* sp, *Piper* sp, *Paepalanthus ater*, *Paepalanthus bromelioides*, *Paepalanthus distichophylus*, *Paepalanthus graomogolensis*, *Paepalanthus leucocephalus*, *Paepalanthus rigidulus*, *Paepalanthus scleranthus*, *Peterocaulon* sp., *Picrolemma sprucei*, *Philodice offmannseggii*, *Riedeliella graciliflora*, *Syngonanthus dealbatus*, *Syngonanthus elegantulus*, *Syngonanthus vernonioides*, *Senna* sp, *Solidago chilensis*, *Trichilia catiguá*, *Tabebuia* sp, *Wedelia* sp, *Vernonia* sp, *Viguera Robusta*, *Virola surinamensis*.

Tipo de material/quantidade de amostras: Espécies comercialmente cultivadas serão adquiridas diretamente dos produtores como por exemplo ou comprá-las de produtores, como por exemplo espécies de *Piper*, *Mikania*, *Trichilia catiguá* e *Eythrina mulungu*. Quando não houver essa possibilidade as coletas serão em torno de meio quilo de material.

**Local de depósito de subamostra:** DEPARTAMENTO DE BOTANICA

**Equipe do projeto:** NORBERTO PEPORINE LOPES / CPF 099.034.918-75

JOAO LUIS CALLEGARI LOPES / CPF 242.694.688-15

LEONARDO GOBBO NETO / CPF 260.985.118-96

JOAO SEMIR / CPF 416.569.038-49

DIONEIA CAMILO RODRIGUES DE OLIVEIRA / CPF 244.653.721-91

JOSE NORBERTO CALLEGARI LOPES / CPF 015.379.628-68

THAIS GUARATINI / CPF 278.586.568-56

ADRIAN MARTIN POHLIT / CPF 148.079.648-44

LUIZ ELIDIO GREGORIO / CPF 267.891.418-63

CARLOS ALEXANDRE CAROLLO / CPF 931.181.121-15

DANIEL ROBERTO CALLEJON / CPF 276.102.618-74

GISELE BARALDI MESSIANO / CPF 289.234.958-32

DAYANA RUBIO GOUVEA / CPF 326.851.028-09



MICHAEL NIEHUES / CPF 234.471.638-60  
LUCAS ROSSI SARTORI / CPF 048.524.476-40  
DENISE BRENTAN DA SILVA / CPF 936.622.971-91  
FERNANDA PERES FERREIRA / CPF 060.873.946-48

**Validade da Autorização:** 26/04/2011 a 15/04/2015

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010174/2011-7. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 26 de Abril de 2011

Paulo Sergio Lacerda Beirao  
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

*Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 2770134586466519 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.*

## ANEXO B- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 2 /10/2012 Parecer nº 122/2012

Pesquisador: Andrea Diniz Setor: DFA

Título: Protocolo nº 058/2012

**Modelagem PK-PD do flavonóide avicularina em ratos**

Entrada: 19/3/2012 Início: 1/7/2012 Término: 30/6/2014

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

**ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após aprovação e a p r o v a ç ã o d o r e l a t ó r i o f i n a l .**

Considerações e Parecer:

Após a pesquisadora esclarecer quanto a atuação dos vários participantes – especialmente com relação às alunas de pós graduação da UEL, e a indicação de substâncias alternativas ao uso de uretana e éter, propõe-se que o presente projeto seja APROVADO, na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM nº 032/2008-CEP, vez que não se constatam óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos nos moldes propostos no protocolo em relação à legislação vigente.

É o parecer. S.M.J.

  
Prof. Dr. GENTE PEDRO DEHERRERA,  
Presidente em exercício do CEAE.

Artigo 10 da Resolução nº 032/2008-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

- I - aprovado;
- II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;
- III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;
- IV - não aprovado

# ***APÊNDICE***

## 1. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA AVICULARINA

### 1.1 Determinação da pureza em massa de alta resolução

Foi preparada uma amostra do padrão isolado de concentração 20µg/ml em solvente MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40). Com essa amostra fez uma infusão direta em espectrômetro de massas com fonte de ionização *electrospray* e analisador TOF, no modo de ionização negativo. O espectro obtido encontra-se na figura 1, e o erro da análise foi calculado através da equação (1):

$$Erro_{ppm} = \frac{mt - mo}{mt} \cdot 1000000 \quad (1)$$

onde, mt= massa teórica; mo= massa observada.

A massa teórica, obtida através dos cálculos do software pela fórmula molecular, foi de 433.0776, e a massa observada na análise foi de 433.0777. Esses valores demonstram um erro de 0,23 ppm, considerado satisfatório para a análise pretendida.

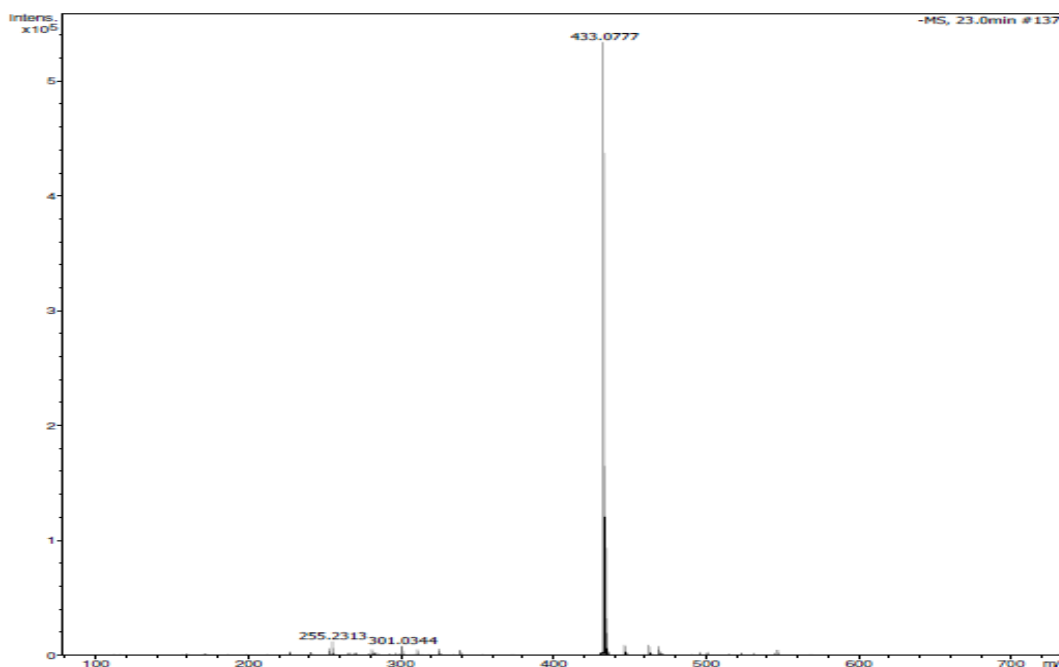


Figura 1. Espectro em massas de alta resolução de avicularina em modo de ionização negativo.

## 1.2 Determinação da pureza cromatográfica

Um método seletivo de separação cromatográfica em CLUE-EM/EM foi desenvolvido, obedecendo as normas da ANVISA e guias para o desenvolvimento de métodos analíticos (ANVISA, 2012; CASS, 2010; LANÇAS, 2004). O produto isolado foi submetido a essa técnica e sua pureza cromatográfica foi calculada por espectroscopia de UV, considerando a área total de picos de cromatograma sendo a área referente ao pico da avicularina de 98,54% (FIGURA 2). Para confirmação da pureza do pico foi realizada a análise de CLUE-EM onde pode-se observar no espectro na figura 3, o íon 433 referente a avicularina ionizada no modo negativo.

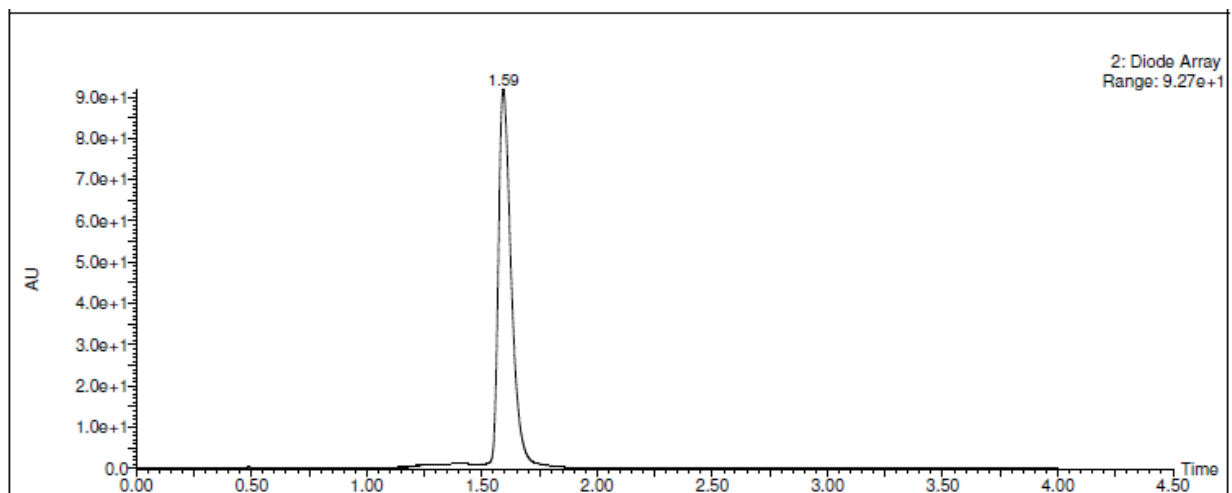


Figura 2. Cromatograma do pico isolado de avicularina por CLUE.

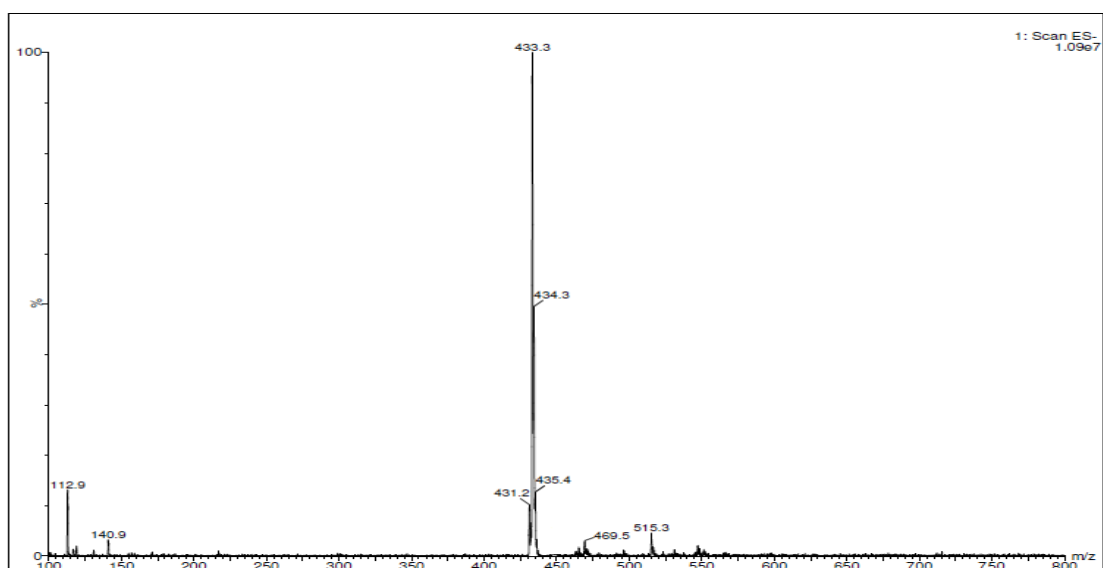


Figura 3. Espectro do pico isolado de avicularina por CLUE-EM no modo SCAN negativo.

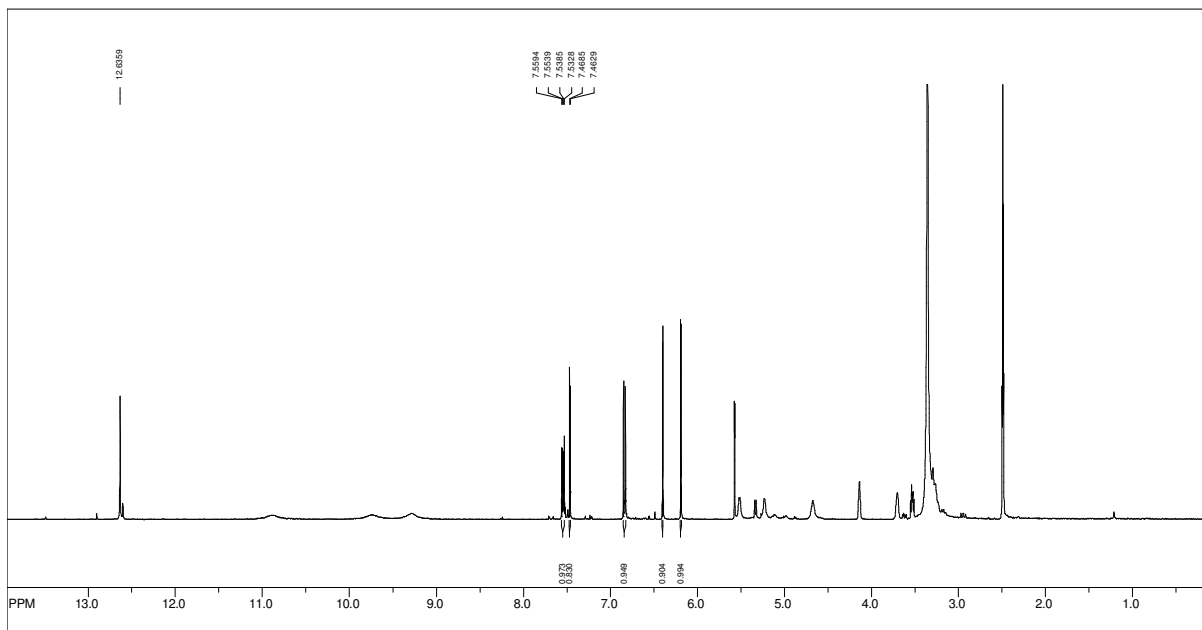
## 1.3 Análise de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os resultados da análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  encontram-se nas figuras e tabelas abaixo.

Tabela 1. Dados de RMN  $^1\text{H}$  do padrão isolado comparados com literatura.

H	Padrão isolado ( $\delta$ ) <sup>a</sup>	3-O- $\alpha$ -arabinofuranosil- quercetina [SILVA, 2009] <sub>a</sub>
6	6,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)	6,20 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
8	6,42 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,2 Hz)	6,40 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,1 Hz)
2'	7,52 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)	7,48 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 2,3 Hz)
5'	6,81 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)	6,85 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz)
6'	7,52 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,2 e 8,5 Hz)	7,55 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,3 e 8,5 Hz)
1''	5,53 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,1 Hz)	5,58 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 1,1 Hz)
2''	4,2 ( <i>dl</i> , <i>J</i> = 2,8)	4,15 ( <i>dl</i> , <i>J</i> = 2,9)
3''	3,78 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,9 e 6,2 Hz)	3,72 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 2,9 e 6,3 Hz)
4''	3,56 ( <i>m</i> )	3,55 ( <i>m</i> )
5''	3,31 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,6 e 12,1 Hz)	3,33 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,6 e 12,2 Hz)
	3,25 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,1 12,2 Hz)	3,27 ( <i>dd</i> , <i>J</i> = 5,2 12,2 Hz)
5-OH	12, 66 ( <i>s</i> )	12, 64 ( <i>s</i> )

<sup>a</sup> (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

Figura 4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do padrão isolado.

SpinWorks 2.5: C13CPD DMSO [C:\Bruker\TOPSPIN] npl 28

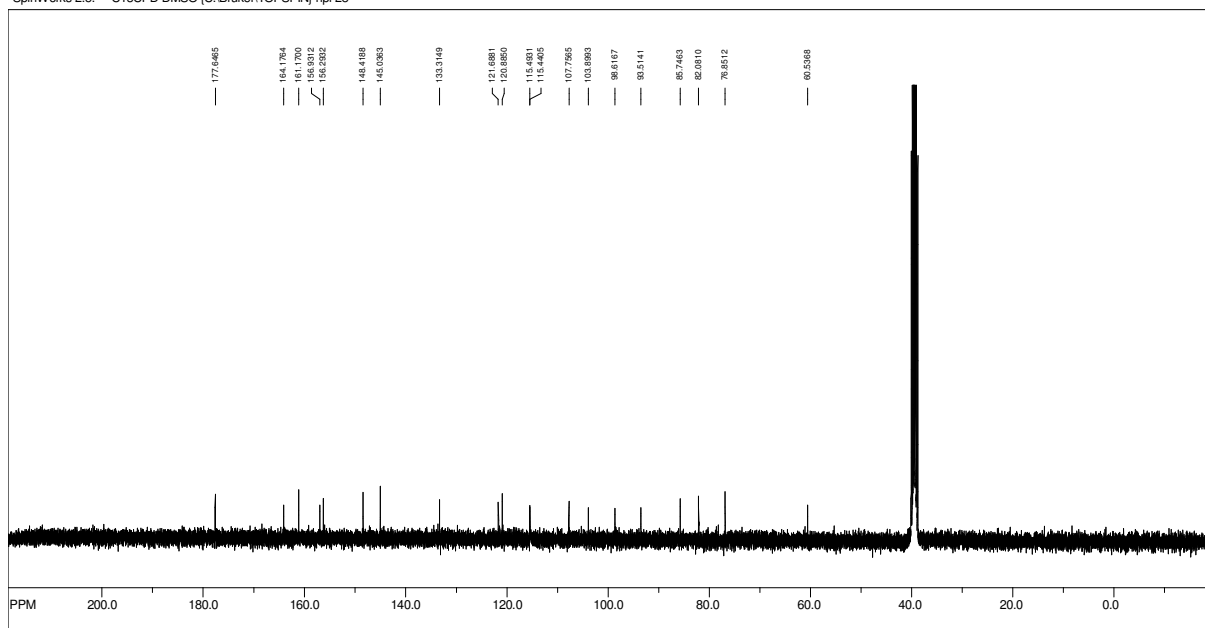


Figura 5. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de avicularina (75 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )

SpinWorks 2.5: C13DEPT135 DMSO [C:\Bruker\TOPSPIN] npl 28

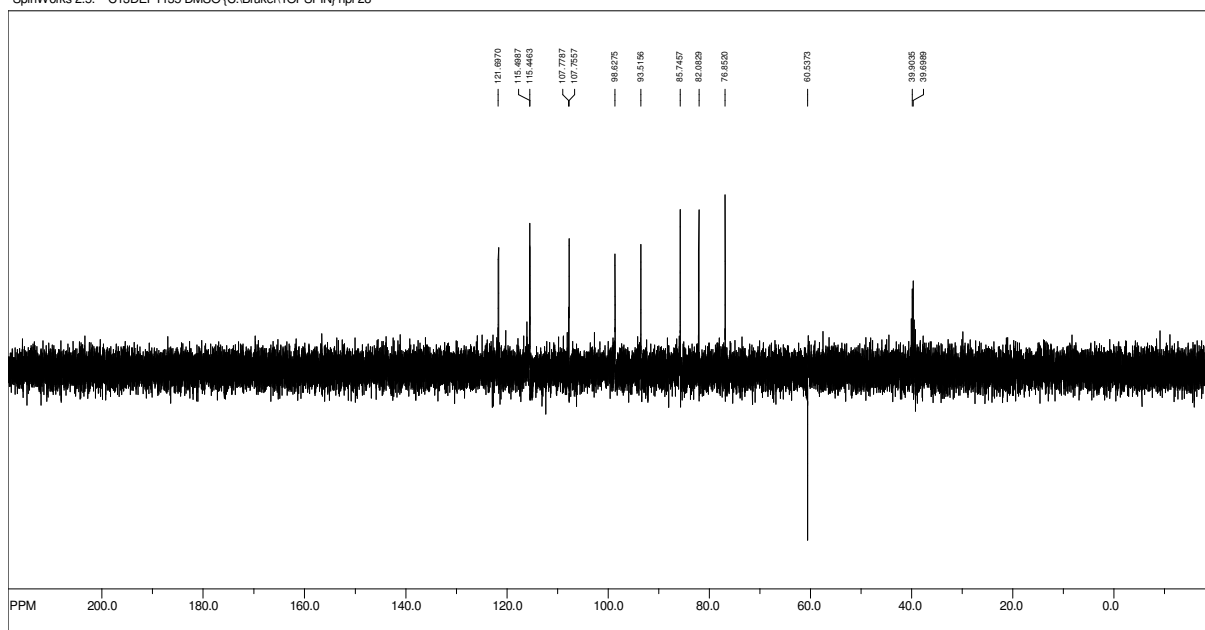


Figura 6. Espectro de DEPT 135° de avicularina (75 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ )

Tabela 2. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do padrão isolado comparados com literatura.

<b>C</b>	<b>Padrão isolado (<math>\delta</math>) *</b>	<b>3-O-<math>\alpha</math>-arabinofuranosil-quercetina [SILVA, 2009] *</b>
<b>2</b>	156,9	157,4
<b>3</b>	133,3	133,8
<b>4</b>	177,6	178,0
<b>5</b>	161,2	161,3
<b>6</b>	98,6	99,1
<b>7</b>	164,2	164,5
<b>8</b>	93,5	94,1
<b>9</b>	156,3	156,8
<b>10</b>	103,9	104,3
<b>1'</b>	120,8	121,4
<b>2'</b>	115,4	115,8
<b>3'</b>	145,1	145,3
<b>4'</b>	148,4	148,7
<b>5'</b>	115,5	115,9
<b>6'</b>	121,7	122,2
<b>1''</b>	107,8	108,2
<b>2''</b>	82,1	82,3
<b>3''</b>	76,8	77,2
<b>4''</b>	85,7	86,2
<b>5''</b>	60,5	60,9

\* (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

#### 1.4 Análise de resíduos minerais

O produto isolado foi submetido a técnica de ICP-MS para o doseamento de metais presentes na amostra. Na tabela 3 abaixo podemos conferir os metais quantificados.

Tabela 3. Doseamento de metais pela técnica de ICP-MS.

<b>Metal</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
<b>Al</b>	17,91
<b>Ba</b>	8,37
<b>Cd</b>	0,45
<b>Co</b>	0,02
<b>Cu</b>	0,76
<b>Mn</b>	0,35
<b>Pb</b>	0,01
<b>Se</b>	0,00
<b>Tl</b>	0,01
<b>Rb</b>	1,05



Zn	7,51
Ni	2,23
Mg	40,26
V	0,00
U	0,04
Bi	0,08
Be	0,03
As	0,22
Cr	8,66
Ag	0,17
Fe	7,97
<b>TOTAL</b>	<b>96,13</b>

### 1.5 Determinação de água e solventes residuais

Para análise de porcentagem de água e solventes residuais, 4,5 mg da amostra foram pesados e submetidos a análise termogravimétrica. Podemos observar através da derivação da curva de TG em DTG as áreas proporcionais as variações de massa em relação à temperatura, demonstrados na figura 7 abaixo, em TG/DTG, onde foi possível concluir que na região de aquecimento de 0 a 200 °C houve uma perda de 5,34% na massa do composto, referente à perda de umidade e volatilização de solventes residuais.

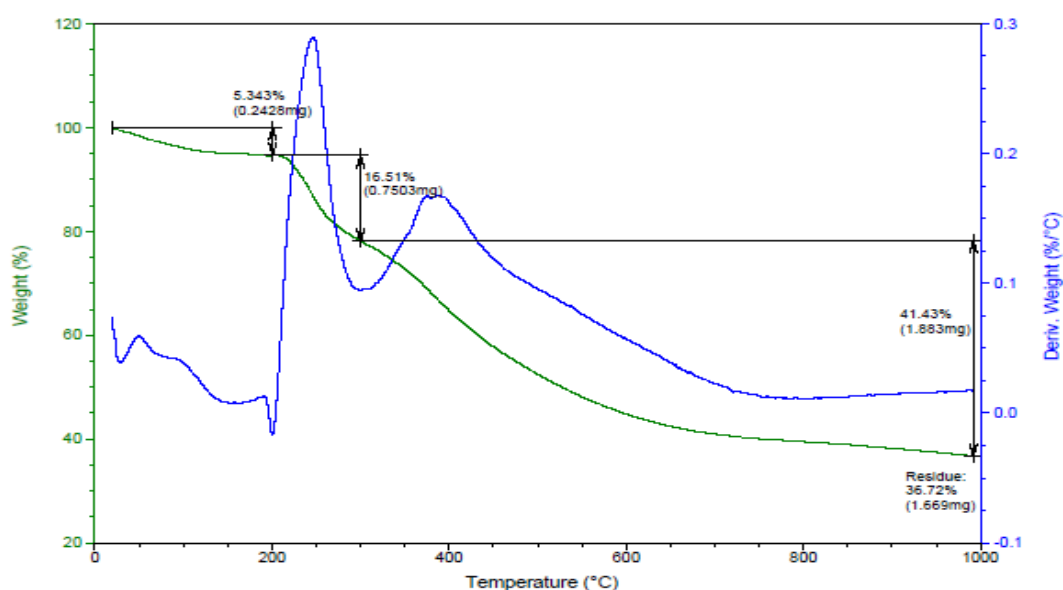


Figura 7. Gráfico TG-DTG do padrão isolado.