UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide

Andréa Diniz

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos naturais e sintéticos.

Orientada: Andréa Diniz

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Ribeirão Preto
2007

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.

Diniz, Andréa

Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide. Ribeirão Preto, 2007.

160 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos naturais e sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. Vicenina-2. 2. Farmacocinética. 3. Desenvolvimento de extrato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: **Andréa Diniz**

Título do trabalho: **Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide.**

Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos
naturais e sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese ao meu filho Brenno, pela precoce compreensão da necessidade do trabalho na vida da gente e também pelo “auxílio nas pesquisas”

E também ao meu pai, Ubirajara Dorival Diniz, o “professor Bira”, grande mestre da estatística que me ensinou a importância da aplicação no estudo e no trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Beto, por ter contribuído muito para que eu tivesse esta oportunidade, por sua condução de mestre até este ponto e pelo muito que poderei fazer a partir daqui.

Ao meu “anjo”, Hosana Deboni, pelo amparo como colega e também pelo companheirismo nesta caminhada, pela acolhida fraterna e a amizade sincera.

A profa. Dra. Maria José Medina Hernandez, por los caminos abiertos en tierras extranjeras y por hacer posible este trabajo con su ayuda técnica imprescindible

Ao prof. Dr. Fábio Yamashita, por toda orientação na etapa do desenvolvimento de extrato, pelo coleguismo e parceria.

A profa. Dra. Kellen Souza, pelas sugestões acertadas e pelo apoio e amizade antiga e permanente.

Ao Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, pela amizade, companheirismo e pelos ensaios realizados.

Ao Ronaldo de Jesus Costa e profa. Dra. Berenice Jordão pela confiança e apoio nos ensaios realizados.

A profa. Dra. Matilde Merino, por hacer disponible su laboratorio y me enseñado tanto a mi en tan poco tiempo.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Londrina e a todos que ali trabalham (especialmente aos amigos Profa. Dra. Célia Guadalupe, Oswaldo e Juca San Martin), pela realização das análises com tanta competência técnica e em ambiente profissional tão fraterno.

Ao Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL pela disponibilidade no uso de equipamentos e por tantos anos de acolhida.

Ao Depto de Ciências Farmacêuticas da UEL pelo apoio.

Ao Michel David dos Santos, obrigada por dividir comigo esse trabalho e pela amizade.

Carlos Carollo, muito obrigada por me ensinar tanto, por me auxiliar e, mais ainda, pelo carinho da acolhida.

Ao Leonardo Gobbo Neto, com a gratidão pela conversa amiga, pela ajuda técnica no laboratório e também pela atenção pessoal em cada parte deste trabalho.

Aos colegas de laboratório e amigos: Aline, Rosângela, Vessechi, Denise, Mineiro, Estela, Nery e Mazza, pessoas sem as quais tudo não teria sido tão bom.

A Ana Claudia, João Fernando e as pequenas Júlia e Alice, a família Sacilloto de que eu gosto tanto, pela amizade e apoio e também por terem me ajudado a iniciar este trabalho.

Aos amigos Mônica Maruno, Franco, Ana Leonor e Cátia Amaral, um muitíssimo obrigada por tudo.

Ao Simão Correia e a Gabriela Buchi, meu agradecimento pelo apoio de inestimável importância.

A Valquíria Jabor, querida descoberta e excelente companhia.

A profa. Dra. Pierina Bonato, pelos auxílios e socorros ao longo deste trabalho e pelo exemplo.

Ao prof. João Callegari, pelo exemplo e socorro nos momentos difíceis e delicados.

A Carlinha e Tomaz, pela permanente disponibilidade e pelo carinho.

A profesora Dra. Laura Escuder Gilabert, por su perfección y conocimientos.

A mi querida Maria Amparo Gomez, por las noches en el laboratorio, por las enseñanzas, por las risas y por su afectuosa amistad.

A Merche, por la agradable compañía en los trabajos.

A querida Sagrário Torres y su familia, por la cooperación en los trabajos, por el cariño y por darme amigos en otras tierras.

A profa. Maria Rosa Villanueva, por el ejemplo, paciencia y amabilidad.

A la Yolanda Biosca por las ayudas y apoyos en mi estancia.

A el prof. Dr. Salvador Sagrado, por su apoyo en los trabajos desarrollados.

A Manoel y Maria Amparo, por el cariño y prontitud en los ensinamento de las técnicas de permeación.

A los amigos Dominique, Silvia, Roberto, Daniela, César, Viviana, Vini, Saleta, Pedro, Alex, Alice, Geraldo, Gabriel, Yvan, Edwiges y familia y Toni por tenerem hecho de seis meses una experiencia tan grande.

A minha querida amiga Maria Rita Zoega e seus filhos Pedro e Júlia, por me terem acolhido com amor como se fossem minha família na Espanha.

As queridas companheiras Suzana Nixdorf e Claudete Name, por tanta dignidade profissional que traz tanta qualidade pessoal e técnica ao trabalho de todos.

Ao Adriano Franciosi por tanto, tanto. Pelas tentativas nos experimentos, pelo engajamento no trabalho e principalmente pela amizade.

A amiga Irene Popper, por estar comigo sempre e ainda.

A minha mãe Alice pelo apoio e compreensão de mais essa fase.

A minha avó Paulina, por tantas memórias, por ter me ajudado em meus primeiros passos, por ter estado sempre ao meu lado e pelas lembranças boas que levarei para sempre.

Ao Jota, pelo muito que me proporcionou, pelo apoio integral e incondicional, por tantas coisas não ditas, porém sentidas. E por estar sempre presente. Nós dois sabemos o quanto esta conquista representa e que ela é fruto de uma unidade familiar que acredita no trabalho de cada um.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Ensaio farmacocinéticos de produtos naturais enfocando a absorção de compostos	7
2.2. Visão geral sobre estudos não envolvendo animais	14
2.2.1. Aspectos sobre a previsão parâmetros de absorção	15
2.2.2. Aspectos sobre a previsão de parâmetros de absorção de produtos utilizando as relações (quantitativas) estrutura retenção-atividade ((Q)RAR)	17
2.2.3. Aspectos sobre a previsão parâmetros de ADME para produtos naturais utilizando métodos alternativos	25
2.3. Aspectos relacionados ao desenvolvimento de extrato seco padronizado	28
2.3.1. Informações botânicas da espécie	28
2.3.2. Perfil fitoquímico e de atividades biológica-farmacológicas de compostos presentes na espécie	29
2.3.3. Aspectos sobre a toxicidade de compostos presentes na espécie	36
2.3.4. Desenvolvimento de extratos vegetais padronizados	
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Caracterização do material vegetal	51
4.1.1. Coleta e identificação botânica	51
4.1.2. Determinação da perda por dessecação	51
4.1.3. Determinação do teor de cinzas totais	51
4.1.4. Determinação do teor de substâncias extraíveis em álcool	51
4.1.5. Determinação da granulometria da droga vegetal cominuída	52
4.1.6. Determinação da densidade aparente da droga vegetal cominuída	52
4.1.7. Isolamento da vicenina-2 a partir das folhas de <i>Lychnophora ericoides</i>	53

4.2. Caracterização da interação da vicenina-2 e flavonóides estruturalmente relacionados, com proteínas plasmáticas utilizando a eletroforese capilar	54
4.2.1. Preparo de amostras para o estudo de interação entre flavonóides e Albumina Sérica Humana (HSA) por Eletroforese Capilar Frontal (CE-FA)	54
4.2.2. Condições do equipamento de eletroforese capilar (CE)	55
4.2.3. Preparo de amostras para o estudo de interação entre os flavonóides com α_1 -glicoproteína ácida (AGP) e albumina (HSA) por CE-FA	55
4.2.4. Preparo das amostras para o estudo de interação entre os flavonóides e as proteínas plasmáticas totais por ultrafiltração e CE	55
4.2.5. Análise dos dados	56
4.3. Estimativa de perfil de permeabilidade do flavonóide vicenina-2 e flavonóides correspondentes por Cromatografia Capilar Micelar de Biopartição (BMC)	57
4.3.1. Preparo de amostras para análise em BMC	57
4.3.2. Condições e equipamento para análise cromatográfica por BMC	57
4.3.3. Obtenção de dados em cromatografia com coluna capilar para comparação de modelo	58
4.3.4. Obtenção dos fatores de retenção dos compostos por Cromatografia Micelar de Biopartição (BMC).	59
4.3.5. Análise dos dados cromatográficos.	60
4.4. Análise da taxa de permeação intestinal da vicenina-2 em ratos	60
4.4.1. Preparo dos animais	60
4.4.2. Preparo das soluções usadas na perfusão intestinal	60
4.4.3. Técnica de permeação intestinal in vivo	61
4.4.4. Análise das amostras de perfusão	61
4.4.5. Cálculos das concentrações de vicenina-2 remanecente no lúmen intestinal	62
4.5. Desenvolvimento e caracterização de extrato padronizado de folhas de <i>Lychnophora ericoides</i>	63
4.5.1. Preparo e caracterização das soluções extrativas	63
4.5.2. Secagem da solução extrativa líquida otimizada e sua caracterização	68
4.5.3. Ensaio de atividade genotóxica dos extratos líquidos (Teste do cometa)	71
4.5.4. Avaliação da atividade do extrato de <i>L. ericoides</i> sobre o Óxido Nítrico	74
4.5.5. Análise de toxicidade aguda dos extratos secos padronizados	75
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1. Caracterização do material vegetal	79
5.1.1. Determinação da perda por dessecação	79
5.1.2. Determinação do teor de cinzas totais	79
5.1.3. Determinação do teor de substâncias extraíveis em álcool	80
5.1.4. Determinação da granulometria da droga vegetal cominuída	80
5.1.5. Determinação da densidade relativa da droga vegetal cominuída	81

5.2. Caracterização da interação da vicenina-2 e flavonóides relacionados com proteínas plasmáticas por eletroforese capilar	82
5.2.1. Interação dos flavonóides com HSA	84
5.2.2. Interação dos flavonóides com AGP	87
5.2.3. Interação dos flavonóides com as proteínas plasmáticas totais	89
5.3. Estimativa de perfil de permeabilidade do flavonóide vicenina-2 e flavonóides correspondentes por Cromatografia Capilar Micelar de Biopartição (BMC)	91
5.3.1. Comparação entre coluna analítica e coluna capilar em BMC	91
5.3.2. Comportamento cromatográfico de flavonóides em BMC usando colunas capilares	94
5.3.3. Estimativa do perfil de permeabilidade dos flavonóides	98
5.4. Análise da taxa de permeação intestinal da vicenina-2 em ratos	102
5.5. Desenvolvimento e caracterização de extrato padronizado de folhas de <i>Lychnophora ericoides</i>	104
5.5.1. Preparo e caracterização das soluções extrativas	104
5.5.2. Doseamento do teor de vicenina-2 nas soluções extrativas preparadas de acordo com o delineamento fatorial e avaliação da eficiência de extração	110
5.5.3. Avaliação da presença de lactonas sesquiterpênicas no material vegetal e no extrato líquido padronizado	116
5.6. Avaliação aspecto morfológico dos extratos secos por nebulização (ESN) por Microscopia Eletrônica de Varredura e da granulometria dos extratos secos	118
5.7. Avaliação do teor de umidade residual e atividade de água nos extratos secos por nebulização (ESN)	120
5.8. Avaliação da sensibilidade dos ESN a umidade do ambiente (isotermas de sorção)	123
5.9. Determinação do rendimento do processo de secagem para os ESN contendo adjuvantes	124
5.10. Avaliação biológica dos extratos de <i>L. ericoides</i>	124
5.10.1. Ensaio de atividade genotóxica dos extratos (Teste do cometa)	124
5.10.2. Avaliação da atividade do extrato de <i>L. ericoides</i> sobre o Óxido Nítrico	127
5.11. Toxicidade aguda do extrato seco padronizado	129
6. CONCLUSÕES	131
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
8. ANEXO	151

RESUMO

DINIZ, ANDRÉA. **Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com alto teor deste flavonóide.** 2007. 160 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

As informações sobre a absorção de flavonóides ainda são muito controversas e na sua grande maioria os estudos foram realizados com O-heterosídeos, flavonóides bastante instáveis. Para o estudo de previsão de absorção de flavonóide foi utilizado a vicenina-2, que é um flavonóide C-heterosídeo, com atividade anti-inflamatório. A relação entre retenção-atividade (QRAR) usando a cromatografia micelar de biopartição (BMC) foi a técnica empregada para atingir tal objetivo.

Palavras-chave: vicenina-2; farmacocinética, BMC, absorção, *Lychnophora ericoides*, delineamento fatorial.

ABSTRACT

DINIZ, ANDRÉA. **Evaluation of the absorption profile of vicenina-2 and development of standardized dry extract of *Lychnophora ericoides* with high chemical content of this flavonoid.** 2007. 160 p. Thesis (Doctorate Degree). Pharmaceutical Science College of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Information on flavonoid absorption is still too controversial. Studies have been mostly carried out with O-heterosides, very unstable flavonoids. As for the study of flavonoid absorption forecast, vicenine-2 was used, which is a C-heteroside flavonoid with anti-inflammatory activity. The quantitative relationship retention-activity (QRAR) using biopartition micellar chromatography (BMC) was the technique used to achieve this purpose.

Key words: vicenin-2; pharmacokinetics; BMC; absorption; *Lychnophora ericoides*; factorial design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de cultura de células Caco-2 sobre membrana filtrante.

Figura 2.- Interações hidrofóbicas ($\rightarrow$) e eletrostáticas ($\rightleftharpoons$) soluto-micela e soluto-fase estacionária com um surfactante catiônico para solutos neutros, aniônicos e catiônicos.

Figura 3. Representação esquemática do secador por atomização (*Spray dryer*).

Figura 4. Perfil granulométrico do pó de *Lychnophora ericoides*.

Figura 5. Eletroesferogramas da flavona (-); da mescla + HSA na concentração de 20 μ M (-) e da mescla flavona + HSA na concentração de 150 μ M (-).

Figura 6. Curvas do perfil de ligação dos polifenóis (dados em concentração de droga livre ($[D_{\text{livre}}]$) e concentrações crescentes de albumina ($[HAS]$) em molaridade (M)). (A) apigenina; (B) (+)-catequina; (C) flavanona; (D) flavona; (E) quercetina; (F) rutina; (G) vicenina-2 e (H) vitexina.

Figura 7. Relação entre os dados de retenção obtidos com colunas capilar e padrão (A). Valores preditos versus experimentais de dados de retenção (ajustado e validação cruzada), obtido com a equação 13 (B).

Figura 8. Cromatogramas em BMC com fase móvel de Brij35 0,04M, pH 7,4 das flavonas [A] 5-hidroxiavona, (1), 7-hidroxiavona, (2) apigenina, (3) flavona, (4) vicenina-2 (5) e vitexina (6); flavanona e flavanas [B] quercetina (7), rutina (8), flavanona (9), (+)-catequina (10) e (-)-epicatequina (11); ácidos fenólicos e outros fenólicos [C] ácido clorogênico (12), ácido p-hidroxicinâmico (13), ácido p-hidroxibenzoico (14) e florogucinol (15).

Figura 9. Comportamento de retenção dos compostos polifenólicos em função do pH das fases móveis. (A): apigenina ($\triangle$), catequina ($*$), epicatequina ($\diamond$), flavanona ($\blacksquare$), flavona ($\blacktriangle$), 5-hidroxiavona ($\circ$), floroglucinol ($\bullet$) e quercetina ($+$). (B) ácido clorogênico ($\blacktriangledown$), ácido 4-hidroxibenzóico ($\star$), ácido p-hidroxicinâmico ($\odot$), vicenina-2 ($\square$), vitexina ($\times$) e rutina (∇). Fase móvel: Brij35 0,04M. Fase estacionária: coluna capilar Kromasil C_{18} .

Figura 10. Perfil das concentrações de vicenina-2 no lúmen intestinal ao longo do experimento de perfusão intestinal.

Figura 11. Curva de calibração da vicenina-2 na solução extrativa. Os pontos experimentais da solução extrativa nas diluições de 0,5%, 1%, 5%, 10% e 25% (n=5).

Figura 12. Curva de calibração da vicenina-2 na solução extrativa. Os pontos experimentais da solução extrativa nas diluições de 0,5%, 1%, 5%, 10% e 25% (n=5).

Figura 13. Curvas de nível e superfície de resposta do teor de vicenina-2 ($\mu\text{g/ml}$) nas soluções extrativas, sendo as variáveis plotadas: teor alcoólico e proporção droga solvente.

Figura 14. Perfil cromatográfico dos extratos EET 20 (A) e EET 80 (B), onde as setas indicam o pico da vicenina-2 obtidos utilizando sistema de gradiente com metanol e água, leitura em $\lambda=330\text{ nm}$.

Figura 15. Espectros de infravermelho do extrato etanólico da droga vegetal produzido com etanol 80° GL (A) e do extrato seco padronizado (lote 1) (B).

Figura 16. Microfotografia dos pós obtidos por nebulização, sendo que em A está o Aerosil nebulizado (ESNbranco) visto em aumento de 2500 vezes, pelo modo de espalhamento de elétrons; e em B o ESN1, visto em aumento de 3000 vezes, pelo modo do retroespalhamento de elétrons

Figura 17. Gráfico de distribuição granulométrica do ESN1 e ESN2.

Figura 18. Isotermas de sorção dos produtos secos por nebulização (ESN1 – com 50% de Aerosil; ESN2 – com 33% de Aerosil) e do Aerosil nebulizado. As umidades relativas são A: 32%; B: 62% e C: 92%.

Figura 19. Níveis de dano ao DNA visualizado após eletroforese no teste do cometa. Classe 0 – núcleos não danificados, não apresentando cauda; Classe 1 – núcleos com cauda menor que o diâmetro do núcleo; Classe 2 – núcleos com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do núcleo; Classe 3 – núcleos com cauda possuindo 2 x ou mais o tamanho do núcleo

Figura 20. Efeito do extrato etanólico (EET) 20 GL de folhas de *Lychonophora ericoides* (arnica-da-serra), contendo alto teor de vicenina-2, sobre a produção de nitrito por macrófagos. Os macrófagos foram incubados com LPS (100 ng/mL), na presença ou ausência de EET 20 GL (controle), por 24 horas. A concentração de nitrito ($\mu\text{M}/10^5$ células, média + desvio padrão de três orifícios de uma placa de cultivo celular de 96 orifícios, obtidos de dois experimentos independentes) produzida por macrófagos controles foi de $27.6 \pm 4,2$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos QRAR para a estimativa de transporte de xenobióticos, através de diferentes barreiras biological, obtidos usando a retenção em BMC e colunas analíticas padrão ^a

Tabela 2. Compostos e estruturas encontrados em *Lychnophora ericoides*.

Tabela 3. Matriz experimental obtida pelo delineamento fatorial 2^3 para obtenção dos extratos, sendo (+) os níveis superiores, (-) os níveis inferiores e (0) o valor no ponto central.

Tabela 4 Delineamento fatorial 2^3 para o estudo das soluções extrativas.

Tabela 5. Teor de adjuvante adicionado às soluções extrativas desalcoholizada de *L. ericoides*.

Tabela 6. Tratamento das células para o teste do cometa.

Tabela 7. Composição das soluções de lise utilizada no Teste do Cometa.

Tabela 8. Estrutura dos flavonóides e suas características hidrofóbicas ($\log P$)*, estimativas de taxas de ligação à proteínas: HSA (PB_{HSA}), HSA+AGP ($PB_{HSA+AGP}$) e proteínas plasmáticas totais (PB_{plasma}) ($\bar{x} \pm s_d$) (n=2). *Dados obtidos do Kowwin, version 1.67. © 2000 US Enviromental Protection Agency.

Tabela 9. Valores das constantes de afinidade estimadas (K_1) e número de sítios (n) de união dos flavonóides a HSA (valores médios correspondentes a dois experimentos independentes $\bar{x} \pm s_d$)

Tabela 10. Flavonóides com suas estruturas e dados físico-químico: peso molecular* (MW); $\log P$ *; ponto de fusão* (MP), solubilidade em água* (Sol) e pK.

Tabela 11. Fatores de retenção dos flavonóides em BMC isando coluna capilar e 0.04M Brij35 como fase móvel em pHs 7,4; 6,5 e 5,5 (k_{BMC}), percentuais de absorção oral preditas (A), coeficientes de distribuição na barreira hematoencefálica ($\log BB$) e coeficientes de permeabilidade cutânea (K_p).

Tabela 12. Parâmetros farmacocinéticos de absorção da vicenina-2 obtidos pelo modelo *in vivo* de perfusão intestinal.

Tabela 13. Teor médio de resíduo seco obtido para as soluções extrativas analisadas (n=3).

Tabela 14. Resultados dos teores de vicenina-2 doseados em extratos produzidos em três dias diferentes e seus respectivos coeficientes de variação (n=3).

Tabela 15. Coeficientes de variação obtidos para as concentrações testadas (n=5).

Tabela 16. Coeficientes de variação da vicenina-2 nas soluções extrativas, nas diluições testadas (n=5).

Tabela 17. Média das concentrações de vicenina-2 nas soluções extrativas, nas diluições testadas (n=5).

Tabela 18. Médias das áreas dos picos e as concentrações de vicenina-2 das soluções extrativas analisadas em três diferentes dias para análise da repetitividade.

Tabela 19. Resultado da recuperação de vicenina-2 em solução extrativa alcoólica realizada com três diferentes concentrações de adição (n=3).

Tabela 20. Teor de vicenina-2 nas soluções extrativas brutas (n=3).

Tabela 21. Teor de vicenina-2 por grama de droga vegetal (n=3).

Tabela 22. Análise estatística para a concentração de vicenina-2.

Tabela 23. Teor de vicenina-2 nas soluções extrativas brutas complementares (n=3).

Tabela 24. Teor de vicenina-2 por grama de *Lychnophora ericoides* referentes as soluções extrativas complementares (n=3).

Tabela 25. Valores médios das análises de teor de umidade residual e da atividade e água (n=3).

Tabela 26. Influencia do valor da atividade de água (a_w) em medicamentos sobre o crescimento bacteriano presente (Adaptado de LIST & SCHIMIDT, 1989).

Tabela 27. Análises estatísticas de comparação de médias entre os ESN pelo Teste t-Student.

Tabela 28. Resultados obtidos no Teste do Cometa com as soluções extrativas de *L. ericoides* preparadas com etanol 20 °GL (EET 20) e 80 °GL (EET80).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3,5-DCQ - ácido 3,5 dicafeoilquínico

4,5-DCQ - ácido 4,5 dicafeoilquínico

A% - Percentual absorvido/permeado

A₀ – Concentração no tempo 0

ADMET – etapas farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e a toxicidade.

AGP – glicoproteína ácida alfa-1

BMC – cromatografia micelar de biopartição

Caco-2 – células carcinogênicas de intestino humano, chamada Caco-2

CE-FA – eletroforese capilar frontal

DL₅₀ – dose letal 50

DNCB - dinitroclorobenzeno

EET 20 – extrato de folhas de *Lychnophora ericoides* preparado com etanol 20° GL

EET 80 - extrato de folhas de *Lychnophora ericoides* preparado com etanol 80° GL

ESN branco – extrato seco nebulizado branco, preparado somente com Aerosil®

ESN1 - extrato seco nebulizado de *Lychnophora ericoides*, lote 1

ESN2 - extrato seco nebulizado de *Lychnophora ericoides*, lote 2

HSA – albumina plasmática humana

IAM – cromatografia usando coluna de membrana artificial imobilizada

k_a – constante de absorção

k_{BMC} – constante de retenção obtida em cromatografia micelar de biopartição

K_p - coeficiente de permeabilidade

LSER – relação linear de energia de solvatação

MeOH - metanol

MLC – cromatografia líquida micelar

MLR – regressão linear múltipla

PB_{HSA} – taxa de união a albumina humana

$PB_{HSA+AGP}$ - taxa de união a glicoproteína ácida alfa-1

$PB_{\text{plasma total}}$ - taxa de união as proteínas do plasma total

PCR – regressão de componentes principais

PGE – prostaglandina

PLS - quadrados mínimos parciais

PSN – produto seco nebulizado

QRAR - relação quantitativa retenção-atividade

QSAR - relação quantitativa estrutura-atividade

RMSEC - erro quadrado médio de calibração

RMSECV - erro de predição baseado na randomização Venetiana cega de validação cruzada

$t_{1/2}$ – tempo de meia-vida de absorção

TNF- α – fator de necrose tumoral

1. INTRODUÇÃO

"O mercado de fitoterápicos movimenta sozinho no Brasil, cerca de US\$ 400 milhões ao ano, conforme dados do Programa de Estudos do Futuro - Profuturo, da Fundação Instituto de Administração da Universidade de São Paulo (FIA), de 2002." Folha de Londrina,

06/10/2003.

O texto acima explica os motivos pelos quais o interesse do setor farmacêutico de fitoterápicos brasileiros vêm crescendo de forma vertiginosa. Os chamados países desenvolvidos já exploram esse mercado há muito tempo. Dados descritos por Eisemberg *et al.* (1998) mostram que o uso de plantas medicinais nos Estados Unidos da América cresceu 380% entre 1990 e 1997. Em valores monetários, esses números podem ser melhor compreendidos quando se compara a movimentação nos EUA no ano de 1996, que foi de US\$ 3,2 bilhões, atingindo US\$ 5 bilhões em 1999, como discutiu Calixto (2000).

A ampliação deste mercado deverá ser regulado pela oferta da droga (extrativismo sustentado ou agroindustrial) e pelos parâmetros técnicos de produção e controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos, pautando-se sempre nos conceitos-chave da preservação da espécie e da garantia da saúde, como exige a Política Nacional de Medicamentos (BRASIL, 1998). Essa portaria diz que: "Todo medicamento comercializado no país deve ter garantida sua segurança, eficácia e qualidade".

Para alcançar tais exigências, os conhecimentos sobre os compostos ativos (marcadores) de um determinado produto devem ser explorados quanto

a sua toxicidade e perfil farmacocinético para que se defina dose e posologia de um produto, além, claro das garantias farmacotécnicas de produção.

Seguindo os propósitos da Política Nacional de Medicamentos, em maio de 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou a Resolução nº 48 que além de atualizar normas e diretrizes para registros de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2000), trouxe a definição de "Medicamento fitoterápico" como sendo "Medicamento farmacêutico obtido por processos tecnologicamente adequados, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins diagnósticos. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela *reprodutibilidade e constância de sua qualidade*. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais".

Nesta direção, o presente trabalho visou avaliar a permeabilidade *in vitro* e *in vivo* da substância 6,8-di-C- β -D-glucosilapigenina, conhecida como vicienina-2 e, a partir daí propor um insumo fitoterápico com máxima extração deste flavonóide anti-inflamatório, seguindo as diretrizes de qualidade e reprodutibilidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ensaios farmacocinéticos de produtos naturais enfocando a absorção de compostos.

Os ensaios sobre os efeitos farmacológicos de uma planta ou seu extrato são temas recorrentes na literatura científica, mas as avaliações farmacocinéticas de produtos de origem vegetal vêm sendo melhor estudadas apenas nas últimas décadas, devido, principalmente, ao aprimoramento dos recursos.

A área dos alimentos funcionais e produtos nutracêuticos têm dado grandes contribuições nas pesquisas farmacocinéticas de compostos de origem vegetal. Dessas pesquisas pôde-se obter importantes informações sobre ADME (abreviatura das etapas farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo e excreção) de algumas classes de compostos polifenólicos.

Os compostos polifenólicos podem ser divididos em muitas classes, entre eles estão os flavonóides, taninos e antraquinonas. Os flavonóides, estruturalmente podem apresentar inúmeras variações no anel flavonoídico, sendo assim, essas variações são utilizadas para classificar os flavonóides em antocianidinas, flavonas, flavanas (também chamadas de catequinas), flavanonas, flavananas, flavonóis, chalconas e isoflavonas entre outras (SIMÕES *et al.*, 1999).

Uma série de estudos envolvendo compostos polifenólicos demonstraram que eles são pouco absorvidos. No trabalho realizado por Barnes *et al.* (2003) os autores apresentam dados que sugerem que a absorção dessa classe de compostos ocorra com o envolvimento de transportadores, ou seja, ocorra por absorção ativa. Entre os transportadores envolvidos estão os transportadores de glicose (GLUTs e SGLTs). Além deste mecanismo, os pesquisadores também relatam a evidência da hidrólise de glicosídeos polifenólicos no intestino delgado, possivelmente catalizada pela enzima lactose florizina hidrolase (LPH), presente na porção apical dos enterócitos (células intestinais). Esta reação indica uma metabolização pré-sistêmica dos polifenólicos e sendo assim, além da absorção ativa dos compostos, mecanismos múltiplos podem estar envolvidos na disponibilidade dos tais compostos.

A classe das antocianinas possui muitos estudos sobre o seu perfil de absorção. Já se sabe que essa classe pode ser absorvida sem hidrólise prévia, isto é, na sua forma glicosídea (PRIOR, 2003). Ensaios *in vitro* sugerem a informação de

que esses compostos podem servir de ligantes para outro tipo de carreador: a enzima bilitranslocase (um carreador de ânions orgânicos presentes nas células epiteliais da mucosa gástrica). Esse fato sugere que essa enzima seja determinante na absorção destes compostos, entretanto o mecanismo exato de absorção das antocianidinas ainda não está totalmente esclarecido (PASSAMONTI *et al.*, 2002).

Quanto a metabolização pré-sistêmica das antocianidinas, dados demonstraram que mais de 50% da ingesta desses compostos foi degradada ou desaparece no lúmen intestinal em poucas horas após a ingestão, sugerindo assim a ocorrência de metabolismo intestinal desses compostos, mas esse processo tampouco está esclarecido (PRIOR, 2003).

Outra classe de fitocompostos que já possui informações sobre a etapa de absorção são as catequinas do chá-verde (*Camélia sinensis*). As catequinas mais amplamente estudadas são: (-)-epicatequina (EC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG), (-)-epigallocatequina (EGC) e (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG).

Alguns estudos sobre a biodisponibilidade dessas catequinas permitiram concluir que a biodisponibilidade sistêmica de catequinas inalteradas, após administração oral, parece ser pequena. Esse fato pôde ser atribuído a formação de metabólitos conjugados durante o metabolismo de primeira-passagem pré-sistêmico da catequina. Esses dados sugerem que o metabolismo seja um importante fator da baixa biodisponibilidade das catequinas (CAI; SHERRY CHOW, 2003), assim como se viu para as antocianidinas anteriormente.

Para a confirmação dessa informação foi desenvolvido um estudo utilizando modelo de perfusão de intestino delgado isolado de rato. Nele, a epicatequina (EC) foi perfundida por 90 minutos no intestino isolado de rato e depois verificou-se que somente 56% de EC inalterada e conjugada foram detectadas no lado serosal do íleo (lado de fora do lúmen) e que desses, só 60% estavam na forma inalterada. Esse trabalho também confirmou que o íleo é a porção intestinal mais importante que o jejuno na absorção de EC (CAI; SHERRY CHOW, 2003).

Sem sombra de dúvidas, entre os compostos polifenólicos, a classe dos flavonóides é a que possui mais estudos sobre suas etapas farmacocinéticas (ADME) e, entre os flavonóides, a quercetina o composto mais estudados. Esse interesse pelo flavonóide quercetina possivelmente ocorra em função de sua ampla distribuição em plantas medicinais e alimentos, e também por sua fácil obtenção.

Assim como para outras substâncias, a extensão da absorção da quercetina e sua biodisponibilidade sistêmica dependem vários fatores: estabilidade química do composto a partir do momento de sua administração até o local da absorção; taxa de degradação por pH e microorganismos intestinais; mecanismo do processo de absorção; taxa de ligação a proteínas plasmáticas e finalmente, da extensão do efeito de primeira passagem (MESKIN *et al.*, 2004). Por algum tempo, a quercetina foi considerada um composto com taxa de absorção pouco significativa. Possivelmente essa afirmativa foi feita em função das informações que eram possíveis de serem obtidas pelos métodos analíticos daquela época. Esses métodos não permitiam a verificação da presença de metabólitos da quercetina, e por isso acreditou-se, até então, que somente a estrutura aglicona da quercetina era passível de sofrer absorção através da parede intestinal. Portanto, o flavonóide heterosídeo com glicose ou ramnose, por exemplo, teria primeiramente, que sofrer uma hidrólise da cadeia de açúcar para estar na forma aglicona, sua forma absorvível (GEE *et al.*, 1998).

Novas pesquisas demonstraram que as quercetinas mono e di-glicosilada (isoladas da cebola) foram capazes de entrar no enterócito, via transportador da glicose, e somente serem hidrolisadas dentro do enterócito, imediatamente antes de penetrar na veia porta (GEE *et al.*, 2000).

Outro ponto a ser ressaltado sobre a temática da absorção de flavonóides é a possível variação na sua biodisponibilidade, quando este é administrado a partir de produtos diferentes (em forma de extrato ou como substância isolada). Num estudo realizado por Graefe *et al.* (2001) os pesquisadores administraram extrato seco de "Buck-wheat" (extrato contendo quercetina, comercializado na Alemanha com nome de Rutinion[®]) e a quercetina-3-O-rutinosídeo isolada. Verificaram então que a concentração da quercetina sérica (quantificada como quercetina conjugada com ácido glicurônico) foi maior após a administração de extrato, do que após a administração da substância isolada. Essa evidência fica mais clara ao se comparar os valores das áreas sob as curvas (ASC) de quercetina a partir do extrato administrado e na forma isolada, sendo $ASC_{0 \rightarrow 24h} = 3,8 \pm 3,9 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ e $2,5 \pm 2,2 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectivamente (GRAEFE *et al.*, 2001).

Os mesmos autores (GRAEFE *et al.*, 2001) puderam observar que, embora os flavonóides tenham sido administrados na forma de diferentes tipos de heterosídeos, somente a quercetina aglicona conjugada com ácido glicurônico pôde ser identificada e quantificada, não variando com o tipo de heterosídeo administrado. Cabe aqui o adendo de que essa glicuronização possivelmente ocorra durante o metabolismo de primeira-passagem intestinal e/ou hepática.

A ausência dessas “diferentes quercetinas” conjugadas permitiu aos autores levantar a hipótese de que ocorra a hidrólise pré-sistêmica, como visto anteriormente nesse compilado, e então, somente a quercetina aglicona fosse absorvida, para posteriormente ser conjugada com o ácido glicurônico (GRAEFE *et al.*, 2001).

Essa tese foi abalada por um trabalho realizado por Bilber (2003) que avaliou o perfil farmacocinético de extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (Egb 761[®]). Quanto a fração de flavonóides glicosídeos e de lactonas diterpênicas. Os compostos foram administrados nas faixas de concentração de 22 a 27% para os flavonóides e de 5 a 7% para as lactonas. Os resultados desse estudo, que usou compostos radioativamente marcados, mostraram que os componentes do extrato foram absorvidos em ratos com taxa de 60%, e os flavonóides apresentaram farmacocinética linear. Os dados demonstraram também que as compostos glicosilados foram mais biodisponíveis que as agliconas, porém também mais rapidamente metabolizados a ácidos hidroxibenzóicos, encontrados na urina (BILBER, 2003). Essa informação contradiz a dada por Graefe *et al.* (2001), indicando a possibilidade absorção de flavonóides glicosilados.

Ainda no trabalho realizado por Bilber (2003), a avaliação dos comportamentos das flavonóides e lactonas do extrato foi também realizada em humanos e indicou comportamento linear para ambas as classes. A biodisponibilidade das lactonas ficou em torno de 80%, com pequenas variações para cada lactona testada (BILBER 2003). Alguns desses resultados corroboram os divulgados por Graefe *et al.* (2001).

A ocorrência de hidrólise pré-sistêmica de compostos glicosilados pode ser atribuída a microbiota intestinal e a sensibilidade dos compostos aos diferentes pHs do estômago e intestino (WILLIAMSON, 2004), assim como a enzima lactose florizina hidrolase (LPH), visto anteriormente. Essas comprovações associadas a

difficuldade de comprovações de estruturas glicosiladas no plasma conduziram a idéia de que a desglicosilação é uma premissa para a absorção dos flavonóides (CRESPY *et al.*, 2002; DAY *et al.*, 2000; WALLE *et al.*, 2000; HEILMANN & MERFORT, 1998^a; HEILMANN & MERFORT, 1998^b), bem como para reações metabólicas como a glucorunização (WILLIAMSON, 2004; CRESPY *et al.*, 2002; DAY *et al.*, 2000; WALLE *et al.*, 2000).

Mais recentemente, com o aprimoramento das técnicas analíticas, tal posicionamento foi revisto. Os resultados de outros trabalhos demonstraram a ocorrência da absorção de flavonóides glicosilados pode sim ocorrer e que ela seria realizada por transportadores de açúcares (WILLIAMSON, 2004; WALLE & WALLE, 2003; GEE *et al.*, 2000).

Um estudo recente sobre o envolvimento de transportadores na absorção dos flavonóides floridizina (heterosidereo) e floretina (aglicona) avaliou a permeação destes compostos por células Caco-2. Este trabalho concluiu que o transportador SGLT1, responsável pelo transporte de estruturas glicosiladas e as proteínas associadas a resistência multidrogas (MRP1 e MRP2), responsável pelo efluxo de fármacos, estão envolvidas no processo de transporte destes compostos (WALLE & WALLE, 2003). Essas proteínas associadas a resistência multidrogas poderiam explicar a baixa biodisponibilidade de compostos.

Como pôde ser visto até agora, a discussão sobre o mecanismo de absorção e biodisponibilidade de flavonóides ainda está longe de ser conclusiva (BIRT, 2004). Ao mesmo tempo em que se reforçam hipóteses sobre a possibilidade de absorção de heterosídeos, há também resultados consistentes sobre a ocorrência da metabolização pré-sistêmica dos flavonóides, conforme revisão bibliográfica publicada por Heilmann & Merfort (1998^a). Nesta revisão foram apresentadas evidências da existência de um “pré-requisito estrutural” para a metabolização microbiana pré-sistêmica de flavonóis: o padrão de substituição de hidroxilas no esqueleto flavonoídico. As hidroxilas em C-3, C-5 e C-7 devem estar preservadas ou substituídas por grupos hidrolisáveis para que possa ocorrer a metabolização pré-sistêmica, sendo que outros padrões de substituição “protegeriam” a molécula da metabolização microbiana.

Além da proposta da existência de um padrão estrutural para a ocorrência do metabolismo pré-sistêmico, Breinholt *et al.* (2002) propôs uma rota universal na

biotransformação dos flavonóides, independentemente das classes de flavonóide ou do local de metabolização. Para isso os autores estudam o comportamento *in vitro* de isoenzimas hepáticas humanas e de camundongos (citocromo P450) sobre flavonóides e constataram que o primeiro sítio de biotransformação do flavonóide são as posições 3'- e 4'- do anel B, resultando no produto final 3', 4'-dihidroxilado no anel B. Esses metabólitos formados na biotransformação são geralmente menos ativos que os compostos originais, porém essa regra pode ter exceções. Isso pode ocorrer quando os metabólitos dos flavonóides possuírem um potencial antioxidante maior que o produto original. Esse fato é devido a hidroxilação 3'- e 4'- do anel B dos metabólitos, que gera uma estrutura mais favorável para a deslocalização eletrônica e portanto mais ativos no que se refere ao potencial antioxidante (BREINHOLT *et al.*, 2002).

No reforço das evidências da metabolização pré-sistêmica, além da produção de frações aglicona de flavonóide por hidrólise enzimática, já foi sugerida a hipótese de que o flavonóide poderia também sofrer uma cisão no anel flavonoídico antes da absorção e portanto, seriam absorvidos como ácidos. Sendo assim, não somente a aglicona seria absorvida, mas também seus respectivos fragmentos fenólicos (CHANG *et al*, 2005). Esses dados corroboram a antiga discussão feita por DeEds (1968) (*apud* HEILMANN & MERFORT, 1998^a) onde já havia sido verificada a presença de ácidos fenolcarbônicos biodisponíveis, após a administração oral do flavonóide agliconas quercetina e seu heterosídeo rutina, em ratos. Essas reações ocorreriam em função da alta capacidade metabólica da microbiota intestinal sobre o próprio esqueleto flavonoídico (HEILMANN & MERFORT, 1998^a).

Todas as discussões até agora descritas envolvem flavonóides agliconas ou heterosídeos O-glicosilados, com frágeis ligações glicosídica, portanto justificaria os dados de ausência ou baixa absorção de flavonóides heterosídeos – por degradação, como já visto. Estudos de absorção e biodisponibilidade de flavonóides C-heterosídeos, com ligações mais estáveis, estão pouco disponíveis na literatura.

DeEds, F. Flavonoid metabolism. Comprehensive biochemistry. V. 20, Florkin, M.; Stotz, E.H.; Eds., Elsevier, Amsterdam, 127-171, 1968.

Dois trabalhos utilizando o C-heterosídeo chamado vitexina-2-O-ramnosídeo que possui uma união glicosídica C-C diretamente no anel flavonoídico e uma ramnose unida pelo átomo de O a esse açúcar (VOR), foram encontrados. Em um deles os pesquisadores administraram doses crescentes do composto a animais e verificaram que o VOR apresentava um perfil farmacocinético de primeira-ordem (YING *et al.*, 2007a). Em outro trabalho, o mesmo grupo de pesquisadores estudou o perfil farmacocinético do VOR após a administração oral do produto em animais utilizando a cromatografia líquida de ultra-performance acoplado a espectrômetro de massa com ionização por eletrospray. Nesse trabalho os autores foram capazes de quantificar o VOR até 360 minutos após a administração, demonstrando a eficiência da metodologia analítica, bem como verificaram que o VOR, flavonóide C-heterosídeo foi absorvido, corroborando as informações anteriores sobre ocorrência da absorção de flavonóides heterosídeos (YING *et al.*, 2007b).

Toda essa discussão sobre perfis farmacocinéticos de flavonóides tem importância clínica, como afirmou Graefe *et al.* (1999), pois 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.

Os estudos apresentados demonstram a eficiência dos resultados obtidos em ensaios farmacocinéticos para produtos naturais, mas os trabalhos até então discutidos foram realizados, na sua maioria, *in vivo*, e existe uma forte tendência no desenvolvimento de ensaios *in vitro* para a avaliação da etapa de absorção de medicamentos. Isso se dá em função do avanço das discussões sobre os dilemas bioéticos, que gerou a necessidade de repensar e readequar a forma de uso de animais empregados nesses ensaios, buscando a diminuição do número de animais utilizados com o mínimo de sofrimento (GULBBELS-VAN-HAL *et al.*, 2005; WETERINGS & VAN ERP, 1987).

2.2. Visão geral sobre estudos não envolvendo animais

O desenvolvimento da química combinatória pelo Professor Árpád Furka, na Hungria, em 1982, iniciou uma nova era no que tange a eficácia e princípios na busca de novos candidatos a fármacos. Desde então a necessidade de triagem de grande número de compostos produzidos pelas técnicas da química combinatória, gerou então outra necessidade: a de rapidez e eficácia nos experimentos de atividade e também de perfis farmacocinéticos. Essa demanda trouxe-nos os conceitos e tecnologias do “*screening* de alta quantidade de itens”, termo traduzido do inglês *High Throughput Screening* (HTS) e que analisa de forma bastante rápida coleções químicas com grande número de substâncias (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2007). A identificação dos compostos com atividades biológicas alvo de um determinado estudo é somente o início de uma cascata de ensaios para que o produto venha ou não a se tornar um fármaco. Entre os ensaios pré-clínicos, que envolve animais, as medidas precoces do perfil de ADMET (sigla dos processos farmacocinéticos: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) minimizam falhas no processo de busca de novos fármacos (NEWTON; LOCKEY, 2003). Mas há que se enfatizar que a tentativa de substituição de técnicas envolvendo animais vêm sendo cada vez mais exigida no meio científico e acadêmico. Embora só recentemente essas exigências tenham se tornado mais evidentes, desde 1959, Russell e Burch introduziram o conceito de 3Rs/3ERRES: recolocar, reduzir e refinar as técnicas de experimentação com animais (FESTING *et al.*, 1998).

Nesta linha de trabalho, os ensaios utilizando animais na avaliação do perfil farmacológico e de ADMET com produtos naturais também têm sido substituídos por técnicas *in vitro* e até mesmo *in silico*.

Entre os métodos alternativos ao uso de animais já descritos estão (CORTI *et al.*, 2006; FLATEN *et al.*, 2006; ESCUDER,-GILABERT, 2005):

a) Métodos *in vitro* :

Uso de órgãos, linhagens de células (ex. Caco-2), membranas artificiais (PAMPA); vesículas de fosfolipídeos;

b) Organismos inferiores não protegidos:

Uso de bactérias, fungos, protozoários, algas, plantas e animais invertebrados;

c) Modelos de predição:

Relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR – do inglês, *Quantitative structure-activity relationship*);

Relações quantitativas retenção-atividade (QRAR – do inglês, *Quantitative retention-activity relationship*);

2.2.1. Aspectos sobre a previsão parâmetros de absorção de produtos utilizando modelos *in vitro*.

Entre as técnicas *in vitro* mais descritas para a avaliação de absorção/permeação intestinal está o uso de linhagens de células Caco-2 (células de adenocarcinoma humanos) e ensaios de permeação por membrana paralela artificial (PAMPA, sigla do inglês *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*).

Para os ensaios de Caco-2, as células intestinais humanas são cultivadas *in vitro*, e utilizadas como membrana que simula a barreira intestinal. Neste modelo avalia-se a capacidade de transporte e a direção em que ele ocorre, sentido apical-basal ou basal-apical (Figura 1). É possível também quantificar a passagem do produto em estudo, bem como avaliar a ocorrência de possível metabolismo de passagem (HIDALGO, 1996).

Figura 1. Representação esquemática de cultura de células Caco-2 sobre membrana filtrante (retirado de LE FERREC *et al.*, 2007).

O sucesso dessa técnica pode ser vista nos resultados de uma pesquisa que avaliou a relação entre a solubilidade do fármacos e sua capacidade de passagem através de células Caco-2. Os autores avaliaram o comportamento dos fármacos: naproxeno, fenitoína, propranolol, diltiazem, ácido salicílico, efedrina, cimetidina, clorotiazida e furosemida. Os resultados demonstraram que há uma grande relação entre a permeabilidade medida pelas células Caco-2, a solubilidade e a fração absorvida em humanos. Com isso evidenciou-se a eficiência deste modelo preditivo (PADE; STAVCHANSKY, 1998).

Os estudos com Caco-2 vêm sendo propostos desde a década de 90, quando Artursson (1990) propôs o uso do modelo, para estudo da difusão passiva de fármacos. Além da eficiência na previsão da difusão passiva, a técnica também foi capaz de prever a absorção humana de diversos produtos assim como avaliar o mecanismo de absorção (YEE, 1997).

Embora os estudos com Caco-2 sejam eficazes na previsão da taxa de absorção de compostos, a cultura de células é uma técnica delicada e de alto custo. Por isso, a substituição de ensaios com Caco-2 por ensaios utilizando PAMPA, membrana artificial comercialmente encontrada, têm tido muito êxito para prever a absorção de fármacos (BERMEJO *et al.*, 2004) quando o processo envolvido é a difusão passiva (CORTI *et al.*, 2006).

2.2.2. Aspectos sobre a previsão de parâmetros de absorção de produtos utilizando as relações (quantitativas) estrutura retenção-atividade (QRAR).

2.2.2.1. Os modelos de relações:

O objetivo dos modelos de predição utilizando relações (quantitativas) estrutura-retenção atividade (QSAR) (sigla do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationship*), é relacionar quantitativamente as atividades biológicas dos compostos com as propriedades físico-químicas e/ou descritores estruturais dos mesmos. A partir desses estudos outras aplicações dessa estrutura de estudo foram sendo desenvolvidas, como o é caso do QSRR (sigla do inglês, *Quantitative Structure-Reactivity Relationships*), cujo objetivo é prever características, propriedades moleculares. Também os estudos QRAR (do inglês *Quantitative Retention-Activity Relationship*) utiliza a mesma metodologia, mas para prever dados físico-químicos ($\log P$, p.ex.) utilizando dados de retenção cromatográfica (HÉBERGER, 2007). Além da previsão de parâmetros físico-químicos, a QRAR também tem sido usada como variável de predição de atividades biológicas, toxicidade e parâmetros farmacocinéticos de compostos (BERMÚDEZ-SALDAÑA *et al.*, 2007; ESCUDER-GILABERT, 2005).

Os modelos QSAR, QSRR e QRAR não são estruturas termodinâmicas formais das relações lineares da energia livre (LFER, *linear free energy relationship*). Isto significa que as propriedades verificadas são as resultantes das interações termodinâmicas moleculares individuais do sistema, as quais estão linearmente relacionadas com as diferenças nas propriedades físico-químicas dos compostos (ESCUDER-GILABERT, 2005; GROVER *et al.*, 2000). Considerando que, na maioria dos casos, o tipo de energia considerada nesses sistemas são as de solvatação, as relações são baseadas na LSER (do inglês, *linear solvation energy relationships*) (HÉBERGER, 2007) e, as variáveis moleculares, também chamados de *descritores*, relacionam-se com a energia de solvatação (LSER), como por exemplo: interações dipolo-dipolo, as forças de dispersão em função do tipo de elétron (n ou π), acidez e basicidade, entre outros (ESCUDER-GILABERT, 2005).

Os modelos QRAR utilizam esses descritores moleculares (baseados na LSER) e os relacionam com resultados cromatográficos. Considerando que tanto processos cromatográficos como biológicos são dinâmicos e que as propriedades hidrofóbicas, eletrônicas e estéricas de produtos são determinantes tanto da atividade biológica, quanto do grau de retenção cromatográfica, essa relação pode ser bastante coerente. Também porque ambos os processos não envolvem a ruptura ou a formação de novas ligações, exceptuando, claro, os processos metabólicos (KALISZAN, 1999).

A previsão de parâmetros de ADMET (absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade) para um candidato a fármaco por meio das relações retenção-atividade (QRAR) utiliza diversos descritores moleculares para a obtenção do modelo. Por *modelagem* pode-se compreender a busca de modelos matemáticos que correlacionem as atividades estudadas com seus descritores (THOMAS, 2003).

Esses descritores moleculares podem ser agrupados em 3 diferentes classes: hidrofóbicos, eletrônicos e estéricos (HANSCH C., 1990).

a) Parâmetros de hidrofobicidade: o parâmetro mais comumente utilizado são os valores de $\log P$ das moléculas em estudo. A obtenção clássica desse parâmetro é feita por medida de coeficiente de partição líquido-líquido entre *n*-octanol-água. Porém, outros métodos têm sido propostos, como alternativo ao clássico, na obtenção desses valores, como o método cromatográfico.

b) Parâmetros eletrônicos: a polarizabilidade foi um dos parâmetros introduzidos nos estudos QSAR, na caracterização da interação fármaco ou xenobiótico-receptor. Outros parâmetros como a carga atômica e a energia dos orbitais moleculares, assim como constantes de protonação ou de acidez para compostos ionizáveis e parâmetros relacionados ao caráter doador ou aceptor de pontes de hidrogênio das moléculas

c) Parâmetros estéricos: podem ser divididos em 5 categorias: descritores topológicos, geométricos, químicos, físicos e diferenciais

Os *descritores topológicos* se baseiam na estrutura molecular e, por uma série de cálculos matriciais, que derivam uma série de descritores estéricos (índices topológicos);

Os *descritores geométricos* compõem uma classe de parâmetros teóricos baseados no raio de van der Waals (r_w);

Já os *descritores químicos* se baseiam no efeito estérico que diferentes substituintes apresentam sobre uma reação padrão;

Os *descritores físicos* mais usados são: a refração molar (R_m), o volume molar (V_m), o “*parachor*” (Pr) e o peso molecular (M). Todos esses descritores são baseados nas propriedades físicas em relação ao tamanho molecular;

A última classe de descritores, os *diferencias*, provém da diferenciação da estrutura tridimensional de uma dada molécula com uma molécula básica.

Essa síntese de descritores, retiradas de Escuder-Gilabert (2005), ordenou os descritores que também são usados nos estudos QRAR, além dos QSAR (ESCUDER-GILABERT *et al.*, 2005; *Idem*, 1999)

Nas relações tipo QRAR os parâmetros cromatográficos de retenção podem vir tanto de ensaios com cromatografia gasosa como líquida. Até mesmo a análise de características de diferentes enantiômeros vem sendo estudada por esse tipo de correlação, chama-se QSERR (do inglês *Quantitative structure–enantioselective retention relationships*) (HÉBERGER, 2007).

2.2.2.2. Os sistemas de cromatografia líquida para a obtenção dos parâmetros de retenção.

a) Cromatografia de afinidade

As correlações entre dados de retenção e propriedades biológicas melhoram quando as colunas analíticas possuem maior grau de mimetismo com os sistemas biológicos.

Entre os principais métodos cromatográficos de afinidade estão a cromatografia de membranas artificiais imobilizadas (IAM, *Immobilized artificial membranes*) e a cromatografia de lipossomas imobilizados (ILC, *Immobilized liposome chromatography*).

A IAM fundamenta-se na capacidade do fármaco em penetrar na membrana celular e relaciona seu coeficiente de partição octanol-água com as características cromatográficas de uma dada substância quando cromatografada em coluna de sílica contendo fosfatidilcolina imobilizada. Já foi demonstrada a correlação entre o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água e o logaritmo do fator de retenção

na técnica cromatográfica proposta (PIGEON, 1990^{a, b}). Com esses resultados esta técnica passou a ser uma alternativa para ensaios preditivos da absorção, descrito por vários outros pesquisadores (YEN *et al.*, 2005; TAILLARDAT-BERTSCHINGER *et al.*, 2002^a; NEUE, 1997; BEIGI *et al.*, 1995). Também foi descrita a aplicação da IAM para a elucidação do mecanismo de biopartição de fármacos (CHAN *et al.*, 2005).

NASAL *et al.* (1995) publicaram resultados de um ensaio realizado com colunas de IAM onde também concluíram que essa seria uma técnica rápida e muito conveniente na caracterização da hidrofobicidade de xenobióticos. Suas conclusões também sugeriram que, baseado nessas características, se poderia descrever a bioatividade individual afetada pela hidrofobicidade dos produtos testados. Diante desses resultados, a técnica da cromatografia de membranas artificiais imobilizadas (IAM) tornou-se uma alternativa aos ensaios com células Caco-2.

Com desenvolvimento e aprimoramento da técnica cromatográfica preditiva da absorção de xenobióticos a informação sobre o tamanho da molécula mostrou-se importante para melhorar o valor preditivo desta técnica. Quando esse dado é considerado na correlação entre o fator de capacidade da IAM ($\log K'_{IAM}$) e a permeabilidade usando Caco-2, a correlação entre as técnicas é significativamente maior (CHAN *et al.*, 2005). Esse resultado já havia sido descrito anteriormente por TAILLARDAT-BERTSCHINGER *et al.* (2002^a). Esses autores concluíram também que a carga e a hidrofobicidade da molécula também eram importantes e deveriam ser considerados na análise de correlação.

A segurança na utilização desta técnica cromatográfica para a previsão da absorção de um produto está cada vez maior, a ponto de já ter sido proposto um guia para otimização técnica de medidas de retenção para IAM (TAILLARDAT-BERTSCHINGER, *et al.*, 2002^b).

Após os trabalhos realizados com a cromatografia de membrana imobilizada, outra técnica cromatográfica começou a ser desenvolvida e empregada na tentativa de obter resultados igualmente confiáveis ou melhores que os obtidos com IAM na previsão de absorção de fármacos. Esta técnica denomina-se cromatografia de lipossomas imobilizados (ILC). Ambas as técnicas, IAM e ILC, fundamentam-se na modificação da fase estacionária em relação a uma cromatografia de fase-reversa tradicional, pela imobilização de proteínas de membranas (IAM) ou pela imobilização

de lipossomas (ILC), simulando assim as características físico-químicas das membranas biológicas na fase estacionária do sistema cromatográfico (ESCUDE-GILABERT *et al.*, 2003; BEIGI *et al.*, 1995).

b) Cromatografias micelares

Desde 1996 até 2006 muitos trabalhos utilizando cromatografia líquida de fase reversa para a busca de parâmetros moleculares (QSRR) foram publicados. Trabalhos mostraram que previsões de princípios farmacodinâmicos, valores de toxicidade, fatores de bioconcentração (ADMET) possuem melhores correlações e conseqüentes predições quando se usa a cromatografia micelar (HÉBERGER, 2007).

Variações no sistema de cromatografia de fase reversa geraram diversos sistemas micelares de cromatografia: Cromatografia líquida micelar (MLC, *micellar liquid chromatography*), Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC, *micellar electrokinetic chromatography*), Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKCC, *micellar electrokinetic capillary chromatography*), Cromatografia eletrocinética lipossomal (LEKC, *liposome electrokinetic chromatography*), Cromatografia eletrocinética de microemulsão (MEEKC, *microemulsion electrokinetic chromatography*) e Cromatografia micelar de biopartição (BMC, *biopartitioning micellar chromatography*) (HÉBERGER, 2007; BURNS *et al.*, 2002; MOLERO-MONFORT *et al.*, 2001; KALISZAN, 1999; NISHI, 1997).

Os princípios físico-químicos envolvidos nos sistemas eletrocinéticos e não-eletrocinéticos são distintos. Os eletrocinéticos são, na verdade, uma variação da eletrorese capilar, que por adição de adjuvantes no sistema de “arraste” forma uma pseudo-fase estacionária. Portanto, o princípio dos sistemas eletrocinéticos é cromatográfico (HÉBERGER, 2007).

O que ocorre com a MEKC, MEKCC, LEKC e MEEKC é a distribuição homogênea das micelas de surfactante carregadas, formadas em uma solução eletrolítica. Nesse sistema, a velocidade das micelas em uma direção definida passa a ser diferente da solução eletrolítica em um campo elétrico. Essa situação permite a separação de produtos neutros com mais eficiência. As principais diferenças entre elas é que, no caso da MEKCC (cromatografia capilar eletrocinética micelar), é utilizado um sistema capilar, sendo que na cromatografia eletrocinética micelar

(MEKC) a micela é formada por diferentes tipos de tensoativos. Enquanto que na cromatografia eletrocinética de microemulsão (MEEKC) e na cromatografia eletrocinética lipossomal (LEKC) as micelas são constituídas por microemulsões e lipossomas, respectivamente.

A cromatografia líquida micelar (MLC), sistema não eletrocinético, diferencia-se da cromatografia em fase reversa padrão somente pela modificação da fase móvel do sistema cromatográfico, mantendo as fases estacionárias padrão (colunas C-18, p.ex.). Na constituição da fase móvel há a presença de surfactantes, em concentrações acima da concentração micelar crítica, fazendo com que a formação de micelas seja garantida e, com isso estaria ocorrendo a semelhança físico-química do sistema cromatográfico com membranas biológicas. Essa semelhança se dá em função desta formação de micelas onde a cabeça polar está orientada para fora e o corpo apolar orientado para dentro desta micela, mimetizando membranas biológicas (ESCUDEIR-GILABERT *et al.*, 2003; NISHI, 1997).

Considerando que a separação se dá em função da presença das micelas de surfactantes, com a modificação do surfactante, obtém-se diferentes eficiências de separação para diferentes compostos. Os surfactantes podem ser divididos em não-iônicos (com carga líquida zero e apresenta caráter doador/receptor de pontes de hidrogênio), aniônicos (com carga líquida negativa e apresenta caráter doador de pontes de hidrogênio), catiônicos (com carga líquida positiva e apresenta caráter receptor de pontes de hidrogênio) e zwitteriônicos (com cargas positivas e negativas em locais distintos, apresentando também caráter doador/receptor de pontes de hidrogênio). Dependendo do tipo de soluto (aniônico, catiônico ou neutro), diferentes interações ocorrem com conseqüentes alterações nos tempos de retenção dos compostos. Na Figura 2 estão apresentadas as diferentes interações entre moléculas neutras, aniônicas e catiônicas na MLC (ESCUDEIR-GILABERT *et al.*, 2003; NISHI, 1997).

Os estudos com surfactantes em cromatografia líquida geraram o método micelar chamado de cromatografia micelar de biopartição (BMC). Esse novo método, que utiliza o surfactante não iônico polioxietileno(23)lauril éter (Brij35), está sendo patenteado pela Universitat de València (número P200002045) e tem demonstrado capacidade de prever absorção de fármacos com excelente correlação com outras técnicas *in vitro*, tais como a cromatografia de afinidade (a ser discutido

posteriormente) e Caco-2, na previsão de parâmetros de absorção. (ESCUDER-GILABERT *et al.*, 2003, MOLERO-MONFORT *et al.*, 2001; MOLERO-MONFORT *et al.*, 2000).

Nesta direção, Molero-Monfort *et al.* (2001) publicaram um estudo que fez a previsão de absorção oral de 74 diferentes fármacos com taxas de absorção conhecidas. Para isso os autores utilizaram o método da BMC como técnica cromatográfica para a obtenção dos fatores de retenção e então correlacionaram os dados com os valores já descritos em literatura de taxa de absorção oral. Os valores de extensão de absorção variaram de 16 a 100%. Os autores também descrevem que os fármacos avaliados possuíam distintas características físico-químicas, expressas em hidrofbicidade ($\log P$ entre 0,34 e 5,2), e cargas (que variaram de estruturas catiônicas, aniônicas e compostos neutros). Essa grande variação de características de fármacos estudada, e os resultados obtidos permitiram verificar que a técnica BMC foi eficiente para prever a absorção, independentemente da característica química e físico-química dos fármacos e geraram um modelo para a previsão de absorção oral.

Figura 2. Interações hidrofóbicas ($\rightarrow$), eletrostáticas ($\rightleftharpoons$) soluto-micela e soluto-fase estacionária com um surfactante catiônico para solutos neutros, aniônicos e catiônicos (ESCUDER-GILABERT, 2005).

Além da capacidade de prever taxa de absorção oral de determinado fármaco, outros estudos utilizaram BMC para demonstrar a capacidade do método para também prever taxa de permeabilidade tópica de 43 diferentes compostos, bem como prever o efeito do pH do veículo sobre a absorção de xenobióticos (MARTÍNEZ-PLA *et al.*, 2003) e também a permeabilidade de fármacos oculares (MARTÍN-BIOSCA *et al.*, 2003). Os resultados obtidos pelos autores demonstram a potencialidade de utilização do método da BMC para previsão de absorção oral e tópica de novos produtos. Na Tabela 1 pode-se verificar os distintos modelos propostos utilizando a BMC e QRAR.

A necessidade de estudos de previsão de absorção oral ou tópica em diferentes fases do desenvolvimento de novos medicamentos é a mesma para os medicamentos de origem vegetal. Entretanto a maioria dos trabalhos que objetivaram prever absorção de produtos naturais utilizou o método das células Caco-2 (SIU PONG *et al.*, 2005; 2003; WALLE & WALLE, 2003; ASANO *et al.*, 2003; KONISHI *et al.*, 2002; MUROTA *et al.*, 2002; LIU; HU, 2002; VAIDYANATHAN & WALLE, 2001;), que como já discutido anteriormente, possui algumas dificuldades de validação.

2.2.2.3. Tratamento estatístico dos dados para geração dos modelos baseados em QRAR.

Escuder-Gilabert (2005) afirmou que “o desenvolvimento dos estudos QSAR ocorreram em paralelo ao desenvolvimento da informática, nos dois sentidos”. Para que seja possível a análise das relações entre descritores moleculares, parâmetros físico-químicos e propriedades biológicas uma gama de *softwares* estão comercialmente disponíveis (GROVER *et al.*, 2000). O método quimiométrico mais utilizado em QSAR tem sido a regressão linear múltipla (MLR, do inglês *multiple linear regression*) (HÉRBELE, 2007). Para se fazer uma seleção prévia dos descritores a serem considerados em um determinado estudo, outras técnicas multivariantes como o mínimo quadrado parcial (PLS, *partial least squares*) ou a regressão nas componentes principais (PCR, *principal component regression*) (FERREIRA, 2002) são usadas (ESCUDER-GILABERT, 2005).

2.2.3. Aspectos sobre a previsão parâmetros de ADME para produtos naturais utilizando métodos alternativos.

Com o crescimento do desenvolvimento e da comercialização de medicamentos fitoterápicos e de fitofármacos, aumenta a necessidade de maiores estudos sobre a farmacocinética desses compostos, sendo que os mecanismos e taxas de absorção das substâncias presentes nesses produtos já são motivos de estudos por técnicas *in vivo*, como já discutimos anteriormente e onde verificou-se que os flavonóides são a classe de metabólitos secundários mais estudadas mundialmente (BIRT, 2004; ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

Se considerarmos que os flavonóides ocorrem naturalmente nas formas glicosídica e aglicona, a discussão sobre possíveis variações no mecanismo de absorção das duas formas de flavonóides torna-se muito importante para que se possa avaliar a eficácia de alimentos funcionais e de medicamentos fitoterápicos contendo tais compostos, bem como propor técnicas que realmente avaliem a biodisponibilidade de flavonóides. Em todos os estudos encontrados na literatura que avaliam absorção e/ou mecanismo de absorção dos flavonóides, as estruturas heterosídicas estudadas foram do tipo O-glicosídicos (WILLIANSON, 2004; WALLE & WALLE, 2003; CRESPIY *et al.*, 2002; DAY *et al.*, 2000; GEE *et al.*, 2000; WALLE *et al.*, 2000). Essas estruturas são facilmente hidrolisadas por ácido e por enzimas (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004), levando a situação experimental da absorção do flavonóide como aglicona. Entretanto pouco se avaliou sobre flavonóides do tipo C-glicosídicos. Essas estruturas são bastante estáveis à hidrólise (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004) e, portanto sua absorção deveria ocorrer na forma glicosídica ou não ocorrer.

Um dos flavonóides C-glicosídeos muito representativos é a 6,8-di-C- β -D-glicosilapigenina (vicenina-2), já que sua distribuição é bastante ampla. Alguns trabalhos descrevem a presença desse flavonóide em plantas de famílias e gêneros distintos, bem como em localizações geográficas distantes. Entre essas plantas estão quatro espécies do gênero *Asplenium*, *A. oligophlebium*, *A. shimurae*, *A. normale* e *A. borale*, todas as espécies nativas do Japão (MATSUMOTO *et al.*, 2003); a *Cotoneaster orbicularis*, nativa do Egito, considerada citotóxica, antitumoral, antiespasmódica, com atividades antiinflamatória e antiviral (EL-MOUSALLAMY *et*

al., 2000); *Passiphora incarnata*, uma das espécies de maracujá com atividade sedativa (RAHMAN *et al.*, 1997); espécies do gênero *Ballota*: *B. hirsuta* e *B. foetida* (SICILIANO *et al.*, 2005); na *Mentha longifolia*, que cresce na Arábia Saudita (SHARAF *et al.*, 1999); na *Achillea setacea* (MARCHART; KOPP, 2003); na espécie *Cydonia oblonga* Miller (FERRERES *et al.*, 2003); na espécie brasileira *Lychnophora ericoides*, chamada de falsa-arnica ou arnica-da-serra (GOBBO-NETO *et al.*, 2005); e em um dos alimentos mais consumidos no mundo, o suco de laranja (GIL-IZQUIERDO *et al.*, 2001).

Esse breve relato da ampla distribuição do flavonóide C-glicosilado vicenina-2 em plantas medicinais, subsidia a utilização deste composto como modelo para o estudo de mecanismos de absorção de flavonóides.

Tabela 1. Modelos QRAR para a estimative de transporte de xenobióticos, através de diferentes barreiras biológicas, obtidos usando a retenção em BMC e colunas analíticas padrão ^a

Barreira biológica	Parâmetros farmacocológico	pH da fase móvel ^b	Modelo ^c	Referências
Trato gastrointestinal	Percentagem de absorção oral em humanos, %A	6.5 (media do pH do intestine delgado)	$\%A = \frac{K_{BMC}}{(0.7 \pm 0.2) + (1.02 \pm 0.03)K_{CMB}} \times 100$ $n = 74; r^2 = 0.72; F = 3185; SE = 9.8; p < 0.0001$	MOLERO-MONFORT <i>et al.</i> , 2001
			$\%A = \frac{K_{BMC}}{(1.0 \pm 0.3) + (1.00 \pm 0.03)K_{CMB}} \times 100$ $n = 74; r^2 = 0.72; F = 3174; SE = 9.8; p < 0.0001$	
Pele	Coeficiente de permeabilidade através da pele, em humanos, K_p (cm h ⁻¹)	7.4 (plasmatic pH)	$\log K_p = (-3.3 \pm 0.3) + (1.3 \pm 0.2) \log K_{BMC} - (0.0080 \pm 0.014) MP$ $n = 42; r^2 = 0.83; F = 93; SE = 0.51; p < 0.0001$ $RMSEC = 0.498; RMSECV = 0.537$	MARTÍNEZ-PLA <i>et al.</i> , 2003
			$\log BB = (-0.84 \pm 0.12) + (0.76 \pm 0.08) \log K_{BMC} - (0.26 \pm 0.11) \alpha$ $n = 42; r^2 = 0.75; F = 60; SE = 0.39; p < 0.0001$ $RMSEC = 0.379; RMSECV = 0.421$	
Barreira hemato-encefálica	Coeficiente de distribuição cérebro-sangue, em ratos, BB	7.4 (pH do plasma)		ESCUDEY-GILABERT <i>et al.</i> , 2004

^a C₁₈ Kromasil (diâmetro interno = 4.6 mm).

^b 0.04 M Brij35 nos pHs indicados.

^c Parâmetros estatísticos e variáveis:

n: número de moléculas incluídas no modelo.

*r*²: coeficiente de determinação.

F: F-razão (residual da razão da variância do modelo).

SE: erro padrão da estimativa do modelo.

p: probabilidade (medida da significância do modelo).

RMSEC: raiz quadrada media do erro de calibração.

RMSECV: raiz quadrada media do erro de validação cruzada (*cross-validation*) (*Venetian-blinds cross-validation*).

K_{BMC}: fator de retenção em BMC.

MP: ponto de fusão (°C).

α: carga molar total.

2.3. Aspectos relacionados ao desenvolvimento de extrato seco padronizado.

2.3.1. Informações botânicas da espécie.

O gênero *Lychnophora* é composto por 68 espécies e pertence à família Asteraceae (subtribo Lychnophorinae). Todas as espécies deste gênero foram encontradas no planalto central brasileiro, compreendendo os estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais e Tocantins (SEMIR, 1991).

SEMIR (1991) descreveu a *Lychnophora ericoides* como “um arbusto candelabriforme a arvoreta com 1,0 a 3,0 m de altura. Ramos alternos e subverticilados com indumento lanoso a subviloso canescente a variadamente acinzentado até cinza pardacento, às vezes ligeiramente ocráceo, com cicatrizes triangulares, circulares a linear-transversais, ou formando alvéolos e dando aos ramos o aspecto tesselado com cerca de 1,5 cm de diâmetro; folhas muito imbricadas na parte superior dos ramos patentes e de ápices mais reflexos abixo, linear-lanceolado a longamente lineares em forma de fita, base arredondada, às vezes ligeiramente truncada, ápice normalmente agudo, ligeiramente acuminado, às vezes pouco obtuso, geralmente mucronado, margem revoluta; venação broquidródoma; face adaxial glabra ou densamente tomentosa até espersamente vilosa ou pilosa quando jovem, posteriormente sunglabrescente permanecendo pubérulas até tomentosas nas folhas mais velhas, variadamente bulada, nervura principal alargada na base afinando-se gradativamente para o ápice, com bordos elevados e tornando-se estas sulcadas, com indumento ligeiramente tomentoso permanecendo na nervura principal, nervuras de outras ordens variadamente impressas, face abaxial densamente seríceo a viloso, canescente a argênteo, cobrindo totalmente as nervuras, podendo a principal ser glabrescente, achatada, sulcada, alada, gradativamente alargada da base para o ápice, com base bem alargada, saliente, com as nervuras de outras gradativamente salientes, porém não evidentes, com 1,5 até 15,0 cm de comprimento e 0,1 a 0,25 cm de largura. Inflorescências em glomérulos simples, folhosos, hemisféricos com folhas esparsas entre eles e capítulos algo laxos com 2,0 a 3,0 cm de comprimento e 3,0 a 5,0 cm de diâmetro, terminais a ramos folhosos de até 10,0 cm de comprimento e 0,3 a 0,5 cm de

largura. Capítulos cilíndricos com 3 a 5 flores, com 7,0 a 9,0 mm de comprimento e 0,3 a 0,5 mm de diâmetro. Brácteas involucrais em 4-5 série triangulares, ovais, oval-lanceolada, ápice obtuso a arredondado, margem lisa ligeiramente escariosa a barbelada ou subciliada, superfície glandulosa, serícea a vilosa quando jovem, glabrescente permanecendo serícea no ápice, as maiores de 7,0 a 8,0 mm de comprimento e 1,5 a 2,0 mm de largura. Flores lilás a púrpura com 9,0 a 10,0 mm de comprimento, lacínios glabros e glandulosos com 4,0 a 5,0 mm de comprimento. Anteras com até 4,0 mm de comprimento. Aquênios ocre a castanho escuro, glabros, costados, angulosos, glandulosos, com 2,0 a 4,0 mm de comprimento e 1,0 a 1,5 mm de diâmetro, pappus externo livre, eroso a agudo no ápice com 2,0 a 4,0 mm de comprimento, pappus interno branco, muito caduco e variadamente paleáceo e espiralado, às vezes com única espira, com cerca de 15 a 20 elementos com 6,0 a 8,0 mm de comprimento.”

Algumas das espécies de *Lychnophora*, entre elas a *L. ericoides*, são conhecidas como “arnica-brasileira”, “arnica-da-serra” ou “falsa-arnica”. Elas são utilizadas na medicina popular como anti-inflamatórios e analgésicos (BORSATO *et al.*, 2000; CERQUEIRA *et al.*, 1987)

2.3.2. Perfil fitoquímico e de atividades biológico-farmacológicas de compostos presentes na espécie.

O uso popular de preparados hidroalcoólicos das folhas e raízes de *L. ericoides* como analgésico e anti-inflamatório motivou estudos fitoquímicos e farmacológicos dos extratos polares e apolares (CERQUEIRA *et al.*, 1987; BORELLA *et al.*, 1998; BORSATO *et al.*, 2000; SAKAMOTO *et al.*, 2003; DOS SANTOS *et al.*, 2005; GOBBO-NETO *et al.*, 2005).

O perfil das raízes:

A avaliação da composição das raízes da espécie mostrou a presença das lignanas: α -cubebina (1), β -cubebina (1), α -metilcubebina (2), β -metilcubebina (2), α -metilclusina (3), β -metilclusina (3), hinoquinina (4) e diidro-cubebina (5) (BORSATO *et al.*, 2000) e dos ácidos cafeoilquínicos: 3,5-di-O-[E]-cafeoilquínico (6), 4,5-di-O-[E]-

cafeoilquínico (7) e 3,4,5-tri-O-[E]-cafeoilquínico (8) (DOS SANTOS *et al.*, 2005) (Tabela 2).

A partir das informações fitoquímicas das raízes da *L. ericoides* iniciou-se a investigação das atividades farmacológicas desses compostos. Os compostos foram avaliados quanto a sua *atividade analgésica* utilizando o método de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os resultados demonstraram que a α -cubebina e a β -cubebina possuem atividade analgésica na faixa de doses testada (de 10, 20, 40 mg/kg) (BORSATO *et al.*, 2000).

Quanto a classe dos derivados cafeoilquínicos, todos os ácidos foram submetidos ao experimento, porém os que apresentaram significativa atividade analgésica foram os ácidos 3,5-di-O-[E]-cafeoilquínico e 4,5-di-O-[E]-cafeoilquínico na dose de 2,5 mg/kg, para ambos, dose intermediária testada (DOS SANTOS *et al.*, 2005).

Após a análise dos ácidos cafeoilquínicos isolados, a fração butanólica do extrato de raiz também foi testada no mesmo modelo experimental, utilizando dose de extrato relativa a 2,5 mg/kg de ácido. Os resultados da atividade analgésica obtidos com a fração foram os mesmos obtidos com os ácidos isolados. Entretanto, cabe ressaltar que na comparação entre a administração dos ácidos isolados e da fração butanólica foi observada maior efetividade da fração em relação aos ácidos isolados. Essa observação foi atribuída a um possível efeito aditivo entre os ácidos e outros componentes minoritários da fração (DOS SANTOS *et al.*, 2005).

Com os promissores resultados obtidos nos ensaios de atividade analgésica das cubebinas, foi então testado a capacidade de *redução de febre* do composto. A febre foi induzida, em ratos, por lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS), entretanto o resultado demonstrou que a cubebina não possui atividade antipirética (BORSATO *et al.*, 2000).

Os resultados até aqui obtidos eram esclarecedores sobre a ação analgésica dos componentes das raízes da espécie, mas a possível atividade antiinflamatória de compostos presentes nas raízes de *L. ericoides* foi estudada em outra série de ensaios.

O teste utilizado com esse objetivo foi a clássica avaliação do edema de pata de rato, induzida por carragenina. Os resultados para a lignana cubebina indicou uma leve ação antiinflamatória deste composto (BORSATO *et al.*, 2000).

Tabela 2. Compostos e estruturas encontrados na *Lychnophora ericoides*

Classes	Partes	Composto	N	Estrutura	Ref.	Classes	Partes	Composto	N	Estrutura	Ref.				
Lignanas	Raízes	α -cubebina, β -cubebina	1		Borsato <i>et al.</i> , 2000	Flavonóides	Inflorescências e folhas	quercetina	13		Borella <i>et al.</i> , 1998				
		α -metilcubebina, β -metilcubebina	2					luteolina	14
		α -metilclusina, β -metilclusina	3					pinobanquisina	15
		hinoquinina	4			Lactonas sesquiterpênicas	Tricoma glandular	(4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i> ,16 <i>R</i>)-1-Oxo-3(10),8(16)-diepoxi-16-metilprop-1 <i>Z</i> -enil-16-metoxi-germacra-2-en-6(12)-olideo	16		Sakamoto <i>et al.</i> , 2003				
		diidro-cubebinal	5					(4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,11 <i>S</i>)-1-Oxo-3,10-epoxi-8-angeloloxigermacra-2-en-6(12)-olideo	17
Ácidos cafeicos	Raízes e Folhas	ácido 3,5-di-cafeoilquínico	6		Dos Santos <i>et al.</i> , 2005			fridelanol	18
		4,5-di-O-[<i>E</i>]-cafeoilquínico	7					lupeol	19
		3,4,5-tri-O-[<i>E</i>]-cafeoilquínico	8					α -amirina	20
Lactonas Sesquiterpênicas	Inflorescências e folhas	centraterina (lichnophorideo A)	9		Borella <i>et al.</i> , 1998	Glicosídeos	Folhas sem tricomas	dendrantemosídeo A	21		Gobbo-Neto, 2003				
		eremantolideo A	10					icarísídeo F ₂	22
		2', 3'-epoxi-15-deoxigolazensolideo	11					apigenina	23
		(4 <i>R</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>S</i> , 7 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 10 <i>R</i> , 11 <i>S</i> , 16 <i>R</i>)-4,5-dihidro-eremantolideo A	12			Flavonóides		apigenina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo (vicenina-2)	24
								crisina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo	25
								pinostrobina	26
								pinocembrina	27

O perfil das partes aéreas:

O primeiro trabalho visando a análise fitoquímica das partes aéreas da espécie *L. ericoides* avaliou as inflorescências e folhas da espécie. Destas foram isoladas as lactonas sesquiterpênicas: centraterina (9), eremantolideo A (10), 2", 3'-epoxi-15-deoxigoiazensolideo (11) e (4*R*, 5*S*, 6*S*, 7*S*, 8*S*, 10*R*, 11*S*, 16*R*)-4,5-dihidroeremantolideo A (12); os flavonóides: quercetina (13), luteolina (14), pinobanquisina (15) (BORELLA *et al.*, 1998) (Tabela 2).

Já a composição do extrato da superfície foliar onde estão situados os tricomas da *L. ericoides*, apresentou 20 lactonas sesquiterpênicas, sendo duas inéditas (16 e 17). Também os triterpenos fridenalol (18), lupeol (19) e α - e β -amirina (20) foram encontrados no extrato dos tricomas (SAKAMOTO *et al.*, 2003) (Tabela 2).

Especificamente nas folhas, o estudo da composição do extrato polar, produzido com folhas pré-lavadas com diclorometano com o objetivo de diminuir a presença das lactonas existentes na superfície foliar, constatou as presenças dos ácidos 3,5-di-O-[*E*]-cafeoilquínico, 4,5-di-O-[*E*]-cafeoilquínico e 3,4,5-tri-O-[*E*]-cafeoilquínico, já descritos anteriormente nas raízes do vegetal (DOS SANTOS *et al.*, 2005), dos glicosídeos dendrantesídeo A (21) e icarisídeo F₂ (22); das flavonas luteolina, apigenina (23), apigenina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo (vicenina-2) (24) e crisina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo (25); das flavanonas pinostrobin (26) e pinocembrina (27), e do diidroflavonol pinoblanquisina (28) (GOBBO-NETO *et al.*, 2003) (Tabela 2).

As flavonas apigenina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo e crisina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo foram avaliadas quanto a possível atividade antiinflamatória e antioxidante (GOBBO-NETO *et al.*, 2005; GOBBO-NETO, 2003). Os autores estudaram a atividade antiinflamatória utilizando o já referido método do edema de pata induzido por carragenina em ratos. Para avaliar o potencial antioxidante, o ensaio utilizado foi o de quimioluminescência usando leucócitos. Os resultados demonstraram que nas duas doses testadas (15 mg/kg e 90 mg/kg) a substância crisina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo mostrou-se ineficaz tanto na redução do edema, demonstrando assim ausência de atividade antiinflamatória dessa flavona. Já a substância apigenina-6,8-di-C- β -D-glicopiranosídeo (vicenina-2) apresentou

significativa atividade antiinflamatória, nas duas doses testadas (15 mg/kg e 90 mg/kg, por via oral). O ensaio de quimioluminescência demonstrou atividade antioxidante para os dois flavonóides testados, sem diferenças entre eles. Esses resultados permitiram aos autores concluir que a atividade antiinflamatória da vicenina-2 não se daria em função da ação antioxidante (GOBBO-NETO *et al.*, 2005).

Resultados obtidos anteriormente com vicenina-2 (UMA DEVI *et al.*, 2000) já haviam demonstrado que a flavona apresenta propriedade antioxidante. A atividade protetora da vicenina-2 contra radiação foi atribuída a essa atividade antioxidante. Os pesquisadores encontraram esses resultados tanto para a vicenina-2 como para outro derivado, a orientina. Há que ressaltar que o ensaio utilizado para essa conclusão não foi o da quimioluminescência, como descrito acima (GOBBO-NETO *et al.*, 2005), mas sim o da medida da inibição da formação do radical hidroxila gerado pela reação de Fenton, assim como as concentrações de vicenina-2 foram distintas, visto que para o primeiro as doses foram administradas em ratos (15 e 90 mg/kg) e os polimorfonucleados (PMN) testados quanto a sua ação antioxidante, e na segunda técnica, *in vitro*, as doses ficaram entre 100 e 500 μM . Apesar dessas diferenças os resultados sobre o potencial antioxidante foram os mesmos.

Ainda na busca por informações que elucidem o mecanismo de ação antiinflamatória do extrato de *L. ericoides*, recentemente tomou-se conhecimento dos resultados de um trabalho que avaliou o efeito dos derivados do ácido cafeoilquínicos e da vicenina-2 sobre a produção de mediadores do processo inflamatório. Os resultados encontrados demonstram que a atividade antiinflamatória da vicenina-2 não ocorre devido ao efeito inibitório da produção de fator de necrose tumoral (TNF- α). Mas, os experimentos evidenciaram que, essa flavona, inibe de modo dose-dependente a produção da prostaglandina-2 (PGE₂), sem alterar a expressão da proteína COX-2, um dos mediadores responsáveis pela conversão do ácido aracdônico em prostaglandina, durante o processo inflamatório (DOS SANTOS, 2006).

Os ácidos testados (ácido 3,5 dicafeoilquínico (3,5-DCQ) e o ácido 4,5 dicafeoilquínico (4,5-DCQ)) tiveram um pequeno efeito inibitório sobre a produção da PGE₂, mas somente nas menores doses testadas. Nas altas doses, esses mesmos

ácidos estimularam a produção de PGE_2 e de $TNF-\alpha$, demonstrando possuir caráter pró-inflamatório nessas doses (DOS SANTOS, 2006).

Além dos ácidos dissustituídos, o trissustituído (ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (3,4,5-TCQ)) também foi testado e demonstrou ser o ácido que melhor inibiu a síntese ou a disposição da proteína quimioatraente de monócitos-3. Quanto ao efeito sobre a PGE e o $TNF-\alpha$, o ácido trissustituído não apresentou inibição desses mediadores em doses baixas, como ocorreu com os dissustituídos, mas aumentou a produção de $TNF-\alpha$ nas altas doses (DOS SANTOS, 2006). De posse de todas essas informações, concluiu-se que os mecanismos do efeito analgésico e antiinflamatório dos ácidos dicafeoilquínicos seriam pela via dos mediadores do processo inflamatório (DOS SANTOS, 2006).

Os resultados positivos para a atividade analgésica e antiinflamatória em animais foram obtidos por meio da administração oral do composto isolado ou do extrato, confirmando tais propriedades por via sistêmica. Porém, o uso tópico também é muito utilizado popularmente e, por isso, estudos sobre a atividade antiinflamatória tópica e o potencial alergênico tópico de extratos de *Lychnophora ericoides* foram avaliados (ALVES, 2004). Para ambos os experimentos (antiinflamatório e alergênico) o mesmo método foi empregado, o de indução de dermatite aguda em cobaias fêmeas. Esse método consiste em sensibilizar um grupo de animais controle positivo, por aplicação tópica de dinitroclorobenzeno (DNBC), como indutor de dermatite. Os grupos experimentais receberam o extrato a ser avaliado na orelha direita. Na orelha esquerda, os mesmos animais receberam somente o veículo dos respectivos extratos. O aumento de espessura da orelha gerado pelo processo inflamatório induzido por DNCB foi avaliado e comparado com os grupos de animais tratados com o extrato hidroalcoólico de *L. ericoides*. Os resultados demonstraram que o extrato não induz dermatite alérgica (ALVES, 2004).

Para o ensaio de atividade antiinflamatória da tintura de folhas de *L. ericoides* sobre processo inflamatório tópico, os animais também foram sensibilizados com o solvente DNCB em ambas as orelhas, mas após a indução inflamatória, os animais tiveram somente a orelha direita tratada com o extrato e a esquerda serviu como controle negativo individual. As espessuras entre as orelhas direita e esquerda de cada animal foram medidas com equipamento apropriado e comparadas. Os resultados demonstraram que o extrato de *L. ericoides* testado possuem atividade

antinflamatória tópica e até mesmo maior que o extrato de folhas da Arnica-verdadeira (*Arnica montana*) (ALVES, 2004).

Há que se dizer que, no extrato hidroalcoólico de *L. ericoides* testado nos experimentos de atividades tópicas, somente o teor de ácidos cafeoilquínicos foi controlado. Como já discutido, esses ácidos possuem atividade analgésica, mas não a atividade antinflamatória, atribuída, principalmente, a flavona vicenina-2.

2.3.3. Aspectos sobre a toxicidade de compostos presentes na espécie.

Estudos de toxicidade de qualquer composto são complexos, principalmente devido ao grande número de ensaios necessários para que se tenha um real perfil da toxicidade do referido produto. Entre os ensaios toxicológicos estão os ensaios de embriofetotoxicidade, toxicidade sobre a fertilidade e capacidade reprodutiva, carcinogenicidade e mutagenicidade. Além desses, os ensaios mais conhecidos de avaliação de toxicidade aguda e crônica também são empregados com o objetivo de conhecer o efeito de um composto sobre organismos vivos (LAPA *et al.*, 2004).

Várias classes de substâncias químicas estão presentes na espécie *Lychnophora ericoides*, como visto até agora, lignanas, lactonas, derivados do ácidos cafeicos, triterpenos e flavonóides. As folhas de *L. ericoides*, objeto deste trabalho, apresentou todas essas classes de compostos, com exceção das lignanas, encontradas somente nas raízes. As informações sobre a composição química relacionado aos perfis de toxicidade dos compostos ou de suas respectivas classes devem ser conhecidas. Para sintetizar as informações, as classes podem ser resumidas em (I) lactonas, (II) triterpenos, (III) derivados do ácido cafeico e (IV) flavonóides.

(I) Lactonas e (II) Triterpenos

A lactonas sesquiterpências têm sido relacionadas as atividades antitumorais ou citotóxicas (PICMAN, 1986). O mecanismo de ação atribuída a tal atividade é a alquilação de nucleófilos biológicos por estruturas carbonílicas α,β - insaturadas por adição de Michael (LEE *et al.*, 1971).

As lactonas sesquiterpências inibem um grande número de enzimas envolvidas nos processos biológicos, como a síntese de DNA e RNA, síntese de

proteínas, de purinas, com a glicólise, com o ciclo do ácido cítrico e com a cadeia transportadora de elétrons mitocondriais (GRIPPO *et al.*, 1992; LEE *et al.*, 1977).

Entre as lactonas presentes, a centraterina (9) foi avaliada quanto ao potencial genotóxico. Os resultados foram positivos, demonstrando que a lactona centraterina foi genotóxica para células mamárias tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BURIM *et al.*, 2001).

A lactona 15-deoxigoiazensolídeo (11), também teve seu potencial genotóxico testado por modelos usando bactéria (*Salmonella Typhimurium*) e fungo (*Saccharomyces cerevisiae*). Esses experimentos permitiram aos autores concluir que essa lactona é mutagênica em fungos possivelmente devido ao efeito de intercalação, bem como foi considerada pró-oxidante por causar dano ao DNA por exacerbação oxidativa (VASCONCELLOS *et al.*, 2007).

Não foram encontrados relatos sobre a toxicidade das lactonas eremantolídeo A (10), (4*R*, 5*S*, 6*S*, 7*S*, 8*S*, 10*R*, 11*S*, 16*R*)-4,5-dihidroeremantolideo A (12), (4*S*,6*R*,7*S*,8*S*,10*R*,11*S*,16*R*)-1-Oxo-3(10),8(16)-diepoxi-16-metilprop-1*Z*-enil-16-metoxigermacra-2-en-6(12)-olideo (16) e 4*S*,6*R*,7*S*,8*S*,10*R*,11*S*)-1-Oxo-3,10-epoxi-8-angeloiloxigermacra-2-en-6(12)-olideo (17). Mesmo não havendo resultados específicos sobre essas lactonas, pode-se esperar efeito citotóxico desses compostos, pela característica química de reatividade dessas estruturas com proteínas, como citado anteriormente.

Os derivados triterpenos encontrados na *L. ericoides* não são descritos na literatura como indutores de toxicidade.

(III) Derivados do ácido cafeico

Os derivados do ácido cafeico encontrados na *L. ericoides* também não possuem evidências de indução de toxicidade.

(IV) Flavonóides

Já é conhecido o fato de alguns metabólitos de flavonóides ligarem-se covalentemente às proteínas e DNA podendo assim aumentar a ocorrência de transformações malignas e mutagenicidade (ZHOU *et al.*, 2004; HODEK *et al.*, 2002), onde por “mutação” compreende-se toda alteração do material genético que não resulta de recombinação ou segregação (RABELLO-GAY *et al.*, 1991). Porém

especificamente para os flavonóides presentes na *L. ericoides* não foram encontrados relatos de toxicidade ou de mutagenicidade.

2.3.4. Desenvolvimento de extratos vegetais padronizados.

2.3.4.1. Aspectos tecnológicos no desenvolvimento e produção de extratos

Em junho de 2006 foi instituída no Brasil a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). Esse decreto tem objetivos bastante amplos no que se concerne ao manejo, desenvolvimento e uso de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais. Em muitos momentos o decreto cita a necessidade de promoção de pesquisa e desenvolvimento de tecnologias nas diversas fases da cadeia produtiva do fitoterápico, bem como cita a necessidade de fomentar o fortalecimento da indústria farmacêutica nacional nessa área de atuação. Há que se considerar que o primeiro objetivo citado neste documento é “Garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos...”.

Ao confrontar a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006) com a Resolução RDC nº 48 de 2004, que regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos, nota-se a evolução de visão conceitual do termo “medicamento fitoterápico”, sendo agora visto como um “medicamento”, não mais como “remédio”. Isso é bastante claro ao se observar o número exigências para a obtenção do registro de um produto fitoterápico. Entre elas incluem-se testes de eficácia e toxicidade, bem como uma gama de ensaios que sejam capazes de garantir a qualidade do produto (BRASIL, 2004).

Pode-se dizer, de forma simplificada, que se considera "*controlada a qualidade*" de um medicamento fitoterápico se houver repetibilidade e reprodutibilidade na concentração do princípio ativo ou da substância marcadora nos diferentes lotes produzidos do produto fitoterápico com tecnologia de preparação padronizada e controlada (FARIAS, 1999 e SONAGLIO *et al.*, 1999).

Neste sentido, os extratos secos vegetais vêm sendo bastante estudados e discutidos e são considerados produtos intermediários que têm como vantagens possuir maior estabilidade química e facilidade de armazenamento, manuseio e

transporte, bem como possuir características tecnológicas adequadas de solubilidade e escoamento quando se pretende utilizá-lo na produção de formas farmacêuticas finais (LIST; SCHIMIDT, 1989).

Entre os processos de secagem de produtos, os mais comumente empregados na secagem de extratos vegetais com finalidade alimentícia estão a *liofilização*, *secagem por leito fluidizado*, *secagem por resfriamento* (*Freeze-drying*) e a *secagem por nebulização* (*Spray-drying*). Entre eles, dois dos processos mais usados na indústria farmacêutica são a *liofilização* e a *secagem por nebulização* (*Spray-drying*) e possuem fundamentos distintos:

(I) A liofilização baseia-se no princípio da sublimação do gelo, sob vácuo, necessitando assim que a amostra seja previamente congelada. É a técnica indicada para extratos que contenham substâncias termolábeis, porém a característica do extrato liofilizado é de pó extremamente leve, muito volumoso e com elevada higroscopicidade, e por isso não é a técnica de escolha pela indústria na secagem de extratos para medicamentos fitoterápicos (WENDEL; ÇELIC, 1998; LIST; SCHIMIDT, 1989).

(II) Já a técnica da *secagem por nebulização*, também denominada aspersão ou atomização, baseia a remoção da umidade na transferência simultânea de calor e massa.

Para que soluções, suspensões, emulsões ou pastas, possam ser secas por nebulização, finas gotículas do produto úmido é lançado no interior de uma câmara quente, a fim de obter a evaporação do solvente e a recuperação de um produto seco no estado particulado (WENDEL; ÇELIC, 1998; SHAW, 1997; LIST; SCHIMIDT, 1989). É a mais utilizada pela indústria de fitoterápicos. Isso se dá em função das características obtidas no produto seco por tal processo, bem como pela possibilidade de ajuste dos parâmetros no equipamento, permitindo assim variações das características desses pós. Os extratos secos que vêm sendo utilizado com maior amplitude em função da sua eficiência e baixo custo são originados pela secagem por nebulização ou atomização ("*spray drying*") (DE SOUZA, 2002; LIST; SCHIMIDT, 1989).

Para compreender melhor esse processo de secagem, as fases pelas quais passa um extrato fluido até tornar-se seco será dividida em: a) fase de alimentação e aspersão do líquido a ser seco; b) fase de contato e eliminação do líquido com o ar

quente, na câmara de secagem e c) obtenção do produto seco; (HELDMAN; LUND, 1992; LIST; SCHIMIDT, 1989). Cada uma dessas etapas acontece em partes distintas do equipamento utilizado (*Spray-dryer*).

Na Figura 3 pode-se observar a representação esquemática do equipamento com seus sistemas: sistema injetor de carga e atomizador; para a secagem o sistema de produção e de injeção de gás quente e a câmara de secagem e coleta do produto.

O bico de atomização é uma variante importante no sistema de secagem, existem distintos tipos: bicos rotatórios, de bocal pressurizado e de bocal pneumático. No primeiro tipo (de bico rotatório) o líquido é disperso em gotículas pela ação da força centrífuga, em direção às paredes da câmara de secagem, como mostrado na Figura 3, já no aspersor de bocal pressurizado o material chega sob pressão, que se converte em energia cinética e é responsável pela divisão do líquido. No terceiro tipo, o aspersor de bocal pneumático, o líquido e o gás de aspersão passam separadamente pela cabeça do aspersor, quando ambos entram em contato no interior do aspersor há a formação de um jato de finas gotículas (SHAW, 1997; LIST; SCHIMIDT, 1989).

Em qualquer tipo de bico injetor, a tensão superficial do líquido aspergido forma uma gota esférica, de pequenas dimensões. Essas dimensões variam com o tipo de bico, mas permite que a gotícula tenha sempre o mesmo tamanho e que seja esférica, atribuindo ao produto seco essas mesmas características tecnológicas de homogeneidade de tamanho de partícula e formato esférico, que determinará posteriormente a fluidez do pó (SHAW, 1997).

A velocidade e intensidade da transferência de calor, princípios responsáveis pelo processo de secagem, dependem de muitos parâmetros que podem ser variados no equipamento: a temperatura, umidade e velocidade do ar; área de troca térmica e da pressão ou velocidade de atomização. Portanto, todas essas variáveis podem ser manejadas ao longo do processo de desenvolvimento de secagem de um extato, visando a obtenção do produto com as características físico-químicas que se deseja (SHAW, 1997).

A *Secagem por nebulização* já é, há tempos, utilizada com sucesso pela indústria farmacêutica para o preparo de fitoterápicos. Trabalhos recentes demonstram a eficiência de tal procedimento, como por exemplo, o estudo realizado

por De Souza (2002) que desenvolveu produtos secos por liofilização e nebulização de *Achiroclines satureoides* (conhecida popularmente como Macela ou Marcela) para comparar seus perfis químicos, tecnológicos e biológicos. O trabalho apresenta a avaliação de soluções extrativas polares brutas, na forma líquidas e secas pelas duas técnicas (liofilização e nebulização), e também da fração flavonoídica. Com o objetivo de otimizar e padronizar o extrato de Macela foram avaliados quatro diferentes sistemas de extração para que, posteriormente, se definisse o melhor sistema extrativo. Nesse trabalho os marcadores químicos utilizados foram a quercetina, a 3-O-metilquercetina e a luteonina. Com o sistema extrator definido foram testados então diferentes parâmetros no processo de secagem por nebulização. Os produtos secos obtidos foram analisados em relação a teor de umidade e quantidade de quercetina no produto final.

FIGURA 3. Representação esquemática do secador por atomização (*Spray dryer*). (Gentilmente cedida pela Dra. Kellen Christinia Borges de Souza).

Como já dito anteriormente, os produtos secos por nebulização (PSN) são utilizados no desenvolvimento de formas farmacêuticas, mas uma de suas desvantagens é a alta higroscopicidade do produto, assim como ocorre com o produto liofilizado (LIST; SCHIMIDT, 1989). Para melhorar ou corrigir essa propriedade foram incorporados adjuvantes ao processo de secagem. Eles têm a finalidade de melhorar a higroscopicidade do PSN, bem como aumentar o

rendimento de produção por esse processo. Vários são os adjuvantes descritos: lactose, dextrina, goma arábica, derivados de celulose, galactomanam e gelatinas (LIST; SCHIMIDT, 1989). Trabalhos mais recentes demonstraram que o dióxido de silício coloidal tem alta eficiência como adjuvante de secagem (CARVALHO, 1997; DE SOUZA, 1997; SOARES, 1997; TEIXEIRA, 1996). Entre esses trabalhos, o realizado por Teixeira (1996) apresenta a avaliação comparativa entre os adjuvantes dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200), celulose microcristalina e β -ciclodextrina sobre as características físicas, químicas e tecnológicas de três PSN preparados a partir de soluções extrativas de *Achyroclines satureoides*. As melhores características de rendimento, umidade residual, recuperação de flavonóides e estabilidade física frente à umidade relativa foram obtidas pelo produto seco nebulizado contendo dióxido de silício coloidal como adjuvante.

Esses resultados demonstram alta potencialidade de uso desse adjuvante na obtenção de PSN para uso farmacêutico.

2.3.4.2. Aspectos analíticos no desenvolvimento e produção de extratos

Nos últimos anos têm sido publicados muitos trabalhos que buscam desenvolver e validar metodologias analíticas que possam avaliar formulações contendo extratos vegetais, bem como os produtos intermediários. Em função de suas características a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais empregada para estudos envolvendo extratos vegetais. (DOS SANTOS *et al.*, 2005; GOBBO-NETO, 2003; SAKAMOTO *et al.*, 2003; DE SOUZA, 2002; LEMAR *et al.*, 2002; ESCARPA; GONZÁLEZ, 2000; LINDEN *et al.*, 2000; PETRY, 1999; KEINAMEN *et al.*, 1998; DE SOUZA, 1997).

Considerando que o medicamento fitoterápico deve ser composto de soluções extrativas totais ou parcialmente purificadas, as análises biológicas de um ou mais marcadores deve ser realizado no produto final, como prevê a legislação brasileira (BRASIL, 2004). Além das diretrizes brasileiras dispostas na RDC 48/04, outras diretrizes nacionais e internacionais buscam harmonizar entendimentos e práticas no procedimento de validação de metodologia analítica (DOQ-CGCRE-008, 2002; ICH, 1996).

Ambas as diretrizes convergem para a necessidade de testes que validem o método analítico quanto a sua linearidade na faixa de trabalho, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limites de quantificação e detecção.

Por *linearidade* entende-se a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração (DOQ-CGCRE-008, 2002; ICH-4, 1996).

Os parâmetros: *limites de quantificação e de detecção* também são necessários durante a investigação da definição da faixa de trabalho. Por *limite de quantificação* entende-se a menor concentração do analito na amostra que é capaz de ser quantificada e que permaneça com um coeficiente de variação aceitável, geralmente entre 80 – 120 % (ICH-4, 1996). O *limite de detecção* é a menor concentração do analito lido no sistema analítico.

Já a *precisão* é um parâmetro que avalia a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Pode ser expressa por meio da repetitividade e da precisão intermediária (DOQ-CGCRE-008, 2002), é expressa pelo coeficiente de variação dos dados (ICH-4, 1996).

O conceito que define *exatidão* pelo ICH-4 (1996) e pelo DOQ-CGCRE-008 (2002) é o grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do produto analisado, ou seja, é a estimativa da proximidade entre a média dos valores obtidos do analito e da concentração real de uma amostra. o quanto o método analítico.

Todos esses parâmetros devem ser definidos e conhecidos no desenvolvimento e padronização do método analítico a ser utilizado no controle de qualidade do extrato vegetal líquido ou seco.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar o perfil de absorção da substância 6,8-di-C- β -D-glicosilapigenina isolada por ensaios *in vivo* e *in vitro*;
- Conhecer o comportamento da substância 6,8-di-C- β -D-glicosilapigenina em relação a sua união a proteínas plasmáticas humanas;
- Desenvolver e padronizar o extrato seco a partir das folhas de *Lychnophora ericoides* por meio de caracterização química e biológica dos extratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Caracterização da matéria-prima vegetal

4.1.1. Coleta e identificação botânica

O material foi coletado na época de sua floração em março de 2000 na cidade de Capitólio-MG. A população da espécie de onde foram coletados o material vegetal foi identificada pelo Prof. Dr. João Semir da Universidade de Campinas (UNICAMP) e a excicata está depositada com o código NPL-123 (Herbário UNICAMP).

O material coletado foi seco em estufa de ar circulante a 35° C por 4 dias consecutivos. Após a secagem, as folhas foram separadas manualmente e cominuídas em moinho de facas e acondicionadas ao abrigo da luz, em recipiente fechado.

4.1.2. Determinação da perda por dessecação (F. BRAS. IV, 1988).

Amostras de 2,0 g de droga vegetal moída foram exatamente pesadas em pesa-filtros tarados e colocadas em estufa, por 2 horas, a temperatura de 105°C. Após resfriamento em dessecador, provido de sílica, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais de 30 minutos. Este procedimento foi repetido até as amostras alcançarem peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

4.1.3. Determinação do teor de cinzas totais (F. BRAS. IV, 1988).

Amostras de 3,0 g de droga vegetal moída foram exatamente pesadas em cadinhos calcinados e tarados e incineradas em mufla a temperatura de 450°C. Após a incineração, os cadinhos foram resfriados em dessecador com sílica e devidamente pesados. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

4.1.4. Determinação do teor de substâncias extraíveis em álcool (F. BRAS. IV, 1988).

Amostras de 2,0 g de droga vegetal moída foram exatamente pesadas e transferido para o cartucho do extrator de Soxhlet, previamente tarado e seco.

Foram adicionados ao balão do extrator 200 mg de hidróxido de sódio e álcool absoluto em quantidade suficiente. O tempo de extração foi de 5 horas. Após o término da extração o cartucho com o resíduo foi seco em estufa a 105°C. O resíduo foi pesado e calculado como teor de substâncias extraíveis em álcool e o resultado foi referido em percentual relacionado ao peso da droga vegetal. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, através da média de três determinações.

4.1.5. Determinação da granulometria da droga vegetal cominuída (F. Brás. IV, 1988).

O jogo de tamises de números 18, 25, 45, 60, 80, 120 e fundo para recolhimento foram montados sobre manta vibratória. Ao tamis 18 foi adicionado uma quantidade de droga vegetal exatamente pesada. O jogo de tamises foi submetido a vibrações em velocidade padronizada por 30 minutos. Após esse procedimento as porções da droga vegetal retida em cada um dos tamises foram pesadas separadamente. A análise foi realizada em triplicada e os valores apresentados e utilizados nos cálculos referem-se à média dos valores obtidos. O cálculo percentual da droga em relação a cada tamis foi calculada e o pó foi classificado de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1988).

4.1.6. Determinação da densidade aparente da droga vegetal cominuída.

A análise da densidade aparente da droga vegetal foi realizada utilizando um densímetro de pós marca Pharma Test (PT-TD). Uma quantidade de droga vegetal referente a 200 ml, medida em proveta, foi pesada e colocada no densímetro. O equipamento foi regulado para 1.250 batidas. Após o término dessa bateria de batidas, foi anotado o volume final do pó e a amostra submetida a uma segunda bateria de 1.250 batidas e assim sucessivamente até não haver mais variação no volume final. O volume final foi anotado e o cálculo da densidade aparente foi realizado de acordo com a Equação 1.

$$D_{aparente}(cm^3/g) = \frac{M(g)}{Vol(l)} \quad (1)$$

onde $D_{aparente}$ é a densidade aparente (cm^3/g), $M(g)$ é a massa da droga vegetal e $Vol(l)$ é o volume final obtido.

4.1.7. Isolamento da vicenina-2 a partir das folhas de *Lychnophora ericoides* (GOBBO-NETO *et al.*, 2005).

As folhas secas moídas de *L. ericoides* (370 g) foram submetidas a extração com MeOH por 24 horas a temperatura ambiente. Após filtração, o extrato foi concentrado em rotaevaporador (com temperatura máxima de 45° C). O resíduo do extrato foi ressuspensão em MeOH:H₂O (8:2) e submetido a extrações líquido-líquido sucessivas: a) com hexano (3 x 300 ml) e; b) dicloroetano (3 x 300 ml).

Todas as frações foram secas e cerca de 4 g do resíduo do extrato metanólico foi ressuspensa em água e extraída com *n*-butanol (3 x 60 ml). Ambas frações foram novamente secas e o resíduo da fração aquosa (cerca de 1,9 g) foi submetida a coluna cromatográfica com Amberlite XAD-2 (100 g) que foi eluída consecutivamente com: a) H₂O (1,5 l); b) MeOH:H₂O (1:1) (1,5 l) e; c) MeOH (2,0 l).

As frações de MeOH:H₂O (1:1) e MeOH foram misturadas e submetidas a HPLC preparativo usando coluna ShimPak ODS 5 µm – Shimadzu, 250 x 20 mm. Foi utilizado um sistema gradiente de eluição linear iniciado com 30 % de MeOH e finalizado com 55%, por 25 minutos. A detecção foi feita em detector UV-vis a 280 nm e o fluxo circulante foi de 9,8 ml/min.

O flavonóide vicenina-2 foi identificado por RMN ¹H e ¹³C e espectrometria de massas.

4.2. Caracterização da interação da vicenina-2 e flavonóides estruturalmente relacionados, com proteínas plasmáticas utilizando a eletroforese capilar.

4.2.1. Preparo de amostras para o estudo de interação entre flavonóides e Albumina Sérica Humana (HSA) por Eletroforese Capilar Frontal (CE-FA).

Primeiramente foram realizadas análises preliminares para avaliação da *performance* de união dos flavonóides a albumina (HSA). Para isso, cada uma das soluções dos flavonóides testados foram misturadas a HSA (Sigma), de modo que a concentração final dos flavonóides fosse de 200 μM e da HSA 475 μM . Essas misturas foram preparadas em tampão eletroforético e equilibradas por 20 minutos em banho-maria a 36 °C antes da injeção no equipamento. Todas as misturas foram preparadas em duplicatas.

O tampão eletroforético foi constituído de tampão fostafo, pH 7,4 a 67 mM e foi preparado dissolvendo quantidade apropriada de difosfato de sódio dihidratado em água e ajustando o pH da solução com solução de NaOH. A solução foi filtrada por filtro de nylon com poro de 0.45 μm (Micron Separation, Westborough, MA, USA).

Após os resultados das análises preliminares, foram estimadas as constantes de união dos flavonóides selecionados com a HSA. Para isso, as misturas de flavonóides com concentração fixa (200 μM) foram postas em contato com concentrações crescentes de albumina (20, 80, 150, 250, 350 e 475 μM). Seguiu-se então o protocolo citado no parágrafo anterior para estabilização da amostra. Todas as misturas também foram preparadas em duplicatas.

As amostras foram injetadas hidrodinamicamente dentro do capilar a 50 mbar por 60 segundos, e a voltagem de análise foi de 15 kV, sendo usado polaridade normal durante a corrida eletroforética.

4.2.2. Condições do equipamento de eletroforese capilar (CE)

Foi utilizado um sistema de eletroforese capilar Hewlett-Packard HP ^{3D}CE (Agilent Phoenix, AZ, USA) acoplado a um detector *diode array* (DAD), controlado

pelo software HP ^{3D}CE Chemstation, com capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoneix, AZ, USA) com 50 µm de diâmetro interno e 363 µm de diâmetro externo com um comprimento total efetivo de 67.5 and 40 cm, respectivamente. O cartucho contendo o capilar foi acondicionado a temperatura de 36.5° C e a voltagem de corrida foi de 15 kV. A detecção por UV ocorreu em 300 nm.

Para o acondicionamento, antes de cada dia de análise, o capilar foi submetido a um fluxo de NaOH (1M) a 60°C por 10 minutos, posteriormente enxaguado por 5 minutos com água e 15 minutos com tampão fosfato pH 7,4 a 36.5°C. Com o objetivo de obter bons picos e tempos de migração reprodutíveis, o capilar também foi acondicionado antes de cada uma das análises realizadas, e a sequência de limpeza do capilar entre as amostras foi: (a) 2 min de enxágüe com água deionizada e ultrafiltrada, (b) 2 min de lavagem com NaOH (1M), (c) 2 min de enxágüe com água deionizada e ultrafiltrada, e (d) 2 min de enxágüe com tampão fosfato a 1000 mbar. Nessas condições a eliminação da adsorção de proteína no capilar está garantida.

4.2.3. Preparo de amostras para o estudo de interação entre os flavonóides com α_1 -glicoproteína ácida (AGP) e albumina (HSA) por CE-FA.

Uma série de amostras contendo 200 µM dos respectivos fármacos, 475 µM de HSA e 20 µM da α_1 -glicoproteína ácida (AGP) (Sigma) em tampão eletroforético (como descrito acima), foram preparados e mantidos em equilíbrio por 20 min em banho-maria a 36 °C antes da injeção no capilar. Todas as misturas foram preparadas em duplicatas e as amostras foram injetadas de acordo com a técnica descrita anteriormente.

4.2.4. Preparo das amostras para o estudo de interação entre os flavonóides e as proteínas plasmáticas totais por ultrafiltração e CE.

Soluções de fármaco foram adicionados a 200 µl de plasma humano, de modo que ao final a concentração de flavonóide fosse de 200 µM, utilizando um volume de solução de fármaco não superior a 20 µl. As amostras foram equilibradas em banho-maria por 20 minutos a 36 °C e posteriormente filtradas em filtros de celulose por centrifugação a 12000 rpm por 40 minutos. Finalmente, a fração

ultrafiltrada foi injetada hidrodinamicamente para dentro do capilar a 50mbar por 4 segundos. A voltagem de corrida foi de 15kV. As amostras foram preparadas em duplicata.

4.2.5. Análise dos dados

Os parâmetros de união flavonóide-HSA foram determinados usando a Equação 2 que relaciona concentração de fármaco livre $[D]_f$, concentração de proteína C_p e concentração de fármaco total, C_D (MARTINEZ *et al.*, 2004).

$$[D]_f = \frac{-(1 - K_1 \cdot C_D + n_1 \cdot K_1 \cdot C_P) + \sqrt{(1 - K_1 \cdot C_D + n_1 \cdot K_1 \cdot C_P)^2 + 4 \cdot K_1 \cdot C_D}}{2 \cdot K_1} \quad (2)$$

sendo n_1 , o número de sítios primários de união e K_1 , sua constante de afinidade correspondente. Esta equação assume somente um tipo de sítios independentes de união na molécula de proteína como responsável pela união a fármacos em condições fisiológicas e com fármacos em concentrações terapêuticas (10^{-7} - 10^{-4} M). O valor de n_1 foi encontrado pelo método de médias de Klotz (Equação 3)(KLOTZ; HUNSTON, 1971).

$$C_p / (C_D - [D]_f) = \frac{1}{n_1} + \frac{1}{(n_1 \cdot K_1)} \cdot \frac{1}{[D]_f} \quad (3)$$

As estimativas de n_1 e K_1 pela Equação 3 foram obtidas usando o algoritmo Simplex (baseado na função FMINS no software MATLAB®), modificado pela busca somente da integração do valor de n_1 . O valor de K_1 foi verificado por regressão não linear usando o software STATGRAPHIC® plus 5.1. A média dos valores de K_1 corresponde a duas séries independentes de ensaios em dias distintos, portanto a incerteza entre-dias foi considerada nesse resultado.

A Equação 4 usada para avaliar o percentual de união dos flavonóides a proteínas (PB), para os experimentos com HSA, HSA-AGP e proteínas plasmáticas totais:

$$PB(\%) = 100 \cdot \frac{C_D - [D]_f}{C_D} \quad (4)$$

onde C_D é a concentração total do fármaco e $[D]_f$ é a concentração livre do fármaco, após a exposição a proteína.

4.3. Estimativa de perfil de permeabilidade do flavonóide vicenina-2 e flavonóides correspondentes por Cromatografia Capilar Micelar de Biopartição (BMC).

4.3.1. Preparo de amostras para análise em BMC.

Todos os compostos analisados foram preparados por diluição em metanol, na concentração final de 1.000 ppm e esta solução estoque foi armazenada sob refrigeração a 4° C até o momento da análise.

No momento da análise os fármacos em soluções-estoque foram diluídos em fase móvel micelar contendo polioxietileno (23) lauril éter (Brij35) 0,04 M em solução tampão fosfato 0,05 M, de modo que a concentração final dos fármacos estivesse em torno de 100 ppm. As amostras foram filtradas por membrana de *nylon* de 0.45 µm de abertura de poro (Micron Separations, Westboro, MA, USA) e então cromatografadas.

4.3.2. Condições e equipamento para análise cromatográfica por BMC.

Os dados cromatográficos dos compostos foram obtidos usando fases móveis micelares de polioxietileno (23) lauril éter (Brij35) (Sigma) 0,04 M com pH entre 4.0 - 7.4 ajustado com tampão fosfato 0,04M. Para a reprodução da pressão osmótica

dos fluídos biológicos, NaCl foi adicionado na fase móvel micelar (9,2 g/l) e azida sódica (0,2 g/l) como fungicida.

O equipamento utilizado foi um Agilent 1100 Series com bomba capilar binária, detector UV-vis com *diode array*, termostato para coluna e um microautoinjeter (Palo Alto, CA, USA). A aquisição e processamento dos dados foram feitos pelo software ChemStation para LC-3D (Rev.A.10.02[1757]©Agilent Technologies, 1990-2003). Coluna capilar Kromasil octadecil-silano C₁₈ (5 µm, 0.5 × 150 mm i.d., Michrom Bioresources, Inc.) foi utilizada. A fluxo da fase móvel foi de 20 µl/min e o volume de injeção foi de 1,5 µl. A detecção foi realizada utilizando uma faixa de comprimento de onda de 220 - 330 nm. Todos os ensaios foram realizados a 36,5°C. As soluções de fase móvel foram desgaseificadas em banho de ultrassom.

4.3.3. Obtenção de dados em cromatografia com coluna capilar para comparação de modelo.

Para a comparação do sistema analítico capilar com o padrão, 47 fármacos foram utilizados: amobarbital, butabarbital, clorfeniramina, cortisona, deoxicorticosterona, hidrocortisona, metoprolol, nadolol, sulpirida, testosterona, terbutalina (Sigma, St. Louis, MO USA), atenolol, propranolol (ICI-Farma, Barcelona, Spain), quazepan (Quiedorm[®], Laboratorios Menarini, Barcelona, Spain), acetanilida, propiofenona, metanol, n-butanol, uréia, tolueno, resorcina e benzeno (Scharlab, Barcelona, Spain), acemetacina e ibuproxano (Laboratorios Fher, Barcelona, Spain), cortexolona e fenobarbital (Bayer, Barcelona Spain), fenol, 2,4-dimetilfenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol e 2,4-dinitrofenol (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg Germany), 17α-hidroxiprogesterona, corticosterona (Fluka, Buchs Switzerland), ácido salicílico (Panreac), testosterona (Schering, Madrid, Spain), naproxeno (Syntex Latino, Madrid, Spain), tiouréia (UCB, Brus, Belgium), fenbufeno (Cincopal[®], Cynamid Iberica S.A., Madrid, Spain), fentiazac (Donorest[®] 100, Wyeth-Orfi, Barcelona, Spain), flurbiprofeno (Froben[®] 50, Laboratorios Knoll, Madrid, Spain), cetoprofeno (Rhône-Poulenc Rorer, Madrid, Spain), tolmetin (Laboratorio Estedi, Barcelona, Spain), diclofenaco (Novartis, Barcelona Spain), indometacina (Laboratorios Llorens, Barcelona, Spain), lidocaína (Seid, Barcelona, Spain), piquetoprofeno (Laboratorios Farmacéuticos Almirall, Barcelona, Spain).

Após as análises cromatográficas os dados cromatográficos dos 47 fármacos foram analisados e comparados com os dados descritos em literatura para os mesmos fármacos, obtidos em coluna padrão (MOLERO-MONFORT *et al.*, 2001).

Uma curva de correlação entre os dois tipos de cromatógrafos foi estabelecida, por análise de correlação.

Após essa análise, os dados obtidos com os flavonóides testados em cromatografia capilar, foram então avaliados.

Os compostos estudados foram 5-hidroxiflavona; 7-hidroxiflavona, apigenina, flavona, vicianina-2, vitexina, quercetina, rutina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido clorogênico, ácido *p*-hidroxicinâmico, ácido *p*-hidroxibenzóico e floroglucinol.

Todas as soluções diluídas e as fases móveis foram filtradas por membranas de nylon de 0.45 µm de abertura de poro (Micron Separations, Westboro, MA, USA) e então utilizadas.

4.3.4. Obtenção dos fatores de retenção dos compostos por Cromatografia Micelar de Biopartição (BMC).

Os fatores de retenção dos compostos foram estimados de acordo com proposta descrita em literatura (Equação 5) (BERMÚDEZ-SALDAÑA *et al.*, 2005).

$$k^{r^2} = \frac{k_2(t_R^g - t_{R1}^g) + k_1(t_{R2}^g - t_R^g)}{t_{R2}^g - t_{R1}^g} \quad (5)$$

onde k^{r^2} é uma estimativa de k (fator de retenção) para o composto em teste, o qual além de seu tempo de retenção (do inglês, *gross retention time*), t_R^g utiliza os tempos de retenção dos compostos de referência R1 (acetanilida) e R2 (propiofenona) (t_{R1}^g e t_{R2}^g), injetados durante a sessão de trabalho. k_1 e k_2 são os fatores de retenção dos compostos de referência, anteriormente estabelecido para as condições experimentais utilizadas (concentração de surfactante, pH e temperatura) e foram considerados constantes. O uso deste tipo de aproximação gera fatores de retenção mais estáveis ao longo do tempo quando comparado às estimativas clássicas baseadas na medida do tempo morto (do inglês, *the gross*

hold-up time). Os fatores de retenção utilizados foram as medias de três determinações.

4.3.5. Análise dos dados cromatográficos.

O valores de propriedades físicas ponto de fusão (MP), solubilidade em água (WS), peso molecular (MW) e o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água ($\log P$), foram obtidos do software EPI Suite software (v.3.12,©2000, US Environmental Protection Agency Version).

Os softwares Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corp.) e STATGRAPHICS (Statistical Graphics Corp. V. 2.1) foram utilizados para efetuar as análises estatísticas de regressão.

4.4. Análise da taxa de permeação intestinal da vicenina-2 em ratos.

4.4.1. Preparo dos animais.

Os animais pertencentes ao biotério da Facultat de Farmácia da Universitat de València foram postos em jejum por cerca de 20 horas, com água *ad libitum*.

4.4.2. Preparo das soluções usadas na perfusão intestinal.

a) *Líquido de lavado curto* (FAMBUENA, 2003):

A solução denominada líquido de lavado curto (LLC), foi constituída por solução fisiológica de NaCl 0,9% (p/v) em água destilada. O pH da solução foi de 6,4 (o mesmo do intestino delgado).

A solução reguladora de pH foi constituída por uma solução de tampão fosfato, 66 mM, pH 6,4. Para o preparo da solução de LLC foi utilizado, portanto, 9 g de NaCl, 10 ml da solução de tampão fosfato e água destilada q.s.p 1000 ml.

Para a determinação da osmolaridade do LLC, foi utilizado um osmômetro crioscópico Gonotec®. A osmolaridade estabelecida fica entre 282 – 297 mOsm/l para que o LLC seja isosmótico em relação ao sangue.

b) Soluções de perfusão

A solução de vicenina-2 (180 mg/kg) foi preparada por dissolução do flavonóide em Tween-80 (5% v/v) no líquido de lavado curto, completando um volume de 10 ml por animal.

4.4.3. Técnica de permeação intestinal in vivo.

No momento do experimento, cinco ratos machos Wistars, pesando entre 180 e 220 g, anestesiados com tiopental (40 mg/kg) intraperitoneal, foram abertos na cavidade abdominal. A parte inicial do intestino delgado (imediatamente após o estômago) foi canulada. A parte final do intestino delgado (imediatamente antes da válvula íleo-cecal) foi fendada. A partir daí o intestino foi lavado com líquido de lavado curto (LLC) para a eliminação completa de resíduos sólidos contidos no intestino. Para isso, 30 ml de LLC foram utilizados, em 3 porções de 10 ml.

Após essa limpeza, a fenda da porção terminal do intestino delgado também foi canulada.

Ambas as cânulas foram conectadas a seringas tipo multifit, com 10 ml de capacidade. A solução de perfusão com vicenina-2 foi posta na seringa e, no momento em que todo volume foi injetado dentro do intestino do animal, iniciou-se a contagem de tempo.

Amostras foram coletadas, alternando os lados (i.e. entrada e saída do intestino), nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A cada tempo alíquotas de 200 µl foram coletadas. Ao final, todo o volume da solução de perfusão restante foi medida e o animal foi sacrificado por deslocamento cervical.

4.4.4. Análise das amostras de perfusão.

Após a finalização do experimento, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm, para clarificação da solução e congeladas a -4° C até o momento da análise, o que não superou 48 horas.

As amostras foram então diluídas de modo que a concentração da solução no tempo 0 estivesse dentro da curva de calibração estabelecida (1 µg/ml a 100 µg/ml). As amostras diluídas foram cromatografadas de acordo com método descrito em (3.5.1.4).

4.4.5. Percentual absorvido de vicenina-2 in vivo.

Após as determinações das concentrações de vicenina-2 em cada amostra do perfundido intestinal, calculou-se a cinética da absorção, seguindo ordem um, por todo o tempo do experimento (30 minutos), de acordo com a Equação (6):

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A \quad (6)$$

sendo sua forma integrada a seguinte equação (Eq. 7):

$$A = A_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (7)$$

onde A representa a concentração remanescente da substância ensaiada no lúmen ao tempo t ; A_0 a ordenada na origem e k_a a constante aparente da velocidade de absorção de ordem um, expressada no tempo recíproco (t^{-1}).

O logarítmo neperiano da Eq. (7) transforma a referida equação na equação de uma reta cuja expressão é:

$$\ln A = \ln A_0 - k_a \cdot t \quad (8)$$

A obtenção dos parâmetros individuais característicos de absorção, k_a e A_0 foi utilizado o programa SIGMAPLOT 8.0, que realiza o ajuste da equação exponencial (7) por regressão não-linear pelos mínimos quadrados ordinários, baseados no algoritmo de Marquardt-Levenberg.

Após a obtenção desses parâmetros, calcula-se a média de cada um deles.

A taxa final de absorção (F_{abs}) é calculada pela relação:

$$F_{abs} = \frac{C_{t30}}{C_{t0}} \cdot 100\% \quad (9)$$

onde C_{t30} é a concentração de vicenina-2 no perfundido no último tempo coletado (30 minutos) e C_{t0} é a concentração inicial de vicenina-2 na solução de perfusão.

4.5. Desenvolvimento e caracterização de extrato padronizado de folhas de *Lychnophora ericoides*.

4.5.1. Preparo e caracterização das soluções extrativas.

4.5.1.1. Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com ponto central após a definição das variáveis em estudo. As variáveis estudadas foram: tempo de extração, mistura solvente e proporção droga:solvente. Entre as variáveis foram avaliados os seguintes níveis:

a) Quanto ao tempo de extração:

- 1) Limite inferior: 24 horas (-)
- 2) Limite superior: 72 horas (+)
- 3) Ponto central: 48 horas (0)

b) Quanto ao teor alcoólico:

- 1) Limite inferior: Etanol 40° (-)
- 2) Limite superior: Etanol 80° (+)
- 3) Ponto central: Etanol 60° (0)

c) Quanto a proporção droga:solvente:

- 1) Limite inferior: Proporção 1:1 p/v (-)
- 2) Limite superior: Proporção 1:3 p/v (+)
- 3) Ponto central: Proporção 1:2 p/v (0)

Na matriz experimental definiu 8 diferentes tipos de extratos mais duas repetições no ponto central, totalizando 10 extratos (Tabela 3).

Tabela 3: Matriz experimental obtida pelo delineamento fatorial 2^3 para obtenção dos extratos, sendo (+) os níveis superiores, (-) os níveis inferiores e (0) o valor no ponto central.

Amostras	Proporção droga:solvente	Tempo de maceração	Teor alcoólico
Extrato 1	+	+	+
Extrato 2	+	+	-
Extrato 3	+	-	+
Extrato 4	+	-	-
Extrato 5	-	+	+
Extrato 6	-	+	-
Extrato 7	-	-	+
Extrato 8	-	-	-
Extrato 9	0	0	0
Extrato 10	0	0	0

4.5.1.2. Preparação das soluções extrativas.

As soluções extrativas foram preparadas utilizando como método de extração a maceração simples. A variação de temperatura ambiente durante a maceração foi registrada. Todos os extratos foram produzidos em triplicata e em dias diferentes para minimizar erros. Os extratos avaliados estão apresentados na Tabela 4

Tabela 4. Delineamento fatorial 2^3 para o estudo das soluções extrativas.

Solução extrativa	Proporção droga:solvente (p/v)	Tempo de maceração (h)	Teor alcoólico (° GL)
1	1:3 (+)	72 (+)	80 (+)
2	1:3 (+)	72 (+)	40 (-)
3	1:3 (+)	24 (-)	80 (+)
4	1:3 (+)	24 (-)	40 (-)
5	1:1 (-)	72 (+)	80 (+)
6	1:1 (-)	72 (+)	40 (-)
7	1:1 (-)	24 (-)	80 (+)
8	1:1 (-)	24 (-)	40 (-)
9	1:2 (0)	48 (0)	60 (0)
10	1:2 (0)	48 (0)	60 (0)

Os extratos foram preparados em volume de 25 ml cada um e após cada tempo de maceração previsto, foram filtrados por filtração simples e acondicionados em frascos âmbar na geladeira até o momento de sua análise por CLAE.

4.5.1.3. Determinação do resíduo seco.

Uma amostra de 5 ml volumetricamente medida foi pesada em pesa-filtro tarado e posteriormente seca em estufa a 105°C até peso constante. O peso do resíduo foi calculado em relação ao volume do extrato e por grama de droga vegetal.

4.5.1.4. Doseamento do teor de vicenina-2 nas soluções extrativas.

As análises de CLAE-UV foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu, bomba modelo LC6A, detector por ultra-violeta, e integrador modelo C-R6A, injetor manual Rheodyne modelo 7125 com alça dosadora de 20 µl, coluna analítica Shim-Pack ODC-18 (4,6 x 250 mm, 5 µm), pré-coluna RP-18 (Lichrospher® 100, 5 µm, 4 x 4 mm, Merck), utilizando-se MeOH e H₂O como solventes da fase móvel, ambos com 2% de ácido acético. Os solventes foram filtrados através de membrana (HVHP) e desaerada com fluxo e gás hélio. A fase móvel foi eluída em fluxo de 0,7 ml/min, em sistema de gradiente nas seguintes proporções e tempos: 0 - 3 minutos: 25% Metanol; 3 - 8 minutos: 40% de Metanol; 8 - 13 minutos: 40% de Metanol; 13 - 17 minutos: 50% de Metanol; 17 - 21 minutos: 50% de Metanol; 21 - 25 minutos: 25% de Metanol; 25 - 30 minutos: 25% de Metanol; 30 minutos: fim da corrida. A detecção foi realizada a 330 nm e a sensibilidade do detector foi de 0.05AUFS.

4.5.1.5. Validação da metodologia analítica.

Foram validados os parâmetros: precisão intermediária, repetibilidade, reprodutibilidade, limite de quantificação e linearidade da vicenina-2 isolada e presente no extrato.

Para validação da precisão intermediária e repetibilidade foi adotado o seguinte procedimento: uma mesma amostra do extrato preparado com os parâmetros do ponto central (1:2, 48 horas e 60 °GL) foi injetada 5 vezes nos dias 1,

2 e 3 de análise. O coeficiente de variação em cada um dos dias foi avaliado. O coeficiente de variação de até 15% foi aceito (ICH-4, 1996).

O limite de quantificação foi avaliado por meio da diluição do extrato do ponto central nas proporções de 1,0%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% e 0,1%. Variações de até 15% nos extratos foram aceitas (ICH-4, 1996).

Todos os cálculos de coeficiente de variação foram feitos utilizando o programa Excel®, já as análises de regressão foram feitas utilizando o programa Origin®.

A linearidade do flavonóide vicenina-2 foi avaliada de duas formas. Na primeira foram preparadas soluções com a vicenina-2 nas concentrações de 1 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml e 100 µg/ml. O solvente utilizado foi Metanol 50%. Após filtração, as amostras foram injetadas em triplicata. As variações foram calculadas e aceitou-se um máximo de 15%. Por meio da análise de regressão foi calculado o coeficiente de correlação (r).

Após a análise da linearidade em soluções-padrão, a linearidade do extrato também foi avaliada. Foram preparadas soluções de vicenina-2 utilizando com diluente o extrato do ponto central diluído a 5%. As concentrações preparadas foram as mesmas que para o padrão purificado. O solvente utilizado foi Metanol 50%. Após filtração, as amostras foram injetadas em triplicata. As variações foram calculadas e aceitou-se um máximo de 7%. Por meio da análise de regressão foi calculado o coeficiente de correlação (r).

Também foi analisado o comportamento de linearidade do extrato. Para isso o extrato no ponto central foi submetido às seguintes diluições: 0,5%, 1,0%, 5,0%, 10,0% e 25,0%. As leituras foram feitas tendo como marcador de linearidade a vicenina-2 dos extratos.

Para a análise da recuperação, uma solução extrativa de concentração conhecida de vicenina-2 foi adicionada em três diferentes concentrações do mesmo analito (3,84 µg/ml; 9,84 µg/ml e 43,4 µg/ml). A recuperação foi calculada de acordo com Equação 10.

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \cdot 100 \quad (10)$$

onde C_1 é a concentração determinada na amostra adicionada, C_2 é a concentração determinada na amostra não adicionada e C_3 é a concentração adicionada.

4.5.1.6. Análise estatística dos dados das soluções extrativas.

A resposta da concentração de vicianina-2 por grama de droga vegetal, em função das variáveis teor alcoólico do solvente, tempo de maceração e proporção planta:solvente foram avaliadas e os dados ajustados ao melhor modelo matemático que explique os dados. Foi utilizado o módulo de delineamento fatorial do software Statistica 5.0[®]. Os efeitos principais e suas interações foram analisadas utilizando o mesmo software e a partir desses dados novas condições experimentais foram propostas.

4.5.1.7. Determinação da presença de lactonas por infravermelho.

Para a determinação da presença de lactonas sesquiterpênicas no material vegetal e extrato líquido padronizado, as amostras foram preparadas da seguinte maneira:

Material vegetal : as folhas integras foram submetidas a extração com etanol 80° GL, por maceração simples, por 24 horas. Após esse procedimento, o material vegetal foi retirado do contato com o solvente e o extrato etanólico foi seco até a evaporação completa do solvente e analisada por espectroscopia de infravermelho.

Extrato seco padronizado: O extrato EET 20, produzido com etanol 20 °GL, de acordo com a metodologia descrita em 3.2., com 24 horas de maceração, e proporção droga:solvente de 1:5. O EET 20 foi seco por nebulização, de acordo com a metodologia descrita em 3.3. e analisada por espectroscopia de infravermelho.

As amostras secas foram depositadas sobre uma janela de NaCl (filme puro da amostra) e analisadas.

O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro de infra-vermelho, marca NICOLET, modelo: PROTÉGÉ 460. A presença da banda em 1760 cm^{-1} no espectro é indicativo da presença de lactona.

4.5.2. Secagem da solução extrativa líquida otimizada e sua caracterização.

4.5.2.1. Secagem da solução extrativa líquida otimizada.

Foram preparados dois lotes de dois litros de solução extrativa padronizada que foram desalcoolizadas por rotaevaporador a 70°C. O volume inicial foi recuperado por meio da adição de água, para evitar precipitações após o resfriamento. A essas soluções desalcoolizadas foram adicionadas o adjuvante tecnológico dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) e homogeneizadas em agitador magnético por uma hora.

Os teores do adjuvante em relação a 100 ml da solução extrativa estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Teor de adjuvante adicionado às soluções extrativas desalcoolizada de *L. ericoides*.

Constituintes	Dispersões	
	D1	D2
Solução extrativa desalcoolizada (RS*)	50	66,7
Aerosil® 200 (% em relação aos sólidos totais da dispersão)	50	33,3

*RS= concentração percentual em resíduo seco de cada solução extrativa

As dispersões D1 e D2 foram submetidas às mesmas condições de secagem, utilizando *spray dryer* (modelo LM-MSD 1.0, Labmac do Brasil Ltda.). As características operacionais são: torre de secagem com 50 cm de altura e 9 cm de diâmetro, com bico injetor pneumático de orifício de saída de 1,2 mm; fluxo de alimentação: 3,0 ml/min; vazão de ar comprimido de 15 L/min; temperatura de entrada: 145° C; temperatura de saída: 90° C; pressão do ar comprimido: 2kgf/cm².

Após a secagem as dispersões D1 e D2 foram denominadas ESN1 e ESN2, respectivamente. Também foi preparado um ESNbranco, que continha somente Aerosil® 200 em água.

4.5.2.2. Determinação da umidade residual

Cerca de 300 mg dos ESN1 e ESN2 foram exatamente pesados, em pesa-filtro, previamente tarado, e colocados em estufa por 2 horas, a 105°C. Após o resfriamento em dessecador e pesagem, o pesa-filtro foi colocado na estufa por mais 30 minutos. O procedimento foi repetido até atingir peso constante. Os resultados foram expressos em percentual ponderal, pela média de três determinações.

4.5.2.3. Determinação do rendimento do processo de secagem

O rendimento do processo de secagem foi calculado após a finalização da secagem de cada um dos ESN1 e 2. Os produtos obtidos foram pesados e tiveram seus pesos calculados percentualmente em relação ao teor de sólidos totais das dispersões D1 e D2, respectivamente, sendo esse peso assumido como 100% de rendimento.

4.5.2.4. Determinação do teor de vicenina-2 nos produtos secos por nebulização.

Para a determinação do teor de vicenina-2 nos produtos secos por nebulização (ESN1 e ESN2), foi empregado o mesmo sistema cromatográfico desenvolvido e validado para as soluções extrativas líquidas, descritas nos itens 5.2.4. e 5.2.5.

4.5.2.5. Avaliação do comportamento em atmosfera com umidade controlada (isotermas de sorção).

Cerca de 200 mg dos ESN1, ESN2 e ESNbranco foram mantidos por 14 dias em atmosfera com umidade de 32%, 62% e 96%. As amostras foram pesadas diariamente e o ganho ponderal final foi avaliado e plotado em gráfico. Para a obtenção dos ambientes úmidos foram utilizadas soluções saturadas de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), nitrito de sódio ($NaNO_3$) e cloreto de bário ($BaCl$) em dessecadores à temperatura ambiente, obtendo-se assim os teores de umidade de 32%, 62% e 96% respectivamente. Os dados expressam a média de três determinações.

4.5.2.6. Avaliação da atividade de água.

Para a determinação da atividade de água nos PSN1 e PSN2 foi utilizado o analisador de atividade de água AQUALAB/DECAGON CX-2. O aparelho foi calibrado utilizando água como referência da atividade de água $a_w = 1,000$. Os valores apresentados da atividade de água são referentes as respectivas médias aritméticas de 5 repetições. As temperaturas das leituras foram registradas.

4.5.2.7. Análise de tamanho de partícula por microscopia ótica.

Uma pequena quantidade do material foi homogeneamente espalhada em uma lâmina de vidro. Para isso o pó foi colocado em uma câmara de acrílico tampada contendo a lâmina, e golfos de ar comprimido foram lançados dentro da câmara.

A lâmina foi observada em microscópio ótico biolular (Lambda®) de luz incidente, acoplado a câmera colorida digital Samsung Scc-131, Studio DC10-Plus versão 1.05.

As imagens capturadas foram analisadas com auxílio do software Image J versão 1.34, de uso livre, disponibilizado pelo National Institute of Câncer com número de licença 39.21986737, da Pinnade Systems.

O software mediu o diâmetro médio das partículas e a análise de distribuição granulométrica foi realizada por meio do software Excel®.

4.5.2.8. Análise morfológica dos produtos secos por microscopia eletrônica de varredura.

As amostras foram cobertas com ouro, por 100 segundos, formando camada de 25 nm. Após a metalização as amostras foram observadas e analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (FEI® Quanta 200), em aumentos que variaram de 500 a 15.000 vezes, nos modos de elétron secundário (SE – *secondary elétron*) e por elétrons retroespalhados (BSE – *back scattering elétron*).

4.5.2.9. Análise estatísticas dos dados.

Todos os parâmetros medidos foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA ou o teste t de Student. Para isso foi utilizado o software Excel®.

4.5.3. Ensaio de atividade genotóxica dos extratos líquidos (Teste do cometa).

4.5.3.1. Cultura celular

Para este estudo, hepatoma de ratos (*Rattus norvegicus*), chamado de HTC (do inglês *hepatoma cells*), foram adquiridos do Banco de células do Rio de Janeiro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células cresceram em monocamadas aderentes em tubos de cultura de 2,5 ml para o teste do cometa (Teste SCGE, abreviatura do inglês “*single-cell gel electrophoresis*”). As células foram cultivadas em meio de cultura D-MEM-F12 (GibcoBRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco). O material foi cultivado a 37°C em estufa incubadora do tipo BOD. Sob essas condições, a duração de um ciclo celular é de 24 horas (RABELLO-GAY *et al.*, 1991). Um número fixo de células foram distribuídas nos frascos de cultura onde cresceram por no mínimo um ciclo celular completo antes de receber os tratamentos experimentais.

4.5.3.2. Teste do Cometa

Aproximadamente $0,5 \times 10^5$ células de hepatoma, previamente estabilizadas, foram distribuídas e incubadas por 24 h em tubos de cultura. As células foram tratadas com os extratos líquidos de folhas de *L. ericoides* EET 20 e EET 80 (produzidos com etanol 20° GL e 80° GL, respectivamente).

O agente indutor de dano utilizado foi metanosulfonato de metila (MMS), preparado na concentração final de 1,2 μ M em solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7,4, estéril. Células de hepatoma de rato HTC (fornecida pelo Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP), foram cultivadas em meio DMEN/F-12 (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal. O material foi acondicionado em estufa do tipo BOD a 37°C, por dois ciclos celulares, sendo que nessas condições o tempo de cada ciclo celular estabelecido é de 24 horas (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

Após 48 horas as células foram lavadas com 5 ml de solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , pH 7,4, estéril, para retirar resíduos e neutralizar o pH da cultura. Adicionou-se então 2,5 ml de meio fresco e as células foram submetidas aos

tratamentos com extrato líquido de *L. ericoides* prepadado com etanol 80 °GL, em proporção droga: solvente 1:3, com 24 horas de maceração.(EET 80), extrato líquido de *L. ericoides* prepadado com etanol 20 °GL, em proporção droga: solvente 1:5, com 24 horas de maceração (EET 20) e o extrato seco por nebulização, com 50% de adjuvante (ESN1), sendo que o PBS (pH 7,4) foi utilizado como controle negativo de dano e o MMS como controle positivo de dano seguindo a Tabela 6.

Após duas horas de incubação a 37°C, as células foram lavadas com 5 ml de PBS, por duas vezes. Então 2,5 ml de meio de cultura fresco foram adicionados aos frascos de cultura. O meio de cultura foi transferido para um tubo de centrifuga e as células foram lavadas novamente com PBS (5 ml) por mais duas vezes, retirando-se o excesso de tampão. A tripsina a 0,025% foi adicionada (0,3 ml) e mantido por 2 minutos para o desprendimento das células da parede do tubo e umas das outras. Em seguida a enzima foi inativada pelo mesmo meio de cultura que fora transferido para o tubo da centrifuga. A suspensão de células restante foi homogeneizada mecanicamente e centrifugada pó 5 minutos a 1500 rpm.

Tabela 6. Esquema de tratamento das células para o Teste do Cometa.

Tratamento	Quantidades adicionadas	
PBS (pH 7,4)		
MMS	1,2 µM	
EET 80	25 µl	50 µl
EET 20	50 µl	50 µl
ESN 1	10 mg	20 mg
Etanol 80 GL	25 µl	50 µl
Etanol 20 GL	50 µl	50 µl
Aerosil®	10 mg	20 mg

O sobrenadante foi retirado até que restasse um volume aproximado de 0,5 ml. As células foram novamente homogeneizadas até suspensão completa. Esse material foi adicionado em uma lâmina previamente preparada com agarose de ponto de fusão normal, 20 µl da suspensão celular e 120 µl de agarose de baixo

ponto de fusão a 37°C. A lâmina foi coberta com lamínula e permaneceram em geladeira a 4°C por 20 minutos. Após o resfriamento do gel de agarose, as lamínulas foram retiradas e em uma cuba protegida de luz, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise gelada, recém preparada a partir da solução estoque e mantidas em geladeira por mais 1 hora. A composição das soluções de lise pode ser observada na Tabela 7.

Tabela 7. Composição das soluções de lise utilizada no Teste do Cometa.

Solução de lise - estoque	
NaCl	146,1 g
EDTA titriplex	37,2 g
Tris	1,2 g
NaOH	8,0 g
Na ⁺ Laurilsarcosinato	10,0 g
Água destilada	890 ml
Solução de lise – para uso	
Triton X 100	1 ml
DMSO	10 ml
Solução de lise estoque	89 ml

Após a retirada da solução de lise, as lâminas foram colocadas horizontalmente na cuba de eletroforese, lado a lado, e todas com a parte esmerilhada voltada para o pólo negativo. O material foi submetido a eletroforese, utilizando tampão de eletroforese (pH>13) gelado (30 ml de NaOH 10N, 5 ml de EDTA 200 mM e água destilada qsp 1000 ml), até a cobertura das lâminas. O sistema foi mantido a 4°C, no escuro até o final.

A fonte elétrica foi ajustada para 25V e 300 mA, sendo que após o tempo de corrida de 20 minutos, as lâminas foram cobertas com tampão de neutralização (Tris 48,5 g e água destilada qsp 1000 ml) pH 7,5, por 5 minutos, repetindo-se a operação por 3 vezes. Ao final da neutralização, as lâminas foram secas ao ar e fixadas com

etanol absoluto, por 15 minutos. A coloração foi feita com 100 µl de brometo de etídio.

A análise de cada lâmina foi realizada imediatamente após a coloração, ao aumento de 400 vezes, em microscópio de fluorescência, utilizando-se filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm. Em cada lâmina foram observadas 100 células não sobrepostas e distribuídas ao acaso. Após a observação as células foram classificadas conforme o comprimento da cauda de DNA migrado. Baseado no critério estabelecido por Kobayashi *et al.* (1995), 100 núcleos foram examinados por lâmina e classificada como a seguir: classe 0 (ausência de cauda); classe 1 (cauda com tamanho até 1 vez maior que o diâmetro do núcleo do controle negativo); classe 2 (cauda com tamanho até 2 vezes maior que o diâmetro do núcleo); e classe 3 (cauda maior que 2 vezes do diâmetro do núcleo). Células apoptóticas não foram contadas (SPEIT *et al.*, 1996). Um total de 300 células foram analisadas por tratamento, e o escore médio do dano celular foi calculado pela multiplicação do número de células apresentando dano em cada classe (n) pelo valor da classe, seguindo a Equação 11:

$$Escore = \frac{(1 \cdot n_1) + (2 \cdot n_2) + (3 \cdot n_3)}{3} \quad (11)$$

4.5.4. Avaliação da atividade do extrato de *L. ericoides* sobre o Óxido Nítrico.

4.5.4.1. Obtenção de macrófagos

Camundongos Balb/c foram inoculados previamente com 1 mL de meio tioglicolato 3% (Synth). 72 horas após o inóculo, os camundongos foram anestesiados com éter e mortos por deslocamento cervical. Os macrófagos foram obtidos através de lavagem peritoneal com PBS gelado (5 ml). A população de macrófagos foi enriquecida através da adesão em placas de cultivo celular com 96 orifícios (Linbro, ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA) contendo 10^6 células por orifício. As células não aderentes foram removidas após 120 minutos de incubação e os macrófagos obtidos (2×10^5 células/orifício) foram cultivados na presença ou não de EET 20GL em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com soro fetal bovino

10% inativado (Cultilab), penicilina (100 U/mL) (RPMI completo) e estreptomicina (100µg/mL) mantido à 37°C em atmosfera rica em 5% de CO₂ por 24 horas.

4.5.4.2. Dosagem de óxido nítrico

Para a realização desse ensaios, os extratos etanólicos produzidos com etanol 80 °GL, proporção droga:solvente 1:3 e tempo de maceração de 24 horas (EET 80) e 20° GL, proporção droga:solvente 1:5 e tempo de maceração de 24 horas (EET 20) foram desalcoholizados e liofilizados. Os extratos liofilizados foram submetidos aos testes.

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada medindo o acúmulo de nitrito no sobrenadante das culturas celulares utilizando-se da reação colorimétrica de Griess, como descrito por Stuehr e Nathan (1989). O conteúdo de nitrito em duplicatas foi medido pela adição de 50µl de reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,05% N-(naphthyl-ethylenediamina em 2,5% de ácido fosfórico a temperatura ambiente) para 50 µl de amostras em placas de 96 orifícios (Costar). A leitura foi realizada 10 minutos mais tarde utilizando o comprimento de onda de 550 nm, comparando com curvas padrão de nitrato de sódio diluído em RPMI 1640 completo; a concentração mínima detectável foi de 1,5 µM.

4.5.5. Análise de toxicidade aguda dos extratos secos padronizados

A toxicidade aguda (DL₅₀) foi avaliada de acordo com o guia da Organização para o Desenvolvimento e Cooperação Econômicos (OECD, 2000). Cada extrato foi administrado a 3 camundongos, em dose única de 2000 mg/kg, por via oral (método de gavagem). Os animais foram previamente mantidos em jejum de 5 horas com água *ad libitum*, sendo reofertada a comida após 2 horas. A mortalidade foi monitorada por 14 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, J.S. Obtenção e avaliação de formas farmacêuticas semi-sólidas fitoterápicas contendo extrato de *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica brasileira). 2004. Tese (doutorado em Fármacos e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
2. ARTURSSON, P. Epithelial transport of drugs in cell culture.I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. **J. Pharm. Sci**, 79: 476 – 482, 1990.
3. ASANO, T.; ISHIHARA, K.; MOROTA, T.; TAKEDA, S.; ABURADA, M. Permeability of the flavonoids liquiritigenin and its glycosides in licorice roots and daidigenin, a hydrogenated metabolite of liquiritigenin, using human intestinal cell line Caco-2. **J. Ethnopharmacol.** 89 (2-3): 285-289,2003.
4. BARNES, S.; D'ALESSANDRO, T.; KIRK, M.C.; PATEL, R.P.; BOERSMA, B.J.; DARLEY-USMAR, V.M. The importance of *in vivo* metabolism polyphenols and their biological actions. In: Meskin, M.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. CRC Press. Boca Raton, pp 51 – 60, 2004
5. BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: Propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química nova** 28 (6): 1046 – 1054, 2005.
6. BEIGI, F.; YANG, Q. and LUNDAHL, P. Immobilized-liposome chromatographic analysis of drug partitioning into lipid bilayers. **J. Chromat. A** v. 704: 315 – 321, 1995.
7. BERMEJO, M.; AVDEEF, A.; RUIZ, A.; NALDA, R.; RUELL, J.A.; TSINMAN, O.; GONZÁLEZ, I.; FERNÁNDEZ, C.; SÁNCHEZ, G.; GARRIGUES, T.M.; MERINO, V. PAMPA—a drug absorption in vitro model. 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. **Eur. J. Pharm. Sci.** 21:429-444, 2004.
8. BERMÚDEZ-SALDAÑA, J.M.; ESCUDER-GILABERT, L.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J.; VILLANUEVA-CAMANÁS, R.M.; SAGRADO, S. Chromatographic retention–activity relationships for prediction of the toxicity pH-dependence of phenols. **Chemosphere** 69:108-117, 2007.
9. BERMÚDEZ-SALDAÑA, J.M.; ESCUDER-GILABERT, L.; VILLANUEVA-CAMANÁS, R.M.; MEDINA-HERNANDEZ, M.J.; SAGRADO, S. Emerging approaches to estimate retention factors in high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A** 1094: 24-33, 2005.
10. BI, S.; DING, L.; TIAN, Y.; SONG, D.; ZHOU, X.; LIU, X.; ZHANG, H. Investigation of the interaction between flavonóides and human serum albumin. **J. Mol. Structure** 703 (1-3): 37-45, 2004.

11. BIBER, A. Pharmacokinetics of Ginkgo biloba extracts. **Pharmacopsychiatry**, 36 suppl 1:S32-S37, 2003.
12. BIRT, D.F.; WANG, W.; PAIVA, N.; AU, A.; CHUNG, C.; SCHIMMITT, L and JIANG, Y. Cancer Prevention by phytochemicals, modulation of cell cycle. In: Meskin, M.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. CRC Press. Boca Raton, 2004, pp 61 - 77.
13. BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W.R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudo villosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology** 26:671-676, 1998.
14. BORSATO, M.L.C.; GRAEL, C.F.F.; SOUZA, G.E.P. e LOPES, N.P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochem.** 55:809-813, 2000.
15. BRASIL, 1998. Política Nacional de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde.
16. BRASIL, 2004. Resolução de diretoria colegiada nº 48 março de 2004. Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
17. BRASIL, 2006. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Brasília. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
18. BREINHOLT, V.M.; OFFORD, E.A.; BROUWE, C.; NIELSEN, S.E.; BROSEN, K.; FRIEDBERG, T. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. **Food and Chemical Toxicology** 40: 609-616, 2002.
19. BURIM, R.V.; CANALLE, R.; LOPES, J.L.C.; VICKNEWSKI, W.; TAKAHASHI, C.S. Genotoxic action of sesquiterpene lactone centraherin of mammalian cells in vitro and in vivo. **Teratog. Carcinog. and Mutagen.** 21: 283-293, 2001.
20. BURNS S.T., AGBODJAN, A.A.; KHALEDI M.G. Characterization of solcation properties of lipid bilayer membranes in liposome electrokinetic chromatography. **J. Chrom. A.** 973: 167-176, 2002.
21. CAI, Y.; SHERRY CHOW, H-H. Pharmacokinetic and bioavailability of green tea catechins. In: Meskin, M.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. CRC Press. Boca Raton, pp 35-50, 2004.
22. CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.** V 33(2) 179:189, 2000.

23. CARVALHO, E.L.S. Desenvolvimento de extrato seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia* Martius ex. (espinheira santa). 1997. Dissertação (Mestrado em Farmácia)_Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
24. CERQUEIRA, M.B.S.; SOUZA, J.T.; JUNIOR, R.A.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. **Ciência e Cultura** 39(5/6): 551-553, 1987.
25. CHAN, E.C.Y.; TAN, W.L.; HO, P.C.; FANG, L.J. Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physicochemical descriptors. **J. Chromatogr. A** 1072: 159-168, 2005.
26. CHANG, Q.; ZUO, Z.; CHOW, M.S.S.; HO, W.K.K. Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 59: 549-555, 2005.
27. COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology** V. 26, 249 – 261, 2004.
28. CORTI, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; ZERROUK, N.; MURA, P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability. **Eur. J. Pharm. Sci.** 27:354-362, 2006.
29. CRESPIY, V., MORAND, C.; BESSON, C.; MANACH, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 618-621, 2002.
30. 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 Lett.** 468 (2-3), 166-170, 2000.
31. DE SOUZA, K.C.B. Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Marcela). 2002. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas). 2002. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
32. DE SOUZA, K.C.B. Desenvolvimento de metodologia analítica e tecnológica na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade flavicarpa. 1997. Dissertação (Mestrado em Farmácia)_Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
33. DE SOUZA, T.P.; HOLZSCHUH, M.H.; LIONÇO M.I.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; PETROVICK, P.R. Validation of a LC method for analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *phyllanthus niruri* aerial parts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.30 p. 351-356, 2002a.

34. DOQ-CGCRE-008. **Documento sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial. 2002.
35. DOS SANTOS, M. D.; CHEN, G.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P.; LANTZ, R.C. Effects of the natural products vicienin-2 and caffeoylquinic acid derivatives on inflammatory mediators production. 2006 (submetido).
36. DOS SANTOS, M.D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **J. Ethnopharm.** v. 96: 545-549, 2005.
37. EISENBERG, D.M.; DAVID, R.B.; ETTNER, S.L. ET ALL. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997. **JAMA** v. 280:1569-75, 1998.
38. EL-MOUSALLAMY, A.M.D.; HUSSEIN, S.A.M.; MERFORT, I.; NAWWAR, A.M. Unusual phenolic glycosides from *Cotoneaster orbicularis*. **Phytochem.** 53: 699 – 704, 2000.
39. ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M.C. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. **Journal of Chromatography A**, v. 897, p. 161-170.
40. ESCUDER-GILABERT L., MARTÍN-BIOSCA Y., VILLANUEVA-CAMAÑAS R.M., MEDINA-HERNÁNDEZ M.J., SAGRADO S. The chromatographic quantification of hydrophobicity using micellar mobile phases. **Chromatographia** 50(5-6): 325-332, 1999.
41. ESCUDER-GILABERT L., MOLERO-MONFORT M., VILLANUEVA-CAMAÑAS R.M., SAGRADO S., MEDINA-HERNÁNDEZ M.J. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. **Journal of Chromatography B** 807(2): 193-201, 2004a.
42. ESCUDER-GILABERT, L. **Estimación de la hidrofobicidad de compuestos orgánicos mediante cromatografía líquida micelar. Implicaciones en los procesos biológicos de reparto**. Tesis. Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, 2005.
43. ESCUDER-GILABERT, L.; MARTÍNEZ-PLA, J.J.; SAGRADO, S.; VILANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; MEDINA-HERNANDEZ, M.J. Bipartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. **J. Chromat. B** 797: 21 – 35, 2003.
44. FAMBUENA, M.J.M. **Absorción gastrointestinal de fármacos inhibidores de la proteasa**. Tesis (doctorado en Farmacia). Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Espana, 2003.

45. FARIAS, MARENI Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. IN: **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. Ed. UFRGS e UFSC., 1999. Pag 197-220.
46. FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4. ed., São Paulo: Atheneu, 1988.
47. FERREIRA, M.M.C. Multivariate QSAR. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 13(6): 742-753, 2002.
48. FERRERES, F.; SILVA, B.M.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). **Phytochemical Analysis**, 14 (6):352 – 359, 2003.
49. FESTING, M.F.W.; BAUMANS, V.; COMBES, R.D.; HALDER, M.; HENDRIKSEN, C.F.M.; HOWARD, B.R.; LOVELL, D.P.; MOORE, G.J.; OVEREND, P.; WILSON, M.S. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. The report and recommendations of ECVAM Workshop 29. **Alternatives to Laboratory Animals** 26:283-301, 1998.
50. FLATEN, G.E.; DHANIKULA, A.B.; LUTHMAN, K.; BRANDL, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion. **Eur. J. Pharm. Sci.** 27: 80:90, 2006.
51. FOLHA DE LONDRINA. Fitoterápicos: setor movimenta US\$ 400 mi no BR. 06/10/2003.
52. GEE, J.M.; DUPONT, M.S.; RHODES, M.J.C.; JOHNSON, I.T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Rad. Biol. Med.** V 25: 19-25, 1998.
53. 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. **J. Nutr.** 130:2765-2771, 2000.
54. GIL-IZQUIERDO, A.; GIL, M.I.; TOMAS-BARBERAN, F.A. In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. **J. Agric. Food Chem.** 49(2):1035-1041, 2001.
55. GOBBO NETO, L. **Estudo fitoquímico do extrato polar de *Lychnophora ericoides* Mart. E avaliação de sua atividade antiinflamatória**. 2003. Dissertação (mestrado em Fármaco e Medicamentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.
56. _____ **Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais**. 2007. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

57. GOBBO NETO, L.; SANTOS, M. D.; KANASHIRO, A; ALMEIDA, M. C.; VALIM, Y. M. L.; LOPES, J. L. C.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. . Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosyflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, 71:3-6, 2005.
58. GRAEFE, E.U.; DERENDORF, H. and VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quecetin in humans. *Intern. J. Clin. Pharmacology and Therapeutics*. V 37(5): 219-233, 1999.
59. GRAEFE, E.U.; WITTIG, J.; MULLER, S.; RIETHLING, A.K.; UEHLEKE, B.; DREWELOW, B.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; DERENDORF, H. and VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quecetin glycosides in humans. **J. Clin. Pharmacol.** V 41: 492-499, 2001.
60. GRIPPO, A.A.; HALL, I.H.; KIYOKAWA, H.; MURAOKA, O.; SHEN, Y.C.; LEE, K.H. The cytotoxicity of helenalin, its mono and difunctional esters, and related sesquiterpene lactones in murine and human tumor cells. **Drug Des Discov** 8:191–206, 1992.
61. GROVER, M.; SINGH, B.; BAKSHI, M.; SINGH, S. Quantitative structure-property relationships in pharmaceutical research-Part 1. **Pharmaceutical Science & Technology Today**. 3(1): 28-35, 2000.
62. GULBBELS-VAN- HAL, W.M.L.G.; BLAAUBOER, B.J.; BARENTSEN. H.M.; HOITINK, M.A; MEERTS, I.A T.M.; VAN DER HOEVEN, J.C.M. Na alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 42: 284-295, 2005.
63. HANSCH, C. (Ed.) **Comprehensive medicinal chemistry. Quantitative drug design**. V. 4. Pergamon Press, Oxford, 1990.
64. HEARD, C.M.; JOHNSON, S.; MOSS, G.; THOMAS, C.P. *In vitro* transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia Cupana*. **Int. J. Pharm.** 317: 26-31, 2006.
65. HÉBERGER, K. Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. **J. Chromat. A**. 1158(1-2): 273-305, 2007.
66. HEILMANN, J. e MERFORT, I. Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. **Pharmazie in unserer Zeit** N. 2, 27 Jahrg., p. 58: 65, 1998a.
67. _____ Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. **Pharmazie in unserer Zeit** N. 4, 27 Jahrg., p. 173-183, 1998b.

68. HELDMAN, D.H.; LUND, D.B. **Handbook of Food Engineering**. Marcel Dekker, Inc., New York, 1992.
69. HIDALGO, I.J. Culture intestinal Epithelial Cell. In: Borchardt, R.T.; Smith, P.L.; Wilson, G. **Models for assessing drug absorption & metabolism**. Plenum Press, New York: p. 35 – 50, 1996.
70. HODEK, P.; TREVIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compound interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions** 139: 1 – 21, 2002.
71. HOLLMAN, PCH; BIJSMAN, M.N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN, E.P.; DE VRIES, J.H.; M.J.B.; KATAN, M.B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids glycosides in man. **Free Radic. Res.** 31: 569-573, 1999.
72. ICH-4- International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2B: **Validation of analytical procedures: Methodology**, 1996.
73. JAY, J.M. **Modern food microbiology**. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1970, 328 p.
74. JESUS-COSTA, R.; DINIZ, A.; MANTOVANI, M.S.; JORDÃO, B.Q. *In vitro* study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the Comet and Micronucleus assays. **J. Ethnopharm.**, 2007. (artigo enviado).
75. KALDAS, M.I.; WALLE, U.K.; VAN DER WOUDE, H.; MCMILLAN, J.M.; WALLE, T. Covalent Binding of the Flavonoid Quercetin to Human Serum Albumin **J. Agric. Food Chem.** 53: 4194-4197, 2005.
76. KALISZAN R. Chromatography and capillary electrophoresis in modelling the basic processes of drug action. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**. 18(6): 400-410, 1999.
77. KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Rev. Food. Sci. Nutr.**, 44: 453-464, 2004.
78. KAREL, M. Water activity and food preservation. In: KAREL, M.; FENNEMA, O.R.; LUND, D.B. **Physical principles of food preservation. V 2** Marcel Dekker, Inc. New York, 1975, 474 p.
79. KEINAMEN, M.; JULKUNEN-TIITTO, R. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. **Journal of Chromatography A**, v. 793, p. 370-377, 1998.
80. KLOTZ, I.M.; HUNSTON, D.L. Properties of Graphical Representations of Multiple Classes of Binding Sites. **Biochem.** 10 (16): 3065-3069, 1971.

81. KOBAYASHI, H., SUGIYAMA, C., MORIKAWA, Y., HAYASHI, M., SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communication** 2, v. 3, 103-115, 1995.
82. KONISHI., Transepithelial transport of fluorescein in Caco-2 cell monolayers and use of such transport in in vitro evaluation of phenolic acid availability. **Biosci Biotechnol. Biochem.**, 66(11):2449-2457, 2002.
83. KRÓL, W.; CZUBA, Z.P.; THREADGILL, M.D.; CUNNINGHAM, B.D.M.; PIETSZ, G. Inhibition of nitric oxide (NO) production in murine macrophages by flavones. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 1031-1035, 1995.
84. LE FERREC, E; CHESNE, C.; ARTUSSON, P.; BRAYDEN, D.; FABRE, G. GIRES, P.; GUILLOU, F.; ROUSSET, M.; RUBAS, W.; SCARINO, M.L. *In vitro* models of the intestinal barriers. Disponível na internet <[altweb.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam46.htm](http://web.jhsph.edu/publications/ECVAM/ecvam46.htm)> acessado em 25 de outubro de 2007.
85. LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O. E LIMA NOGUEIRA, T.C.M. Farmacologia e Toxicologia de produtos naturais. IN: **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. Ed. UFRGS e UFSC. Pag 247-262, 2004.
86. LEE, K.H., HUANG, E.S.; PIANTADOSI, C., PAGANO, J.S.; GEISSMAN, T.A. Cytotoxicity of sesquiterpene lactones. **Cancer Res** 31:1649-1654, 1971.
87. LEE, K.H.; HALL, I.H.; MAR, E.C.; STARNES, C.O.; ELGEBALY, S.A.; WADDELL, T.G.; HADGRAFT, R.I.; RUFFNER, C.G.; WEIDNER, I. Sesquiterpene antitumor agents: inhibitors of cellular metabolism. **Science** 196: 533-536, 1977.
88. LEMAR, K.M.; TURNER, M.P.; LLOYD, D. Garlic (*Allium sativum*) as an anti-Candida agent: a comparison of efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 93, p. 398-405, 2002.
89. LINDEN, R.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R., BASSANI, V.L. Response surface analysis applied to the preparations of tablets containing a high concentration of vegetable spray-dried extract. **Drug Development and Industry Pharmacy**, v.26, n.4, p. 441-446, 2000.
90. LIST, P.H.; SCHIMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. London: Heyden, 1989. 374p.
91. LIU, Y.; HU, M. Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model. **Drug Metab. Dispos.** 30:370-377, 2002.

92. MARCHART, E. and KOPP, B. Capillary electrophoretic separation and quantification of flavone-O- and C-glycosides in *Achillea setacea* W. Et K. **J. Chromat. B**, 792: 363 – 368, 2003.
93. MARTÍN-BIOSCA, Y.; MOLERO-MONFORT, M.; SAGRADO, S.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J. Rapid in vitro test to predict ocular tissue permeability based on biopartitioning micellar chromatography. **Eur. J. Pharm. Sci.** 20: 209 – 216, 2003.
94. MARTÍNEZ-PLÁ, M.A., MARTÍN, Y., SAGRADO, S., VILLANUEVA, R.M., MEDINA, M.J. High-throughput capillary electrophoresis frontal analysis method for the study of drug interactions with human serum albumin at near-physiological conditions. **Electrophoresis** 25: 3176-3185, 2004.
95. _____ Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability. **Biomed. Chromatogr.** 17: 530 – 537, 2003.
96. MARTINEZ-GOMEZ, M.A.; SAGRADO, S.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; MEDINA-HERNANDEZ, M.J. Characterization of basic drug-human serum protein interactions by capillary electrophoresis **Electrophoresis** 27 (17): 3410-3419, 2006.
97. MASTERS, K. **Spray Drying**. 2nd.ed. New York: John Wiley, 1976. 384f.
98. MATSUMOTO, S.; IWASHINA, T.; KITAJIMA, J.; MITSUTA, S. Evidence by flavonoid markers of four natural hybrids among *Asplenium normale* and related species (Aspleniaceae) in Japan. **Biochem. Syst. Ecol.**, 31: 51-58, 2003.
99. MESKIN, M.; BIDLACK, W.R.; DAVIES, A.J.; LEWIS, D.S.; RANDOLPH, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. CRC Press. Boca Raton, pp 21 – 33, 2004.
100. MOLERO-MONFORT, M.; ESCUDER-GILABERT, L.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; SAGRADO, S.; MEDINA-HERNANDEZ, M.J. Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption.. **J. Chromatogr. B** 753: 225 - 236, 2001.
101. MOLERO-MONFORT, M.; MARTÍN-BIOSCA, Y.; SAGRADO, S.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; MEDINA-HERNANDEZ, M.J. Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport. **J. Chromatogr. A** 870: 1 – 11, 2000.
102. MUROTA, K.; SHIMIZU, S.; MIYAMOTO, S.; IZUMI, T.; OBATA, A.; KIKUCHI, M.; TERAOKA, J. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: Comparison of isoflavonoids and flavonoids. **J. Nutr.** 132: 1956-1961, 2002.
103. NASAL, A.; Sznitowska, M.; Buciński, A.; Kaliszan, R. Hydrophobicity parameter from high-performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationship to bioactivity. **J. Chromatogr. A** 692: 83-89, 1995.

104. NEUE, U.D. **HPLC COLUMNS – theory, technology and practice**. Wiley-VCH. New York. 393p. 1997.
105. NEWTON, C.G.; LOCKEY, P.M. The importance of early pharmacokinetics. **Current drug discovery**. April, p. 33-36, 2003. Disponível da internet <www.currentdrugdiscovery.com> Acessado em 2/10/2007.
106. NISHI, H. Pharmaceutical applications of micelles in chromatography and eletrophoresis. **J. Chromatogr. A** 780: 243 - 264, 1997.
107. OECD. OECD guideline for testing of chemicals number 423 - Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. 2001.
108. OLTJOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid and cafeic acid are absorbed in humans. **J. Nutr**, 131: 66-71, 2001.
109. PADE, V. and STAVCHANSKY, S. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. **J. Pharm. Sciences** v. 87(12): 1604-1607, 1998.
110. PAPADOPOULOU, A.; GREEN, R.J.; FRASIER, R.A. Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study. **J. Agric. Food Chem.** 53: 158-163, 2005.
111. PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 296: 631-636, 2002.
112. PETRY, R.D. **Desenvolvimento e validação de métodos de doseamento de flavonóides de Passiflora edulis Sims. (maracujá)**. 1999. 167p. Dissertação (Mestrado em Farmácia)_Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
113. PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochem Syst Ecol** 14:255–281, 1986.
114. PIDGEON, C. Immobilized artificial membrane. **U.S. Patent** 4,931,498, 1990^a.
115. _____ Method for solid membrane mimetics. **U.S. Patent** 4,927,879, 1990^b.
116. PRIOR, R.L. Absorption and metabolismo f anthocyanins: Potential health effects. In: Meskin, M.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. CRC Press. Boca Raton, pp 1-20, 2004.
117. RABELLO GAY, M. N.; RODRÍGUEZ, M. A. R.; MONTELEONE NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP, p. 96, 1991.

118. RAHMAN, K.; KRENN, L.; KOPP, B.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; MAYER, K.K.; KUBELKA, W. Isoscoparin-2''-O-glucoside from *Passiphora incarnata*. **Phytochem.** 45 (5): 1093-1094, 1997.
119. RAWEL, H.M.; FREY, S.K.; MEIDTNER, K.; KROLI, J.; SCHWEIGERT, F. Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. **J. Mol. Nutr. Food Res.** 50: 705-713, 2006.
120. SAKAMOTO, H.T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E.E.; STARK, C.B.W.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Sesquiterpenes lactones from *Lychnophora ericoides*. **J. Nat. Prod.** V. 66, p. 693-695, 2003.
121. SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V. and ADAM, A. Differential stimulation of macrophage for tumor cytotasys and monokine production. **Cancer Letter** v. 64, p. 187-194, 1992.
122. SCHREIBER, A.A.; FREI, K.; LICHTENSTEIGER, W. and SCHLUMPF, M. Alteration in interleukin-6 production by LPS and Com-A stimulated mixed splenocytes, spleen macrophages and lymphocytes in prenatally diazepam-exposed rat. **Agents actions** v. 39, p. 166-173, 1993.
123. SEMIR, J. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniae: Compositae). Campinas, 1991. 515p. Tese (Doutorado) – IB-UNICAMP.
124. SHARAF, M.; EL-ANSARI, M.A.; SALEH, N.A.M. Flavone glycosides from *Mentha longifolia*. **Fitoterapia**, 70: 478 – 483, 1999.
125. SHAW, F.S. Spray Drying as an alternative granulation technique. In: **Handbook of pharmaceutical granulation technology**. Marcel Dekker. New York, 1997.
126. SICILIANO, T.; BADER, A.; VASSALLO, A.; BRACA, A.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Secondary metabolites from *Ballota undulata* (Lamiaceae). **Biochem. System. Ecol.**, 33: 341 – 351, 2005.
127. SIU PONG, NG; WONG, K.Y.; ZHANG, L.; ZUO, Z. Evaluation of the first-pass glucuronidation of selected flavones in gut by Caco-2 monolayer model. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, 8(1):1-9, 2005.
128. SOARES, L.A.L. **Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. – Euphorbiaceae (Quebra-pedra)**. 1997. Dissertação (Mestrado em Farmácia)_Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
129. SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R. E BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. IN: **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. Ed. UFRGS e UFSC., 1999. Pag 221-258.

130. SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters** 88: 91–98, 1996.
131. TAILLARDAT-BERTSCHINGER, A.; GALLAND, A.; CARRUPT, P.A.; TESTA, B. Immobilized artificial membrane liquid chromatography: proposed guidelines for technical optimization of retention measurements. **J. Chromat. A**, 953: 39 – 53, 2002^b.
132. TAILLARDAT-BERTSCHINGER, A.; MARTINET, C.A.M.; CARRUPT, P.A.; REIST, M.; CARON, G.; FRUTTERO, R.; TESTA, B. Molecular factors influencing retention on immobilized artificial membrane (IAM) compared to partitioning in liposomes and n-octanol. **Pharm. Res.**, 19 (6): 729 – 737, 2002^a.
133. TEIXEIRA, H. F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyroclines satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. 1996. 146p. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.
134. THOMAS, G. **Química Medicinal – Uma Introdução**. Ed. Guanabara-Koogan, 413 p. 2003.
135. UMA DEVI, P.; GANASOUNDARI, A.; VRINDA, B.; SRINIVASAN, K.K.; UNNIKRISHNAN, M.K. Radiation Protection by the Ocimum Flavonoids Orientin and Vicenin: Mechanisms of Action. **Radiation Research**. 154: 455-460, 2000.
136. VAIDYANATHAN, J. and WALLE, T. Transport and metabolism of tea flavonoid (-)-Epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. **Pharmaceutical Research**, v. 18(10):1420-1425, 2001.
137. VASCONCELLOS, M.C.; ROSA, R.M.; MACHADO, M.S.; VILELLA, I.V.; CROTTI, A.E.M.; LOPES, J.L.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; LOPES, N.P.; COSTA-LOTUFO, L.C.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of 15-deoxygoyazensolide in bacteria and yeast. **Mutation Research** v. 631: 16-25, 2007.
138. WALLE, T. and WALLE, U.K. The β -D-glucoside and sodium-dependent glucose transporter 1 (SGL1) – inhibitor phloridzin is transported by both SGLT1 and multidrug resistance-associated proteins $\frac{1}{2}$. **Drug Metab. Dispos.** v 31 (11): 1288 – 1291, 2003.
139. WALLE, T.; OTAKE, H.; WALLE, U.K.; and Wilson, F.A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. **J. Nutr.**, 130, 2658-2661, 2000.

140. WENDEL, S.; ÇELIC, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de Spray-drying. **Pharmaceutical Technology** (edição brasileira) p. 31-45, 1998.
141. WETERINGS, P.J.J.M., VAN ERP, Y.H.M. Alternative methods in toxicology. In: Goldberg, A.M. (Ed.), **Vitro toxicology— Approaches to Validation**, Vol. V. M.A. Liebert, New York, USA, 1987.
142. 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**. CRC Press. Boca Raton, pp 21 – 33, 2004.
143. YANG, B.; KOTANI, A.; ARAI, K.; KUSU, F. Estimation of antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. **Anal. Sci.** 17: 599-604, 2001.
144. YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - fact or myth. **Pharm. Research** v. 14(6):763-766, 1997.
145. YEN, T.E.; Agatonovic-Kustrin, S.; Evans, A.M.; Nation, R.L.; Ryandd, J. Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors. **J. Pharm. Biom. Anal.** V. 38: 372 – 478, 2005.
146. 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. **J. Pharm. Biom. Anal.** 44: 802-806, 2007a.
147. YING, X.; LU, X.; SUN, X.; LI, X.; LI, F. Determination of vitexin-2''-O-rhamnoside in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **Talanta** 72:1500-1506, 2007b.
148. YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V. (Org). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Ed. Univali, 2007, pp. 9-32.
149. ZHOU, S.; KOH, H.; GAO, Y.; GONG, Z.; LEE, E.J.D. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. **Life sciences** 74: 935-968, 2004.
150. ZHU, M.; CHEN, Y.; LI, R.C. Oral absorption and bioavalilability of tea catechins. **Planta Med** 66: 444-447, 2000.
151. ZUANAZZI, J.A.S. e MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J,C,P.; Mentz, L.A. e Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Ed. da UFSC/UFRGS editora, Florianópolis/Porto Alegre, 1102p, 2004.

8. ANEXO

Permeability Profile Estimation of Flavonoids and other Phenolic Compounds by Biopartitioning Micellar Capillary Chromatography

ANDRÉA DINIZ,^{†,§,#} LAURA ESCUDER-GILABERT,[#] NORBERTO P. LOPES,[§]
LEONARDO GOBBO-NETO,[§] ROSA MARÍA VILLANUEVA-CAMAÑAS,[#]
SALVADOR SAGRADO,[#] AND MARÍA JOSÉ MEDINA-HERNÁNDEZ^{*,#}

Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Café s/n, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil; and Departamento de Química Analítica, Universitat de València, C/ Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

This paper points out the usefulness of biopartitioning micellar chromatography (BMC) using capillary columns as a high-throughput primary screening tool providing key information about the oral absorption, skin permeability, and brain–blood distribution coefficients of 15 polyphenols (6 flavones, 2 flavonols, a flavanone, 2 flavan-3-ols, 3 phenolic acids, and a phloroglucinol) in a simple and economical way. For the compounds studied, except vicenin-2, rutin, chlorogenic acid, *p*-hydroxycinnamic acid, and 4-hydroxybenzoic acid, maximal oral absorption (>90%) can be expected, if there are not solubility problems or metabolic processes. On the other hand, the most retained compounds in BMC, that is, 5-hydroxyflavone, flavone, and flavanone, show the highest brain–blood distribution coefficients and skin permeability coefficients.

KEYWORDS: Biopartitioning micellar capillary chromatography; flavonoids; polyphenolic compounds; absorption percentage; skin permeation; blood–brain permeation

INTRODUCTION

The phenolic acids and flavonoids belonging to the polyphenolic group are secondary plant metabolites. These compounds are present in vegetables and fruits, such as beverages, foods, and some phytomedicines, and their pharmacological activities have received a great deal of attention (1). Their beneficial effects are the antiinflammatory, anticarcinogenic, and antimutagenic activities, protective against cardiovascular diseases and antioxidant action, among others (2).

Relatively few studies have appeared in the literature about the pharmacokinetic profile of polyphenolic compounds (3), but defining their pharmacokinetic characteristics is necessary to interpret in vivo biological data (4). For this purpose, predictive models can be an alternative or a complementary tool to conventional assays that can reduce the use of animal experimentation, the cost, and save time. Among the alternative methods to estimate biological or pharmacological properties of compounds without involving animals or volunteers, quan-

titative structure–activity relationships (QSAR) are the most used. For polyphenolic compounds, there are some studies relating distinct substitution patterns to biological or pharmacological activities such as the inhibition of multidrug resistant proteins 1 and 2 for flavonoids (5), antioxidant potential (6–10), estrogen-like activities (11, 12), and union to GABA (A) receptors (13). Some studies have been developed using Caco-2 cell lines and rat intestinal tissue to estimate permeability factor (P_{app}) and absorption percentage (%A) for natural products (3, 14–16).

Chromatography is a powerful technique for the measurement of physicochemical parameters. Therefore, the chromatographic retention factor (expressed as k or its logarithmic form) obtained under adequate experimental conditions has proven to be a good surrogate to $\log P$ (logarithm of *n*-octanol–water partition coefficient, the most used parameter in QSAR studies) because of its higher accuracy and easier experimental performance. The use of retention as a predictor variable of biological activities has generated the designated quantitative retention–activity relationships (QRAR) (17). In this field, our research group has proposed biopartitioning micellar chromatography (BMC), which uses C_{18} stationary phases and polyoxyethylene (23) lauryl ether (Brij35) micellar mobile phases at near physiological conditions. The retention factor (k or $\log k$) of drugs obtained in BMC has been successfully applied to construct QRAR

* Author to whom correspondence should be addressed (telephone +34-96 354 58 99; fax +34-96 354 49 53; e-mail maria.j.medina@uv.es).

[†] Universidade Estadual de Londrina.

[§] Universidade de São Paulo.

[#] Universitat de València.

Table 1. Structure, Molecular Weight (MW), Octanol–Water Partition Coefficient (log *P*), Melting Point (MP), Water Solubility (WS), and Acidity Constants (*pK_a*) of the Compounds Studied

Compounds	N	Structure	MW	logP ^a	MP(°C) ^b	WS (mg/L) ^a	<i>pK_a</i> ^c
<i>Flavones</i>							
5-Hydroxyflavone	1		238.25	4.30	151.33	22.2	-
7-Hydroxyflavone	2		238.25	3.62	247	84.6	-
Apigenin	3		270.24	3.02 2.36 ^d	347.5	183	-
Flavone	4		222.25	3.56	100	30.5	-
Vicenin-2	5		594.28	-4.31	349.84 ^a	1000000	-
Vitexin	6		432.39	0.32	307.42	3919	-
<i>Flavonols</i>							
Quercetin	7		302.24	1.48 1.15 ^d	316.5	2472	-
Rutin	8		610.53	-2.02 -1.87 ^d	125	27600	-
Flavanone	9		224.26	3.14	77	68	-
<i>Flavan-3-ols</i>							
(+)-Catechin	10		290.28	1.18 0.86 ^d	347.5	63000	-
(-)-Epicatechin	11		290.28	1.18 0.86 ^d	214	63000	-
<i>Phenolic acids</i>							
Chlorogenic acid	12		354.32	-1.01	247.83	40000	2.66
<i>p</i> -Hydroxycinnamic acid	13		164.16	1.79	211.5	18300	4.64
4-Hydroxybenzoic Acid	14		138.12	1.58	214.5	14500	4.54
<i>Other phenols</i>							
Phloroglucinol	15		126.11	0.1	218.5	264000	8.45

^{a,b} Data taken from software EPIWIN (v. 3.12, ©2000, U.S. Environmental Protection Agency version) (a, estimated values; b, experimental values). ^c PhysProp Database <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>. ^d Reference (36).

Figure 1. (A) Retention factors in capillary versus standard analytical column relationship. (B) Validation plot of the model: (○) fitted data; (+) cross-validated data. Solid line represents the theoretical line.

models for describing and predicting the drug pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of therapeutic families (18, 19) and also to obtain general models to evaluate the xenobiotic permeability profile through different biological barriers such as the intestinal tract, skin, ocular tissue, and blood–brain barrier (20–25).

The success of BMC for these estimations can be attributed to similarities between the chromatographic system and biological barriers—extracellular fluid (19). The retention of a compound in this chromatographic system is mainly governed by its hydrophobic and electronic properties and, to a lesser extent, its steric properties; these features of compounds also determine its passive diffusion across cell membranes. However, BMC has some drawbacks; it may fail when compounds are actively transported or transported by paracellular pathway or when metabolic processes are involved.

The main aim of the present study is to estimate the oral absorption, skin permeability, and brain–blood distribution coefficients of flavonoids and other phenolic compounds from their BMC retention in capillary columns using previously developed and validated QRAR models constructed from BMC retention in standard columns. For this purpose, the adequate

transformation from the experimental capillary retention data to estimated retention data in standard columns is intended.

The polyphenolic compounds studied include the flavones 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, apigenin, flavone, vicenin-2, and vitexin; the flavonols quercetin and rutin; the flavanone; the flavan-3-ols (+)-catechin and (–)-epicatechin; the phenolic acids chlorogenic acid, *p*-hydroxycinnamic acid and 4-hydroxybenzoic acid; and phloroglucinol.

MATERIALS AND METHODS

Instruments and Measurements. An Agilent 1100 series chromatograph with a binary capillary pump, an UV–visible diode array detector, a column thermostat, and a microautosampler (Palo Alto, CA) was used. Data acquisition and processing were performed with a ChemStation and LC-3D software (Rev. A.10.02[1757] ©Agilent Technologies, 1990–2003). A Kromasil C₁₈ capillary column (5 μ m, 0.5 $\times$ 150 mm i.d., Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA) was used. The mobile phase flow rate was 20 μ L min^{–1}, and an injection volume of 1.5 μ L was used. Detection was performed in the UV region over the wavelength range of 220–400 nm. All of the assays were carried out at 36.5 °C.

Mobile phase solutions were degassed in an ultrasonic bath (JP Selecta, Barcelona, Spain). A Crison Micro pH 2000 pH-meter from Crison Instruments (Barcelona, Spain) was employed.

Reagents and Standards. The chromatographic data of compounds were obtained using micellar mobile phases of 0.04 mol L^{–1} polyoxyethylene (23)lauryl ether (Brij35, Acros, Geel, Belgium) prepared in 0.05 M citrate buffer at pH 4.0, 5.0, 5.5, 6.5 and 7.4. Sodium citrate (analytical reagent, Guinama S.L., Valencia, Spain) and hydrochloric acid (for analysis, Merck, Darmstadt, Germany) were used to adjust the mobile phase pH. To reproduce the osmotic pressure of biological fluids, NaCl (purissimum, Panreac, Montplet & Esteban S.A., Barcelona, Spain) was added to the micellar mobile phase (9.2 g L^{–1}) and sodium azide (0.2 g L^{–1}, synthesis grade, Scharlab, Barcelona, Spain) for antifungal activity.

The 47 compounds used for the comparison between retention data obtained with standard and capillary columns were cimetidine, famotidine, 17 β -estradiol, and estrone (all from Guinama); amobarbital, butabarbital, chlorpheniramine, cortisone, deoxycorticosterone, hydrocortisone, metoprolol, nadolol, sulpiride, testosterone, and terbutaline (Sigma, St. Louis, MO); atenolol and propranolol (ICI-Farma, Barcelona, Spain); quazepan (Quiedorm, Laboratorios Menarini, Barcelona, Spain); acetanilide, propiophenone, methanol, *n*-butanol, urea, toluene, resorcinol, and benzene (Scharlab); acemetacin and ibuprofen (Laboratorios Fher, Barcelona, Spain); corticosterone and phenobarbital (Bayer, Barcelona Spain); phenol, 2,4-dimethylphenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, and 2,4-dinitrophenol (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg Germany); 17 α -hydroxyprogesterone and corticosterone (Fluka, Buchs, Switzerland); salicylic acid (Panreac); testosterone (Schering, Madrid, Spain); naproxen (Syntex Latino, Madrid, Spain); thiourea (UCB, Brus, Belgium); fenbupropion (Cincopal, Cynamid Iberica S.A., Madrid, Spain); fentiazac (Donorest100, Wyeth-Orfi, Barcelona, Spain); flurbiprofen (Froben50, Laboratorios Knoll, Madrid, Spain); ketoprofen (Rhône-Poulenc Rorer, Madrid, Spain); tolmetin (Laboratorio Estedi, Barcelona, Spain); diclofenac (Novartis, Barcelona Spain); indomethacin (Laboratorios Llorens, Barcelona, Spain); lidocaine (Seid, Barcelona, Spain); and pikeprofen (Laboratorios Farmacéuticos Almirall, Barcelona, Spain).

The commercial sources of polyphenolic compounds studied were flavone, flavanone, and 7-hydroxyflavone (Acros); 5-hydroxyflavone, *p*-hydroxycinnamic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and phloroglucinol (Sigma); rutin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); (–)-epicatechin, vitexin, and apigenin (Fluka); chlorogenic acid and (+)-catechin (Cayman Chemical Co.); and vicenin-2, isolated according to the method of Gobbo-Neto (26).

Stock standard solutions of 1000 mg L^{–1} were prepared by dissolving 10 mg of compound in 10 mL of methanol (Multisolvent, Scharlab). Working solutions of 40 mg L^{–1} were prepared by dilution of the stock

Figure 2. Chromatograms obtained in BMC using a capillary column and 0.04 mol L⁻¹ Brij35 at pH 7.4 mobile phase: **(A)** flavones, 5-hydroxyflavone (1), 7-hydroxyflavone (2), apigenin (3), flavone (4), vicenin-2 (5), and vitexin (6); **(B)** flavanone, flavonols, and flavan-3-ols, quercetin (7), rutin (8), flavanone (9), (+)-catechin (10), and (-)-epicatechin (11); **(C)** phenolic acids and other phenols, chlorogenic acid (12), *p*-hydroxycinnamic acid (13), *p*-hydroxybenzoic acid (14), and phloroglucinol (15).

standard solutions with the mobile phase solution. The solutions were stored in the refrigerator at 4 °C.

Barnstead E-pure, deionized water (Sybron, Boston, MA) was used throughout. The mobile phases and the solutions injected into the chromatograph were vacuum-filtered through 0.45 μm nylon membranes (Micron Separations, Westboro, MA).

BMC Data. The retention factors of compounds were estimated according to the approach previously proposed (27, 28)

$$k'^2 = \frac{k_2(t_{R2}^g - t_{R1}^g) + k_1(t_{R2}^g - t_{R1}^g)}{t_{R2}^g - t_{R1}^g} \quad (1)$$

where k'^2 is an estimate of k for the test compound, which besides its gross retention time, t_R^g , uses the gross retention times of the references R1 (acetanilide) and R2 (propiphenone) (t_{R1}^g and t_{R2}^g) injected during the working session at regular time intervals (~1.5 h). k_1 and k_2 are the retention factors of references, previously established for the experimental conditions assayed (surfactant concentration and temperature), and were considered to be constant. The use of this approach provides retention factor estimations more stable along time than the classical estimations based on the measurement of the dead time (actually, the gross hold-up time). Retention factor values were averages of at least triplicate determinations.

Software and Data Processing. The values of the physical properties melting point (MP), water solubility (WS), molecular weight (MW), and logarithm of octanol–water partition coefficient (log P) are from EPI Suite software (v. 3.12, ©2000, U.S. Environmental Protection

Agency version). This software estimates physical properties of compounds but also contains a database with experimental values. In this paper, experimental data are used when available (see **Table 1**).

Microsoft Excel 2000 software (Microsoft Corp.) and STATGRAPHICS (V. 2.1, Statistical Graphics Corp.) were used to perform the statistical analysis of the regressions.

Descriptive and Predictive Ability of the Models. To evaluate the predictive ability of the models in terms of cross-validated data, the comparison between the fit error (e.g., the root-mean-square error of calibration, rmsEC) and the prediction error based on cross-validation (e.g., root-mean-square error of cross-validation, rmsECV) was used. The rmsEC value provides the average deviation of the model from the data

$$\text{RMSEC} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (2)$$

where $\hat{y}_i$ is the predicted dependent variable value when all of the n molecules are included in the model construction. In contrast, the rmsECV value is a measure of the model ability to predict the dependent variable of new compounds. rmsECV is defined as rmsEC in eq 2 except that now, $\hat{y}_i$ values are predictions for other compounds not included in the model formulation (e.g., randomly omitting an arbitrary number of molecules from the calibration set and then predicting their dependent variable value in the model built with the remaining molecules; this procedure is repeated until all molecules have been excluded from the

Figure 3. Retention behavior of polyphenolic compounds in BMC as a function of mobile phase pH using a capillary column and a 0.04 mol L⁻¹ Brij35 mobile phase: (A) (△) apigenin, (★) catechin, (◇) epicatechin, (■) flavanone, (▲) flavone, (○) 5-hydroxyflavone, (●) phloroglucinol, and (+) quercetin; (B) (▼) chlorogenic acid, (*) *p*-coumaric acid, (○) *p*-hydroxycinnamic acid, (□) vicenin-2, (×) vitexin, and (▽) rutin.

model; this methodology is referred to as the Venetian blind cross-validation).

From a qualitative point of view, the more differences between rmsEC and rmsECV that exist, the lower is the robustness of the models obtained and, therefore, more caution must be taken in future predictions.

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison between Standard Analytical and Capillary Columns in BMC. As has been indicated in the Introduction, BMC has proven to be a useful high-throughput technique to obtain reliable models for the estimation of the permeability and pharmacokinetic profile of xenobiotics. To increase the high-throughput capability of the technique, capillary instead of standard analytical columns were used. First of all, a comparison

between retention in BMC using standard, Kromasil C₁₈ (5 μm, 4.6 × 150 mm i.d.) (23, 24), and capillary columns, Kromasil C₁₈ (5 μm, 0.5 × 150 mm i.d.), was made in order to use the previously reported BMC-QRAR models obtained from retention data in a standard column.

For this purpose, the retention factors of a heterogeneous group of 47 compounds, selected to cover a wide range of hydrophobicity and acid-base properties (see Materials and Methods), in standard analytical columns and in capillary columns were related. The equation of the fitted model (eq 33), coefficient confidence intervals (at 95% confidence level), and statistical features were

$$k_{BMC}(\text{capillarycolumn}) = (-0.5 \pm 0.7) + (0.65 \pm 0.03)k_{BMC}(\text{standard column}) \quad (3)$$

$$n = 47; r^2 = 0.98; SE = 1.6; F = 2716; p < 0.0001$$

The model explains 98% of variance in the data. The slope and the model were statistically significant at the 99% confidence level ($p < 0.01$). The intercept was not statistically significant ($p > 0.05$), and its elimination from the model did not change the slope value:

$$k_{BMC}(\text{capillarycolumn}) = (0.637 \pm 0.016)k_{BMC}(\text{standard column}) \quad (4)$$

$$n = 47; r^2 = 0.992; SE = 1.6; F = 6185; p < 0.0001$$

The adequate statistical features of models indicate that eq 4 can be used to switch capillary–standard retention data. The use of capillary columns in the conditions used in this paper allows a reduction of approximately 40% in standard retention data (Figure 1).

The predictive ability of the models was evaluated by means of the rmsEC and rmsECV statistics based on the Venetian blind cross-validation. The rmsEC and rmsECV values, 1.53 and 1.59, respectively, were similar, suggesting the robustness and the predictive ability of the model are adequate. Figure 1B shows the predicted versus experimental (fitted and cross-validated) values of retention data, obtained from eq 4. As can be observed, the fitted and cross-validated point distributions agree with the theoretical straight line slope and intercept equal to 1 and 0, respectively.

Chromatographic Behavior of Phenolic Compounds in BMC Using Capillary Columns. Table 1 shows the chemical structures of the 15 polyphenolic compounds considered in this paper, which include 6 flavones, 2 flavonols, a flavanone, 2 flavan-3-ols, 3 phenolic acids, and a phloroglucinol. As can be observed in Table 1, the compounds considered present a wide range of hydrophobicity (octanol–water partition coefficients, log *P*, ranging between -4.3 and 3.6) and acid character. The retention of compounds considered in this study was obtained in BMC conditions using a capillary column to save time, reagents, and samples and to improve efficiency and sensitivity. Figure 2 shows the chromatograms of the polyphenolic compounds obtained in a 0.04 mol L⁻¹ Brij35 mobile phase at pH 7.4 and the Kromasil C₁₈ capillary column. As can be observed, compounds eluted between 1 and 30 min, and their chromatographic peaks showed adequate symmetry. On the other hand, as expected, the most hydrophobic compounds, that is, 5-hydroxyflavone (1), flavone (4), and flavanone (9), were the most retained, whereas the retention of the most hydrophilic polyphenolic compounds, that is, vicenin-2 (5), chlorogenic acid (12), and rutin (8), was the lowest. In Figure 2, the retention of *p*-hydroxycinnamic (13) and *p*-hydroxybenzoic acid (14) was

Table 2. QRAR Models To Estimate Transport of Xenobiotics through Different Biological Barriers Obtained Using Retention in BMC with a Standard Analytical Column ^a

biological barrier	pharmacological parameter	mobile phase pH ^b	model ^c	ref
gastrointestinal tract	percentage of oral absorption in humans, %A	6.5 (average pH of the small intestine)	$%A = k_{BMC} / (0.7 \pm 0.2) + (1.02 \pm 0.03)k_{BMC} \times 100$	(21)
		7.4 (plasmatic pH)	$%A = k_{BMC} / (1.0 \pm 0.3) + (1.00 \pm 0.03)k_{BMC} \times 100$	
blood–brain barrier	brain–blood distribution coefficient in rats, BB	7.4 (plasmatic pH)	$\log BB = (-0.84 \pm 0.12) + (0.76 \pm 0.08) \log k_{BMC} + (0.26 \pm 0.11)\alpha$	(22)
			$n = 74; r^2 = 0.72; F = 3185; SE = 9.8; p < 0.0001$ $n = 74; r^2 = 0.72; F = 3174; SE = 9.8; p < 0.0001$	
skin	skin permeability coefficient in humans, K_p (cm h ⁻¹)	5.5 (skin pH)	$\log K_p = (-3.3 \pm 0.3) + (1.3 \pm 0.2) \log k_{BMC} - (0.0080 \pm 0.014)MP$	23, 24
			$n = 42; r^2 = 0.75; F = 60; SE = 0.39; p < 0.0001$ $rmsEC = 0.379; rmsECV = 0.421$ $n = 40; r^2 = 0.83; F = 93; SE = 0.51; p < 0.0001$ $rmsEC = 0.498; rmsECV = 0.537$	

^a C₁₈ Kromasil (internal diameter = 4.6 mm). ^b 0.04 mol L⁻¹ Brij35 at indicated pH values. ^c Statistical parameters and variables: *n*, number of molecules included in the model; *r*², determination coefficient; *F*, *F* ratio (residual to modeled variance ratio); *SE*, standard error of estimate of the model; *p*, probability (measure of significance of the model); *rmsEC*, root mean square error of calibration; *rmsECV*, root mean square error of cross-validation (Venetian blind cross-validation); *k*_{BMC}, retention factor in BMC; *MP*, melting point (°C); *α*, total molar charge.

Table 3. Retention Factors of Polyphenolic Compounds in BMC Using a Capillary Column and 0.04 mol L⁻¹ Brij35 Mobile Phases at pH 7.4, 6.5, and 5.5 (*k*_{BMC}), Predicted Percentage of Oral Absorption (*A*), Predicted Brain–Blood Distribution Coefficients (log BB), and Predicted Skin Permeability Coefficients (*K*_p)

compound	<i>N</i>	<i>k</i> _{BMC} (pH 7.4)	<i>k</i> _{BMC} (pH 6.5)	<i>k</i> _{BMC} (pH 5.5)	<i>A</i> ^a (%)	log BB	log <i>K</i> _p (cm h ⁻¹)
flavones							
5-hydroxyflavone	1	32.25 ± 0.12	35.39 ± 0.07	35.43 ± 0.10	97.5 ± 1.0	0.484	-2.242
7-hydroxyflavone	2	12.93 ± 0.06	13.559 ± 0.007	13.4 ± 0.4	95.1 ± 0.2	0.153	-3.557
apigenin	3	12.9 ± 0.2	13.34 ± 0.02	13.5 ± 0.6	95.1 ± 0.3	0.152	-4.357
flavone	4	23.528 ± 0.013	23.78 ± 0.04	23.3 ± 0.5	96.8 ± 0.8	0.351	-2.069
vicenin-2	5	0.566 ± 0.003	1.1360 ± 0.0001	1.70 ± 0.07	59 ± 17	-1	-5.544
vitexin	6	4.66 ± 0.02	6.439 ± 0.008	7.06 ± 0.3	90 ± 3	-0.2	-4.402
flavanols							
quercetin	7	12.89 ± 0.08	13.485 ± 0.003	12.99 ± 0.04	95.1 ± 0.2	0.152	-4.130
rutin	8	2.318 ± 0.008	2.780 ± 0.003	2.7 ± 0.4	82 ± 4	-0.4	-3.479
flavanone	9	35.960 ± 0.011	36.06 ± 0.03	36.23 ± 0.16	98 ± 1.0	0.491	-1.635
flavan-3-ols							
(+)-catechin	10	6.83 ± 0.02	6.939 ± 0.002	6.9 ± 0.3	91.8 ± 0.5	-0.057	-4.738
(-)-epicatechin	11	6.45 ± 0.02	6.592 ± 0.003	6.60 ± 0.13	91.5 ± 0.6	-0.074	-3.692
phenolic acids							
chlorogenic acid	12	0.67 ± 0.14	0.80 ± 0.02	0.8 ± 0.2	57 ± 9	-1.082	-5.161
<i>p</i> -hydroxycinnamic acid	13	0.773 ± 0.016			55	-1.036	
4-hydroxybenzoic acid	14	0.233 ± 0.003			27	-1.431	
other phenols							
phloroglucin	15	4.529 ± 0.006	4.6319 ± 0.0009		89.6 ± 1.4	-0.214	

^a Average value of estimates obtained at pH 7.4 and 6.5. ^b Oral absorption estimated at pH 7.4.

lower than expected with respect to their log *P* values (1.79 and 1.58, respectively) because they are highly ionized at pH 7.4.

To evaluate the mobile phase pH effect on the BMC retention behavior of 15 polyphenolic compounds, 0.04 mol L⁻¹ Brij35 mobile phases were prepared at different pH values in the range of 4.0–7.4. **Figure 3** shows the results obtained. As can be expected from the bibliographic *pK*_a values, the retention of carboxylic compounds, chlorogenic acid, *p*-hydroxycinnamic acid, and 4-hydroxybenzoic acid clearly decreases as pH increases as a consequence of ionization of the carboxylic group. For vicenin-2, vitexin, and rutin decreases of 69, 36, and 25%, respectively, in the retention factors were observed. This behavior indicates that the compounds show an acidic character, probably due to the presence of sugar moieties in their molecules (29, 30). On the other hand, the retention of the rest of flavones, flavonols, flavanone, flavan-3-ols, and phloroglucinol does not change significantly as mobile phase pH increases.

Permeability Profile Estimation of Polyphenolic Compounds. Table 2 summarizes previously developed and vali-

dated QRAR models based on BMC retention in standard analytical columns to estimate passive transport of xenobiotics through different biological barriers: the gastrointestinal tract, blood–brain barrier, and skin (21–24). From the BMC experimental retention data of polyphenolic compounds at different pH values in the capillary column (**Table 3**), their BMC retentions in a standard column were calculated using eq 4 and used to estimate the permeability profile of unaltered products (**Table 3**).

The major absorption barrier to orally administered drugs is the intestinal mucosa where drugs are generally absorbed by a passive diffusion mechanism. In a previous paper, the usefulness of BMC in predicting oral drug absorption in humans was evaluated (21). A univariate hyperbolic model based on the BMC retention in 0.04 M Brij35 at pH 6.5 (the average pH of the small intestine) and 7.4 (the plasmatic pH value) of compounds was proposed as a fast primary screening tool for predicting the extension of oral drug absorption. As with other reported methods, that is, Caco-2 cell lines and PAMPA, the initial steep slope of the model limits the prediction accuracy

for low to medium absorption drugs. The models fail when factors that decrease the absorption of drugs exist, that is, poor dissolution of the compound, chemical and bacterial decomposition at the absorption site, and first-pass metabolism in the intestinal cells and the liver.

If passive diffusion is the mechanism responsible for absorption, from the retention data in BMC of compounds two groups of polyphenols are observed:

Group 1 consists of compounds with retention factors higher than 3 at pH 6.5 in capillary columns; maximal oral absorption (>90%) is predicted. This is the case of flavones (except vicenin-2), flavonols (except rutin), flavanone, flavan-3-ols, and phloroglucinol. For the compounds 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, apigenin, flavone, and flavanone, which present low solubility, the dissolution in the gastrointestinal tract could limit the absorption processes, and differences in presentation forms and physiological variables could influence their absorption.

On the other hand, for xenobiotics with maximal absorption and high solubility [i.e., vitexin, quercetin, (+)-catechin, (-)-epicatechin, and phloroglucinol; **Table 1**], their bioavailability could only be reduced due to presystemic metabolism and/or first pass metabolism. In this sense, reported values for bioavailability of (-)-epicatechin, quercetin, and (+)-catechin are 39% (4), 24% (31), and 10% (32), respectively. The reduced bioavailability of (+)-catechin and (-)-epicatechin could be attributed to a chemical decomposition with the pH; in fact, at pH 6.5 and 7.4 another peak appeared in the chromatogram with a larger retention time. No chemical decomposition with pH for the rest of the compounds of group 1 was observed.

Group 2 consists of compounds with retention factors $k < 3$ at pH 6.5 (vicenin-2, rutin, and phenolic acids); low and variable extents of absorption should be expected. For the intake of chlorogenic acid, an oral absorption in humans of $33 \pm 17\%$ has been reported (33), which agrees with the predicted value in BMC. The bibliographic results found for rutin indicate a bioavailability value of 17% (31). For this compound chemical degradation at pH 6.5 and 7.4 was observed, evidenced by the presence of another peak in the chromatogram.

One of the most interesting properties of polyphenolic compounds, from a therapeutic point of view, is their antioxidant activity. This property is of special importance for the prevention of neurological diseases, that is, Alzheimer's, Parkinson's, and cerebrovascular diseases (34). Therefore, prediction of passage across the blood-brain barrier (BBB) of polyphenolic compounds is of great importance. In a previous paper (22), a multiple linear regression model (see **Table 2**) that relates the brain-blood distribution coefficients (BB) data with BMC retention data and total molar charge of compounds was proposed. The analysis of the coefficients of the proposed model implies that the passage of neutral or cationic and hydrophobic compounds through the BBB is favored. By interpolation of the retention data of considered compounds into the log BB model, polyphenols can be classified as poor (BBB-) or easy (BBB+) brain penetrators. As can be observed in **Table 3**, the use of a cutoff of 0 implies that xenobiotics with $\log BB > 0$ accumulate preferably in the brain (>50%). Using this criterion, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, apigenin, flavone, quercetin, and flavanone can cross the BBB. If a more restrictive cutoff is chosen to define BBB+ compounds ($\log BB > 0.5$), only 5-hydroxyflavone, flavone, and flavanone can be considered as easy brain penetrators.

Another area of growing interest in polyphenolic compound research is their use in cosmetics and cosmeceutics. The

penetration of xenobiotics through the skin may be expressed either as percent of absorption or as permeability coefficient, K_p .

Martínez-Pla et al. (23, 24) developed a QRAR model based on BMC retention using a 0.04 mol L^{-1} Brij35 at pH 5.5 mobile phase to describe and predict skin permeability (**Table 2**). In this model the retention of compounds in BMC expressed as $\log k_{\text{BMC}}$ and melting point (MP), a physicochemical property strongly dependent on molecular weight and hydrogen bonding, was used as a predictive variable. By interpolating the retention of polyphenolic compounds obtained at pH 5.5 and their corresponding melting points, the estimated $\log K_p$ values (**Table 3**) were obtained. As can be observed, flavanone, flavone, and 5-hydroxyflavone are the compounds that can more quickly cross the skin barrier. Vicenin-2, chlorogenic acid, and (+)-catechin show the lowest skin permeability. The only $\log K_p$ value found in the literature was for (+)-catechin ($\log K_p = -5.924$) (35), which agrees with the low permeability predicted in BMC.

This paper points out the usefulness of BMC using capillary columns as a high-throughput primary screening tool that can provide key information about the potential transport properties of polyphenols in a simple and economical way.

ACKNOWLEDGMENT

A.D. thanks Dayana Rubio Gouvea for helping with the vicenin-2 isolation.

LITERATURE CITED

- (1) WHO/FAO. *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2003.
- (2) Meskin, M.; Bidlack, W. R.; Davies, A. J.; Lewis, D. S.; Randolph, R. K. *Phytopharmaceuticals Mechanism of Action*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004; pp 21–33.
- (3) Kuo, S. M. Transepithelial transport and accumulation of flavone in human intestinal Caco-2 cells. *Life Sci.* **1998**, 63 (26), 2323–2331.
- (4) Zhu, M.; Chen, Y.; Li, R. C. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med.* **2000**, 66, 444–447.
- (5) van Zanden, J. J.; Wortelboer, H. M.; Bijlsma, S.; Punt, A.; Usta, M.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M. C. M.; Cnubben, N. H. P. Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoids mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochem. Pharm.* **2005**, 69, 699–708.
- (6) Ghiotto, R. C. T.; Lavarda, F. C.; Ferreira, F. J. B. Antioxidant activity of flavonols. *Int. J. Quantum Chem.* **2004**, 97, 949–952.
- (7) Lien, E. J.; Ren, S.; Bui, H.-H.; Wang, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26 (3–4), 285–294.
- (8) Rasulev, B. F.; Adbullaev, N. D.; Syrov, V. N.; Leszczynsky, J. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of the antioxidant activity of flavonoids. *QSAR Comb. Sci.* **2005**, 24 (9), 1056–1065.
- (9) Kontogiorgis, A. C.; Pontiki, A. E.; Hadjipavlou-Litina, D. A review on quantitative structure-activity relationship (QSARs) of natural and synthetic antioxidants compounds. *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, 5 (6), 563–574.
- (10) Farkas, O.; Jakus, J.; Heberger, K. Quantitative structure-activity relationships of flavonoids compounds. *Molecules* **2004**, 9 (12), 1079–1088.
- (11) Vaya, J.; Tamir, S. The relation between the chemical structure of flavonoids and their estrogen-like activities. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11 (10), 1333–1343.
- (12) Mukherjee, S.; Mukherjee, A.; Saha, A. QSAR modeling on binding affinity of diverse estrogenic flavonoids: electronic, topological and spatial functions in quantitative approximation. *J. Mol. Struct.* **2005**, 715, 85–90.

- (13) Huang, X. Q.; Liu, T.; Gu, J. D.; Luo, X. M.; Ji, R. Y.; Cao, Y.; Xue, H.; Wong, J. T. F.; Wong, B. L.; Jiang, H. L.; Chen, K. X. 3D-QSAR model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABA (A) receptors. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1883–1891.
- (14) Shimizu, M. Tea polyphenols inhibit the transport of dietary phenolic acids mediated by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7296–7302.
- (15) Dupas, C.; Baglieri, A. M.; Ordonaud, C.; Tomé, D.; Maillard, M. N. Chlorogenic acid is poorly absorbed independently of the food matrix: a Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 1053–1060.
- (16) Ruan, L.-P.; Chen, S.; Yu, B.-Y.; Zhu, D.-N.; Cordell, G. A.; Qiu, S. X. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 605–610.
- (17) Deconinck, E.; Ates, H.; Callebaut, N.; Van Gyseghem, E.; Vander Heyden, Y. Evaluation of chromatographic descriptors for prediction of gastro-intestinal absorption of drugs. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1138*, 190–202.
- (18) Escuder-Gilabert, L. M.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Quantitative retention–structure and retention–activity relationship studies of local anesthetics by micellar liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 28–34.
- (19) Quiñones-Torrel, C.; Martín-Biosca, Y.; Martínez-Plá, J. J.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. QRAR models for central nervous system drugs using biopartitioning micellar chromatography. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2* (2), 145–161.
- (20) Escuder-Gilabert, L.; Martínez-Pla, J. J.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. *J. Chromatogr., B* **2003**, *797*, 21–35.
- (21) Molero-Monfort, M.; Escuder-Gilabert, L.; Villanueva-Camañas, R. M.; Sagrado, S.; Medina-Hernandez, M. J. Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption. *J. Chromatogr., B* **2001**, *753*, 225–236.
- (22) Escuder-Gilabert, L.; Molero-Monfort, M.; Villanueva-Camañas, R. M.; Sagrado, S.; Medina-Hernandez, M. J. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood–brain barrier. *J. Chromatogr., B* **2004**, *807*, 193–201.
- (23) Martínez-Pla, J. J.; Martín-Biosca, Y.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability. *Biomed. Chromatogr.* **2003**, *17*, 530–537.
- (24) Martínez-Pla, J. J.; Martín-Biosca, Y.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability by biopartitioning micellar chromatography. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1047*, 255–262.
- (25) Martín-Biosca, Y.; Molero-Monfort, M.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Rapid in vitro test to predict ocular tissue permeability based to biopartitioning micellar chromatography. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *20*, 209–216.
- (26) Gobbo-Neto, L.; Santos, M. D.; Kanashiro, A.; Almeida, M. C.; Valim, Y. M. L.; Lopes, J. L. C.; Souza, G. E. P.; Lopes, N. P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). *Planta Med.* **2005**, *71*, 3–6.
- (27) Bermúdez-Saldaña, J. M.; Escuder-Gilabert, L.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J.; Sagrado, S. Emerging approaches to estimate retention factors in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1094*, 24–33.
- (28) Bermúdez-Saldaña, J. M.; Escuder-Gilabert, L.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J.; Sagrado, S. On the measurement of consistent long term retention factor values in micellar liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *595*, 19–27.
- (29) Voirin, B.; Sportouch, M.; Raymond, O.; Jay, M.; Bayet, C.; Dangles, O.; El Hajji, H. Separation of flavone C-glycosides and qualitative analysis of *Passiflora incarnata* L. by capillary zone electrophoresis. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 90–98.
- (30) Mielczarek, C. Acid–base properties of selected flavonoid glycosides. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *25*, 273–279.
- (31) Hollman, P. C. H.; Bijlsman, M. N.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoids glycosides in man. *Free Radical Res.* **1999**, *31*, 569–573.
- (32) Karakaya, S. Bioavailability of phenolic compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 453–464.
- (33) Olthof, M. R.; Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 66–71.
- (34) Youdim, K. A.; Shukitt-Hale, B.; Joseph, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, 1683–1693.
- (35) Heard, C. M.; Johnson, S.; Moss, G.; Thomas, C. P. In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of guarana, *Paullinia cupana*. *Int. J. Pharm.* **2006**, *317*, 26–31.
- (36) Yang, B.; Kotani, A.; Arai, K.; Kusu, F. Estimation of antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 599–604.

Received for review March 13, 2007. Revised manuscript received July 24, 2007. Accepted July 29, 2007. We acknowledge the Spanish Ministry of Science and Technology (MCYT), the European Regional Development Fund (ERDF) (Project SAF2005-01435), and Generalitat Valenciana (ACOMP07-011) for financial support. A.D. thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) (BEX 1525/06-9) for financial support. L.E.-G. is grateful to the Generalitat Valenciana for a grant (APOSTD/2007/062).

JF070730R