Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários
presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart.
(Asteraceae: Vernonieae)**

Dayana Rubio Gouvea

**Ribeirão Preto
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários
presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart.
(Asteraceae: Vernonieae)**

Dayana Rubio Gouvea

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários
presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart.
(Asteraceae: Vernonieae)**

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientada: Dayana Rubio Gouvea

Orientador: Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas no dia 08/10/2013. A versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Gouvea, Dayana Rubio

Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart. (Asteraceae: Vernoniaeae). Ribeirão Preto, 2013. 128p.; 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. *Lychnophora salicifolia*.
2. metabolismo.
3. vicianina-2.
4. ácido lychnofólico.
5. farmacocinética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dayana Rubio Gouvea

Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart. (Asteraceae: Vernonieae).

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: 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 esse trabalho à minha família, a razão e origem de tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pela confiança, liberdade, exemplo e amizade. Por dividir comigo seu amor à ciência e ser fonte de entusiasmo sempre.

À Profa. Dra. Veronika Butterweck pela oportunidade e pronta acolhida, pelo exemplo de profissional e colaboração nos estudos com células Caco-2 e microsomas hepáticos humanos.

À querida Gabriela Amaral Buqui pela amizade, pelo verdadeiro trabalho em equipe nos estudos de farmacocinética. Pelo cuidado no trato com os animais, tornando esse processo de aprendizado praticamente indolor.

Ao companheiro de viagem Arthur de Barros Bello Ribeiro pela imprescindível colaboração e habilidade no cultivo das células.

A Ursula Thormann por toda a paciência e disposição para nos ensinar o cultivo das células.

À Profa Dra. Andrea Diniz pela inestimada colaboração, incentivo e ensinamentos nos estudos de farmacocinética.

Ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira e a aluna Fernanda Lima pela colaboração no trabalho utilizando microsomas hepáticos de ratos.

À Profa. Dra. Marilda das Dores Assis (FFCLRP- USP) e à Dra. Valéria P. Barros pela colaboração nos estudos com metaloporfirinas.

À Profa. Dra. Glória Emilia Petto de Souza pelo exemplo de amor e dedicação à docência e ao apoio nos estudos *in vivo*, e à Míriam Cristina Contin de Melo também pela paciência e pelos imprescindíveis ensinamentos sobre o trato com os animais.

Aos funcionários do Biotério da FCFRP-USP pela colaboração e disposição em ajudar sempre

Ao querido amigo Daniel P. Pavarini companheiro de coleta por toda colaboração e belas fotos.

Ao Prof. Dr. João Semir pela identificação botânica e preciosa aula em campo.

A todos os companheiros de laboratório, funcionários, técnicos, alunos e professores, que de forma direta ou indireta são coresponsáveis pela realização deste trabalho e minha formação.

Em especial, agradeço aos queridos Izabel Cristina Casanova Turatti e José Carlos Tomaz, dois exemplos de dedicação e amor ao trabalho, pela colaboração e disposição em ajudar sempre.

Agradeço também à Jacqueline Nakau Mendonça pela colaboração principalmente no isolamento das substâncias.

Em especial aos amigos e colaboradores do dia a dia: Leandro De Santis Ferreira, Eduardo F. Fernandes, Lucas R. Sartori, Juliana Neves, Maria Elvira P. Martucci, Denise Brentan, Madeleine Ernst, Ricardo Vessecchi e Ivanildes Vasconcelos.

Agradeço especialmente ao Jean P. Ravaneli, com todo amor, por estar ao meu lado em todos os momentos, pela paciência na ausência e por tornar essa jornada mais doce.

À Fapesp pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

GOUVEA, D. R. Estudos *in vitro* e *in vivo* do metabolismo dos compostos majoritários presentes no extrato das folhas de *Lychnophora salicifolia* Mart. (Asteraceae: Vernoniaeae). 2013. 128f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A espécie *Lychnophora salicifolia* Mart. é conhecida popularmente como arnicão e é utilizada como anti-inflamatório e analgésico de uso tópico, além de edulcorante em cachaça. A vicenina-2 é um flavonoide C-glicosilado presente em grande quantidade no extrato hidroalcoólico das folhas e apresenta ação anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer entre outras. Outra substância majoritária nesse extrato, o ácido lychnofólico, é um dos responsáveis pela ação antibacteriana e tripanocida do extrato. Devido à necessidade de estudos mais completos envolvendo produtos naturais, neste trabalho estudamos o metabolismo dessas duas moléculas sendo que não foi possível observar a formação de metabólitos *in vitro* a partir da vicenina-2 e no caso do ácido lychnofólico houve a formação de dois metabólitos pela adição de um átomo de oxigênio na molécula utilizando microsomas hepáticos de ratos. As mesmas substâncias foram formadas utilizando FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como agente oxidante. Nas reações com microsomas hepáticos humanos foi observada a conjugação do ácido lychnofólico com o ácido glucurônico sendo possível calcular: $V_{\text{máx}} = 272,5 \pm 12,75 \text{ } \mu\text{mol/g proteína/hora}$; $K_m = 12,38 \pm 1,218 \text{ } \mu\text{M}$ e o $R^2 = 0,9980$. Os estudos com células Caco-2 indicam que o ácido lychnofólico é rapidamente absorvido por difusão passiva. Já a vicenina-2 em nenhuma condição avaliado atravessou a monocamada de células. Quanto ao perfil farmacocinético do ácido lychnofólico verificou-se um baixíssimo $t_{1/2}$, alto Cl e alto Vd. Já a vicenina-2 apresentou valores um pouco maiores, mas ainda sim, baixos de $t_{1/2}$ e Cl e Vd, indicando que ambas as substâncias são rapidamente eliminadas do organismo.

Palavras-chave: *Lychnophora salicifolia*; metabolismo; vicenina-2; ácido lychnofólico; farmacocinética.

ABSTRACT

GOUVEA, D. R. *In vitro* and *in vivo* metabolism of the major secondary metabolites present in the extract of *Lychnophora salicifolia* Mart. (Asteraceae: Vernonieae) leaves. 2013. 128f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The species *Lychnophora salicifolia* Mart. popularly known as “arnicão” is used as an anti-inflammatory and topical analgesic agent; it is also employed as flavoring in the Brazilian cachaça. Vicenin-2 is a C-glycoside flavonoid present in large amounts in the hydroalcoholic extract of the leaves of *L. salicifolia* and has anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer activities. Another major substance in this extract is lychnopholic acid, which accounts for the antibacterial and trypanocidal actions of the extract. More comprehensive studies involving natural products are necessary; therefore, we studied the metabolism of the two aforementioned molecules. We did not observe the *in vitro* formation of metabolites from vicenin-2. In the case of lychnopholic acid, we detected the formation of two metabolites using rat liver microsomes, which possibly originated from the addition of an oxygen atom to the acid's molecule. The same substances may also have been produced when we employed FeTFPP as catalyst and *m*-CPBA as oxidizing agent. In the reactions involving human liver microsomes, we verified that lychnopholic acid conjugation with glucuronic acid and calculated the following parameters: $V_{\max} = 272.5 \pm 12.75 \mu\text{mol g}^{-1} \text{protein h}^{-1}$; $K_m = 12.38 \pm 1.218 \mu\text{M}$, and $R^2 = 0.9980$. Studies using Caco-2 cells indicated that lychnopholic acid was quickly absorbed by passive diffusion. On the other hand, vicenin-2 was not transported, suggesting no absorption or efflux of this compound in Caco-2 cells. As for the pharmacokinetic profile, lychnopholic acid presented very low $t_{1/2}$, high Cl, and very high Vd. Concerning vicenin-2, the $t_{1/2}$ value was slightly larger, but still rather low, whereas Cl and Vd values were slightly lower, indicating that both substances are quickly eliminated from the body.

Keywords: *Lychnophora salicifolia*; metabolism; vicenin-2; lychnopholic acid; pharmacokinetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo catalítico geral do citocromo P450 (Guengerich, 2001).....	5
Figura 2. Estruturas das metaloporfirinas utilizadas neste estudo.....	7
Figura 3. Esquema do poço da placa com o <i>insert</i> contendo células Caco-2 crescendo sobre uma membrana permeável	9
Figura 4. Esquema do poço da placa com o <i>insert</i> contendo células Caco-2 crescidas sobre a membrana permeável e as possíveis rotas de absorção e efluxo de um composto	9
Figura 5. Esquema dos analisadores no detector TQ (Waters) e as respectivas funções no modo de aquisição MRM. Adaptado (Waters, 2006-2010)	16
Figura 6. Esquema dos analisadores no detector TQ (Waters) e as respectivas funções no modo de aquisição de perda neutra. Neste caso, apenas os íons detectados no primeiro quadrupolo analisador (MS1) que geram fragmentos relativos à determinada perda que são detectados no último analisador (MS2) irão compor o cromatograma. Adaptado (Waters, 2006-2010)	17
Figura 7. Fotos de indivíduos da espécie <i>Lychnophora salicifolia</i> e as estruturas da vicenina-2 e do ácido lychnofólico presentes no extrato hidroalcoólico das folhas dessa planta (fotos: Daniel Petinatti Pavarini)	21
Figura 8. Células Caco-2 sendo cultivadas em placas de Petri (passagem P59) antes de atingirem 90% de confluência e serem semeadas nos <i>inserts</i> da placa de 6 poços	38
Figura 9. Espectro de UV da vicenina-2 obtido na análise por HPLC-DAD	49
Figura 10. Cromatograma obtido na análise por HPLC-DAD para o padrão de vicenina-2 (325nm).....	50
Figura 11. Espectro de UV do ácido lychnofólico obtido na análise por HPLC-DAD.....	50
Figura 12. Cromatograma obtido na análise por HPLC-DAD para o padrão de ácido lychnofólico (254 nm).....	50
Figura 13. Cromatogramas obtidos preparando-se as amostras primeiramente em A: MeCN/H ₂ O 1:1 e posteriormente em B: MeCN/H ₂ O 1:9 (Vic: vicenina-2; PI: padrão interno quercetina; AL: ácido lychnofólico).....	55
Figura 14. Espectros de massas da solução contendo o padrão de vicenina-2 (<i>m/z</i> 593) e ácido lychnofólico (<i>m/z</i> 249) obtidos com diferentes energias do capilar (1,5; 2,0 e 3,0 kV)	56

Figura 15. Espectros de massas da solução contendo o padrão de vicenina-2 (m/z 593) e ácido lychnofólico (m/z 249) obtidos com diferentes energias do cone (10, 20 e 30 V)	56
Figura 16. Espectros de massas obtidos no modo negativo de ionização após fragmentação da vicenina-2 utilizando diferentes energias de colisão (20-35 eV)	57
Figura 17. Espectros de massas obtidos no modo negativo de ionização após fragmentação do ácido lychnofólico utilizando diferentes energias de colisão (0-25 eV)	58
Figura 18. Cromatogramas UPLC-DAD e UPLC-MS (modo negativo de ionização) evidenciando a presença da vicenina-2 e do ácido lychnofólico no extrato bruto de <i>Lychnophora salicifolia</i>	62
Figura 19. Cromatogramas (UPLC-DAD e UPLC-MS/MS modo MRM) obtidos para a quantificação da vicenina-2 e do ácido lychnofólico no extrato final de <i>Lychnophora salicifolia</i>	63
Figura 20. Cromatogramas (UPLC-DAD) obtidos para as reações da vicenina-2 com as diferentes metaloporfirinas: MnTAPP, NiTAPP, Mn(Salen), FeTMPyP com o oxidante PhIO	64
Figura 21. Cromatogramas (UPLC-DAD) obtidos para as reações da vicenina-2 utilizando como catalisador Mn(Salen) e diferentes oxidantes (PhIOAc ₂ e <i>m</i> -CPBA).....	66
Figura 22. Cromatogramas (UPLC-MS, scan, TIC, modo negativo de ionização) obtidos para as reações do ácido lychnofólico com as diferentes metaloporfirinas: FeTMPyP, Mn(Salen), NiTAPP e MnTAPP com o oxidante PhIO.....	67
Figura 23. Cromatogramas (UPLC-MS) relativos ao modo negativo de ionização (TIC) após reação de oxidação do ácido lychnofólico utilizando as metaloporfirinas FeTDCPP e a FeTFPP como catalisadores e PhIO como agente oxidante.....	68
Figura 24. Cromatogramas (UPLC-MS) relativos ao modo negativo de ionização (TIC) após reação de oxidação do ácido lychnofólico utilizando as metaloporfirinas FeTDCPP e a FeTFPP como catalisadores e <i>m</i> -CPBA como agente oxidante	69
Figura 25. Ácido lychnofólico (1) e os possíveis produtos de oxidação (2, 3 e 4) utilizando metaloporfirinas FeTDCPP e a FeTFPP como catalisadores e <i>m</i> -CPBA como agente oxidante	70
Figura 26. Exemplo de cromatogramas (UPLC-MS, scan) obtidos para o controle e branco da reação do ácido lychnofólico utilizando a metaloporfirina FeTFPP como catalisador e <i>m</i> -CPBA como agente oxidante	70

Figura 27. Cromatogramas (UPLC-DAD) obtidos para as reações do ácido lychnofólico utilizando como catalisador Mn(Salen) os oxidantes *t*-BHP, PhIOAc₂ e *m*-CPBA respectivamente 71

Figura 28. Cromatogramas obtidos na análise por UPLC-DAD-MS da vicenina-2 submetida à incubação com microsossomas hepáticos de ratos 72

Figura 29. Cromatogramas (UPLC-MS) obtidos em modo scan. Primeiramente o cromatograma obtido para o branco da reação, embaixo o cromatograma obtido para o controle da reação e finalmente o cromatograma da reações de metabolização do ácido lychnofólico utilizando microsossomas hepáticos de ratos. Os metabólitos formados apresentaram tempo de retenção de 2,5 e 2,7 minutos e *m/z* 265 no modo negativo de ionização 72

Figura 30. Espectros de massas relativos aos metabólitos formados na reação de metabolização do ácido lychnofólico utilizando microsossomas hepáticos de ratos. Abaixo os espectros de massas dos sinais que eluíram no mesmo tempo de retenção no controle da reação. Os metabólitos formados apresentam tempo de retenção de 2,5 e 2,7 minutos e *m/z* 265 no modo negativo de ionização 73

Figura 31. Comparação dos cromatogramas (UPLC-MS/MS) monitorando a fragmentação dos íons *m/z* 265 (scan de íons filhos) para as reações de metabolização do ácido lychnofólico utilizando FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como agente oxidante e microsossomas hepáticos de ratos 74

Figura 32. Comparação dos espectros de massas (MS/MS) dos sinais cromatográficos com tempo de retenção de 2,5 minutos. Fragmentação dos íons *m/z* 265 (scan de íons filhos) com energia de colisão de 20 e 25 eV para as reações de metabolização do ácido lychnofólico utilizando FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como agente oxidante e microsossomas hepáticos de ratos 75

Figura 33. Comparação dos espectros de massas (MS/MS) dos sinais cromatográficos com tempo de retenção de 2,7 minutos. Fragmentação dos íons *m/z* 265 (scan de íons filhos) com energia de colisão de 20 e 25 eV para as reações de metabolização do ácido lychnofólico utilizando FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como agente oxidante e microsossomas hepáticos de ratos 76

Figura 34. Exemplos de cromatogramas obtidos para análise do ácido lychnofólico e da vicenina-2 nos estudos de permeação em células Caco-2 e nos estudos de metabolização por microsossomas hepáticos humanos 77

Figura 35. Exemplos de curvas de calibração obtidas em triplicata para a análise da vicenina-2 e do ácido lychnofólico nos estudos de permeação com células Caco-2. As respectivas equações da reta e coeficientes de correlação ao quadrado .. 80

Figura 36. Mecanismo geral para a conjugação com o ácido glucurônico. Adaptado (Rowland, Miners e Mackenzie, 2013) 81

Figura 37. Comparação dos cromatogramas relativos à reação de conjugação do ácido lychnofólico (t.r. = 11,3 min) com o ácido glucurônico, evidenciando a formação do produto conjugado com tempo de retenção de 9,8 minutos 82

Figura 38. Gráficos relacionando a área do sinal cromatográfico referente ao ácido lychnofólico e ao produto formado na reação de metabolização de fase II de glucuronidação (ácido lychnofólico conjugado com o ácido glucurônico) ao longo do tempo utilizando-se diferentes concentrações proteicas (0,12 – 1 mg/mL) 83

Figura 39. Gráfico da cinética de reação de Michaelis–Menten para a reação de conjugação do ácido lychnofólico com o ácido glucurônico utilizando microsomas hepáticos humanos (n = 3) 84

Figura 40. Possível metabólito formado na reação de conjugação do ácido lychnofólico com o ácido glucurônico utilizando microsomas hepáticos humanos via mecanismo de substituição nucleofílica S_N2 84

Figura 41. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte rico em glicose e pH 7,4. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita: vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 Mm 87

Figura 42. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pobre em glicose (5 mM) e pH 7,4. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita: vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M 87

Figura 43. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte isento de glicose e pH 7,4. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita: vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M 88

Figura 44. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte livre de glicose e pH 6,0 no compartimento apical e 7,4 no basal . Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita: vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M 88

Figura 45. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando como meio de transporte HBSS. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita: vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M 89

Figura 46. Gráficos com os valores de quantidade de apigenina nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte livre de glicose e pH 6,0 no compartimento apical e 7,4 no basal . Esquerda: apigenina colocada no compartimento apical e direita: vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 25 μ M 89

Figura 47. Gráficos com os valores de quantidade de ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 7,4 no compartimento apical e basal. Esquerda: ácido lychnofólico colocado no compartimento apical e direita: ácido lychnofólico colocado no compartimento basal, ambos na concentração de 50 μ M 91

- Figura 48.** Gráficos com os valores de quantidade de ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 7,4 no compartimento apical e basal. Esquerda: ácido lychnofólico colocado no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado no compartimento basal, ambos na concentração de 25 μ M 91
- Figura 49.** Gráficos com os valores de quantidade de ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 6,0 no compartimento apical e 7,4 no basal durante 5 horas de experimento. Esquerda: ácido lychnofólico colocado no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado no compartimento basal, ambos na concentração de 50 μ M..... 92
- Figura 50.** Gráficos com os valores de quantidade de ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 6,0 no compartimento apical e 7,4 no basal durante 3 horas de experimento. Esquerda: ácido lychnofólico colocado no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado no compartimento basal, ambos na concentração de 50 μ M..... 92
- Figura 51.** Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 e ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 7,4 nos compartimentos apicais e basais durante 3 horas de experimento. Esquerda: ácido lychnofólico colocado juntamente com a vicenina-2 no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado juntamente com a vicenina-2 no compartimento basal, ambos na concentração de 50 μ M 93
- Figura 52.** Avaliação dos valores TEER durante a incubação com as células Caco-2 de diferentes concentrações de ácido lychnofólico, vicenina-2 e do extrato hidroalcoólico de *L. salicifolia*. Controle: meio de transporte pH 7,4 94
- Figura 53.** Esquema do dispositivo de ultrafiltração Centrifree utilizado neste trabalho para a determinação da fração ligada à proteína plasmática do ácido lychnofólico. Adaptado (Millipore, 2012)..... 96
- Figura 54.** Cromatogramas (UPLC-MS/MS) obtidos para a amostra branco de plasma de ratos analisada no modo MRM para detecção dos analitos e do padrão interno 98
- Figura 55.** Cromatogramas (UPLC-MS/MS) obtidos para a amostra branco de plasma de ratos adicionada dos analitos e analisada no modo MRM..... 98
- Figura 56.** Esquema do modo de injeção combinado em um UPLC-DAD-MS/MS em que é feita a eluição de uma amostra de plasma branco e simultaneamente a infusão de uma solução contendo os analitos para a avaliação da supressão de ionização 99
- Figura 57.** Teste do efeito matriz em plasma de ratos utilizando a infusão combinada dos padrões no espectrômetro de massas concomitantemente à eluição de uma amostra de plasma branco de ratos. A: scan no modo positivo de ionização; B: scan no modo negativo de ionização; C: aquisição em modo MRM para detecção da vicenina-2; D: aquisição em modo MRM para detecção do padrão interno cumarina e E: aquisição em modo MRM para detecção do ácido lychnofólico 100

Figura 58. Exemplos de curvas de calibração e os respectivos gráficos de resíduos obtidos para a análise da vicenina-2 e do ácido lychnofólico em plasma de ratos	101
Figura 59. Exemplos de cromatogramas (UPLC-MS/MS) monitorando no modo MRM o ácido lychnofólico, o padrão interno cumarina e a vicenina-2 na análise de uma amostra branco injetada logo após a análise do LSQ.....	102
Figura 60. Gráfico da média ($\pm$ DP) da concentração plasmática <i>versus</i> tempo obtido para a vicenina-2 após a administração IV da dose de 0,5 mg/kg. Dados obtidos a partir do cálculo da média das amostras de 7 ratos analisados	104
Figura 61. Gráficos em escala logarítmica de concentração plasmática de vicenina-2 <i>versus</i> tempo obtidos para os 8 ratos Wistar analisados neste trabalho, as respectivas equações e R^2	105
Figura 62. Gráfico de previsão da concentração plasmática <i>versus</i> tempo para a vicenina-2 após a administração via oral da dose de 90 mg/kg. Dados obtidos considerando F = 60%	108
Figura 63. Gráfico da média ($\pm$ DP) da concentração plasmática <i>versus</i> tempo obtido para o ácido lychnofólico após a administração IV da dose de 2,0 mg/kg. Dados obtidos a partir do cálculo da média das amostras de 9 ratos analisados	110
Figura 64. Gráficos em escala logarítmica de concentração plasmática de ácido lychnofólico <i>versus</i> tempo obtidos para 7 ratos Wistar analisados neste trabalho, as respectivas equações e R^2	111
Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C obtido em 100 MHz para a vicenina-2 (DMSO- d_6) isolada	123
Figura 66. Espectro de RMN de ^1H obtido em 400 MHz para a vicenina-2 (DMSO- d_6) isolada	124
Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C obtido em 100 MHz para o ácido lychnofólico (CD_3OD) isolado	125
Figura 68. Espectro de RMN de ^1H do ácido lychnofólico isolado neste trabalho adquirido em 400 MHz, CDCl_3	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente de fase móvel empregado para o isolamento da vicenina-2 por HPLC-DAD.....	26
Tabela 2. Gradientes de fase móvel utilizados no método por UPLC-DAD-MS/MS para análise de vicenina-2 e do ácido lychnofólico.....	32
Tabela 3. Parâmetros do método MRM para detecção da vicenina-2, do ácido lychnofólico e dos padrões internos quercetina e cumarina.....	32
Tabela 4. Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para a quantificação da vicenina-2 e do ácido lychnofólico.....	33
Tabela 5. Gradiente de fase móvel utilizado no método por HPLC-DAD nos estudos de permeação em células Caco-2 e metabolização por microsomas hepáticos humanos.....	34
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a vicenina-2 (DMSO-d_6) isolada neste trabalho e a comparação com os dados publicados anteriormente na literatura (Lu e Foo, 2000).....	52
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3) e ^{13}C (CD_3OD) obtidos para o ácido lychnofólico isolado neste trabalho e a comparação com os dados publicados anteriormente na literatura (Vichewski <i>et al.</i> , 1980).....	53
Tabela 8. Valores obtidos na validação da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Lychnophora salicifolia</i>	60
Tabela 9. Sinais cromatográficos observados nas reações de oxidação da vicenina-2 (t.r. = 4,74 min) utilizando NiTAPP e os respectivos íons para cada composto.....	65
Tabela 10. Sinais cromatográficos observados nas reações do ácido lychnofólico utilizando FeTMPyP e os respectivos íons para cada composto.....	67
Tabela 11. Sinais observados após reação de oxidação do ácido lychnofólico utilizando as metaloporfirinas FeTDCPP e a FeTFPP como catalisadores e <i>m</i> -CPBA como agente oxidante.....	69
Tabela 12. Valores obtidos na validação da metodologia analítica por HPLC-DAD para a quantificação de vicenina-2 e ácido lychnofólico nos estudos de permeabilidade em células Caco-2	79
Tabela 13. Valores obtidos na validação da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise da vicenina-2 e do ácido lychnofólico em plasma de ratos	103
Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos calculados para a vicenina-2 após a administração IV de uma dose de 0,5 mg/kg em 8 ratos Wistar.....	106
Tabela 15. Concentrações plasmáticas médias no estado de equilíbrio (C_{pss}) (ng/mL), estimada pela equação 15, assumindo-se $F = 0,6$; $\text{Cl}_{\text{tot}} = 6,4 \text{ mL/min}$; $k_e = 0,03 \text{ min}^{-1}$	109
Tabela 16. Parâmetros farmacocinéticos calculados para o ácido lychnofólico após a administração IV de uma dose de 2,0 mg/kg em 7 ratos Wistar.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	acetato de etila
AL	ácido lychnofólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área Sob a Curva
ASCM	Área Sob a Curva do primeiro Momento estatístico
AUMC	<i>Area Under the first Moment Curve</i>
BEH	<i>Ethylene Bridged Hybrid</i>
CD ₃ OD	metanol deuterado
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cl	<i>clearance</i>
CMD	Concentração Média Determinada
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cp	Concentração plasmática
Cp _{ss}	Concentração plasmática média no estado de equilíbrio
CQA	amostra de Controle de Qualidade Alto
CQB	amostra de Controle de Qualidade Baixo
CQM	amostra de Controle de Qualidade Médio
CV	Coeficiente de Variação
CYP	citocromo P450
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão

EPR	Erro Padrão Relativo
ESI	ionização por eletrospray
EtOH	etanol
eV	eletronvolt
F	fração biodisponível
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (soro fetal bovino)
HAc	ácido acético
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
Hex	<i>n</i> -hexano
HM	<i>High Mass</i>
HPLC	<i>High Performance / Pressure Liquid Chromatography</i>
HRESI-MS	<i>High Resolution Electrospray-Mass Spectrometry</i>
IV	intravenoso
K _e	constante de eliminação
K _m	constante de Michaelis-Menten
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LM	<i>Low Mass</i>
LSQ	Limite Superior de Quantificação
<i>m/z</i>	massa/carga
<i>m</i> -CPBA	ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
MeCN	acetonitrila
MeOH	metanol
MHz	Mega Hertz
min	minutos
MRM	<i>Multiple Reaction Mode</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>

ODS	octadecilsilano
Papp	permeabilidade aparente
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato salina)
P-gp	glicoproteína-P
PhIO	iodosilbenzeno
PhIOAc ₂	iodosilbenzeno diacetato
PI	padrão interno
PTFE	politetrafluoretileno
PVDF	fluoreto de polivinilideno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SIR	<i>Selected Ion Recording</i>
t.r.	tempo de retenção
t _{1/2}	tempo de meia vida
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butil hidroperóxido
TEER	<i>Transendothelial Electrical Resistance</i>
TMR	Tempo Médio de Residência
TOF	analisador por tempo de voo
UDP-ácido glucurônico	5'- uridina difosfato ácido glucurônico
UGT	enzima UDP - glucuroniltransferase
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
V _d	Volume de distribuição
VIC	vicenina-2
τ	intervalo entre as doses

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Biotransformação e metabolismo de xenobióticos.....	2
1.2 Sistemas <i>in vitro</i> para o estudo do metabolismo de compostos orgânicos.....	5
1.3 O modelo de previsão de absorção via oral em células Caco-2	8
1.4 O estudo da disposição cinética de xenobióticos	11
1.5 O estudo do metabolismo de produtos naturais.....	14
1.6 Substâncias estudadas nesse trabalho e sua importância.....	18
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Obtenção das substâncias estudadas.....	25
3.2 Preparo das amostras para análise por UPLC-DAD-MS/MS e HPLC-DAD.....	28
3.2.1 Amostras dos extratos das folhas de <i>L. salicifolia</i> analisados por UPLC-DAD-MS/MS	28
3.2.2 Amostras das reações com metaloporfirinas analisadas por UPLC-DAD-MS/MS	28
3.2.3 Amostras das reações com microsomas hepáticos de ratos analisadas por UPLC-DAD-MS/MS	29
3.2.4 Amostras das reações com microsomas hepáticos humanos analisadas por HPLC-DAD	29
3.2.5 Amostras do estudo com células Caco-2 analisadas por HPLC-DAD	29
3.2.6 Amostras dos estudos de farmacocinética em ratos analisadas por UPLC-DAD-MS/MS	30
3.3 Desenvolvimento da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise da vicianina-2 e do ácido lychnofólico.....	30
3.3.1 Condições cromatográficas utilizadas nas análises por UPLC-DAD-MS/MS.....	30
3.3.2 Condições otimizadas para análise por espectrometria de massas	32

3.4 Metodologia por HPLC-DAD utilizada nos estudos de permeação em células Caco-2 e metabolização por microsomas hepáticos humanos.....	34
3.5 Reações utilizando metaloporfirinas	35
3.6 Estudo do metabolismo da vicenina-2 e do ácido lychnofólico utilizando microsomas hepáticos de ratos.....	35
3.7 Estudo do metabolismo da vicenina-2 e do ácido lychnofólico utilizando microsomas hepáticos humanos.....	36
3.8 Avaliação da permeabilidade dos compostos em células Caco-2	37
3.9 Determinação da fração ligada à proteína plasmática do ácido lychnofólico	39
3.10 Avaliação do perfil farmacocinético da vicenina-2 e do ácido lychnofólico em ratos	40
3.11 Validação das metodologias de análise por UPLC-DAD-MS/MS e HPLC-DAD.....	43
3.11.1 Validação da metodologia de análise por UPLC-DAD-MS/MS do extrato das folhas de <i>L. salicifolia</i>	44
3.11.2 Validação da metodologia de análise por HPLC-DAD nos estudos de permeabilidade em células Caco-2	45
3.11.3 Validação da metodologia de análise por UPLC-DAD-MS/MS para análise da vicenina-2 e do ácido lychnofólico em plasma de ratos.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Obtenção e caracterização das substâncias estudadas	49
4.2 Desenvolvimento das metodologias analíticas por UPLC-DAD-MS/MS	54
4.2.1 Otimização das condições cromatográficas para análise da vicenina-2, do ácido lychnofólico e dos padrões internos quercetina e cumarina	54
4.2.2 Otimização das condições de ionização da vicenina-2, do ácido lychnofólico e dos padrões internos quercetina e cumarina	55
4.3 Validação da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Lychnophora salicifolia</i>	59
4.4 Quantificação da vicenina-2 e do ácido lychnofólico presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Lychnophora salicifolia</i>	61
4.5 Estudos utilizando metaloporfirinas	63
4.5.1 Reações utilizando metaloporfirinas e a vicenina-2	63
4.5.2 Reações utilizando metaloporfirinas e o ácido lychnofólico.....	66
4.6 Estudos de biotransformação por microsomas hepáticos de ratos.....	71
4.7 Metodologia por HPLC-DAD utilizada nos estudos de permeação em células Caco-2 e metabolização por microsomas hepáticos humanos.....	77
4.8 Estudo do metabolismo da vicenina-2 e do ácido lychnofólico utilizando microsomas hepáticos humanos.....	80
4.9 Avaliação da permeabilidade dos compostos em células Caco-2	85

4.10 Determinação da fração ligada à proteína plasmática do ácido lychnofólico	95
4.11 Validação da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise da vicenina-2 e o ácido lychnofólico em plasma de ratos.....	97
4.12 Avaliação do perfil farmacocinético da vicenina-2 em ratos	104
4.13 Avaliação do perfil farmacocinético do ácido lychnofólico em ratos	109
5 CONCLUSÕES.....	115
6 REFERÊNCIAS	118
APÊNDICES	123
APÊNDICE 1 - Espectros de RMN obtidos para a vicenina-2 isolada neste trabalho.....	123
APÊNDICE 2 - Espectros de RMN obtidos para o ácido lychnofólico isolado neste trabalho.	125
ANEXOS	127
ANEXO 1 - Certificação do CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) do campus da USP de Ribeirão Preto para a realização deste trabalho.	127
ANEXO 2 - Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético Nº 010174/2011-7.	128

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biotransformação e metabolismo de xenobióticos

Os termos biotransformação e metabolismo são muitas vezes usados como sinônimos, especialmente quando aplicados aos fármacos. O termo metabolismo é usado frequentemente para descrever absorção, distribuição, biotransformação e eliminação de uma substância. No entanto, o termo metabolismo é mais comumente usado para designar biotransformação, o que é compreensível a partir do ponto de vista de que os produtos de biotransformação de xenobióticos (compostos exógenos ao organismo) são conhecidos como metabólitos (Klaassen, 2001).

As reações catalisadas por enzimas que biotransformam xenobióticos são geralmente divididas em dois grupos, chamados de fase I e fase II. As reações de fase I envolvem hidrólise, redução e oxidação. Estas reações podem expor ou introduzir um grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH ou -COOH), e geralmente resultam em apenas um pequeno aumento na hidrofilicidade da molécula (Furge e Guengerich, 2006).

Reações de biotransformação de fase II incluem glucuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutatona e a conjugação com aminoácidos (como a glicina, taurina, e ácido glutâmico). Os cofatores para estas reações reagem com grupos funcionais que ou são introduzidos/expostos durante a fase I ou que já fazem parte das moléculas. A maioria das reações de fase II resulta em um grande aumento na hidrofilicidade dos xenobióticos, promovendo a excreção desses compostos de forma modificada (Caldwell, Gardner e Swales, 1995; Testa e Kramer, 2008).

As reações de biotransformação de fase II de xenobióticos podem ou não serem precedidas das reações de fase I. Por exemplo, morfina, heroína e a codeína são convertidos

para morfina-3-glucoronídeo. No caso da morfina, este metabólito é formado diretamente pela conjugação com ácido glucurônico. Nos outros dois casos, no entanto, a conjugação com ácido glucurônico é precedida por reações de fase I: desacetilação no caso da heroína e *O*-desmetilação no caso de codeína. Assim, a biotransformação de fase I é muitas vezes necessária para posterior fase de biotransformação. Em geral, a fase II de biotransformação não precede a fase I de biotransformação, embora existam exceções a essa regra (Klaassen, 2001).

Entre as enzimas de biotransformação de fase I, o sistema do citocromo P450 ocupa o primeiro lugar em termos de versatilidade catalítica e o grande número de xenobióticos que desintoxica ou ativa a intermediários reativos. A maior concentração de enzimas P450 envolvidas na biotransformação de xenobióticos é encontrada no retículo endoplasmático hepático (microsomas), mas as enzimas do P450 estão presentes em praticamente todos os tecidos (Furge e Guengerich, 2006).

Os citocromos P450 são uma família de proteínas encontradas tanto em mamíferos, como em plantas, bactérias, fungos, insetos e pássaros. Possuem como grupo prostético a ferro protoporfirina IX (hemeproteínas) e possuem essa denominação pois o complexo citocromo P450 e CO absorve a luz em torno de 450 nm. Já a nomenclatura dos citocromos, é dada conforme a similaridade da sequência de aminoácidos (dentro da mesma família deve ser de pelo menos 40%, na subfamília de 55%). Assim, por exemplo: CYP3A4 significa: CYP = citocromo P450, 3 = família, A = subfamília e 4 = isoforma (Furge e Guengerich, 2006).

Há dois principais papéis funcionais para estas oxigenases. Um deles é o metabolismo de xenobióticos funcionalizando as moléculas com porções mais polares que facilitam a solubilização das mesmas e facilitam sua excreção. Também têm papel na biossíntese de moléculas sinalizadoras, como na síntese de hormônios esteroides (Sligar *et al.*, 2005).

Os microsossomas do fígado humano podem conter 15 ou mais diferentes enzimas P450 (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 4A9, e 4A11) que biotransformam xenobióticos e/ou substratos endógenos. Os citocromos P450 são régio e estéreo específicos, sendo que, por exemplo, o CYP3A4 do fígado humano metaboliza cerca de 50% dos fármacos comerciais (Sligar *et al.*, 2005).

A reação básica catalisada pelo citocromo P450 é a mono-oxigenação em que um átomo de oxigênio é incorporado em um substrato e o outro é reduzido a água com a redução do NADPH. O citocromo P450 catalisa uma série de reações de oxidação (Furge e Guengerich, 2006):

1. Hidroxilação de carbonos alifáticos ou aromáticos
2. Epoxidação de ligações duplas
3. Oxigenação de heteroátomos (*S*-, *N*-, e *I*-) e *N*-hidroxilação
4. *O*-, *S*-, *N*- e *Si*- desalquilações
5. Transferência oxidativa de grupos
6. Clivagem de ésters
7. Desidrogenação

O ciclo catalítico geral da oxidação de compostos pelo CYP450 está ilustrado na figura a seguir (Guengerich, 2001).

Figura 1. Ciclo catalítico geral do citocromo P450 (Guengerich, 2001).

Sabe-se que os produtos de metabolismo de substâncias biologicamente ativas podem apresentar ação sinérgica com as mesmas (Jacobs *et al.*, 2011), ou também podem ser tóxicas para o organismo ou não terem ação e simplesmente servir como meio de detoxificação do organismo (Tang e Lu, 2010). Por isso o estudo sobre os metabólitos formados é de fundamental importância quando se trata da segurança no uso de substâncias biologicamente ativas.

1.2 Sistemas *in vitro* para o estudo do metabolismo de compostos orgânicos

Existem modelos de estudo *in vitro* do metabolismo de substâncias em ordem decrescente de complexidade biológica como, por exemplo, fatias de fígado, culturas de

células, preparados subcelulares, e enzimas isoladas. Entre estes, os preparados subcelulares oferecem um excelente compromisso entre a produção de informações por um lado, e, por outro lado, a facilidade de uso e baixo consumo de materiais (Testa e Kramer, 2006).

Neste caso, o tecido a ser utilizado (fragmentos de fígado ou de outros órgãos) é primeiramente homogeneizado, o retículo endoplasmático é fragmentado em pequenas esferas visíveis ao microscópio chamadas microssomas. A primeira centrifugação remove debris celulares, núcleos e mitocôndrias, que podem ser ainda mais separados e isolados. O sobrenadante é chamado GS9H (um abreviatura de 9000 x g sobrenadante) e é de particular interesse, uma vez que é feito de microssomas e citoplasma, e, portanto, contém a maioria das enzimas envolvidas na metabolização de xenobióticos presentes no tecido (Testa e Kramer, 2006).

A ultracentrifugação, em seguida, separa o citoplasma e os microssomas. Todo o procedimento é realizado em baixa temperatura. Após esse processo, o precipitado microssomal pode ser ressuspendido em tampão, complementado com os co-fatores necessários e incubado com o substrato (Testa e Kramer, 2006).

Visando mimetizar as funções do citocromo P450, uma série de sistemas tem sido desenvolvidos. Por exemplo, o catalisador de Jacobsen e outras metaloporfirinas podem ser utilizados como modelos biomiméticos do sistema enzimático P450 sendo que apresentam eficiência na oxidação de alcanos e alcenos na presença de oxidantes como iodosilbenzeno e peróxido de hidrogênio (Mac Leod *et al.*, 2007).

As metaloporfirinas possuem uma estrutura central muito parecida com a do núcleo da porfirina de ferro do citocromo P450, e têm sido extensivamente estudadas como catalisadores para reações de oxidação (Che e Huang, 2009). A utilização desses catalisadores é de grande valia uma vez que viabilizam a obtenção dos metabólitos em maior escala, tanto para a caracterização estrutural dos mesmos como para a utilização dos compostos em testes

toxicológicos (Bernadou e Meunier, 2004). Além disso, a possibilidade de obtenção de um grande número de produtos de oxidação auxilia da criação de bibliotecas de espectros de massas.

As metaloporfirinas utilizadas neste trabalho variam tanto no substituinte como no metal do núcleo porfirínico, no caso foram utilizados ferro, níquel e manganês. Na figura 2 estão ilustradas as estruturas básicas dos catalisadores empregados nesse estudo.

Figura 2. Estruturas das metaloporfirinas utilizadas neste estudo.

1.3 O modelo de previsão de absorção via oral em células Caco-2

Entre os parâmetros de ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), uma boa biodisponibilidade oral é um dos atributos mais desejáveis de um novo fármaco. A predição da biodisponibilidade oral é um desafio, visto que envolve múltiplos fatores biológicos e físico-químicos como dissolução no trato gastrointestinal, permeação pelas membranas intestinais e metabolismo de primeira passagem intestinal e hepático (Artursson, 1990).

Muito esforço tem sido feito para predizer a absorção intestinal, que é a primeira etapa para uma boa biodisponibilidade oral. O uso de cultura de células apresenta várias vantagens como o tempo utilizado, a possibilidade de estudar mecanismos de absorção pelo uso de condições controladas de experimento, permite o estudo utilizando células humanas, e possibilita a diminuição do uso de animais que muitas vezes podem ser controversos, caros e despendem muito tempo (Artursson, 1990).

O modelo em células Caco-2 tem sido muito utilizado em estudos preliminares de absorção de compostos. As células Caco-2 são células humanas de adenocarcinoma de cólon, capazes de se diferenciar e se polarizar espontaneamente quando cultivadas, formando junções oclusivas. Por apresentarem características de permeação das drogas através da monocamada que se correlacionam com as características de permeação na mucosa intestinal, elas têm sido utilizadas para predizer a absorção oral de fármacos em seres humanos, sendo também muito úteis em estudos sobre mecanismo de absorção de compostos e para realização de testes rápidos *in vitro* na busca de novas substâncias (Wilson *et al.*, 1990).

Entre os modelos para o estudo da absorção de substâncias, podem ser utilizadas monocamadas ou multicamadas de células epiteliais que são cultivadas em *inserts* permeáveis. Esses *inserts* são colocados em poços de placas de cultura de células. As células são assim cultivadas, crescem sobre a membrana permeável, se diferenciando após um determinado tempo que pode variar de dias até semanas (Wilson *et al.*, 1990) (figura 3).

Figura 3. Esquema do poço da placa com o *insert* contendo células Caco-2 crescendo sobre uma membrana permeável.

Assim, uma monocamada de células cresce sobre uma membrana permeável e é possível avaliar a passagem das substâncias através dessa monocamada. Essa passagem pode ocorrer na direção do compartimento apical, equivalente ao lúmen intestinal, para o compartimento basal, equivalente ao sangue. Ou na direção contrária, do compartimento basal para o apical, ou seja, o efluxo do composto, sendo que as substâncias podem atravessar a monocamada de células por simples difusão ou através de transporte ativo por carreadores (Artursson, 1990) (figura 4).

Figura 4. Esquema do poço da placa com o *insert* contendo células Caco-2 crescidas sobre a membrana permeável e as possíveis rotas de absorção e efluxo de um composto.

Um dos problemas apresentados por esse modelo é a falta de reprodutibilidade entre diferentes laboratórios. A TEER (*Transendothelial Electrical Resistance*, Resistência Elétrica Transepitelial) é um indicativo da existência da barreira celular e pode variar até 20 vezes de laboratório para laboratório. Essa variabilidade pode ser atribuída às diferenças nas condições de cultura das células além de diferenças na composição da subpopulação celular (Wilson *et al.*, 1990).

Pequenas diferenças nas condições de cultura como semeadura, densidade de células, rotina de troca de meio de cultura bem como composição do mesmo, osmolaridade do meio de transporte, idade das células, número da passagem e duração da cultura na placa com os *inserts*. Os níveis de expressão dos transportadores também pode variar de acordo com as condições de cultura. Como por exemplo, os níveis de expressão da P-gp (glicoproteína-P) um importante transportador de efluxo, que varia muito dependendo da idade da cultura das células (Wilson *et al.*, 1990).

Apesar dos modelos utilizando cultura de células serem relativamente mais econômicos que os modelos *in vivo*, ainda sim são caros, pois a manutenção das células envolve materiais relativamente caros e o tempo necessário para o cultivo também é grande. A preparação de uma monocamada de células Caco-2 totalmente funcional requer três semanas após a semeadura das células além do período de cultura que pode conter 8-9 passos de troca de meio, dependendo da passagem das células utilizadas e a rotina de cada laboratório. Além disso, a falta de padronização nos métodos aumenta a variabilidade dos resultados e dificulta a comparação dos resultados obtidos por diferentes laboratórios (Balimane e Chong, 2005).

Apesar da variabilidade que esse modelo pode apresentar, ainda assim, é possível obter informações que podem auxiliar na predição da absorção oral de substâncias tanto servindo como método de *screening* como método de estudo sobre mecanismo de absorção de compostos.

1.4 O estudo da disposição cinética de xenobióticos

A caracterização da disposição cinética de fármacos é um requisito importante para a determinação ou modificação de regimes de dosagem para indivíduos e grupos de pacientes. O estudo da farmacocinética envolve tanto a abordagem teórica como a experimental. O aspecto experimental da farmacocinética envolve o desenvolvimento de técnicas para amostragem, métodos analíticos para a quantificação dos compostos e metabólitos, além de procedimentos que facilitem a coleta de dados e a manipulação (Storpiertis, 2011).

Quanto ao aspecto teórico da farmacocinética está envolvido, por exemplo, o desenvolvimento de modelos farmacocinéticos que predizem a disposição do xenobiótico após a administração deste. A farmacocinética exerce um papel importantíssimo na promoção da eficácia dos fármacos ao fornecer relações quantitativas entre a eficácia e a dose utilizada. Assim, através das avaliações das concentrações nos fluidos biológicos, conseguimos reduzir a toxicidade relacionada aos níveis plasmáticos aumentando a segurança da utilização dos medicamentos (Shargel, Wu-Pong e Yu, 2004).

Na farmacocinética são propostos modelos matemáticos que auxiliam na interpretação dos dados obtidos a partir curva de concentração plasmática *versus* tempo. A partir desses dados podem-se obter equações exponenciais que quando representadas em gráficos ortogonais lineares-logarítmicos mostram-se como segmentos lineares. Aplicando os modelos compartimentais consegue-se interpretar o destino do fármaco no organismo e calcular os parâmetros farmacocinéticos (Storpiertis, 2011).

Nos modelos compartimentais o organismo é entendido como dividido em compartimentos sendo que no modelo monocompartimental o organismo é tido como apenas um compartimento e no multicompartimental dois ou mais. No caso do modelo monocompartimental, assume-se que a absorção e a distribuição do composto estudado são instantâneas e homogêneas por todos os líquidos e tecidos do organismo. Neste caso, a

alteração da quantidade de substância no organismo após a administração da dose pode ser representada por (Storpirtis, 2011) (equação 1):

$$dC_p/dt = - K_e \cdot C_p \quad (1)$$

Considerando que dC_p/dt é a variação da quantidade da substância no plasma em relação à variação de tempo (t), K_e é a constante de eliminação (sinal negativo indica o decaimento das concentrações plasmáticas do composto em função do tempo) e C_p é a concentração do composto no plasma (Storpirtis, 2011).

Porém, como o decaimento das concentrações no organismo da substância estudada não é um processo linear, mas sim exponencial, temos (Storpirtis, 2011) (equação. 2):

$$C_p = C_{p_0} \cdot e^{-k_e \cdot t} \quad (2)$$

Outro parâmetro farmacocinético que pode ser obtido a partir do gráfico de concentração plasmática *versus* tempo é o volume de distribuição (V_d), que é uma medida relacionada com o volume no qual o composto está diluído no organismo. Dá-se o nome de volume porque relaciona a quantidade (dose) da substância no organismo com a sua concentração (C_p) no plasma (Storpirtis, 2011) (equação 3):

$$V_d = \text{dose}/C_{p_0} \quad (3)$$

Já a meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) é o tempo necessário para que metade da quantidade da substância seja eliminada do organismo. No caso do modelo monocompartimental, pode-se utilizar a seguinte equação para o cálculo (Storpirtis, 2011) (equação 4):

$$t_{1/2} = 0,693/K_e \quad (4)$$

Esse parâmetro é dependente do volume de distribuição (V_d) e do *clearance* (Cl), já que (Storpirtis, 2011) (equação 5):

$$t_{1/2} = 0,693 \cdot V_d/Cl \quad (5)$$

O *clearance* descreve a eficiência de eliminação (irreversível) de determinado composto do organismo, podendo ser definido como a fração de volume de distribuição que é

completamente depurada da substância por unidade de tempo e pode ser calculado pela seguinte equação (Storpirtis, 2011) (equação 6):

$$Cl = Vd \cdot K_e \quad (6)$$

É importante ressaltar que o *clearance* total corresponde à soma de todos os *clearances* parciais relacionados com os processos de eliminação da substância do organismo como o *clearances* hepático e renal (Storpirtis, 2011).

Uma depuração reduzida (Cl baixo) influenciará diretamente o valor do $t_{1/2}$, aumentando-o significativamente. Assim como, o aumento do volume de distribuição aumentará a meia vida do composto, o que pode ser explicado pelo fato de que o alto Vd implica que a substância está distribuída nos tecidos e consequentemente em menor concentração no plasma, portanto, menos disponível para os processos de eliminação do organismo (Storpirtis, 2011).

Quanto aos métodos não compartimentais, estes questionam qual é a probabilidade de uma molécula percorrer o organismo e ser eliminada. Considera-se assim a permanência da molécula no organismo, também chamada de residência. Esse parâmetro é denominado de área sob a curva do primeiro momento estatístico (ASCM), cuja sigla em inglês corresponde a AUMC (*Area Under the first Moment Curve*) (Storpirtis, 2011).

Considerando que a área sob a curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo (ASC) pode ser calculada pelo método dos trapézios e nos dá informação de biodisponibilidade, a relação entre ASCM e a ASC é considerada uma medida do seu tempo médio de residência (TMR, ou em inglês, MRT, *Mean Residence Time*). O TMR é uma analogia à meia vida de eliminação o qual nos dá uma estimativa quantitativa da persistência da molécula no organismo (Storpirtis, 2011) (equação 7):

$$TMR = ASCM/ASC \quad (7)$$

No caso de um composto administrado via oral, vários fatores podem alterar a disponibilidade sistêmica, incluindo absorção limitada após a administração oral, efeito de primeira passagem intestinal, efeito hepático de primeira passagem, e o modo de formulação que afeta, por exemplo, a taxa de dissolução ou incorporação em micelas (para compostos lipossolúveis) (Klaassen, 2001). A absorção oral pode ser influenciada, por exemplo, no caso dos produtos naturais normalmente administrados em mistura, por outros compostos presentes no extrato, os quais podem atuar aumentando ou dificultando a absorção intestinal do composto a ser estudado.

Quanto à eliminação, as substâncias são eliminadas do corpo por vários caminhos, por exemplo, através de excreção pelos rins ou intestinos, biotransformação pelo fígado, ou pela expiração nos pulmões. A propriedade física que permite que muitos xenobióticos possam ser absorvidos através da pele, pulmões ou trato gastrointestinal, ou seja, a sua lipofilicidade é um obstáculo à sua eliminação, além de que compostos lipofílicos podem ser reabsorvidos. Consequentemente, a eliminação de xenobióticos muitas vezes depende de sua conversão à moléculas mais solúveis em água como já discutido anteriormente (Ramanathan, 2009).

1.5 O estudo do metabolismo de produtos naturais

Estima-se que um terço dos adultos nos países desenvolvidos e mais de 80% da população em muitos países em desenvolvimento utilizam medicamentos a base de plantas para a promoção da saúde e tratamento de doenças comuns, tais como, inflamação, doença cardíaca, cirrose hepática, diabetes e doenças do sistema nervoso central. A incorporação da fitoterapia pela medicina tem sido incentivada pela Organização Mundial de Saúde. Isto ocorre apesar da falta de evidências clínicas para a eficácia e dados de segurança sobre os medicamentos fitoterápicos mais comumente utilizados (He *et al.*, 2010).

Os perfis de segurança da maioria fitoterápicos em humanos são desconhecidos e têm sido relatados que muitos produtos naturais podem causar lesões a órgãos em humanos sem se conhecer os mecanismos responsáveis. Por isso, compreender a biotransformação bem como a farmacocinética dos produtos naturais utilizados pela população é de extrema relevância (He *et al.*, 2010).

O estudo das propriedades farmacocinéticas de plantas medicinais em geral é complicado, pois na maioria das vezes as misturas são complexas contendo muitas substâncias. Além disso, as concentrações dos compostos no produto final estão na faixa inferior a miligramas por dose. As concentrações plasmáticas resultam assim de miligramas para picogramas por litro. Como consequência, os métodos analíticos para avaliar a biodisponibilidade e parâmetros farmacocinéticos de preparações à base de plantas têm de ser suficientemente sensíveis (Butterweck *et al.*, 2011).

Nesse contexto a espectrometria de massas se torna uma importante ferramenta tanto quando nos referimos à sensibilidade dos métodos quanto quando se trata de especificidade. Os diferentes modos de aquisição nos permitem a busca de compostos com maior especificidade e sensibilidade, como por exemplo, o modo MRM (*Multiple Reaction Mode*). Neste modo de aquisição dos espectros, o íon de determinada m/z , é selecionado em um primeiro analisador (normalmente a molécula protonada ou desprotonada), posteriormente esse íon é fragmentado na cela de colisão e então um outro íon fragmento de m/z específica e característica do composto estudado é então monitorado no último analisador (Ramanathan, 2009).

Na figura abaixo está ilustrado o esquema e a função de cada analisador quando o modo de aquisição selecionado é o MRM em um equipamento tipo triplo quadrupolo ou similar como é o caso do detector TQ (ACQUITY, Waters) utilizado neste trabalho.

Figura 5. Esquema dos analisadores no detector TQ (Waters) e as respectivas funções no modo de aquisição MRM. Adaptado (Waters, 2006-2010).

A espectrometria de massas também é uma ferramenta muito útil na busca pelos metabólitos das moléculas estudadas, sendo possível buscar os metabólitos esperados já que, por exemplo, é possível monitorar íons referentes à adição de oxigênio na molécula (+16u) ou adição de água (+18u), bem como monitorar se a molécula sofreu hidrogenação (+2u) ou, por exemplo, sulfatação (monitorando a fragmentação e perda de SO_3 , -80u), acetilação (na fragmentação é observada a perda de CH_2CO , -42u) (Prasad *et al.*, 2011).

Assim, visando monitorar ou buscar os íons fragmentos característicos de determinado metabólito, pode-se, por exemplo, buscar os íons que ao serem fragmentados apresentam a diferença de massa característica de determinada via de biotransformação. Por exemplo, a diferença de 121u em relação ao fragmento formado, ou seja, a perda de $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ relativo à cisteína possivelmente conjugada ao composto de estudo. Outra reação que pode ser investigada, entre outras, é a glucuronidação (perda de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ relativa ao ácido glucurônico quando o íon do metabólito é fragmentado na cela de colisão, -176u) (Prasad *et al.*, 2011). Na figura abaixo está exemplificado o monitoramento de perda neutra em um detector TQ (ACQUITY, Waters).

Figura 6. Esquema dos analisadores no detector TQ (Waters) e as respectivas funções no modo de aquisição de perda neutra. Neste caso, apenas os íons detectados no primeiro quadrupolo analisador (MS1) que geram fragmentos relativos à determinada perda que são detectados no último analisador (MS2) irão compor o cromatograma. Adaptado (Waters, 2006-2010).

Uma alternativa para estudos envolvendo produtos naturais em baixas concentrações, em termos de sensibilidade é o uso da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*Ultra Performance Liquid Chromatography* - UPLC) a qual mantém os mesmos princípios que Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), porém utiliza colunas de 1-2,1 mm de diâmetro interno e partículas abaixo de 2 μm , já que o uso dessas pequenas partículas com fase móvel em alta velocidade linear aumenta a resolução e detecção e diminui o tempo de análise. Assim, as análises são mais rápidas, o volume de solvente é menor, a eficiência é maior e a detectabilidade é 2-3 vezes maior quando comparado com a análise por HPLC (Maldaner e Jardim, 2009; Ramanathan, 2009).

No caso das colunas, a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência promoveu o desenvolvimento de partículas híbridas, produzidas pela reação de bis(trietoxissilietano) e tetraetoxissilano, que dá origem a uma partícula de sílica com pontes de etano inseridas na sua estrutura (polietoxissilano), denominada de sílica híbrida de segunda geração. Estas partículas se diferenciam das partículas tradicionais de sílica, porque as modificações têm resultado em adição de carbono (grupos etil) nas ligações siloxano. Assim, são geradas partículas com diâmetros de 1,7 μm que possuem maior estabilidade mecânica, uma vez que as ligações

silício-carbono são similares às ligações silício-oxigênio. Essas pontes de carbono que estão inseridas na superfície da sílica fazem com que esse tipo de fase estacionária seja resistente em uma faixa extensa de pH (1-12) (Maldaner e Jardim, 2009).

Os detectores usados com sistemas UPLC têm que ser capazes de lidar com a digitalização muito rápida já que sinais cromatográficos com largura a meia altura de cerca de 1 segundo são normalmente obtidos com colunas empacotadas com partículas de 1,7 μm . A fim de integrar de forma precisa e reproduzível os sinais dos analitos, a taxa de amostragem do detector deve ser alta o suficiente para capturar um grande número de pontos e formar o sinal cromatográfico. Deve-se ressaltar que a detecção utilizando a espectrometria de massas é significativamente reforçada por UPLC, já que há um aumento nas concentrações dos sinais cromatográficos, diminuição na dispersão cromatográfica com a diminuição do fluxo de fase móvel e a não utilização de *split*, o que melhora a eficiência de ionização (Ramanathan, 2009).

1.6 Substâncias estudadas nesse trabalho e sua importância

A espécie *Lychnophora salicifolia* Mart. (Vernonieae, Asteraceae) é considerada a espécie tipo do gênero *Lychnophora*, sendo a de maior distribuição geográfica e a mais polimórfica do gênero. Essa espécie tem ocorrência na Bahia, em Minas Gerais e em Goiás, crescendo em declives secos de rochas de arenito e quartzito, sobre o campo rupestre aberto (Semir *et al.*, 2011).

Seu uso popular, assim como para outras espécies do gênero *Lychnophora*, se dá pela forma de preparados hidroalcoólicos das folhas os quais são utilizados topicamente para tratar dor e inflamação. Espécies desse gênero também são utilizadas como edulcorantes em cachaça no interior do Brasil (Semir *et al.*, 2011).

A vicenina-2 é um flavonoide C-glicosilado que apresenta atividade anti-inflamatória, além de também apresentar atividade antioxidante (Gobbo-Neto *et al.*, 2005; Marrassini *et al.*, 2011). Além disso, foi demonstrada sua ação anticâncer em estudo sobre câncer de próstata (Nagaprashantha *et al.*, 2011). Também está presente nas folhas de *Passiflora edulis* (maracujá) usada popularmente como sedativo ou tranquilizante, para combater a febre e inflamações de pele, sendo a ação anti-inflamatória atribuída principalmente aos flavonoides C-glicosídicos, entre eles, além da vicenina-2, a isoorientina e a spinosina (Zucolotto *et al.*, 2009).

Pouco se estudou sobre a absorção dos flavonoides C-glicosilados, no caso da vicenina-2, Jabor *et al.* utilizando HPLC-MS/MS estudaram algumas de suas propriedades farmacocinéticas após administração intraperitoneal em ratos (Jabor *et al.*, 2010). Posteriormente foram estudadas as propriedades farmacocinéticas da vicenina-2 após administração oral do extrato de *Abrus mollis* em camundongos (Wang *et al.*, 2012). Em outro estudo já citado anteriormente, em que foi verificada sua ação anticâncer também foi verificada a absorção desse composto administrado oralmente em camundongos (Nagaprashantha *et al.*, 2011).

Há um interesse crescente em pesquisas sobre a segurança e o metabolismo de produtos naturais, especialmente os ativos extraídos de plantas, entre eles, muitos englobam o metabolismo de flavonoides (Breinholt *et al.*, 2002; Walle e Wen, 2006; Walle, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Andres-Lacueva *et al.*, 2009; Hendrich *et al.*, 2010). A maior parte das discussões sobre a metabolização e absorção dos flavonoides envolve as porções agliconas ou os heterosídeos O-glicosilados, com frágeis ligações glicosídicas.

Hein e colaboradores demonstraram em estudo realizado *in vitro* que a metabolização pré-sistêmica de flavonoides pela microbiota intestinal não é influenciada pela estrutura da aglicona, porém, o tipo de ligação glicosídica (C- ou O-glicosídeo) tem grande influência nas

taxas de metabolização como, por exemplo, no caso da vitexina, um C-glicosídeo que apresentou taxas de metabolização muito menores que os derivados O-glicosilados estudados (Humpf *et al.*, 2008). Portanto, o tipo de ligação glicosídica pode ser fundamental para determinar a estabilidade do flavonoide perante o trato gastrointestinal e viabilizar a absorção da molécula em sua forma íntegra.

Sabendo-se da necessidade de estudos mais completos envolvendo produtos naturais, e levando-se em consideração que estes são consumidos em misturas complexas contendo muitas substâncias, também foi abordado neste trabalho, o estudo de alguns aspectos do metabolismo de outro composto majoritário presente no extrato hidroalcoólico das folhas de *L. salicifolia*, o sesquiterpeno ácido lychnofólico, um dos responsáveis pela ação antibacteriana dessa planta contra *Staphylococcus aureus* (Miguel *et al.*, 1996) e ação tripanocida (Jordão *et al.*, 2004). Assim, foi considerada pertinente a associação de uma molécula relativamente apolar com poucos estudos relatados na literatura como o ácido lychnofólico e outra mais polar como a vicenina-2, com propriedades distintas a fim de entendermos melhor o metabolismo dos constituintes do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. salicifolia* (figura 7).

vicenina-2

Gli: glicose

ácido lychnofólico

Figura 7. Fotos de indivíduos da espécie *Lychnophora salicifolia* e as estruturas da vicenina-2 e do ácido lychnofólico presentes no extrato hidroalcoólico das folhas dessa planta (fotos: Daniel Petinatti Pavarini).

Objetivos

2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram o estudo da metabolização *in vitro* e *in vivo* e avaliação do perfil farmacocinético do flavonoide C-glicosilado, vicenina-2 e do sesquiterpeno ácido lychnofólico, os constituintes majoritários do extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *Lychnophora salicifolia* empregada na medicina popular como anti-inflamatório e analgésico.

Já os objetivos específicos foram:

Isolamento das substâncias a serem estudadas;

Realização de reações utilizando metaloporfirinas;

Estudar a possível metabolização *in vitro* da vicenina-2 e do ácido lychnofólico utilizando microsomas hepáticos de ratos e humanos,

Avaliar a possível absorção das substâncias utilizando células de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2,

E por fim, determinar em ratos o perfil e os principais parâmetros farmacocinéticos desses compostos.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das substâncias estudadas

A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. João Semir do departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Unicamp, e as exsicatas referentes ao material vegetal estão depositadas no herbário UEC dessa instituição. Para a coleta e acesso ao patrimônio genético das plantas nos foi concedida a autorização pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) nº 010143/2011-4 (anexo 2).

As folhas de *L. salicifolia* codificada como NPL 327 (coletada em Piatã-BA: S 13°06'11.3''; W 41°51'20.3'') foram secas em estufa de ar circulante a 40°C e pulverizadas em moinho de facas. Foi obtido 400 g de pó, o qual foi submetido à maceração exaustiva utilizando 3 L de uma mistura de etanol (EtOH) e H₂O (2:8), por 72 horas. Após a filtração, o material sólido foi submetido ao mesmo processo por mais duas vezes.

O extrato final etanólico seco (40 g) foi ressuspensionado em 500 mL de uma mistura de metanol (MeOH) e H₂O (9:1) e submetido à primeira partição com igual volume de hexano (Hex), sendo que o processo foi repetido 3 vezes. Foi necessário adicionar água para observar a completa separação de fases. A seguir, foi feito o mesmo procedimento utilizando acetato de etila (AcOEt). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo (RV 10 digital, Ika, Werke) a 50°C.

Assim, 5 g da fração MeOH/H₂O remanescente foi ressuspensionada em 5 mL de MeOH, filtrada e aplicada numa coluna empacotada com Sephadex LH 20 de dimensões 30 cm x 5 cm, a qual foi eluída utilizando MeOH. Foram coletadas 60 frações. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada, utilizando como fase móvel uma mistura de H₂O/MeOH/AcOEt na proporção de 2:2:6, sendo que as placas foram reveladas sob luz

ultravioleta mineralight UVGL-25 operando em $\lambda = 365$ e 254 nm e as frações foram reunidas de acordo com sua composição.

Pela comparação do fator de retenção com um padrão, foi observada a presença da substância vicenina-2 em algumas frações, as quais foram reunidas (250 mg no total) e submetidas à purificação por HPLC-DAD semi-preparativo (Shimadzu) (bombas modelo LC-6AD; detector UV-DAD modelo SPD-M10Avp, controlados pelo software CLASS-VP 6.14). Foram utilizados MeOH e H₂O como fase móvel, vazão de 8 mL/min, coluna Shimadzu, ShimPack ODS 5 μ m de dimensões 250 mm x 20 mm e a detecção foi realizada na faixa de $\lambda = 200$ a 600 nm. O gradiente de fase móvel empregado está descrito na tabela 1:

Tabela 1. Gradiente de fase móvel empregado para o isolamento da vicenina-2 por HPLC-DAD.

Tempo (minutos)	% de metanol
0,01	15
30	55
35	100
40	100

Logo no início da obtenção do extrato hidroalcoólico, foi observada a formação de um precipitado, o qual foi separado, lavado com hexano e água gelada, filtrado e analisado em HPLC-DAD e UPLC-DAD-MS/MS.

Também foi realizada a extração das folhas secas de *L. salicifolia* codificada como NPL 387 (coletada em MG - Estrada de Olhos d'água para Diamantina: S 17°27'29.7''; W 43°34'10.0'') após obtenção do pó em moinho de facas (950 g), o mesmo foi submetido à maceração utilizando 8 L de uma mistura de EtOH e água (1:1), por 72 horas. Após a

filtragem, o material sólido foi submetido ao mesmo processo mais duas vezes. O extrato hidroalcoólico obtido foi concentrado utilizando-se evaporador rotativo a 50°C, obteve-se assim 83 g de extrato. O extrato foi ressuspenso (800 mL) e submetido à partição com hexano. Nesta etapa também houve a formação de precipitado branco, o qual foi mais uma vez filtrado e lavado com Hex e H₂O gelada e posteriormente analisado.

Aproximadamente 4 g da fração etanólica remanescente foi aplicada em coluna empacotada com Sephadex LH 20 e as frações contendo vicenina-2 foram purificadas utilizando HPLC-DAD preparativo, da mesma forma como descrito anteriormente (esse processo foi repetido 5 vezes, ou seja com aproximadamente 20 g da fração hidroalcoólica).

Para a confirmação da identidade dos compostos isolados, foi utilizado o método desenvolvido anteriormente para análise do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *L. salicifolia* (Gouvea et al., 2012). Assim, foram comparados o tempo de retenção, espectros de massas (MS/MS e HRESI) e os espectros de UV das substâncias isoladas. Para a reprodução desse método, foi utilizado um HPLC-DAD composto por uma bomba LC-20, detector DAD SPD-M20A, controlador CBM20A e software LC solution (Shimadzu). Foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS-2 (5 µm, 4,6 x 250 mm) (Sigma Aldrich), acoplada a uma pré-coluna de 1 cm de material equivalente.

As massas acuradas foram obtidas em um espectrômetro de massas de alta resolução modelo micrOTOF (Bruker Daltonics) com ionização por eletrospray (ESI) e analisador do tipo tempo de voo. Também foram realizadas análises de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) de ¹H e ¹³C, utilizando o equipamento espectrômetro Bruker-Advance DRX 400, operando em 400 MHz para as análises de ¹H e em 100 MHz para as análises de ¹³C.

3.2 Preparo das amostras para análise por UPLC-DAD-MS/MS e HPLC-DAD

3.2.1 Amostras dos extratos das folhas de *L. salicifolia* analisados por UPLC-DAD-MS/MS

Foram realizadas análises para determinar a melhor extração de vicenina-2 e ácido lychnofólico antes da obtenção do extrato. Essas extrações foram feitas com diferentes proporções de uma mistura de EtOH e H₂O, sendo testadas: EtOH/H₂O (1:1; 2:3; 3:2; 4:1).

Quanto ao preparo das amostras das curvas de calibração todas as soluções mães foram feitas em acetonitrila (MeCN)/H₂O (9:1). As diluições foram feitas seriadamente utilizando uma solução de MeCN/H₂O (1:9) com 0,1% de ácido acético adicionando-se o padrão interno quercetina 100 ng/mL. A amostra do extrato foi preparada utilizando 10 mg do extrato seco ressuspendido em 10 mL da mesma solução, posteriormente filtrado em membranas de 13 mm de PTFE, poro de 0,22 µm descartáveis (Millex, Millipore) e analisado por UPLC-DAD-MS/MS.

3.2.2 Amostras das reações com metaloporfirinas analisadas por UPLC-DAD-MS/MS

As reações com metaloporfirinas foram realizadas em MeCN/H₂O (9:1). Após decorrido o tempo de reação (24 horas) as amostras foram submetidas à partição com igual volume de hexano. Após a separação das fases, a fração aquosa foi filtrada utilizando membranas de 13 mm de PTFE, poro de 0,22 µm descartáveis (Millex, Millipore) e uma alíquota foi injetada para análise no UPLC-DAD-MS/MS.

3.2.3 Amostras das reações com microsossomas hepáticos de ratos analisadas por UPLC-DAD-MS/MS

No caso das amostras das reações com microsossomas hepáticos de ratos, após o tempo de incubação, foi adicionado 1000 µL de MeCN e 1000 µL de Hex ao volume total de reação (1000 µL) e as amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas (10 minutos, 25°C, 21380 x g; centrífuga M-240R, Boeco). A fase MeCN/H₂O foi então filtrada (membranas de 13 mm de PTFE, poro de 0,22 µm descartáveis; Millex, Millipore) e uma alíquota de 5 µl foi injetada para análise no UPLC-DAD-MS/MS.

3.2.4 Amostras das reações com microsossomas hepáticos humanos analisadas por HPLC-DAD

Nas reações com microsossomas hepáticos humanos o mesmo procedimento descrito no item acima foi adotado. Porém, a cada tempo, as amostras foram coletadas (100 µl), adicionou-se MeCN (100 µl) e Hex (100 µl), agitou-se utilizando agitador vortex durante 30 segundos. Centrifugou-se por 10 minutos a 25°C, 9200 x g (centrífuga Eppendorf modelo 5415R). As amostras foram filtradas utilizando filtros Titan3 de 0,45 µm, 17 mm, de PVDF e uma alíquota de 5 µl foi injetada e analisada por HPLC-DAD.

3.2.5 Amostras do estudo com células Caco-2 analisadas por HPLC-DAD

As amostras dos estudos com células Caco-2 foram coletadas dos *inserts* onde os compostos foram incubados com a monocamada de células e diretamente injetadas (volume de injeção de 5 µL) e analisadas por HPLC-DAD.

3.2.6 Amostras dos estudos de farmacocinética em ratos analisadas por UPLC-DAD-MS/MS

Quanto às amostras de plasma de ratos, inicialmente, o sangue coletado em tubos heparinizados, centrifugado por 5 minutos a temperatura ambiente (centrífuga Ministar, 2000 x g). O plasma foi então separado. A cada 100 µl de plasma foi adicionado 100 µl da solução contendo padrão interno cumarina em MeCN. A concentração final do padrão interno nas amostras foi de 250 ng/mL. Adicionou-se posteriormente 100 µl de Hex. Agitou-se em vortex e as amostras foram centrifugadas a 15°C, por 15 minutos a 21380 x g (centrífuga Boeco, modelo M-240R). A fase MeCN/H₂O foi então filtrada utilizando filtros de 13 mm de PTFE, poro de 0,22 µm descartáveis (Millex, Millipore) e uma alíquota de 5 µl foi injetada para análise no UPLC-DAD-MS/MS.

3.3 Desenvolvimento da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise da vicienina-2 e do ácido lychnofólico

3.3.1 Condições cromatográficas utilizadas nas análises por UPLC-DAD-MS/MS

Foi utilizado um sistema de UPLC-DAD-MS/MS ACQUITY UPLC Waters, o qual é composto por uma bomba binária, injetor automático, degasseificador, forno para coluna, detector DAD (eLambda 800 nm) e detector de massas TQ equipado com uma fonte de eletrospray. A coluna empregada foi uma ACQUITY 1,7 µm BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) C18, dimensões de 2,1 mm x 50 mm, equipada com pré-coluna de material equivalente (Vanguard 2.1 mm x 5 mm). O software utilizado para a aquisição e edição dos dados foi o MassLynx V4.1. Todos são da marca Waters.

A fase móvel utilizada inicialmente foi MeCN e H₂O contendo ambas 1% de ácido acético (HAc). Com o decorrer do trabalho a fase móvel foi modificada e passou-se a utilizar acetonitrila e água contendo apenas 0,1% de HAc a fim de se evitar a supressão de ionização no detector de massas que poderia ser causada pelo excesso de ácido acético na fase móvel. Com essa alteração não houve uma mudança significativa nos tempos de retenção observados, por isso optou-se por essa fase móvel. A temperatura da coluna foi mantida a 40°C e as amostras acondicionadas a 20°C no injetor automático. O vazão de fase móvel foi de 0,3 mL/min e o volume de injeção de 5 µl.

No sistema de injeção automática do UPLC, foi utilizado uma mistura contendo H₂O/MeOH/MeCN (2:4:4; 400 µl) como o solvente forte, ou seja, com maior quantidade de solvente orgânico e H₂O/MeOH/MeCN (8:1:1; 1000 µl) como solvente fraco (menor quantidade de solvente orgânico) para limpeza. O modo de injeção utilizado para as análises por UPLC-DAD-MS/MS foi o *partial loop uses needle overfill*, neste caso o solvente fraco de limpeza não é injetado juntamente com a amostra, como ocorre no modo *partial loop*. Além disso, em um *loop* de 10 µl como o utilizado neste trabalho, para 5 µl de injeção, o volume de amostra gasto por injeção é em torno de apenas 20 µl, enquanto o modo *full loop* a única opção de injeção seria 10 µl e para isso seria gasto 40 µl de amostra. O modo de injeção utilizado demonstrou valores de precisão e exatidão adequados além do volume de amostra necessário para a injeção ser menor.

O gradiente de fase móvel também foi otimizado com o decorrer das análises. Assim, alguns cromatogramas de análises das reações com metaloporfirinas apresentados neste trabalho foram adquiridos utilizando o gradiente de eluição 1, e os cromatogramas finais, dos métodos validados para as quantificações foram adquiridos utilizando o gradiente final. Ambos estão apresentados na tabela 2:

Tabela 2. Gradientes de fase móvel utilizados no método por UPLC-DAD-MS/MS para análise de vicianina-2 e do ácido lychnofólico.

Gradiente 1		Gradiente final (otimizado)	
Tempo (minutos)	Acetonitrila % (1% ácido acético)	Tempo (minutos)	Acetonitrila % (0,1% ácido acético)
0,01	5	0,01	3
3,00	10	1,00	15
4,00	15	3,50	100
5,00	100	4,50	100
6,00	100		

Todos os solventes utilizados tanto nas análises por HPLC como por UPLC foram de grau espectroscópico (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker e/ou LiChosolv, Merck Millipore), além de água ultrapurificada (Milli-Q, 18 mΩ, sistema Direct-Q, Millipore).

3.3.2 Condições otimizadas para análise por espectrometria de massas

Para quantificação tanto da vicianina-2 como do ácido lychnofólico foi otimizado o método MRM, assim como para os padrões internos quercetina e cumarina. Os parâmetros estão na tabela 3:

Tabela 3. Parâmetros do método MRM para detecção da vicianina-2, do ácido lychnofólico e dos padrões internos quercetina e cumarina.

Composto	modo de ionização	ions monitorados (<i>m/z</i>)	energia no cone (V)	energia de colisão (eV)
vicianina-2	negativo	593 > 353	30	35
ácido lychnofólico	negativo	249 > 205	20	20
quercetina (PI)	negativo	301 > 151	30	30
cumarina (PI)	positivo	147 > 91	20	25

Quanto aos parâmetros do MS tune, estes estão de acordo com a calibração do equipamento, assim no modo MRM o MS tune é lincado com a calibração para métodos quantitativos. Para as aquisições em modo scan ou SIR os parâmetros estão lincados com a calibração qualitativa. Os parâmetros utilizados no tune do detector de massas estão descritos na tabela 4. Nos métodos de aquisição em que não há fragmentação, como scan e SIR, o fluxo do gás de colisão é desligado e não há pressão na cela de colisão.

Tabela 4. Parâmetros de tune do espectrômetro de massas ajustados para a análise da vicianina-2 e do ácido lychnofólico.

Parâmetros ajustados no MS TUNE				
			MRM	SCAN
Capilar	2,5 kV	LM resolução 1	2,7	14,8
Cone:	30 V	HM resolução 1	15,0	8,7
Rf lentes	0,1	energia do íon 1	0,5	0,7
Temperatura da fonte:	150°C	Entrada	50	
Temperatura de dessolvatação	350°C	Colisão		3
Fluxo de gás de dessolvatação (nitrogênio)	600 L/h	Saída		50
Fluxo de gás no cone (nitrogênio)	0 L/h	LM resolução 2	9,3	14,3
Fluxo do gás de colisão (argônio)	0,15 L/h	HM resolução 2	14,9	8,3
Pressão na cela de colisão	$3,02 \times 10^{-3}$ mBar	energia do íon 2	0,6	0,9

Sendo LM: *Low Mass*; HM: *High Mass*

3.4 Metodologia por HPLC-DAD utilizada nos estudos de permeação em células Caco-2 e metabolização por microsomas hepáticos humanos

Os experimentos com as células Caco-2 e microsomas hepáticos humanos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Veronika Butterweck na Fachhochschule Nordwestschweiz (Basiléia/Suíça).

As análises dos experimentos com células Caco-2 e microsomas hepáticos humanos foram realizadas em HPLC-DAD (Agilent) constituído de detector DAD modelo [G4212A] [DEBAF00471]; de um injetor automático modelo Low Flow Hip Sampler [G1377A] [DE64555676] e uma bomba Cap Pump [G1376a] [DEAAG00144].

A coluna utilizada foi uma Nucleodur Macherey-Nagel C18 Gravity, 3 μ m (70 mm x 4,0 mm; Machery-Nagel). A fase móvel utilizada foi MeCN e H₂O contendo ambas 1% de HAc. A coluna foi mantida a temperatura ambiente e as amostras acondicionadas a 25°C no injetor automático. O vazão de fase móvel foi de 0,3 mL/min e o volume de injeção foi de 2 e 5 μ l.

Os solventes utilizados nessa etapa foram de grau espectroscópico (Sigma) e a água ultrapurificada em um sistema Arium (Sartorius Stedim Biotech GmbH).

O gradiente de fase móvel utilizado está descrito na tabela a seguir:

Tabela 5. Gradiente de fase móvel utilizado no método por HPLC-DAD nos estudos de permeação em células Caco-2 e metabolização por microsomas hepáticos humanos.

Tempo (minutos)	% acetonitrila (1 % de ácido acético)
0	5
5	45
10	100
13	100

3.5 Reações utilizando metaloporfirinas

As reações com metaloporfirinas foram realizadas com o auxílio da Dra. Valéria P. Barros e da Profa. Dra. Marilda das Dores Assis (FFCLRP- USP).

Foram testadas as seguintes metaloporfirinas: MnTAPP, NiTAPP, FeTAPP, FeTFPP, FeTMPyP, FeTDCPP, além de Mn(Salen).

Primeiramente os testes foram realizados utilizando como oxidante PhIO (iodosilbenzeno). Os substratos (vicenina-2 e ácido lychnofólico) foram solubilizados em MeCN/H₂O (9:1). Em todos os testes os parâmetros foram mantidos, como solvente, volume de reação (1,5 mL), tempo (24 horas) e o número de mols do catalisador (5×10^{-8}). A proporção catalisador:substrato:oxidante foi de 1:100:40.

Utilizando-se Mn(Salen) foram testados também diferentes oxidantes além de PhIO, como o *m*-CPBA (ácido *m*-cloroperbenzóico), PhIOAc₂ (iodosilbenzeno diacetato), *t*-BHP (*tert*-butil hidroperóxido). Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente, sob atmosfera de ar, em frascos de vidro com agitação magnética.

3.6 Estudo do metabolismo da vicenina-2 e do ácido lychnofólico utilizando microsossomas hepáticos de ratos

Os estudos *in vitro* utilizando microsossomas hepáticos de ratos foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira (FFCLRP-USP) e da aluna Fernanda Lima.

Para a obtenção dos microsossomas hepáticos foi seguido o método já descrito na literatura (De Oliveira *et al.*, 2009). A incubação foi feita adicionando-se a solução do analito aos tubos (25 µl). Posteriormente, foi adicionado à solução de incubação o sistema de

regeneração de NADPH contendo NAD^+ , glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase. O meio microsomal foi pré-incubado na presença do substrato e do sistema de regeneração de NADPH a 37°C durante 5 min.

Finalmente, foi acrescentada a fração microsomal do fígado de rato e o volume do meio de incubação (1000 μl) completado com tampão fosfato 1 mol/L pH 7,4. A incubação foi realizada sob agitação a 37°C durante determinado tempo em banho metabólico (Dubnoff, Solab). Depois de decorrido o tempo de incubação, a reação foi imediatamente interrompida adicionando-se 500 μL de hexano e 500 μL de acetonitrila. Uma alíquota da fração MeCN/ H_2O foi analisada por UPLC-DAD-MS/MS.

Também foram feitos controles sem a adição do sistema de regeneração de NADPH. Foram testadas as concentrações de 0,25; 0,5 e 1,0 mg/mL dos analitos (25 μL adicionados em um volume total final de 1000 μL), além dos tempos de incubação de 60, 90 e 120 minutos e as concentrações de 1; 2 e 3 mg/mL de proteínas.

3.7 Estudo do metabolismo da vicenina-2 e do ácido lychnofólico utilizando microsomas hepáticos humanos

O *pool* de microsomas hepáticos humanos foi adquirido da BD Gentest (*pool* obtido de 50 doadores), assim como as soluções padrões para as reações tanto de fase I como de fase II. Para as primeiras foram adquiridas as soluções de regeneração do sistema de NADPH: solução A (contendo 26 mM de NADP^+ , 66 mM de glicose-6-fosfato e 66 mM de MgCl_2 em água) e solução B (contendo 40 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase em 5 mM de citrato de sódio). Neste caso, considerando o volume final de 500 μl era adicionado o volume fixo de 25 μl da solução A e 5 μl da solução B. O volume da solução contendo o substrato variou de acordo com a concentração final desejada, o mesmo ocorreu quanto ao volume de

microssomas pipetado, já que foram feitos testes com diferentes concentrações proteicas. O volume final foi ajustado sempre com tampão fosfato.

Para a reação de fase II, utilizou-se a solução A (25 mM de 5'-uridina difosfato ácido glucurônico) e solução B (250 mM de tampão Tris-HCl, 40 mM de MgCl₂, 0,125 mg/mL de alameticina em água). Para o volume final de 500 µl era adicionado o volume fixo de 100 µl da solução B e 40 µl da solução A, sendo que quanto ao substrato e microssomas assim como nos testes das reações de fase I, o volume foi ajustado de acordo com a concentração final e neste caso para completar o volume final de reação foi utilizada água.

Os substratos foram solubilizados em etanol 40%. Todas as reações foram testadas em diferentes tempos. Para os cálculos foram utilizados os softwares Excel 2007 e o GraphPad Prism 5.

3.8 Avaliação da permeabilidade dos compostos em células Caco-2

As células Caco-2 foram cultivadas de acordo com Kapitza e colaboradores (Kapitza *et al.*, 2007). Para o cultivo das células foi utilizado meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) com alta concentração de glicose e sem piruvato, soro fetal bovino (FCS), L-glutamina, solução de aminoácidos não-essenciais (100 X) e tampão fosfato salina (PBS), os quais foram adquiridas da Gibco. Para o cultivo das células o meio DMEM foi suplementado com 2 mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos não-essenciais e 10% de FCS. O meio de transporte utilizado para os estudos de permeação foi preparado utilizando-se meio base DMEM (Sigma) não contendo vermelho de fenol, piruvato de sódio, FCS e NaHCO₃. A base era então dissolvida em água bi-destilada e o meio suplementado com glicose (4,5 g/L), Hepes (4,76 g/L), NaCl (1,987 g/L) e L-glutamina (0,876 g/L).

Também foram realizados testes com meio de transporte pobre em glicose (1 g/L) e totalmente isento de glicose. O pH foi ajustado para 7,4 ou 6,0 e o meio final foi sempre submetido à filtração estéril. Foram utilizadas placas de Petri (56,7 cm²) e placas de 6 poços adquiridos da Costar. O meio de transporte utilizado como matriz para a validação da metodologia analítica foi com pH 7,4 e rico em glicose (4,5 g/L)

As células Caco-2 foram cultivadas em placas de Petri (figura 8), mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 8% de CO₂ e em equilíbrio com água bi-distilada. A passagem das células foi feita sempre que as células atingiam 90% de confluência, através de tratamento com tripsina 0,25% contendo 2,65 mM de EDTA. As células foram utilizadas para os experimentos entre as passagens de número 60 a 65.

Figura 8. Células Caco-2 sendo cultivadas em placas de Petri (passagem P59) antes de atingirem 90% de confluência e serem semeadas nos *inserts* da placa de 6 poços.

As células foram semeadas nos *inserts* da placa de 6 poços na densidade de aproximadamente 114000 células/cm² em um *insert* de área 4,7 cm² e o tamanho do poro da membrana de policarbonato era de 0,4 µm. O meio de cultura foi trocado em dias alternados e a monocamada de células foi utilizada entre os 19º e 21º dia após a semeadura.

Para os experimentos de permeação, a solução contendo os compostos foi adicionada tanto no compartimento apical como no basal em relação à monocamada.

A TEER da monocamada de células cultivadas no *insert* da placa de 6 poços foi monitorada antes e depois dos experimentos de permeação utilizando um voltímetro epitelial EVOM (World Precision Instruments).

Antes dos experimentos, as monocamadas de células Caco-2 eram lavadas com PBS Dulbecco (contendo Ca^{2+} e Mg^{2+}) e pré-incubadas com meio de transporte por 1 hora a 37°C antes da medida da TEER. As monocamadas foram consideradas fisiologicamente e morfológicamente bem desenvolvidas com pelo menos 19 dias após a semeadura e com valor de TEER entre 400 e 650 Ωcm^2 .

A permeação dos compostos através das monocamadas foi monitorada aliquotando-se 100 μL das amostras tanto do compartimento basal como do apical. Foi retirado no máximo 800 μL já que esse volume não era repostado. O volume inicial de solução no compartimento apical foi de 1,6 mL e no basal de 2,8 mL. Durante os experimentos, a placa de 6 poços foi mantida a 37°C em atmosfera saturada de vapor e sob agitação em um agitador orbital a 50 min^{-1} (Edmund Bühler). As amostras foram diretamente injetadas (volume de injeção de 5 μL) e analisadas por HPLC-DAD.

3.9 Determinação da fração ligada à proteína plasmática do ácido lychnofólico

Para a determinação da fração ligada à proteína plasmática do ácido lychnofólico, foram utilizados tubos para ultrafiltração (Centrifree, Millipore). Foram avaliadas amostras de plasma de ratos adicionadas de ácido lychnofólico nas concentrações finais de 25, 1250 e 2000 ng/mL em triplicata.

Primeiramente o plasma adicionado de ácido lychnofólico foi incubado durante 20 minutos a 37°C. As amostras (500 μL) foram então transferidas para os tubos de ultracentrifugação e centrifugadas a 24°C, 2500 x g, por 25 minutos (centrífuga Eppendorf

modelo 5810R). O material ultrafiltrado coletado foi então analisado por UPLC-DAD-MS/MS (descrição no item 3.3.1.: modo MRM de aquisição, gradiente final de fase móvel) para a determinação da concentração de ácido lychnofólico na porção ultrafiltrada. Também foram analisadas nas mesmas concentrações as mesmas concentrações preparadas apenas em água e centrifugadas nas mesmas condições citadas para avaliarmos a adsorção inespecífica à membrana do dispositivo.

3.10 Avaliação do perfil farmacocinético da vicenina-2 e do ácido lychnofólico em ratos

O estudo do perfil farmacocinético das substâncias desse trabalho foi desenvolvido em colaboração com a Profa. Dra. Andrea Diniz (Universidade Estadual de Maringá; Departamento de Farmácia) e da aluna Gabriela Amaral Buqui.

Para este trabalho, foram utilizados ratos machos da raça Wistar com aproximadamente 7 semanas de idade, pesando entre 210 a 250 g, fornecidos pelo Biotério Central da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram ambientados a 25°C com ciclos de luz de 12 horas. Água e comida foram fornecidas à vontade.

As soluções de vicenina-2 e ácido lychnofólico administradas para os animais foram preparadas em salina e solubilizadas com auxílio de dimetilsulfóxido (DMSO, concentração final máxima de 5%). Quanto à dose administrada, não há dados na literatura de estudos farmacológicos realizados utilizando como via de administração a via intravenosa. Assim, os dados da literatura serviram como guias para os primeiros testes e os estudos pilotos foram fundamentais para a definição da quantidade de substância a ser administrada e que era possível detectar no plasma dos animais de acordo com o método desenvolvido para análise por UPLC-MS/MS. Assim, a dose administrada para a vicenina-2 foi de 0,5 mg/kg e para o ácido lychnofólico 2 mg/kg.

Para a administração IV dos compostos foi utilizado um cateter intravenoso (SAFELET NIPRO, amarelo, modelo 24G x 3/4”), o qual era inserido em uma das veias caudais laterais do animal. Para facilitar a visualização das veias foi utilizada uma lâmpada incandescente que com o calor gerado favorece a dilatação das veias e a visualização das mesmas. Dessa forma, os animais eram colocados em uma caixa de madeira (dimensões: 19,5 cm x 35 cm x 30 cm) com a lâmpada fixada no canto esquerdo superior da tampa, e eram mantidos dentro dessa caixa fechada por no máximo 1 minuto para que houvesse a dilatação das veias.

Amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados (aproximadamente 200 µl de sangue por coleta, em microtubos de 600 µl) utilizando-se o mesmo tipo de cateter, porém durante no mínimo 1 hora de coleta, tomou-se o cuidado de não utilizar a mesma veia na qual a substância foi administrada.

Os tempos de coleta foram otimizados de acordo com os resultados obtidos nos estudos pilotos. Para a vicenina-2 foram coletadas amostras nos tempos: 5; 15; 25; 35; 45; 60; 90 e 120 minutos. Já para o ácido lychnofólico foi necessário diminuir o intervalo de coleta, já que nos experimentos pilotos foi verificado que a meia vida do composto era muito baixo. Assim, as coletas foram feitas nos seguintes tempos: 3; 5; 8; 12; 15; 20; 25 e 30 minutos.

Após a coleta do sangue, os tubos foram imediatamente centrifugados durante 5 minutos a temperatura ambiente (mini centrífuga Ministar, 2000 x g) e o plasma então foi separado e armazenado em freezer a -80°C até o momento do preparo da amostra para análise por UPLC-MS/MS.

Para a coleta de plasma branco, os animais eram sacrificados por decaptação e o sangue coletado em tubos heparinizados e da mesma forma centrifugados para a separação do plasma o qual era armazenado em freezer a -80°C até o momento do uso. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se os softwares Excel 2007 e o Scientist.

A partir das curvas de concentração plasmática de vicianina-2 ou de ácido lychnofólico em função do tempo, calculou-se os parâmetros farmacocinéticos não compartimentais: área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta (ASC_{0-t}) (equação. 8), área sob a curva extrapolada ($ASC_{t-\infty}$) (equação. 9), área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) (equação. 10), área sob a curva no primeiro momento ($ASMC_{0-\infty}$) (equação. 11) e tempo de residência média (TRM) (equação. 7).

$$ASC_{0-\infty} = (Cp_0 + Cp_1/2) \cdot \Delta t + (Cp_1 + Cp_2/2) \cdot \Delta t + (Cp_x + Cp_t/2) \cdot \Delta t \quad (8)$$

Sendo que ASC_{0-t} é a área sob a curva no tempo zero ao último tempo de coleta, Cp_0 , Cp_1 , Cp_2 são as concentrações plasmáticas no tempo zero e nos tempos das coletas subsequentes, sendo Cp_x a concentração no penúltimo tempo de coleta e Cp_t a concentração no último tempo de coleta; Δt é a variação do intervalo de tempo de coleta das amostras de plasma.

$$ASC_{t-\infty} = Cp_t/k_e \quad (9)$$

Neste caso, $ASC_{t-\infty}$ é a área sob a curva extrapolada, Cp_t a concentração no último tempo de coleta e k_e a constante de eliminação determinada pelo modelo monocompartimental, por regressão não linear.

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + ASC_{t-\infty} \quad (10)$$

A área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi calculada pela soma de ASC_{0-t} e $ASC_{t-\infty}$, calculadas como as equações 8 e 9.

$$ASMC_{0-t} = [(Cp_0 + Cp_1)/2] \cdot \Delta t + [(Cp_1 + Cp_2)/2] \cdot \Delta t + [(Cp_x + Cp_t)/2] \cdot \Delta t \quad (11)$$

$ASMC_{0-t}$ é a área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao último tempo de coleta, Cp_0 , Cp_1 , Cp_2 são as concentrações plasmáticas no tempo zero e nos tempos das coletas subsequentes, sendo Cp_x a concentração no penúltimo tempo de coleta e Cp_t a concentração no último tempo de coleta; Δt é a variação do intervalo de tempo de coleta das amostras de plasma.

$$ASMC_{t-\infty} = (Cp_t \cdot t / \lambda + Cp_t / \lambda^2) \cdot \Delta t \quad (12)$$

Sendo que $ASMC_{t-\infty}$ é a área sob a curva do último tempo de coleta ao infinito, t é o último tempo de coleta, λ é a inclinação dos 3 últimos pontos do gráfico em escala monologarítmica $Cp_t * t$ versus tempo.

$$ASMC_{0-\infty} = ASMC_{0-t} + ASMC_{t-\infty} \quad (13)$$

Onde $ASMC_{0-\infty}$ é área sob a curva do tempo zero ao infinito, $ASMC_{0-t}$ é a área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao último tempo de coleta, calculado de acordo com a equação 11, $ASMC_{t-\infty}$ é a área sob a curva no primeiro momento do último tempo de coleta ao infinito, claculado de acordo com a equação 12. Sequencialmente, os dados foram analisados quanto ao modelo farmacocinético compartimental que mais se ajustavam aos dados. Para isso foram testados os modelos monocompartimental e bicompartimental (Gibaldi e Perrier, 1989) utilizando o software Scientist.

A cópia da certificação concedida pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) do campus da USP de Ribeirão Preto, para o uso dos animais neste estudo está em anexo neste documento, protocolo nº: 12.1.1054.53.1.

3.11 Validação das metodologias de análise por UPLC-DAD-MS/MS e HPLC-DAD

As validações das metodologias analíticas foram realizadas seguindo as recomendações nacionais e internacionais de acordo com a necessidade de aplicação de cada método para este trabalho (ICH, 1996; Anvisa, 2003; 2012). Para os cálculos foram utilizados os softwares Excel 2007 e o Waters Quanlynx, presente no pacote MassLynx 4.1.

Como já citado anteriormente, a metodologia por UPLC-DAD-MS/MS foi validada para a quantificação da vicenina-2 e do ácido lychnofólico tanto para a análise do extrato de *L. salicifolia* bem como para as análises em plasma de ratos e outra metodologia por HPLC-DAD foi validada para os estudos com células Caco-2. Assim, os seguintes parâmetros foram avaliados: Linearidade, Precisão, Exatidão e Estabilidade.

Os valores de precisão estão expressos como coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula: $CV (\%) = (DP/CMD) \times 100$. Em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O Erro Padrão Relativo (EPR) foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$EPR = [(Concentração\ média\ experimental - Valor\ nominal) / Valor\ nominal] * 100$$

3.11.1 Validação da metodologia de análise por UPLC-DAD-MS/MS do extrato das folhas de *L. salicifolia*

Para avaliar o intervalo linear do método de análise do extrato de *L. salicifolia* foram injetadas em triplicata, soluções padrões nas concentrações de 0,5; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1000; 1500; 2000 e 5000 ng/mL, as quais foram obtidas pela diluição seriada em solução de MeCN/H₂O (1:9) com 0,1% de ácido acético adicionando-se o padrão interno quercetina 100 ng/mL.

A precisão intradia foi avaliada injetando-se as soluções de controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) em triplicata no caso do método para análise do extrato de *L. salicifolia*.

Já a precisão intermediária foi determinada através da injeção das soluções padrões também nas 3 concentrações: baixa, média e alta no mesmo laboratório, com o mesmo analista, porém em dias diferentes.

A exatidão intracorridas foi avaliada calculando-se o Erro Padrão Relativo (EPR) a partir da análise de 3 concentrações (CQB, CQM e CQA) injetadas em triplicata. O mesmo procedimento foi adotado para avaliar a exatidão intercorridas considerando análises realizadas em 3 dias diferentes.

Para cada método foi avaliada a estabilidade das soluções de acordo com as possíveis necessidades das análises. Assim, para o método de análise do extrato de *L. salicifolia* foi avaliada a estabilidade das soluções em temperatura ambiente por até 48 horas.

3.11.2 Validação da metodologia de análise por HPLC-DAD nos estudos de permeabilidade em células Caco-2

No caso do método para avaliar a permeação das substâncias em células Caco-2 as soluções utilizadas para avaliar a linearidade (1,87; 3,75; 7,5; 15; 30; 60; 120 e 240 µg/mL ou seja; para a vicenina-2: 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µM e para o ácido lychnofólico: 3,75; 7,5; 15; 30; 60; 120; 240 e 480 µM) foram preparadas adicionando as soluções padrão (preparadas em EtOH/H₂O 1:9) na matriz, ou seja, meio de transporte.

A precisão intradia foi avaliada injetando-se as soluções de controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) preparadas adicionando as soluções padrões adicionadas na matriz também em triplicata nos estudos com células Caco-2.

A precisão intermediária foi determinada da mesma forma descrita anteriormente, também nas 3 concentrações: baixa, média e alta no mesmo laboratório, com o mesmo analista, porém em dias diferentes.

A exatidão intracorridas foi avaliada calculando-se o Erro Padrão Relativo (EPR) a partir da análise de 3 concentrações (CQB, CQM e CQA) injetadas em triplicata para a validação do método de análise das células Caco-2 mesmo dia. A exatidão intercorridas, foi avaliada da mesma forma, porém para análises realizadas em 3 dias diferentes.

Quanto à estabilidade nos estudos com as células Caco-2, foram avaliadas as estabilidades das soluções contendo os analitos preparadas em MeCN/H₂O e as soluções dos analitos preparadas em matriz. Foram avaliadas as estabilidades por até 96 horas no injetor

automático com controle de temperatura a 25°C, além de ciclos de congelamento e descongelamento, sendo avaliados 3 ciclos no total.

Durante as análises, não foi necessário o congelamento das amostras, porém, em alguns casos, devido ao grande número de amostras geradas em cada experimento, o tempo de espera no injetor automático chegou a mais de 24 horas, porém isso não foi um problema, já que a estabilidade das soluções foi avaliada em meio de transporte utilizado nos experimentos.

3.11.3 Validação da metodologia de análise por UPLC-DAD-MS/MS para análise da vicianina-2 e do ácido lychnofólico em plasma de ratos

Para avaliar o intervalo linear do método de análise em plasma de ratos foram injetadas em triplicata, soluções padrões adicionadas em plasma branco de ratos nas concentrações finais de 0,5; 1; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1000; 1500; 2000 e 5000 ng/mL. Dessa forma, primeiramente foram adicionadas as soluções padrões diluídas apenas em MeCN, depois adicionada a solução de cumarina (padrão interno) em MeCN, a fim de se obter a concentração final de cumarina de 250 ng/mL.

A precisão intradia foi avaliada injetando-se as soluções de controle de qualidade (CQ) nas concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) em quintuplicata para a análise do plasma de ratos, sendo que neste caso também foi injetada em quintuplicata a concentração referente ao limite inferior de quantificação (LIQ).

Já a precisão intermediária foi determinada através da injeção das soluções padrões também nas 3 concentrações: baixa, média e alta no mesmo laboratório, com o mesmo analista, porém em dias diferentes. Também foi analisada a concentração referente ao LIQ.

A exatidão intracorridas foi avaliada calculando-se o Erro Padrão Relativo (EPR) a partir da análise de 4 concentrações (LIQ, CQB, CQM e CQA) injetadas em quintuplicata.

Já no caso da exatidão intercorridas, o mesmo cálculo foi feito, porém para análises realizadas em 3 dias diferentes.

Para avaliar a estabilidade das amostras de plasma de ratos, foi avaliada a estabilidade do plasma em freezer a -80 °C por 1 mês e 1 ciclo de congelamento e descongelamento.

É importante ressaltar que em cada caso a possibilidade de análise das amostras imediatamente foi preferida quando possível. No caso das amostras dos estudos com metaloporfirinas, as amostras se mostraram extremamente instáveis, provavelmente devido não só a instabilidade intrínseca de alguns produtos possivelmente formados, como também pela possível permanência de oxidante mesmo após o tempo requerido para a finalização da reação. Para evitar a degradação dos produtos formados, as reações foram secas e ressuspendidas apenas no momento da análise.

Quanto às amostras de plasma de ratos, após a coleta e separação do plasma, o mesmo era congelado e armazenado. O tempo de armazenamento não foi superior a 1 mês em nenhum caso, além disso não foi necessário outro ciclo de congelamento e descongelamento para nenhuma amostra analisada.

Resultados e discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e caracterização das substâncias estudadas

Após a purificação por HPLC foi obtido no total 480 mg de vicenina-2 e foi possível purificar cerca de 5 g de ácido lychnofólico. Como já descrito, foi utilizado o método por HPLC-DAD desenvolvido anteriormente (Gouvea *et al.*, 2012), para análise do extrato hidroalcoólico bruto de *L. salicifolia* para a identificação dos compostos através da comparação com o tempo de retenção, espectros de massas e espectros de UV característicos dos compostos.

Essa comparação permitiu a identificação da vicenina-2 e no caso do precipitado formado durante as extrações foi identificado como sendo o ácido lychnofólico. A determinação da pureza dos compostos foi feita através da mesma análise por HPLC-DAD e obteve-se para a vicenina-2 99% de pureza de e para o ácido lychnofólico 98% (figuras 9, 10, 11 e 12).

Figura 9. Espectro de UV da vicenina-2 obtido na análise por HPLC-DAD.

Figura 10. Cromatograma obtido na análise por HPLC-DAD para o padrão de vicenina-2 (325nm).

Figura 11. Espectro de UV do ácido lychnofólico obtido na análise por HPLC-DAD.

Figura 12. Cromatograma obtido na análise por HPLC-DAD para o padrão de ácido lychnofólico (254 nm).

Na análise no modo negativo de ionização por HRESI-MS foi observado o íon $[M-H]^-$ 593,1500 com erro de 2 ppm em relação à massa exata da vicenina-2 desprotonada, nos permitindo confirmar a fórmula molecular: $C_{27}H_{30}O_{15}$. Quanto ao ácido lychnofólico o íon observado $[M-H]^-$ 249,1485 (erro de 4 ppm em relação à massa exata do composto desprotonado) também nos permite confirmar sua fórmula molecular: $C_{15}H_{22}O_3$.

Os dados de RMN obtidos permitiram a confirmação da identidade das duas substâncias utilizadas neste trabalho. Na tabela 6 estão os dados obtidos nas análises de RMN para a vicenina-2 e a comparação com os dados da literatura (Lu e Foo, 2000). Os respectivos espectros estão no Apêndice 1 deste documento.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a vicenina-2 (DMSO- d_6 ; 21°C) isolada neste trabalho e a comparação com os dados publicados anteriormente na literatura (90°C) (Lu e Foo, 2000).

Vicenina-2				
Isolada			Literatura	
	^1H 400 MHz δ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]	^{13}C 100 MHz δ (ppm)	^1H 500 MHz δ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]	^{13}C 125 MHz δ (ppm)
aglicona				
2		164,04		164,13
3	6,84 [1H; s]	102,57	6,59 [1H; s]	102,86
4		182,30		182,30
5		158,53		159,58
5-OH	13,72 [1H; s]			
6		107,47		108,50
7		163,64		162,78
8		105,25		104,78
9		155,02		155,23
10		103,84		103,6
1'		121,47		122,01
2'	8,04 [2 H; d; J 8]	129,02	7,92 [2 H; d; J 8,7]	128,9
3'	6,90 [2 H; d; J 8]	115,78	6,91 [2 H; d; J 8,5]	116,27
4'	-----	161,19	-----	161,42
5'	6,90 [2 H; d J 8]	115,95	6,91 [2 H; d; J 8,5]	116,27
6'	8,04 [2 H; d; J 8]	128,68	7,92 [2 H; d; J 8,7]	128,93
glicosos				
g-1/g-1'	4,76 [1 H; d; J 8]/ 4,81 [1 H; d; J 8]	74,03/73,31	4,76 [1 H; d; J 9,8]/ 4,88 [1 H; d; J 9,8]	74,32/74,51
g-2/g-2'	*	71,90/ 70,85	3,86 [2 H; t; J 8,7]	71,87/71,87
g-3/g-3'	*	77,70/78,80	3,32 [2 H; m]/ 3,38[1 H; m]	78,76/79,1
g-4/g-4'	*	68,99/70,48	3,32 [2 H; m]/ 3,42 [1 H; m]	70,32/70,85
g-5/g-5'	*	80,83/ 81,89	3,30 [1 H; m]/ 3,35 [1 H; m]	81,41/81,88
g-6a/ g-6a'	3,58 [2 H; dd; J 12;8]	59,73/61,21	3,58 [2 H; dd; J 11,9; 7,8]	61,07/61,53
g-6b/ g-6b'	*		3,7 [1 H; d; J 11,0]/ 3,76 [1 H; d; J 11,0]/	

Foi utilizado TMS como padrão interno.

*sinais não informados devido à sobreposição parcial dos sinais pelos sinais dos solventes ou da água.

Na tabela 7 estão os dados obtidos nas análises de RMN para o ácido lychnofólico e a comparação com os dados da literatura (Vichewski *et al.*, 1980). Os respectivos espectros estão no Apêndice 2 deste documento.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3) e ^{13}C (CD_3OD) obtidos para o ácido lychnofólico isolado neste trabalho e a comparação com os dados publicados anteriormente na literatura (Vichewski *et al.*, 1980).

Ácido lychnofólico				
Isolado			Literatura	
	^1H 400 MHz δ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]	^{13}C 100 MHz δ (ppm)	^1H 270 MHz δ (ppm) [integral; multiplicidade; J (Hz)]	^{13}C 67,09 MHz δ (ppm)
1	1,86 [1H; t ; J 8]	58,38	1,84 [1H; t ; J 10]	58,26
2	4,10 [1H; dt ; J 8, 12]	74,00	4,07 [1H; dt ; J 6, 10]	73,73
3a	1,99 [1H; dd ; J 12]	46,04	1,98 [1H; dd ; J 12, 10]	45,84
3b	3,00 [1H; t ; J 12]		2,96 [1H; dd ; J 12, 6]	
4				
5	6,38 [1H; dd ; J 12, 8]	146,98	6,38 [1H; dd ; J 10, 7]	146,67
6a	3,19 [1H; m]	31,23	3,17 [1H; m ; J 10, ?]	30,99
6b	2,26 m		2,23 m	
7 a, b	2,26 m	34,95	2,23 m	34,83
8		153,64		153,34
9	2,49 [1H; m]	45,59	2,46 [1H; dt ; J 11, 10]	45,27
10 a	1,68 [1H; t ; J 12]	42,15	1,64 [1H; tl ; J 10]	42,02
10 b	1,55 [1H; t ; J 12]		1,52 [1H; tl ; J 10]	
11		35,07		35,83
12	1,24 [3 H; s]	23,14	1,19 [3 H; s]	23,07
13	1,17 [3 H; s]	32,19	1,05 [3 H; s]	32,11
14		171,40		171,05
15 a	5,06 [1 H; s/l]	114,45	5,03 [1 H; s/l]	114,23
15 b	4,93 [1 H; s/l]		4,91 [1 H; s/l]	

Foi utilizado TMS como padrão interno.

4.2 Desenvolvimento das metodologias analíticas por UPLC-DAD-MS/MS

4.2.1 Otimização das condições cromatográficas para análise da vicenina-2, do ácido lychnofólico e dos padrões internos quercetina e cumarina

Os primeiros testes realizados neste estudo foram as reações utilizando metaloporfirinas, assim primeiramente, visando à análise de produtos de oxidação, provavelmente de maior polaridade quando comparados às substâncias estudadas, foi utilizado um gradiente de fase móvel com menor proporção de solvente orgânico. Posteriormente, foi observada a possibilidade de tornar o método ainda mais rápido. Por isso o mesmo foi otimizado e as análises finais foram feitas utilizando o segundo gradiente. Ambos estão apresentados na seção Material e Métodos 3.3.1. (tabela 2).

Dessa forma, a metodologia analítica final foi adequada para a análise de todos os experimentos realizados com as diferentes metaloporfirinas bem como com o meio microssomal de fígado de ratos. O mesmo gradiente de fase móvel foi utilizado na análise dos compostos em plasma de ratos.

Quanto ao preparo das amostras, no caso da análise do extrato de *L. salicifolia*, estas eram inicialmente diluídas em MeCN/H₂O 1:1 porém, estava sendo observado um ombro no sinal cromatográfico relativo à vicenina-2 (figura 13, A:Vic), quando a solução de diluição das amostras foi modificada para uma proporção mais próxima à fase móvel inicial com maior quantidade de água (MeCN/H₂O 1:9) não foi mais observado o ombro como pode ser visualizado na figura 13 (B:Vic) melhorando significativamente o perfil cromatográfico.

Figura 13. Cromatogramas obtidos preparando-se as amostras primeiramente em A: MeCN/H₂O 1:1 e posteriormente em B: MeCN/H₂O 1:9 (Vic: vicenina-2; PI: padrão interno quercetina; AL: ácido lychnofólico).

4.2.2 Otimização das condições de ionização da vicenina-2, do ácido lychnofólico e dos padrões internos quercetina e cumarina

No caso da vicenina-2, da quercetina e do ácido lychnofólico, por serem compostos de natureza ácida, o modo de ionização escolhido foi o negativo. Apenas para o padrão interno cumarina, utilizado no estudo em plasma de ratos, o modo positivo de ionização foi o que proporcionou maior intensidade dos íons, sendo, portanto utilizado. Nos espectros apresentados abaixo (figura 14) a energia do cone foi mantida em 20 V e a energia do capilar foi alterada variando de 1 a 4,5 kV. Na figura 14 estão os espectros obtidos com as energias de 1,5; 2,0 e 3,0 kV.

Figura 14. Espectros de massas da solução contendo o padrão de vicenina-2 (m/z 593) e ácido lychnofólico (m/z 249) obtidos com diferentes energias do capilar (1,5; 2,0 e 3,0 kV).

Observa-se que a intensidade dos íons sofre menor alteração quando variamos a energia do capilar do que no caso da variação da energia do cone, em que testamos até 50 V. Na figura 15 estão apresentados os espectros com as energias de 10, 20 e 30 V. Sendo que a energia de 2,5 kV para o capilar e 30 V para o cone são as condições em que observamos a maior intensidade dos íons.

Figura 15. Espectros de massas da solução contendo o padrão de vicenina-2 (m/z 593) e ácido lychnofólico (m/z 249) obtidos com diferentes energias do cone (10, 20 e 30 V).

No caso do ácido lychnofólico, essa energia do cone de 30 V acarreta sua fragmentação na fonte, pois é possível observar o íon de m/z 205 em grande intensidade no espectro, sendo que este é um fragmento característico dessa molécula relativo à perda de CO_2 que ocorre facilmente devido à presença da função ácido carboxílico na molécula. Por essa razão a energia do cone escolhida para a análise dessa substância foi de 20 V.

Nas figura 16 e 17, temos os diferentes espectros de massas obtidos a partir da fragmentação da vicenina-2 e do ácido lychnofólico com diferentes energias de colisão. Pode-se observar que o ácido lychnofólico fragmenta com uma energia de colisão muito menor que a vicenina-2, inclusive na fonte como já discutido anteriormente.

Figura 16. Espectros de massas obtidos no modo negativo de ionização após fragmentação da vicenina-2 utilizando diferentes energias de colisão (20-35 eV).

Figura 17. Espectros de massas obtidos no modo negativo de ionização após fragmentação do ácido lychnofólico utilizando diferentes energias de colisão (0-25 eV).

A energia de colisão de 20 eV foi suficiente para promover a fragmentação do ácido lychnofólico com a formação do íon m/z 205 em grande intensidade (relativo à perda de CO_2 muito favorecida), já para a vicenina-2, a energia de 35 eV foi a que promoveu a fragmentação da molécula desprotonada formando o íon m/z 353 em maior intensidade para ser monitorado no método MRM.

Na tabela 3 apresentada na seção Material e Métodos item 3.3.2. estão apresentados os íons monitorados e as energias de cone e energia de colisão utilizadas no método MRM para aquisição dos dados nas análises por UPLC-MS/MS para quantificação da vicenina-2 e do ácido lychnofólico.

É importante ressaltar que para aumentar a sensibilidade do método, a análise foi dividida em diferentes segmentos de tempo, assim de acordo com o tempo de retenção de cada composto, foi determinada uma janela de tempo para a aquisição de cada transição de MRM. Também é importante enfatizar que para diminuir a quantidade de sujeira no detector de massas, o método foi ajustado para que até o primeiro minuto da análise, o fluxo fosse desviado para o descarte, de 1 a 4 minutos para o detector de massas normalmente e após 4 minutos, durante a limpeza e condicionamento da coluna o fluxo foi desviado novamente para o descarte.

4.3 Validação da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise do extrato hidroalcoólico das folhas de *Lychnophora salicifolia*

A metodologia utilizada para avaliação do teor de vicenina-2 e ácido lychnofólico no extrato de *L. salicifolia* foi validada de acordo com a necessidade dos estudos. A metodologia utilizada posteriormente nas análises de plasma de ratos foi validada separadamente já que se trata de uma matriz completamente diferente e está apresentada a seguir neste documento.

Exemplos de equações da reta obtidas em uma das curvas de calibração encontram-se a seguir, os coeficientes de correlação ao quadrado obtidos em todos os dias da validação mantiveram-se acima de 0,99, sendo considerados adequados. Assim uma das equações obtida para a vicenina-2 foi: $y = 0,495624 x + 0,690214$ e para o ácido lychnofólico: $y = 0,393463 x + 4,69545$.

A faixa de concentração foi determinada de acordo com o intervalo linear do método variando de 10 a 1000 ng/mL.

Limites de detecção e limites de quantificação:

O limite de detecção, além dos limites de quantificação mínimo e máximo para as substâncias estudadas foram determinados através do método visual sendo obtidos a partir da própria curva de calibração construída para avaliação da linearidade. Os valores foram adequados à necessidade dos estudos e podem ser visualizados na tabela 8.

Tabela 8. Valores obtidos na validação da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise do extrato hidroalcoólico das folhas de *Lychnophora salicifolia*.

Parâmetro avaliado	Valores obtidos					
	Vicenina-2			Ácido lychnofólico		
Limite de detecção (ng/mL)	0,5			0,5		
Limite superior de quantificação (ng/mL)	1000			1000		
Limite inferior de quantificação (ng/mL)	10			10		
Concentrações avaliadas (ng/mL)	15	75	750	15	75	750
	CQB	CQM	CQA	CQB	CQM	CQA
Precisão intracorridas (CV %)	5,0	2,7	1,9	4,8	4,8	1,5
Precisão intercorridas (CV %)	2,4	3,5	3,1	2,8	0,6	2,4
Exatidão intracorridas EPR (%)	0,8	0,9	1,0	0,7	2,0	0,9
Exatidão intercorridas EPR (%)	1,1	0,8	1,1	0,9	1,0	1,2
Estabilidade (%)						
24 horas	95	101	97	96	95	103
48 horas	92	93	92	94	94	95
Estabilidade quercetina (PI) (%)	100 ng/mL					
24 horas	98					
48 horas	94					

No caso da repetibilidade (precisão intracorridas), ou seja, a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação foram obtidos coeficientes de variação adequados. Os respectivos valores também se encontram na tabela 8.

Para a avaliação da precisão intermediária (precisão intercorridas), obtidas em 3 dias diferentes, os valores também estão abaixo de 5%, dentro do limite desejado para esse estudo como pode ser visualizado na tabela 8.

Estabilidade:

A solução contendo quercetina 100 ng/mL foi avaliada quanto à sua estabilidade em temperatura ambiente por até 48 horas e os valores sugerem que não há variação significativa após esse período indicando estabilidade desse composto em solução contendo acetonitrila e água. O mesmo ocorre para a vicenina-2 e o ácido lychnofólico que também tiveram sua estabilidade em solução avaliada.

A validação do método analítico garantiu a confiabilidade dos resultados e a credibilidade do método para os propósitos deste estudo.

4.4 Quantificação da vicenina-2 e do ácido lychnofólico presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de *Lychnophora salicifolia*

Para a obtenção do extrato e isolamento dos compostos, foram avaliadas diferentes proporções de etanol e água para extração das folhas secas *L. salicifolia* já que nesse caso era necessária a obtenção tanto de vicenina-2 como do ácido lychnofólico. Assim, a proporção escolhida foi de 50% de etanol, já que essa concentração foi a que propiciou a maior extração das duas substâncias.

Na figura 18 estão os cromatogramas evidenciando a presença desses compostos no extrato obtido. Primeiramente o cromatograma com detecção por DAD e posteriormente os cromatogramas obtidos no modo SIR (*Selected Ion Recording*) monitorando apenas o íon referente à vicenina-2 (m/z 593) e o ácido lychnofólico (m/z 249) no modo negativo de ionização.

Figura 18. Cromatogramas UPLC-DAD e UPLC-MS (modo negativo de ionização) evidenciando a presença da vicenina-2 e do ácido lychnofólico no extrato bruto de *Lychnophora salicifolia*.

Após a partição com hexano e obtenção do extrato seco, foram quantificados (utilizando o modo de aquisição MRM) os compostos de interesse nesse trabalho. Assim no extrato final a concentração da vicenina-2 encontrada foi de 11,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato seco e do ácido lychnofólico de 12,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato seco (figura 19).

Figura 19. Cromatogramas (UPLC-DAD e UPLC-MS/MS modo MRM) obtidos para a quantificação da vicenina-2 e do ácido lychnofólico no extrato final de *Lychnophora salicifolia*.

4.5 Estudos utilizando metaloporfirinas

Como já descrito na seção Material e Métodos, foram testadas neste trabalho as seguintes metaloporfirinas: MnTAPP, NiTAPP, FeTAPP, FeTFPP, FeTMPyP, FeTDCPP além de Mn(Salen) com o oxidante PhIO. Serão apresentados abaixo os cromatogramas exemplificando os produtos das reações acima citadas.

4.5.1 Reações utilizando metaloporfirinas e a vicenina-2

Na figura 20, estão apresentados os cromatogramas obtidos para as reações da vicenina-2, tempo de retenção (t.r.): 4,74 minutos, com as diferentes metaloporfirinas: MnTAPP, NiTAPP, FeTAPP e Mn(Salen) com o oxidante PhIO (t.r. = 5,6 min). Essas análises foram realizadas utilizando o gradiente 1 de fase móvel.

Figura 20. Cromatogramas (UPLC-DAD) obtidos para as reações da vicenina-2 com as diferentes metaloporfirinas: MnTAPP, NiTAPP, Mn(Salen), FeTMPyP com o oxidante PhIO.

Observamos que o catalisador NiTAPP foi responsável por formar um maior número de produtos de oxidação sendo que com o uso de MnTAPP obteve-se um resultado semelhante. É interessante notar que neste caso houve a mudança apenas do metal no núcleo porfirínico. Já no caso do catalisador (Mn)Salen foi o que apresentou um menor número de produtos. Comparando os respectivos espectros de massas e os tempos de retenção, sugere-se que os produtos formados com (Mn)Salen também foram formados com NiTAPP.

Na tabela 9, podem ser visualizados os sinais cromatográficos observados com a NiTAPP e os respectivos íons observados para cada composto.

Tabela 9. Sinais cromatográficos observados nas reações de oxidação da vicienina-2 (t.r. = 4,74 min) utilizando NiTAPP e os respectivos íons para cada composto.

tempo de retenção (minutos)	<i>m/z</i> (modo positivo)	<i>m/z</i> (modo negativo)
4,66*	595	593
4,74	595	593
4,80*	593	591
4,91	591	589
4,92	593	591
4,95	593	591

*sinais observados também para a reação com o catalisador (Mn)Salen.

Observamos que há uma redução de 2 ou 4u nos produtos de oxidação em relação à vicienina-2. No caso de 2u a menos, podemos sugerir a formação de 1 epóxido. O mesmo pode ocorrer 2 vezes e resultar em compostos com 4u a menos que o substrato. Sabe-se que as metaloporfirinas podem favorecer a formação de epóxidos em duplas ligações (Bernadou e Meunier, 2004). Apenas utilizando a espectrometria de massas não é possível inferir exatamente a posição das reações.

Devido à formação de um menor número de produtos quando utilizado como catalisador Mn(Salen) foram testados também diferentes oxidantes além de PhIO, como o *m*-CPBA, PhIOAc₂, *t*-BHP. As análises foram realizadas utilizando o gradiente otimizado de fase móvel (figura 21). Quando utilizado o oxidante PhIOAc₂ foi observada a formação de apenas um produto de oxidação (t.r. = 1,89 min) o qual no espectro de massas no modo positivo de ionização apresentou *m/z* 593, ou seja, 2u a menos que a vicienina-2, indicando a formação de um epóxido ou uma função cetona, porém a formação desse produto se deu em baixíssimo rendimento o que não torna essa reação viável para a obtenção de padrões de

metabólitos. No caso dos outros oxidantes é possível apenas visualizar o sinal cromatográfico referente à vicenina-2 (t.r.=1,80min).

Figura 21. Cromatogramas (UPLC-DAD) obtidos para as reações da vicenina-2 utilizando como catalisador Mn(Salen) e diferentes oxidantes (PhIOAc₂ e *m*-CPBA).

4.5.2 Reações utilizando metaloporfirinas e o ácido lychnofólico

Em relação aos estudos feitos com o ácido lychnofólico e as metaloporfirinas FeTMPyP, NiTAPP, MnTAPP e (Mn)Salen observamos nos respectivos espectros de massas que os produtos formados continuam ionizando no modo negativo (figura 22, tabela 10; utilizado o gradiente 1 para análise, t.r. = 5,35 min para o ácido lychnofólico). Nesse caso a FeTMPyP produziu uma quantidade maior de produtos.

Figura 22. Cromatogramas (UPLC-MS, scan, TIC, modo negativo de ionização) obtidos para as reações do ácido lychnofólico com as diferentes metaloporfirinas: FeTMPyP, Mn(Salen), NiTAPP e MnTAPP com o oxidante PhIO.

Tabela 10. Sinais cromatográficos observados nas reações do ácido lychnofólico utilizando FeTMPyP e os respectivos íons para cada composto.

tempo de retenção (minutos)	m/z (modo positivo)	m/z (modo negativo)
4,99	267	265
5,04	253	251/281
5,13	267	265/281
5,21	267	265
5,35 (ácido lychnofólico)	251	249

Pode-se notar a adição de 16u no caso dos produtos com m/z 265 no modo negativo de ionização e no caso dos m/z 281 a adição de 32u (nesse caso, o aparecimento do sinal m/z 265 pode indicar a fragmentação na fonte do produto formado) sugerindo que um ou dois átomos de oxigênio foram inseridos na molécula. É esperado que essas metaloporfirinas favoreçam a formação de epóxidos em duplas ligações (Bernadou e Meunier, 2004) sendo que no caso o ácido lychnofólico possui duas ligações duplas que poderiam sofrer a epoxidação.

Já que observamos uma maior quantidade de produtos quando utilizadas metaloporfirinas contendo ferro no núcleo porfirínico, foram testadas outras duas metaloporfirinas com esse metal a fim de avaliar se outros produtos de oxidação seriam formados. Nesse caso, foi utilizado o gradiente 2 de fase móvel para análise, na figura 23 podemos observar os cromatogramas relativos ao modo negativo de ionização (TIC) com a FeTDCPP e a FeTFPP utilizando ainda PhIO como agente oxidante. Não foi produzido um maior número de produtos e o consumo do ácido lychnofólico (t.r. = 2,91 min) não foi significativo.

Figura 23. Cromatogramas (UPLC-MS) relativos ao modo negativo de ionização (TIC) após reação de oxidação do ácido lychnofólico utilizando as metaloporfirinas FeTDCPP e a FeTFPP como catalisadores e PhIO como agente oxidante.

Após a obtenção desses resultados foi testado se outro oxidante poderia incrementar o rendimento dessas reações com metaloporfirinas contendo um átomo de ferro central. Assim foi feita a reação com o oxidante *m*-CPBA e pode-se verificar que esse oxidante foi responsável pelo maior consumo do ácido lychnofólico e também a formação de maior quantidade de produtos de oxidação (figura 24, tabela 11).

Figura 24. Cromatogramas (UPLC-MS) relativos ao modo negativo de ionização (TIC) após reação de oxidação do ácido lychnofólico utilizando as metaloporfirinas FeTDCPP e a FeTFPP como catalisadores e *m*-CPBA como agente oxidante.

Tabela 11. Sinais observados após reação de oxidação do ácido lychnofólico utilizando as metaloporfirinas FeTDCPP e a FeTFPP como catalisadores e *m*-CPBA como agente oxidante.

tempo de retenção (minutos)	<i>m/z</i> (modo negativo)
2,28	281
2,41	265
2,46	265
2,63	265
2,73 (<i>m</i> -CPBA)	155
2,91 (ácido lychnofólico)	249

Mais uma vez pode-se notar a adição de 16u e no caso do primeiro sinal a adição de 32u, sugerindo que um ou dois átomos de oxigênio foram inseridos na molécula (figura 25).

Figura 25. Ácido lychnofólico (1) e os possíveis produtos de oxidação (2, 3 e 4) utilizando metaloporfirinas FeTDCPP e a FeTFPP como catalisadores e *m*-CPBA como agente oxidante.

É importante ressaltar que os testes feitos mostraram que em alguns casos as reações sem as metaloporfirinas, ou seja, os controles das reações, aparentemente produzem os mesmos produtos de oxidação que as reações com os catalisadores, apresentando perfil cromatográfico semelhante (figura 26). Deve-se destacar a vantagem do uso das metaloporfirinas como catalisadores que podem conferir estereo e régio seletividade para as reações, assim como as enzimas no meio biológico, sendo por isso utilizadas neste trabalho.

Figura 26. Exemplo de cromatogramas (UPLC-MS, scan) obtidos para o controle e branco da reação do ácido lychnofólico utilizando a metaloporfirina FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como agente oxidante.

No caso do catalisador de Jacobsen, (Mn)Salen, também não foi observado uma intensa formação de produtos utilizando como oxidante PhIO, por isso também foram testados outros, como o *m*-CPBA, PhIOAc₂ e *t*-BHP. Mesmo com os diferentes oxidantes (figura 27) não obteve-se nenhum produto observável já que o sinal no t.r. de 3,81 min é referente ao Mn(Salen); 3,83 min ao PhIOAc₂; 3,80 min ao *t*-BHP; 2,72 min é referente ao *m*-CPBA e o 2,90 min o próprio ácido lychnofólico.

Figura 27. Cromatogramas (UPLC-DAD) obtidos para as reações do ácido lychnofólico utilizando como catalisador Mn(Salen) os oxidantes *t*-BHP, PhIOAc₂ e *m*-CPBA respectivamente.

4.6 Estudos de biotransformação por microsomas hepáticos de ratos

Em todas as condições em que os testes foram feitos neste trabalho não houve metabolização da vicenina-2 pelos microsomas hepáticos de ratos (figura 28). Esse resultado já era esperado, pois polifenóis não são bons substratos para o citocromo P450 (Yang *et al.*, 2008) e, portanto não são metabolizadas facilmente, visto que já são moléculas polares.

Foram testadas diferentes concentrações de microsomas hepáticos de ratos (1, 2 e 3 mg/mL, além de diferentes tempos de incubação (60, 120 e 180 minutos) e também diferentes concentrações dos analitos (adição de 25 µl das soluções 0,25; 0,5 e 1 mg/mL) sendo que em nenhuma condição foi possível observar formação de metabólitos bem como a degradação e/ou metabolização da vicenina-2.

Figura 28. Cromatogramas obtidos na análise por UPLC-DAD-MS da vicenina-2 submetida à incubação com microssomas hepáticos de ratos.

No caso do ácido lychnofólico, já com o tempo de incubação de 60 minutos foi possível observar a formação de dois metabólitos. Em todas as concentrações de microssomas testadas o mesmo ocorreu. Porém na concentração de 3 mg/mL de microssomas hepáticos de ratos, adição de 25 μ l da solução 0,5 mg/mL de ácido lychnofólico (volume final de 1000 μ l de reação) e no tempo de incubação de 60 minutos foram as condições em que observamos a maior formação dos metabólitos. Um exemplo de análise encontra-se na figura 29 abaixo:

Figura 29. Cromatogramas (UPLC-MS) obtidos em modo scan. Primeiramente o cromatograma obtido para o branco da reação, embaixo o cromatograma obtido para o controle da reação e finalmente o cromatograma das reações de metabolização do ácido lychnofólico utilizando microssomas hepáticos de ratos. Os metabólitos formados apresentaram tempo de retenção de 2,5 e 2,7 minutos e m/z 265 no modo negativo de ionização.

Esses metabólitos apresentaram no modo negativo de ionização m/z 265, ou seja, 16u a mais em relação ao ácido lychnofólico (m/z 249), indicando que 1 átomo de oxigênio foi inserido na molécula. Na figura 30 estão apresentados os espectros de massas dos metabólitos observados bem como os espectros de massas relativos ao mesmo tempo de retenção na análise do controle da reação, demonstrando que os sinais que apresentaram m/z 265 identificados como metabólitos não estão presentes no controle.

Figura 30. Espectros de massas relativos aos metabólitos formados na reação de metabolização do ácido lychnofólico utilizando microsossomas hepáticos de ratos. Abaixo os espectros de massas dos sinais que eluíram no mesmo tempo de retenção no controle da reação. Os metabólitos formados apresentam tempo de retenção de 2,5 e 2,7 minutos e m/z 265 no modo negativo de ionização.

Comparando-se os tempos de retenção dos metabólitos formados utilizando microsomas hepáticos de ratos e as reações com metaloporfirinas, observamos a formação possivelmente das duas mesmas substâncias, já que os tempos de retenção são equivalentes, assim como os respectivos espectros de massas (figuras 31, 32 e 33).

Figura 31. Comparação dos cromatogramas (UPLC-MS/MS) monitorando a fragmentação dos íons m/z 265 (scan de íons filhos) para as reações de metabolização do ácido lychnofólico utilizando FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como agente oxidante e microsomas hepáticos de ratos.

Observamos que no caso do primeiro produto formado (2,5 minutos) a fragmentação da molécula desprotonada resultou na formação dos íons relativos à perda de CO_2 (m/z 221) e do íon relativo à perda de água e CO_2 (m/z 203) assim como ocorre para o ácido lychnofólico. No caso do segundo produto, (2,7 minutos), verificamos além dessas fragmentações a perda de mais uma molécula de água, o que nos permite sugerir que foi formada uma função hidroxila nesse caso e no primeiro uma função epóxido em uma das duplas ligações presentes no ácido lychnofólico.

Apesar de esperarmos que a hidroxila favorecesse que o composto eluísse em menor tempo de retenção em fase reversa, devido ao aumento da polaridade da substância, pode-se

sugerir que a formação dessa função em uma posição que permita uma ligação de hidrogênio intramolecular explica a maior retenção em relação ao possível epóxido.

Figura 32. Comparação dos espectros de massas (MS/MS) dos sinais cromatográficos com tempo de retenção de 2,5 minutos. Fragmentação dos íons m/z 265 (scan de íons filhos) com energia de colisão de 20 e 25 eV para as reações de metabolização do ácido lychnofólico utilizando FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como agente oxidante e microsomas hepáticos de ratos.

Figura 33. Comparação dos espectros de massas (MS/MS) dos sinais cromatográficos com tempo de retenção de 2,7 minutos. Fragmentação dos íons m/z 265 (scan de íons filhos) com energia de colisão de 20 e 25 eV para as reações de metabolização do ácido lychnofólico utilizando FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como agente oxidante e microsossomas hepáticos de ratos.

4.7 Metodologia por HPLC-DAD utilizada nos estudos de permeação em células Caco-2 e metabolização por microsomas hepáticos humanos

Assim como nos outros métodos descritos anteriormente, foi utilizada a mesma metodologia analítica para a quantificação das duas substâncias simultaneamente, o que propiciou a análise dos compostos na mesma análise cromatográfica quando testadas em conjunto no caso dos experimentos com células Caco-2.

Esse mesmo método cromatográfico foi utilizado para os estudos com microsomas hepáticos humanos. Neste caso, o método não foi validado, por se tratar de um tipo de matriz diferente do meio de transporte base utilizado nos experimentos com as células além do preparo da amostra envolver etapas de precipitação de proteínas e filtração enquanto no caso dos estudos com as células, após a coleta, as amostras eram diretamente injetadas no HPLC-DAD.

Na figura 34 está um exemplo de cromatograma obtido na análise dos padrões dos compostos em estudo no caso das análises dos estudos com células Caco-2 e dos microsomas hepáticos humanos por HPLC-DAD.

Figura 34. Exemplos de cromatogramas obtidos para análise do ácido lychnofólico e da vicenina-2 nos estudos de permeação em células Caco-2 e nos estudos de metabolização por microsomas hepáticos humanos.

A avaliação da possível absorção da vicenina-2 e do ácido lychnofólico pelas células humanas do epitélio intestinal (Caco-2) foi feita através da quantificação dos compostos tanto no compartimento apical quanto no compartimento basal do *insert* na placa de 6 poços. Para que a quantificação fosse possível, o método foi validado de acordo com as necessidades do estudo. Para isso, foi utilizada como matriz, o meio de transporte base utilizado nos experimentos.

Assim, para a avaliação da estabilidade, foram avaliadas a estabilidade dos analitos solubilizados em EtOH/H₂O bem como dos analitos solubilizados no meio de transporte base utilizado durante os experimentos de permeação. Os valores dos parâmetros validados do método estão na tabela a seguir.

Tabela 12. Valores obtidos na validação da metodologia analítica por HPLC-DAD para a quantificação de vicenina-2 e ácido lychnofólico nos estudos de permeabilidade em células Caco-2.

Parâmetro avaliado	Valores obtidos					
	Vicenina-2			Ácido lychnofólico		
Limite de detecção (µM)	1,75			3,75		
Limite superior de quantificação (µM)	400			480		
Limite inferior de quantificação (µM)	3,15			7,5		
Concentrações avaliadas						
analitos no meio de transporte (µM)	6,25	100	200	15	120	240
Precisão intracorridas (CV%)	0,25	0,53	0,46	0,91	1,96	0,85
Precisão intercorridas (CV%)	0,19	0,46	0,31	1,67	1,76	1,15
Exatidão intracorridas EPR (%)	9,97	1,27	0,79	2,06	1,23	0,97
Exatidão intercorridas EPR (%)	9,58	0,74	0,61	0,18	0,01	0,00
Recuperação (%)	108	102	102	111	108	106
Estabilidade (%) 25°C						
24 horas	101	99,6	99,9	98,4	99,6	100
Ciclos de congelamento (%)						
1x	102,7	99,9	100,3	99,0	97,0	99,0
2x	107,0	99,9	100,9	98,0	99,0	100,0
3x	103,7	100	99,7	94,9	100,0	100,3

Na figura 35 encontram-se exemplos de curvas de calibração obtidas para a vicenina-2 e para o ácido lychnofólico nas análises de permeação utilizando células Caco-2.

Figura 35. Exemplos de curvas de calibração obtidas em triplicata para a análise da vicenina-2 e do ácido lychnofólico nos estudos de permeação com células Caco-2. As respectivas equações da reta e coeficientes de correlação ao quadrado.

4.8 Estudo do metabolismo da vicenina-2 e do ácido lychnofólico utilizando microsossomas hepáticos humanos

Os testes com os microsossomas hepáticos humanos foram realizados variando-se a concentração de microsossomas bem como a concentração dos substratos, além de serem testados diferentes tempos de incubação assim como foi feito nos estudos com microsossomas hepáticos de ratos.

Da mesma forma como nas reações com microsossomas hepáticos de ratos, em nenhuma condição testada, tanto quanto às reações de fase I como no estudo de reação de conjugação com o ácido glucurônico foi observada a metabolização e/ou degradação da vicenina-2. A concentração desse flavonoide se manteve constante em todas as condições testadas. Como já discutido anteriormente, os polifenóis não são facilmente metabolizados, até por já serem moléculas de alta polaridade.

Já no caso do ácido lychnofólico, a formação do metabólito pela adição de 1 átomo de oxigênio como foi observado nos microsomas de ratos, não foi verificado nos estudos utilizando os microsomas humanos, sendo que a concentração do ácido lychnofólico se manteve constante em todas as condições testadas nesse caso. Sabe-se que há significantes diferenças quando se tenta extrapolar os dados obtidos com animais e seres humanos, por isso a necessidade de se realizarem estudos utilizando os microsomas humanos (Lewis, Ioannides e Parke, 1998).

A glucuronidação é a via de biotransformação mais comum para os xenobióticos em mamíferos. Essa reação requer como co-fator a 5'-uridina difosfato ácido glucurônico (UDP-ácido glucurônico) e é catalisada pela enzima UDP- glucuroniltransferase (UGT) as quais estão localizadas no retículo endoplasmático de células do fígado e de outros tecidos (figura 36) (Klaassen, 2001).

Figura 36. Mecanismo geral para a conjugação com o ácido glucurônico. Adaptado (Rowland, Miners e Mackenzie, 2013).

Neste trabalho, no estudo sobre a conjugação com o ácido glucurônico, foi possível observar a formação do metabólito do ácido lychnofólico conjugado (figura 37) em várias condições testadas como diferentes tempos de incubação e diferentes concentrações proteicas.

Figura 37. Comparação dos cromatogramas relativos à reação de conjugação do ácido lychnofólico (t.r. = 11,3 min) com o ácido glucurônico, evidenciando a formação do produto conjugado com tempo de retenção de 9,8 minutos.

Na figura a seguir estão os gráficos relacionando as áreas dos sinais cromatográficos em relação ao tempo de incubação da reação tanto em relação ao consumo de ácido lychnofólico como da formação do produto conjugado com o ácido glucurônico. Os resultados não estão expressos em concentração, pois não foi possível obter o padrão analítico para a quantificação do produto de conjugação.

Figura 38. Gráficos relacionando a área do sinal cromatográfico referente ao ácido lychnofólico e ao produto formado na reação de metabolização de fase II de glucuronidação (ácido lychnofólico conjugado com o ácido glucurônico) ao longo do tempo utilizando-se diferentes concentrações proteicas (0,12 – 1 mg/mL).

Em relação às reações catalisadas por enzimas, sabe-se que o gráfico que representa a relação entre concentração de substrato $[S]$ e velocidade inicial de reação (V_0) tem o mesmo comportamento para a maior parte dos enzimas. Esta curva pode ser descrita algebricamente pela equação de Michaelis-Menten. Essa equação nos fornece a relação quantitativa entre a velocidade inicial V_0 , a velocidade máxima $V_{máx}$ e a quantidade inicial de substrato $[S]$, todas relacionadas pela constante de Michaelis K_m (Storpirtis, 2011):

$$V_0 = V_{máx} [S] / K_m + [S] \quad (14)$$

Para se obter os parâmetros cinéticos da reação de glucuronidação do ácido lychnofólico, as reações foram realizadas variando-se a concentração de microsomas utilizados bem como a concentração dos substratos. Todas as reações foram testadas em diferentes tempos. Assim, a cinética da reação pode ser avaliada (figura 39), foi possível calcular os parâmetros a partir do gráfico de Michaelis-Menten: $V_{máx} = 272,5 \pm 12,75 \mu\text{mol/g}$ proteína/hora; $K_m = 12,38 \pm 1,218 \mu\text{M}$ e o $R^2 = 0,9980$. Os pontos visualizados no gráfico representam a média de 3 medidas.

Figura 39. Gráfico da cinética de reação de Michaelis–Menten para a reação de conjugação do ácido lychnofólico com o ácido glucurônico utilizando microsossomas hepáticos humanos ($n = 3$).

Sabe-se que a conjugação com o ácido glucurônico ocorre via substituição nucleofílica, assim grupos funcionais ricos em elétrons como alcoóis, fenóis, grupos amino terciários, além de ácidos carboxílicos, assim como tióis e amidas presentes no xenobiótico servem como nucleófilos (figura 36) (Rowland, Miners e Mackenzie, 2013).

No caso do ácido lychnofólico a hidroxila pode agir como nucleófilo e, portanto a reação provavelmente ocorre nessa porção da molécula, no entanto o produto da reação não pôde ser isolado e completamente caracterizado (figura 40).

Figura 40. Possível metabólito formado na reação de conjugação do ácido lychnofólico com o ácido glucurônico utilizando microsossomas hepáticos humanos via mecanismo de substituição nucleofílica S_N2 .

4.9 Avaliação da permeabilidade dos compostos em células Caco-2

Não foi possível observar a permeação da vicenina-2 nos experimentos realizados utilizando a monocamada de células Caco-2. Os gráficos das figuras 41-45 mostram que nos experimentos avaliando a permeação dessa substância do compartimento apical para o basal, as quantidades de vicenina-2 permaneceram constantes em todos os tempos avaliados, mesmo quando se variou o pH e a composição do meio de transporte.

No caso dos experimentos para avaliação da passagem do composto do compartimento basal para o apical, ou seja, avaliação do efluxo dessa molécula, também não foi observada variação nas quantidades de vicenina-2. Em todos os tempos analisados e em todas as condições avaliadas, a quantidade de vicenina-2 no compartimento basal permaneceu igual à quantidade inicial, sendo que no compartimento apical não foi possível detectar a presença dessa substância (figuras 41-45).

A vicenina-2 não seria realmente bem absorvida baseando-se na predição da absorção oral proposta por Lipinsky e colaboradores, que de acordo com resultados analisados a partir de um banco de dados, chegaram à conclusão de que um número excessivo de grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio como é o caso da vicenina-2, assim como o peso molecular relativamente alto dificultariam a permeabilidade através de uma bicamada de membrana enquanto uma lipofilicidade elevada facilita a absorção (Lipinski et al., 2001, Abraham et al., 1994).

Utilizando modelos QRAR, Diniz e colaboradores (Diniz, Escuder-Gilabert et al., 2007) estimaram para a vicenina-2 baseados em tempo de retenção em cromatografia micelar que a porcentagem de absorção oral desse composto em seres humanos seria de 59% (± 17). A retenção do composto nesse tipo de sistema é governada principalmente por suas características hidrofóbicas e propriedades eletrônicas, e em menor proporção por propriedades estéricas, as mesmas propriedades que determinam a facilidade com que um composto pode sofrer difusão passiva em uma membrana biológica.

Em estudo avaliando a absorção da vicenina-2 presente no extrato de *Abrus mollis* após administração oral em camundongos, foi verificado que o composto foi absorvido (Wang *et al.*, 2012). Porém, nesse caso outros compostos presentes no extrato podem ter facilitado a absorção da vicenina-2.

Outro trabalho em que foi avaliada a ação anticâncer desse flavonoide, também administrado oralmente, foi constatada a atividade quando administrada oralmente além da presença do composto no plasma dos ratos. Porém nesse caso, a vicenina-2 foi administrada durante 8 semanas, e portanto, o uso crônico que pode ter influenciado na absorção dessa substância (Nagaprashantha *et al.*, 2011).

Sabendo-se que existe também a possibilidade da molécula ser absorvida por transporte ativo e considerando o fato da vicenina-2 conter 2 glicoses, consideramos a possibilidade da mesma ser absorvida ativamente através de transportadores de glicose já que há relatos na literatura de outros flavonoides glicosilados que são transportados por essa via (Gee, Dupont *et al.*, 1998; Walgren, Lin *et al.*, 2000).

Assim, os resultados iniciais, utilizando meio com alta concentração de glicose poderiam ser resultado da inibição do transporte devido à alta quantidade de glicose no meio (25 mM) (figura 41). Porém, foi testado o meio de transporte contendo baixa concentração de glicose (5 mM) (figura 42) e meio de transporte isento de glicose (figura 43) e em nenhum teste foi observada a absorção do composto nesse modelo.

Devemos considerar que a absorção pode se dar por um transportador não expresso nas células utilizadas em nosso trabalho, ou expresso em quantidades muito menores do que as observadas *in vivo*. Sabe-se, por exemplo, que antibióticos β -lactâmicos que são substratos para transportadores de dipeptídeos, apresentam pobre permeabilidade em células Caco-2, mas são totalmente absorvidos *in vivo* (Chong, Dando *et al.*, 1996), portanto, esse modelo pode gerar falsos negativos.

As células Caco-2 podem servir como uma ferramenta de *screening* de compostos, uma vez que substâncias que apresentam grande permeabilidade nesse modelo, normalmente apresentam alta absorção *in vivo*, porém compostos com baixa permeabilidade não podem ser excluídos da possibilidade de absorção *in vivo* (Balimane e Chong, 2005).

vicenina-2 50 μ M

Compartimentos apical e basal contendo meio de transporte pH 7,4

Figura 41. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte rico em glicose e pH 7,4. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita: vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M.

vicenina-2 50 μ M

Compartimentos apical e basal contendo meio de transporte pH 7,4 e 5 mM de glicose

Figura 42. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pobre em glicose (5 mM) e pH 7,4. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita: vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M.

vicenina-2 50 μ M

Compartimentos apical e basal contendo meio de transporte pH 7,4 - sem glicose

Figura 43. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte isento de glicose e pH 7,4. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M.

vicenina-2 50 μ M

Compartimentos apical pH 6,0 e basal pH 7,4 – meio de transporte sem glicose

Figura 44. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte livre de glicose e pH 6,0 no compartimento apical e 7,4 no basal. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M.

vicenina-2 50 μ M

Compartimentos apical e basal contendo como meio de transporte HBSS

Figura 45. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 nos compartimentos apicais e basais utilizando como meio de transporte HBSS. Esquerda: vicenina-2 colocada no compartimento apical e direita vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 50 μ M.

apigenina 25 μ M

Compartimento apical pH 6,0 e basal pH 7,4 - meio de transporte sem glicose

Figura 46. Gráficos com os valores de quantidade de apigenina nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte livre de glicose e pH 6,0 no compartimento apical e 7,4 no basal. Esquerda: apigenina colocada no compartimento apical e direita vicenina-2 colocada no compartimento basal, ambas na concentração de 25 μ M.

No caso do ácido lychnofólico, foi observado que esse composto atravessa a monocamada de células Caco-2 facilmente sendo detectado no outro compartimento logo nos tempos iniciais dos experimentos. O valor da permeabilidade aparente para o ácido lychnofólico foi calculado a partir dos resultados obtidos no experimento realizado com o meio de transporte pH 7,4 tanto no compartimento apical como no basal e na concentração de 50 μM de ácido lychnofólico (figura 47). Os valores obtidos foram: $\text{Papp A} \rightarrow \text{B} = 4,07 \cdot 10^{-6}$ cm/s $\text{Papp B} \rightarrow \text{A} = 4,17 \cdot 10^{-6}$ cm/s; **$\text{Papp A} \rightarrow \text{B} / \text{Papp B} \rightarrow \text{A} = 0,97$** . O mesmo cálculo foi realizado a partir dos dados do experimento idêntico ao anterior, porém utilizando uma concentração de ácido lychnofólico de 25 μM (figura 48) e o valor obtido foi próximo ao anterior: $\text{Papp A} \rightarrow \text{B} = 4,68 \cdot 10^{-6}$ cm/s $\text{Papp B} \rightarrow \text{A} = 4,41 \cdot 10^{-6}$ cm/s; **$\text{Papp A} \rightarrow \text{B} / \text{Papp B} \rightarrow \text{A} = 1,06$** .

O valor da razão **$\text{Papp A} \rightarrow \text{B} / \text{Papp B} \rightarrow \text{A}$** próximo de 1 sugere que a molécula atravessa a monocamada de células Caco-2 por difusão passiva. Quando o pH do compartimento apical foi alterado para 6,0, mais próximo ao pH intestinal, mais ácido, o ácido lychnofólico atravessou a monocamada com uma velocidade muito maior (figuras 49 e 50). Esse pH favorece que o composto, que é um ácido, permaneça na sua forma não ionizada e portanto mais apolar, o que facilitaria a difusão passiva através da monocamada de células, sendo portanto mais um forte indício de que essa molécula permeia a monocamada de células por difusão passiva.

Outro indício de que não há o envolvimento de transportadores nesse caso são os valores de das razões $\text{Papp A} \rightarrow \text{B} / \text{Papp B} \rightarrow \text{A}$ muito próximos para as duas concentrações, pois se houvesse transporte ativo, os transportadores poderiam sofrer saturação com a concentração maior.

Ácido lychnofólico 50 μ M

Compartimentos apical e basal contendo meio de transporte pH 7,4

Figura 47. Gráficos com os valores de quantidade de ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 7,4 no compartimento apical e basal. Esquerda: ácido lychnofólico colocado no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado no compartimento basal, ambos na concentração de 50 μ M.

Ácido lychnofólico 25 μ M

Compartimentos apical e basal contendo meio de transporte pH 7,4

Figura 48. Gráficos com os valores de quantidade de ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 7,4 no compartimento apical e basal. Esquerda: ácido lychnofólico colocado no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado no compartimento basal, ambos na concentração de 25 μ M.

Ácido lychnofólico 50 μ M

Compartimento apical pH 6,0 e basal pH 7,4

Figura 49. Gráficos com os valores de quantidade de ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 6,0 no compartimento apical e 7,4 no basal durante 5 horas de experimento. Esquerda: ácido lychnofólico colocado no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado no compartimento basal, ambos na concentração de 50 μ M.

Ácido lychnofólico 50 μ M

Compartimento apical pH 6,0 e basal pH 7,4

Figura 50. Gráficos com os valores de quantidade de ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 6,0 no compartimento apical e 7,4 no basal durante 3 horas de experimento. Esquerda: ácido lychnofólico colocado no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado no compartimento basal, ambos na concentração de 50 μ M.

Foi avaliado se a vicenina-2 e o ácido lychnofólico quando colocados juntos, como no caso do extrato, em concentrações iguais, poderiam apresentar mudanças na absorção em células Caco-2. Porém não foi observada alteração significativa nos perfis de permeação nesse caso.

Ácido lychnofólico e vicenina-2 50 μ M

Compartimentos apical e basal pH 7,4

Figura 51. Gráficos com os valores de quantidade de vicenina-2 e ácido lychnofólico nos compartimentos apicais e basais utilizando meio de transporte pH 7,4 nos compartimentos apicais e basais durante 3 horas de experimento. Esquerda: ácido lychnofólico colocado juntamente com a vicenina-2 no compartimento apical e direita ácido lychnofólico colocado juntamente com a vicenina-2 no compartimento basal, ambos na concentração de 50 μ M

A toxicidade tanto do extrato, como da vicenina-2 e do ácido lychnofólico foi avaliada em relação às células Caco-2. Para isso, o extrato e as substâncias foram incubados com as células da mesma forma que era feito durante os experimentos de permeação, e em determinados intervalos de tempo era feita a medida da TEER. Não foi observada diferença na medida do TEER nessas condições em relação à medida do controle, incubado apenas com o meio de transporte (figura 52). Isso indica que o extrato e as substâncias não apresentam toxicidade para as células nas concentrações testadas já que a medida da TEER é um indicativo da integridade da monocamada e, portanto da integridade celular.

Avaliação da toxicidade frente à células Caco-2 do ácido lychnofólico, da vicenina-2 e do extrato hidroalcoólico de *L. salicifolia*

Compartimentos apical e basal pH 7,4

Figura 52. Avaliação dos valores TEER durante a incubação com as células Caco-2 de diferentes concentrações de ácido lychnofólico, vicenina-2 e do extrato hidroalcoólico de *Lychnophora salicifolia*. Controle: meio de transporte pH 7,4.

4.10 Determinação da fração ligada à proteína plasmática do ácido lychnofólico

As moléculas podem ser transportadas no organismo tanto em sua forma livre como ligadas a proteínas plasmáticas. Essa é uma forma do organismo além de transportar, também armazenar temporariamente as moléculas. A ligação dos compostos às proteínas se dá de forma reversível e pode envolver ligações iônicas, de Van der Waals ou, por exemplo, ligações de hidrogênio. A velocidade de ligação da substância com a proteína é muito rápida, assim o complexo formado pode se dissociar em milésimos de segundo e liberar o composto, o qual ficará então livre para atravessar as membranas (Storpiritis, 2011).

A taxa de ligação a proteínas plasmáticas varia de acordo com a afinidade entre a substância e a proteína, a concentração sanguínea da substância e a concentração plasmática da proteína. As moléculas de caráter ácido ou neutro ligam-se principalmente à albumina, e as de caráter básico tem maior afinidade pela α_1 -glicoproteína ácida (Storpiritis, 2011).

À medida que a concentração do composto aumenta, também pode aumentar sua fração livre, pois a capacidade de ligação pode estar saturada. No entanto, em uma ampla margem de concentração, a fração livre não se altera, pois há abundância de sítios de ligação e a saturação só ocorre em concentrações muito elevadas, o que normalmente é terapeuticamente irrelevante (Storpiritis, 2011).

A determinação da ligação dos compostos às proteínas do plasma é de especial importância porque o deslocamento desses compostos de seus sítios de ligação com as proteínas por outro agente, aumentando a fração livre dessa substância no plasma, pode resultar em efeitos toxicológicos significativos, já que em concentrações maiores a substância pode ter efeitos tóxicos para o organismo (Klaassen, 2001).

No caso de fármacos que possuem metabolismo ou excreção de primeira ordem, o deslocamento das moléculas dos sítios de ligação das proteínas não irá alterar o efeito

farmacológico, já que ao se aumentar a fração livre do composto, aumenta-se o metabolismo ou a excreção do mesmo. No entanto, caso o metabolismo ou a excreção, obedeçam a uma cinética de ordem zero, esse deslocamento pode ter consequências clínicas, pois os processos de metabolismo e excreção apresentam velocidades constantes, e como a concentração plasmática da substância deslocada aumentou, não ocorrerá maior metabolismo e excreção, assim, esse excedente permanecerá no organismo podendo provocar aumento no efeito farmacológico e até mesmo pode acarretar no surgimento de efeitos tóxicos (Storpiritis, 2011).

Assim a determinação da fração livre dos compostos no plasma é um parâmetro essencial no estudo da farmacocinética dos compostos. Para a determinação da fração livre do ácido lychnofólico neste trabalho, utilizamos a ultrafiltração que em contraste com a diálise ou a filtração em gel proporciona maior precisão para medir a concentração do ligante livre. A fração proteica é separada (o concentrado), enquanto a substância (ligante), passe livre através da membrana juntamente com a água (ultrafiltrado) (figura 53) (Klaassen, 2001).

Figura 53. Esquema do dispositivo de ultrafiltração Centrifree utilizado neste trabalho para a determinação da fração ligada à proteína plasmática do ácido lychnofólico. Adaptado (Millipore, 2012).

As soluções preparadas apenas em água e submetidas à ultrafiltração não apresentaram diferença em relação à concentração considerada 100% livre, ou seja, em relação à curva de

calibração preparada com as soluções em água e diretamente injetada no UPLC-DAD-MS/MS. Assim podemos concluir que não houve adsorção inespecífica do ácido lychnofólico à membrana do dispositivo de ultrafiltração. Em relação à análise das amostras preparadas em plasma de ratos e submetidas à ultrafiltração, foram obtidos os seguintes valores de ligação à proteína plasmática: para a concentração de 25 ng/mL a fração ligada foi de 60%, já para 1250 ng/mL foi de 77,4%, e para 2000 ng/mL foi de 73,4%.

No caso da vicenina-2 esse parâmetro já foi descrito na literatura como sendo 42% (Diniz *et al.*, 2008) por isso não consideramos necessária a realização deste estudo no presente trabalho.

4.11 Validação da metodologia analítica por UPLC-DAD-MS/MS para análise da vicenina-2 e o ácido lychnofólico em plasma de ratos

Quanto à validação da metodologia analítica para a análise dos compostos em plasma de ratos, foram obtidos resultados satisfatórios que permitem confiabilidade nos resultados obtidos para a análise das amostras do estudo da disposição cinética tanto da vicenina-2 como do ácido lychnofólico em ratos.

Para avaliarmos a seletividade do método utilizando como matriz o plasma branco de ratos, foram injetadas, além das soluções padrões dos compostos em estudo, assim como o plasma branco, o plasma branco adicionado dos padrões. Dessa forma, comparando-se os cromatogramas obtidos no modo MRM de aquisição, podemos verificar que não há interferentes do plasma eluindo no mesmo tempo de retenção dos compostos estudados (figuras 54 e 55).

Figura 54. Cromatogramas (UPLC-MS/MS) obtidos para a amostra branco de plasma de ratos analisada no modo MRM para detecção dos analitos e do padrão interno.

Figura 55. Cromatogramas (UPLC-MS/MS) obtidos para a amostra branco de plasma de ratos adicionada dos analitos e analisada no modo MRM.

Quanto ao teste da supressão de ionização em plasma de ratos, este foi feito através da infusão direta dos padrões de vicenina-2, ácido lychnofólico e do padrão interno no espectrômetro de massas concomitantemente em fluxo combinado com a eluição de uma amostra de plasma branco de ratos como esquematizado na figura abaixo.

Figura 56. Esquema do modo de injeção combinado em um ULPC-DAD-MS/MS em que é feita a eluição de uma amostra de plasma branco e simultaneamente a infusão de uma solução contendo os analitos para a avaliação da supressão de ionização.

A queda ou aumento da intensidade da linha de base indica que algum componente do plasma está promovendo a supressão da ionização dos compostos, isso não ocorreu nos tempos de retenção observados para os compostos em estudo, tanto na aquisição em modo scan como no modo MRM indicando que não houve supressão de ionização desses compostos por nenhum componente presente do plasma de ratos (figura 57).

Figura 57. Teste do efeito matriz em plasma de ratos utilizando a infusão combinada dos padrões no espectrômetro de massas concomitantemente à eluição de uma amostra de plasma branco de ratos. A: scan no modo positivo de ionização; B: scan no modo negativo de ionização; C: aquisição em modo MRM para detecção da vicenina-2; D: aquisição em modo MRM para detecção do padrão interno cumarina e E: aquisição em modo MRM para detecção do ácido lychnofólico.

Na figura a seguir está apresentado um exemplo de curva de calibração obtida e os respectivos gráficos de resíduos para a análise dos compostos neste caso.

Figura 58. Exemplos de curvas de calibração e os respectivos gráficos de resíduos obtidos para a análise da vicenina-2 e do ácido lychnofólico em plasma de ratos.

Os gráficos de resíduos apresentados indicam que os valores de variação dos dados estão distribuídos aleatoriamente em torno do zero, ou seja, os dados obtidos são homocedásticos. Quanto às curvas de calibração, estas apresentaram coeficientes de correlação ao quadrado, superiores a 0,99. Quanto aos resultados obtidos na validação da metodologia para análise das substâncias em plasma de ratos estão apresentados na tabela 13.

Todos os parâmetros foram avaliados da mesma forma descrita no item 3.11. e estão de acordo com as necessidades desse estudo, dentro dos parâmetros aceitos para métodos bioanalíticos.

Outro parâmetro avaliado na validação do método para análise dos compostos no plasma de ratos foi o efeito residual (*carryover*). Esse parâmetro analisa o efeito residual que as análises de amostras anteriores podem causar, gerando o aparecimento ou aumento dos sinais dos analitos ou do padrão interno devido à contaminação no sistema de injeção da amostra. Para isso foi injetada uma amostra branco, primeiramente antes da análise do limite superior de quantificação (LSQ) e duas injeções dessa mesma amostra branco após a análise do LSQ.

Na primeira análise após a injeção do LSQ observamos que há um pequeno efeito residual no caso dos dois analitos do nosso estudo e do padrão interno, porém esse efeito corresponde a menos que 20% do sinal dos analitos no ponto do LIQ (figura 59), portanto aceitável.

Figura 59. Exemplos de cromatogramas (UPLC-MS/MS) monitorando no modo MRM o ácido lychnofólico, o padrão interno cumarina e a vicenina-2 na análise de uma amostra branco injetada logo após a análise do LSQ.

4.12 Avaliação do perfil farmacocinético da vicenina-2 em ratos

Após a administração intravascular de uma substância e a determinação de sua concentração plasmática em diferentes intervalos de tempos, é possível calcular os principais parâmetros farmacocinéticos desse composto no organismo. Sendo que a administração de uma solução em dose única IV evita o aparecimento de diversas variáveis, como por exemplo, absorção incompleta, irregular ou retardada do composto que pode estar sendo liberado de uma determinada formulação (Storpiotis, 2011).

Primeiramente foram realizados estudos piloto onde testamos diferentes doses e diferentes tempos de coleta, foi possível avaliar a concentração plasmática *versus* tempo para a vicenina-2 após a administração IV da dose de 500 µg/kg em 8 ratos Wistar. Na figura 60 está apresentado o gráfico das médias dos valores de concentração plasmática *versus* tempo para a vicenina-2 administrada nestas condições citadas.

Figura 60. Gráfico da média ($\pm$ DP) da concentração plasmática *versus* tempo obtido para a vicenina-2 após a administração IV da dose de 0,5 mg/kg. Dados obtidos a partir do cálculo da média das amostras de 8 ratos analisados.

Após a transformação das curvas de concentração plasmática *versus* tempo em gráficos ortogonais lineares-logarítmicos e obtenção das respectivas equações exponenciais (figura 61) foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos para a vicenina-2. Os valores dos parâmetros calculados a partir desses dados para a vicenina-2 estão na tabela 14.

Os dados farmacocinéticos compartimentais foram calculados assumindo que a vicenina-2 apresentou comportamento monocompartimental, já que observamos apenas uma inclinação na

reta obtida com o gráfico em escala logarítmica. Isso é reforçado pelos valores de R^2 próximos de 0,99 e baixos desvios padrões, indicando que os dados se ajustam a esse modelo.

Figura 61. Gráficos em escala logarítmica de concentração plasmática de vicenina-2 *versus* tempo obtidos para os 8 ratos Wistar analisados neste trabalho, as respectivas equações e R^2 .

Tabela 14. Parâmetros farmacocinéticos calculados para a vicenina-2 após a administração IV de uma dose de 0,5 mg/kg em 8 ratos Wistar.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	média	desvio padrão
Parâmetros farmacocinéticos compartimentais										
K_e (min^{-1})	0,029	0,025	0,03	0,035	0,027	0,031	0,026	0,027	0,029	0,003
$t_{1/2}$ (min)	23,5	27,3	23,1	19,5	25,2	22,1	26,3	26,0	24,1	2,6
Vd (mL)	135,5	214,1	207,7	207,3	297,4	225,4	213,8	274,1	221,9	48,5
Cl (mL/min)	4,0	5,4	6,2	7,4	8,2	7,1	5,6	7,3	6,4	1,3
Parâmetros farmacocinéticos não compartimentais										
$ASC_{0-\text{inf}}$ ($\text{ng} \cdot \text{min} \cdot \text{min/mL}$)	30688,3	21339,7	19432,7	16666,2	14819,0	18288,6	21259,2	17603,3	20012,1	4848,7
$ASCM_{0-t}$ ($\text{ng} \cdot \text{min} \cdot \text{min/mL}$)	785978,8	637586,2	549960,0	456411,3	437636,3	426922,5	635877,5	527923,8	557287,0	123824,4
TMR (min)	31,1	37,4	34,0	32,7	38,0	32,6	36,8	38,9	35,2	2,9

Observamos que o valor do $t_{1/2}$ (24,1 minutos) e TMR (35,2 minutos) são relativamente baixos, e ambos indicam que a vicenina-2 permanece intacta em circulação durante pouco tempo no organismo. Isso já era esperado, pois a alta polaridade desse composto permite que o mesmo seja eliminado rapidamente do organismo, o que também reflete na alta taxa de depuração ($Cl = 6,4 \text{ mL/min}$). O alto valor de volume de distribuição (221,9 mL) indica que essa substância se distribui no organismo e não está concentrada apenas no plasma.

O valor de $t_{1/2}$ calculado em trabalho anterior para a vicenina-2 (Jabor *et al.*, 2010) foi de aproximadamente 1 hora, porém a via de administração utilizada foi a intraperitonal, em que há a necessidade de absorção para a corrente circulatória sistêmica antes do processo de distribuição, tornando os dois valores incomparáveis. Ressalta-se ainda que, para a correta determinação de perfis de eliminação, a via de administração indicada é a intravenosa, como realizada neste trabalho (Storpiertis, 2011).

Após a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos, considerando a dose de 90 mg/kg descrita como dose ativa via oral para a vicenina-2 em ensaio anti-inflamatório (Gobbo-Neto *et al.*, 2005) e considerando que a fração biodisponível (F) seja de 60% (baseado em dados ainda não publicados pelo nosso grupo de pesquisa obtidos em experimento de permeação intestinal de ratos), foi possível realizar a previsão da disposição cinética da vicenina-2 após sua administração por via oral em dose única (figura 62).

Figura 62. Gráfico de previsão da concentração plasmática *versus* tempo para a vicenina-2 após a administração via oral de única dose de 90 mg/kg. Dados obtidos considerando $F = 60\%$.

O gráfico apresentado na figura 62 indica que a velocidade de absorção é bastante alta, sendo o tempo máximo ($T_{\max}$) de cerca de 10 minutos e a concentração plasmática máxima ($C_{p_{\max}}$) cerca de 40 ng/mL. Considerando esses dados pode-se estimar que as concentrações plasmáticas descritas pela simulação seriam as concentrações ativas no estudo citado anteriormente em que Gobbo-Neto e colaboradores (2005) verificaram a atividade anti-inflamatória da vicenina-2 após única dose de 90 mg/kg de vicenina-2 por via oral.

Há que se considerar que em um regime terapêutico real, raramente utiliza-se uma única dose, sendo assim, se utilizarmos o modelo para determinar a concentração plasmática média no estado de equilíbrio (do inglês, *steady state*) ($C_{p_{ss}}$) após múltiplas doses (equação 15) pode-se estimar as concentrações após diferentes regimes terapêuticos.

$$C_{p_{ss}} = F \cdot D / Cl_{\text{tot}} \cdot \tau \quad (15)$$

Onde F é a fração biodisponível; D é a dose administrada; Cl_{tot} é o *clearance* total e τ é o intervalo entre as doses. Dessa forma, é possível realizar as previsões de concentrações plasmáticas médias no estado de equilíbrio de acordo com diferentes regimes terapêuticos (tabela 15).

Tabela 15. Concentrações plasmáticas médias no estado de equilíbrio (Cp_{ss}) (ng/mL), estimada pela equação 15, assumindo-se $F = 60\%$; $Cl_{tot} = 6,4$ mL/min; $k_e = 0,03$ min⁻¹.

Regime de administração oral	Cp_{ss} (ng/mL)	Cp_{ss} (ng/mL)
	dose de 90 mg/kg	dose de 180 mg/kg
De 4 em 4 horas	40,5	81,1
De 6 em 6 horas	27,0	54,1
De 8 em 8 horas	20,3	40,5
De 12 em 12 horas	13,5	27,02

Esses dados podem servir de subsídio para outras etapas de desenvolvimento de medicamentos contendo a vicensina-2, assim como podem dar suporte a novos experimentos farmacodinâmicos *in vitro* que necessitam de concentrações estabelecidas para serem avaliadas, pois estas poderão estar mais próximas às concentrações farmacológicas observadas *in vivo*

4.13 Avaliação do perfil farmacocinético do ácido lychnofólico em ratos

No estudo do perfil farmacocinético do ácido lychnofólico, foi necessário que os tempos de coleta fossem muito curtos e próximos, assim, o sangue dos animais foi coletado apenas até 30 minutos, já que nesse tempo, as concentrações plasmáticas medidas estavam próximas ao limite de quantificação do método por UPLC-MS/MS. O estudo final do perfil

farmacocinético foi realizado então utilizando 7 ratos Wistar e administração IV de 2,0 mg/kg de animal. Na figura 63 está apresentado o gráfico das médias dos valores de concentração plasmática *versus* tempo para o ácido lychnofólico nestas condições citadas.

Figura 63. Gráfico da média ($\pm$ DP) da concentração plasmática *versus* tempo obtido para o ácido lychnofólico após a administração IV da dose de 2,0 mg/kg. Dados obtidos a partir do cálculo da média das amostras de 7 ratos analisados.

Após a construção dos gráficos de concentração plasmática *versus* tempo em escala logarítmica (figura 64), foi possível verificar a presença de apenas uma reta, assim como ocorreu para a vicenina-2. Isso indica que esse composto também apresenta comportamento monocompartimental, se distribuindo rapidamente e homogeneamente por todo o organismo. Mais uma vez, os valores de R^2 próximos a 0,99 e os baixos desvios padrões calculados para os dados utilizando esse modelo, confirmam o melhor ajuste dos dados ao modelo monocompartimental. Os parâmetros farmacocinéticos calculados para o ácido lychnofólico encontram-se na tabela 16.

Figura 64. Gráficos em escala logarítmica de concentração plasmática de ácido lychnofólico *versus* tempo obtidos para 7 ratos Wistar analisados neste trabalho, as respectivas equações e R^2 .

Tabela 16. Parâmetros farmacocinéticos calculados para o ácido lychnofólico após a administração IV de uma dose de 2,0 mg/kg em 7 ratos Wistar.

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	média	desvio padrão
Parâmetros farmacocinéticos compartimentais									
K_e (min^{-1})	0,272	0,201	0,223	0,181	0,247	0,238	0,240	0,229	0,030
$t_{1/2}$ (min)	2,5	3,4	3,1	3,8	2,8	2,9	2,9	3,1	0,4
Vd (mL)	420	610	670	710	370	590	610	570	130
Cl (mL/min)	110	120	150	130	90	140	150	130	20
Parâmetros farmacocinéticos não compartimentais									
ASC_{0-inf} ($\text{ng} \cdot \text{min} \cdot \text{min/mL}$)	9372,45	4390,07	6412,7	7500,06	11749,9	7300,28	6751,96	7639,62	2341,1
$ASCM_{0-inf}$ ($\text{ng} \cdot \text{min} \cdot \text{min/mL}$)	57572,6	35700,5	32222,9	49665,8	55631	44321,1	38647,7	44823,1	9858,9
TMR (min)	6,1	8,1	5,0	6,6	4,7	6,1	5,7	6,1	1,1

Observamos que o ácido lychnofólico apresentou o valor de $t_{1/2}$ (3,1 minutos) e TMR (6,1 minutos) ainda menores que a vicenina-2, indicando que essa substância também permanece intacta durante pouquíssimo tempo em circulação no organismo (tabela 16). O valor muito alto de volume de distribuição (570 mL) calculado mostra que o ácido lychnofólico se distribui muito no organismo e não está concentrado no plasma assim como a vicenina-2.

Os estudos *in vitro* realizados neste trabalho sugerem que esse composto pode ser bastante metabolizado, sendo tanto mono-oxidado pelo CYP450 no caso dos microssomas hepáticos de ratos assim como conjugado com o ácido glucurônico pelos microssomas hepáticos humanos. Apesar de não ter sido possível encontrar esses metabólitos nos estudos *in vivo*, o alto valor de depuração ($Cl = 130 \text{ mL/min}$) pode ser explicado pelo fato dessa molécula ser alta e rapidamente metabolizada e então eliminada do organismo. Além disso, se considerarmos os valores de Log D calculados para essa substância em $\text{pH } 6,0 = 1,24$ e para o $\text{pH } 7,4 = -0,09$, podemos sugerir que o pH fisiológico de 7,4 favorece a ionização da substância aumentando significativamente sua hidrofilicidade e portanto sua eliminação pela urina.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

Podemos concluir em relação ao ácido lychnofólico, que houve a formação de dois metabólitos formados a partir da adição de um átomo de oxigênio na molécula. Esses compostos foram observados nas reações utilizando metaloporfirinas (FeTFPP e *m*-CPBA como oxidante) e provavelmente as mesmas substâncias foram formadas nos estudos *in vitro* utilizando microsomas hepáticos de ratos, pois apresentaram o mesmo tempo de retenção e espectro de massas quando comparados os dois estudos.

Esses metabólitos mono-oxigenados não foram observados nas reações com microsomas humanos. Porém, nesse caso foi observada a conjugação do ácido lychnofólico com o ácido glucurônico, uma importante reação de metabolização de fase II. No estudo da cinética dessa reação foi possível calcular: $V_{\text{máx}} = 272,5 \pm 12,75 \mu\text{mol/g proteína/hora}$; $K_m = 12,38 \pm 1,218 \mu\text{M}$ e o $R^2 = 0,9980$.

Já a vicenina-2 não foi facilmente metabolizada tanto pelos microsomas hepáticos de ratos quanto pelos microsomas humanos sendo que não foi possível observar a formação de metabólitos e/ou a degradação dessa substância nestes casos.

Os estudos com células de adenocarcinoma humano de cólon Caco-2 nos permite concluir que o ácido lychnofólico provavelmente é absorvido no intestino por difusão passiva. Quanto à vicenina-2, apesar dos dados na literatura indicarem que há absorção intestinal, não foi possível determinar o mecanismo utilizando as células Caco-2, já que em nenhuma condição avaliada esse composto atravessou a monocamada de células. Apenas podemos excluir a possibilidade de absorção via difusão passiva e sugerir que a absorção se dá por um transportador não expresso nas células utilizadas neste trabalho ou que compostos presentes nos extratos ou a administração crônica, como são os dados citados na literatura, são responsáveis pela absorção observada nestes casos.

O estudo do perfil farmacocinético do ácido lychnofólico exigiu tempos de coleta de sangue muito próximos devido à baixíssima meia vida desse composto o qual apresentou perfil compatível com o modelo monocompartimental. A análise do perfil farmacocinético da vicienina-2 também revelou um comportamento monocompartimental, com baixa meia vida e alto valor de volume de distribuição e *clearance* também.

Esses dados indicam que provavelmente a vicienina-2 é eliminada rapidamente e inalterada do organismo pela urina, devido a sua alta hidrofiliabilidade. Quanto ao ácido lychnofólico, este também pode ser rapidamente eliminado inalterado, bem como monoxidado pelo CYP450 como observado nas reações *in vitro* com microsossomas hepáticos de ratos ou em humanos conjugado com o ácido glucurônico.

Em resumo, os dados obtidos nesse trabalho fornecem de forma pioneira no Brasil uma visão dos processos farmacocinéticos dos produtos naturais majoritários de um fitoterápico e/ou edulcorante tipicamente brasileiro.

Referências

6 REFERÊNCIAS

ANDRES-LACUEVA, C. et al. Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7258-7267, 2009. ISSN 0021-9673.

ANVISA. **Resolução número 899**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2003.

_____. **Resolução número 27**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2012.

ARTURSSON, P. Epithelial transport of drugs in cell-culture . A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 6, p. 476-482, 1990. ISSN 0022-3549.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 5, p. 335-343, 2005. ISSN 1359-6446.

BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 346, n. 2-3, p. 171-184, 2004. ISSN 1615-4150.

BREINHOLT, V. M. et al. *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 5, p. 609-616, 2002. ISSN 0278-6915.

BUTTERWECK, V. et al. Pharmacokinetics of alpha-mangostin in rats after intravenous and oral application. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. S67-S74, 2011. ISSN 1613-4125.

CALDWELL, J.; GARDNER, I.; SWALES, N. An introduction to drug disposition - the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. **Toxicologic Pathology**, v. 23, n. 2, p. 102-114, 1995. ISSN 0192-6233.

CHE, C.; HUANG, J. Metalloporphyrin-based oxidation systems: from biomimetic reactions to application in organic synthesis. **Chemical Communications**, n. 27, p. 3996-4015, 2009. ISSN 1359-7345.

DE OLIVEIRA, A. R. M. et al. *In vitro* metabolism study of a new nitrosyl ruthenium complex [Ru(NH center dot NHq)(terpy)NO](3+) nitric oxide donor using rat microsomes. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 14-19, 2009. ISSN 1089-8603.

DINIZ, A. et al. Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 2, p. 625-632, 2008. ISSN 1618-2642.

FURGE, L. L.; GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. **Biochem Mol Biol Educ**, v. 34, n. 2, p. 66-74, 2006. ISSN 1470-8175.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. **Pharmacokinetics**. Segunda edição. New York: Marcel Dekker, 1989. ISBN 0-8247-1042-8.

GOBBO-NETO, L. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, v. 71, n. 1, p. 3-6, 2005.

GOUVEA, D. R. et al. A new HPLC-DAD-MS/MS method for the simultaneous determination of major compounds in the crude extract of *Lychnophora salicifolia* Mart. (Brazilian arnicão) leaves: Application to chemical variability evaluation. **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 28-36, 2012. ISSN 0003-2670.

GUENGERICH, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 6, p. 611-650, 2001. ISSN 0893-228X.

HE, S. M. et al. Disposition pathways and pharmacokinetics of herbal medicines in humans. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 33, p. 4072-4113, 2010. ISSN 0929-8673.

HENDRICH, S. et al. Greater Apparent absorption of flavonoids is associated with lesser human fecal flavonoid disappearance rates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 141-147, 2010. ISSN 0021-8561.

HUMPF, H. U. et al. Deconjugation and degradation of flavonol glycosides by pig cecal microbiota characterized by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2281-2290, 2008. ISSN 0021-8561.

ICH. Q2(R1) **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**. Geneva 1996.

JABOR, V. A. P. et al. LC-MS-MS Identification and determination of the flavone-C-glucoside vicenin-2 in rat plasma samples following intraperitoneal administration of *Lychnophora* extract. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 5, p. 741-745, 2010. ISSN 1934-578X.

JACOBS, H. J., H. et al. Identification of the metabolites of the antioxidant flavonoid 7-mono-*O*-(beta-hydroxyethyl)-rutoside in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 39, n. 5, p. 750-756, 2011. ISSN 0090-9556.

JORDÃO, C. O. et al. Trypanocidal activity of chemical constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 4, p. 332-334, 2004. ISSN 0951-418X.

KAPITZA, S. B. et al. Absorption of poorly water soluble drugs subject to apical efflux using phospholipids as solubilizers in the Caco-2 cell model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 1, p. 146-158, 2007. ISSN 0939-6411.

KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 6. 2001.

LEWIS, D. F. V.; IOANNIDES, C.; PARKE, D. V. Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 10, p. 633-641, 1998. ISSN 0091-6765.

LU, Y. R.; FOO, L. Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 3, p. 263-267, 2000. ISSN 0031-9422.

MAC LEOD, T. et al. Jacobsen catalyst as a P450 biomimetic model for the oxidation of an antiepileptic drug. **Journal of Molecular Catalysis a-Chemical**, v. 273, n. 1-2, p. 259-264, 2007. ISSN 1381-1169.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. The state of art of Ultra Performance Liquid Chromatography. **Quimica Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009. ISSN 0100-4042.

MARRASSINI, C. et al. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of *Urtica circularis*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1503-1507, 2011. ISSN 0163-3864.

MIGUEL, O. G. et al. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 8, p. 694-696, 1996. ISSN 0951-418X.

MILLIPORE, M. Dispositivos de ultrafiltração Centrifree® Para utilização em investigação e diagnóstico *in vitro*. Guia do utilizador. 2012.

NAGAPRASHANTHA, L. D. et al. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicenin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 9, p. 1100-1109, 2011. ISSN 0006-2952.

PRASAD, B. et al. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 360-387, 2011. ISSN 0165-9936.

RAMANATHAN, R. **Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. New Jersey: Wiley, 2009. 389.

ROWLAND, A.; MINERS, J. O.; MACKENZIE, P. I. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 6, p. 1121-1132, 2013. ISSN 1357-2725.

SEMIR, J. et al. **As arnicas endêmicas das Serras do Brasil**. Ouro Preto, MG: Editora UFOP, 2011. ISBN 978-85-288-0276-4.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5. 2004.

SLIGAR, S. G. et al. Structure and chemistry of cytochrome P450. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 6, p. 2253-2277, 2005. ISSN 0009-2665.

STORPIRTIS, S. **Farmacocinética básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 220.

TANG, W.; LU, A. Y. H. Metabolic bioactivation and drug-related adverse effects: current status and future directions from a pharmaceutical research perspective. **Drug Metabolism Reviews**, v. 42, n. 2, p. 225-249, 2010. ISSN 0360-2532.

TESTA, B.; KRAMER, S. D. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1. Principles and overview. **Chem Biodivers**, v. 3, n. 10, p. 1053-101, 2006. ISSN 1612-1880.

_____. The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 4. reactions of conjugation and their enzymes. **Chem Biodivers**, v. 5, n. 11, p. 2171-336, 2008. ISSN 1612-1880.

VICHEWSKI, W. et al. Lychnopholic acid and its acetate from *Lychnophora martiana*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 4, p. 685-686, 1980. ISSN 0031-9422.

WALLE, T. Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 826-832, 2007. ISSN 1543-8384.

WALLE, T.; WEN, X. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 10, p. 1786-1792, 2006. ISSN 0090-9556.

WANG, H. et al. Simultaneous determination of three flavonoid C-glycosides in mice biosamples by HPLC-ESI-MS method after oral administration of *Abrus mollis* extract and its application to biodistribution studies. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 903, p. 68-74, 2012. ISSN 1570-0232.

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

WILSON, G. et al. Transport and permeability properties of human Caco-2 cells - an *in vitro* model of the intestinal epithelial-cell barrier. **Journal of Controlled Release**, v. 11, n. 1-3, p. 25-40, 1990. ISSN 0168-3659.

YANG, C. S. et al. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. S139-S151, 2008. ISSN 1613-4125.

ZHANG, Y. et al. Metabolism of flavone C-glucosides and *p*-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 3, p. 484-494, 2007. ISSN 0007-1145.

ZUCOLOTTO, S. M. et al. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, n. 11, p. 1221-1226, 2009. ISSN 0032-0943.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Espectros de RMN obtidos para a vicenina-2 isolada neste trabalho.

Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C obtido em 100 MHz para a vicenina-2 (DMSO- d_6) isolada.

Figura 66. Espectro de RMN de ^1H obtido em 400 MHz para a vicenina-2 (DMSO-d_6) isolada.

APÊNDICE 2

Espectros de RMN obtidos para o ácido lychnofólico isolado neste trabalho.

Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C obtido em 100 MHz para o ácido lychnofólico (CD_3OD) isolado.

Figura 68. Espectro de RMN de ^1H do ácido lychnofólico isolado neste trabalho adquirido em 400 MHz, CDCl_3 .

ANEXOS

ANEXO 1

Certificação do CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) do campus da USP de Ribeirão Preto para a realização deste trabalho.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1054.53.1), intitulado "Estudo da Absorção e Metabolismo *in vitro* e *in vivo* de Flavonoides C. glicosilados", de autoria de **Dayana Rúbio Gouvea** e de **Norberto Peporine Lopes**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 03.09.2012.

Colaboradores: Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira;
Yassuko Iamamoto;
Marilda das Dores Assis

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1054.53.1), entitled: "Estudo da Absorção e Metabolismo *in vitro* e *in vivo* de Flavonoides C. glicosilados", by **Dayana Rúbio Gouvea** and **Norberto Peporine Lopes**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, September, 3 2012.

Ribeirão Preto, 11 de setembro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

ANEXO 2

Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético
Nº 010174/2011-7.

2770134586466519

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

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 181/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO - USP

CNPJ: 630.255.300/0001-04

Representante Legal: MARCO ANTONIO ZAGO

Cargo/Função: Pró-Reitor de Pesquisa

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

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

Coordenador do Projeto: Norberto Peporine Lopes

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

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

Amostras a serem acessadas:

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

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

Local de depósito de subamostra: DEPARTAMENTO DE BOTANICA

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

JOAO LUIS CALLEGARI LOPES / CPF 242.694.688-15

LEONARDO GOBBO NETO / CPF 260.985.118-96

JOAO SEMIR / CPF 416.569.038-49

DIONEIA CAMILO RODRIGUES DE OLIVEIRA / CPF 244.653.721-91

JOSE NORBERTO CALLEGARI LOPES / CPF 015.379.628-88

THAIS GUARATINI / CPF 278.586.568-56

ADRIAN MARTIN POHLIT / CPF 148.079.648-44

LUIZ ELIDIO GREGORIO / CPF 287.891.418-63

CARLOS ALEXANDRE CAROLLO / CPF 931.181.121-15

DANIEL ROBERTO CALLEJON / CPF 278.102.618-74

GISELE BARALDI MESSIANO / CPF 289.234.958-32

DAYANA RUBIO GOUVEA / CPF 326.851.028-09