UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação farmacocinética do extrato bruto e de metabólitos
secundários das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.**

Juliana de Carvalho da Costa

**Ribeirão Preto
2016**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação farmacocinética do extrato bruto e de metabólitos secundários
das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.**

Juliana de Carvalho da Costa

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação farmacocinética do extrato bruto e de metabólitos secundários
das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.**

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: Juliana de Carvalho da Costa

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Co-orientador: Prof. Dr. Hartmut Derendorf

Versão corrigida da Tese de Doutorado
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas no dia 19/04/2016. A
versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

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.

Da Costa, Juliana de Carvalho

Avaliação farmacocinética do extrato bruto e de metabólitos secundários das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.. Ribeirão Preto, 2016.

114 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

Co-orientador: Hartmut, Derendorf.

1. *Copaifera langsdorffii*. 2. Quercitrina. 3. Ácidos galoilquínicos. 4. Urolitíase. 5. Farmacocinética. 6. Microdiálise.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana de Carvalho da Costa

Avaliação farmacocinética do extrato bruto e de metabólitos secundários das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.

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: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos.

Co-orientador: Prof. Dr. Hartmut Derendorf.

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 este trabalho a todos aos quais me espelho e me
fazem ansiar um mundo cada dia melhor...*

Vocês fazem do meu mundo cada dia melhor!

AGRADECIMENTOS

Alegro-me ao dizer que meus agradecimentos serão longos. Durante esses quatro anos de doutorado, seis anos de USP Ribeirão Preto, esforcei-me ao máximo para aproveitar cada oportunidade oferecida. Foram inúmeras as pessoas que passaram por mim e deixaram um pouco de si. Foram incríveis os locais que pude conhecer e agregar conhecimento. Assim, dou início aos meus sinceros agradecimentos...

Obrigada meu Deus por esta oportunidade, por me permitir chegar onde nem se quer imaginava. Espero sempre fazer da minha vida, Sua vontade.

À minha família, meus pais Augusto e Eliane e ao meu irmão João Paulo. Sou feliz em partilhar minha vida com vocês e agradeço por sempre se fazerem presente, mesmo que por pensamento. Amo vocês!

Ao meu amor, Diego Francisco Cortés Rojas, por estar ao meu lado desde o princípio desta jornada. Todo o seu apoio foi fundamental nesses anos que estamos juntos. Desejo que possamos fazer da nossa união e companheirismo, uma bela família.

De maneira especial ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela orientação nesses seis anos e, principalmente, por me dar asas para alcançar meus objetivos. Aprendi muito todos esses anos e agradeço por me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Hartmut Derendorf, pela co-orientação durante o doutorado sanduíche realizado na Universidade da Flórida. Foi uma experiência incrível poder trabalhar ao seu lado e com toda a sua equipe de alunos e funcionários.

Também agradeço a Profa. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me acolher como uma de seus alunos e me dar todo o suporte na conclusão de estudos farmacocinéticos deste projeto.

Aos meus amigos e colaboradores que foram fundamentais na execução das etapas deste projeto. Agradeço a enorme ajuda recebida do M.Sc. Erick Motta (FCFRP - USP), Dra. Nivea Falcão (UF) e do Dr. Fabiano Barreto (UFRGS), pelas incontáveis horas de trabalho em parceria.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacognosia, que desde o princípio partilharam comigo seus conhecimentos. Graças a vocês adquiri experiência em técnicas laboratoriais e

trabalhamos muito bem em equipe. Muito obrigada a todos que me receberam de braços abertos, Mauro Nogueira, Renata Tiossi, Mariza Miranda, Ricardo Furtado, William Andrioli, Eliane Silva, Daniela Chagas e Rejane de Oliveira. Também agradeço a todos os que chegaram no decorrer dessa trajetória, Cristiane Bernardes, Ana Carolina Pereira, Marivane Lemos, Jonas Mangabeira, Jennyfer Aldana, Debora Munhoz, Mohamed El-Salam, Jéssica São José, Tatiane Carvalho, Marcela Etchebehere, Camila Paludo, Ingrid Pontes, João Luiz Esteves, Fabian Arias, Anny Lima, Tiago Branquinho, Bruno Leite, Federico Padilla, Rosana Casoti, Danniela Faleiro e Felipe Antunes. Aos Professores Dr. Fernando Da Costa e Dra. Nieve Furtado, juntamente aos técnicos, Mário Ogasawara, Walter Lopes e Angélica Chellegatti, por poder contar com eles sempre que foi preciso.

Aos meus colegas de laboratório de Farmacocinética da Universidade da Flórida, Ingonr Pra, Sherwin Sy, Alex Voelkner, Pui Vipada, Wendy Yichao, Ravi Singh, Jatinder Kaur, María Avilán, Mongjen Chen, Ahmed Samir, Nihal Roubey e Aline Hilzendeger. Com carinho à técnica Yufei Tang e as secretárias Patricia Khan e Kim Howell.

Aos meus colegas de laboratório de Farmacocinética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Andressa Braga, Bruna Torres, Carolina Miranda, Eduardo Palma, Fernando Carreño, Izabel Alves, Jaqueline Izolan, João Victor Laureano, Maiara Pigatto, Natália Girondi, Priscila Bernardi e Ricardo Lorenzoni. A todas as IC's que participaram ativamente dos experimentos, em especial, Victória Etges, Daiane Lima e Leticia Mezzomo. Agradeço as Professoras Dra. Bibiana Araujo e Dra. Teresa Dalla Costa, por todo o apoio e excelente acolhida.

A todos os Professores e Técnicos da FCFRP, que desde o princípio me receberam tão bem e abriram as portas de seus laboratórios para que pudesse aprender e conhecer novas áreas.

Aos funcionários da FCFRP, porteiros, seguranças, copeiras, motoristas, técnicos em informática, técnicos da elétrica, limpeza, secretárias e a todos que de forma direta ou indireta me auxiliaram constantemente.

Aos meus familiares e amigos que fizeram desta caminhada uma trajetória repleta de momentos felizes. Obrigada pela torcida e pelo olhar vibrante a cada conquista minha. Um agradecimento especial ao meu Avô Antônio, por nos ter ensinado a viver com simplicidade e sempre plantando bons frutos.

Agradeço também as famílias que fui construindo em cada lugar que chegava. Muito obrigada aos meus amigos de Gainesville, em especial, Andréa Diniz, Brenno Diniz, Lúcia Leite, Pat Hill e Jed Kessling. Aos amigos de Porto Alegre, sendo que de forma muito saudosa a todas as amigas da Casa Amarela, Nubia Martins, Roberta Martins, Rosana Martins, Rozilene Ferreira, Ana Carina Vasconcelos, Lorena Ferreira, Vivian Reina, Milena Zapata e Emeline Lhoumaud. Todo esse tempo que passei fora de casa foi muito mais fácil na companhia de vocês, muito obrigada.

Por fim, agradeço a todos os professores que foram essenciais à minha formação. Serei eternamente grata ao Professor Nilton São Thiago (*in memoriam*), por ter me transmitido tanto conhecimento dentro e fora de uma sala de aula. Que seus sonhos e ideais sejam perpetuados para as futuras gerações.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro. Muito obrigada!!!

*“Aos outros dou o direito de ser como são,
a mim dou o dever de ser cada dia melhor.”*

Chico Xavier

RESUMO

Da Costa, J.C. **Avaliação farmacocinética do extrato bruto e de metabólitos secundários das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.** 2016. 114 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Copaifera langsdorffii Desf., popularmente conhecida como “copaíba”, distribui-se abundantemente no cerrado brasileiro, sendo que diversas atividades biológicas já foram descritas na literatura para o seu oleorresina. Contudo, nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem estudando as partes aéreas desta espécie e verificou-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* apresentava atividade antiliteásica. Com a intenção de descobrir quais são os compostos relacionados a esta atividade, foi realizado o estudo fitoquímico das folhas. Com o auxílio de análises cromatográficas foi possível verificar o perfil de cada fração e, assim, escolher as mais promissoras para isolamento de compostos. A partir da fração em acetato de etila obtiveram-se os flavonoides quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) e canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina), isolados por cromatografia contra-corrente (HSCCC), seguida de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-preparativa). Já a partir da fração aquosa obtiveram-se os derivados galoilquínicos 5'',5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico e 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico por cromatografia de filtração em gel (*Sephadex*), seguida de purificação em CLAE-preparativa. Nos testes farmacocinéticos, o extrato hidroalcoólico, quercitrina e o galoilquínico 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico foram os compostos selecionados para serem estudados. Para ambos os compostos, métodos analíticos foram validados em plasma e em salina para a realização dos estudos farmacocinéticos. Realizou-se também a calibração da sonda de microdiálise *in vitro* por retrodiálise, para se determinar as condições a serem empregadas *in vivo*. De maneira geral, quercitrina se ajustou ao modelo farmacocinético de dois compartimentos e, após administração intravenosa de 1 mg/kg, apresentou meia vida curta ($t_{1/2} = 0,40 \pm 0,07$ h), uma rápida ($\alpha = 11,32 \pm 1,90$ h⁻¹) e boa ($V_{dss} = 2,10 \pm 0,52$ L/kg) distribuição tecidual e alta depuração ($CL = 6,85 \pm 0,62$ L/h/kg). Por análise dos microdialisados renais, a fração livre de quercitrina nos rins foi 13 vezes maior do que a concentração livre no plasma. O composto galoilquínico, por se tratar de um composto inédito, foi estudado farmacocineticamente por via intravenosa em três concentrações (1 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2 mg/kg) e se ajustou bem ao modelo de dois compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten, apresentando comportamento não linear ($ASC_{0-\infty}$ 103,85 $\pm$ 23,90; 273,7 $\pm$ 81,6 e 363,6 $\pm$ 142,32 μ g h/mL, respectivamente). Não foi possível quantificar a concentração livre nos rins por microdiálise para o galoilquínico, pois o mesmo se ligava a sonda. Dessa maneira, o estudo de distribuição tecidual foi realizado, demonstrando que tanto quercitrina quanto o galoilquínico apresentavam alta penetrabilidade nos rins, com uma razão tecido renal/plasma de 23,7 e 12,4, respectivamente. Com relação ao perfil farmacocinético do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* e da fração butanólica após administração por via oral, verificou-se que não foi possível detectar nenhum dos isolados no plasma, sugerindo que tais substâncias foram metabolizadas e, provavelmente, tornaram-se ainda mais hidrossolúveis para posterior eliminação por via renal. Frente aos resultados, conclui-se que quercitrina e galoilquínico são substâncias de rápida eliminação e que podem estar relacionadas à atividade antiliteásica descrita para o extrato das folhas de *C. langsdorffii*.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*, antiliteásica, quercitrina, galoilquínico, farmacocinética, microdiálise.

ABSTRACT

Da Costa, J.C. **Pharmacokinetic evaluation of the crude extract and secondary metabolites from the leaves of *Copaifera langsdorffii* Desf.**, 2016. 114 f. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Copaifera langsdorffii Desf., popularly known as "copaíba" is abundantly distributed in the Brazilian cerrado, with several biological activities that have been described in the literature for its oleoresin. However, since few years ago, our research group has been studying the aerial parts of this species, and it was found that the hydroalcoholic extract of its leaves display antilithiatic activity. Aiming to identify the compounds related to this activity, the phytochemical study of the leaves hydroalcoholic extract was undertaken. By using chromatography techniques, it was possible to choose the most promising fractions to isolate compounds. From the ethyl acetate fraction, it was isolated by countercurrent chromatography (HSCCC) followed by preparative HPLC purification, the flavonoids quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (quercitrin) and kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (afzelin). From the aqueous fraction, it was isolated the galloylquinic acid derivatives 5''-*O*-methyl-3,4-di-*O*-galloylquinic and 5',5''-di-*O*-methyl-3,4-*O*-di-galloylquinic by using gel filtration chromatography (Sephadex) followed by preparative HPLC purification. For the pharmacokinetic assays, the hydroalcoholic extract, quercitrin and 5', 5''-di-*O*-methyl-3,4-di-*O*-galloylquinic acid were chosen to be studied. For both compounds, it was validated analytical methods in plasma and saline, to perform pharmacokinetic studies. It was also held the microdialysis probe calibration *in vitro* by retrodialysis, to determine the conditions to be employed *in vivo*. In general, quercitrin fitted to a two-compartmental pharmacokinetic model and after intravenous administration of 1 mg/kg, it presented a short half-life ($t_{1/2} = 0.40 \pm 0.07$ h) a fast ($\alpha = 11.32 \pm 1.90$ h⁻¹) and good ($V_{dss} = 2.10 \pm 0.52$ L/kg) tissue distribution and high clearance ($CL = 6.85 \pm 0.62$ L/h/kg). In the kidney microdialysates analyses, the free renal fraction of quercitrin was 13 times greater than the free plasma concentration. The galloylquinic compound, which is a new isolated one, was studied intravenously in three concentrations (1 mg/kg, 1.5 mg/kg and 2 mg/kg) and fitted to a two-compartmental model with Michaelis-Menten elimination, presenting the non-linear behavior ($ASC_{0-\infty}$ 103.85 ± 23.90 , 273.7 ± 81.6 and 363.6 ± 142.32 μ g h/mL, respectively). It was not possible to quantify the free concentration of galloylquinic in the kidney by microdialysis, because it bound to the probe. Thus, the study of tissue distribution was performed, in which it was demonstrated that both quercitrin and galloylquinic showed high penetration in the kidneys, with a tissue/plasma ratio of 23.7 and 12.4, respectively. With regard to the pharmacokinetic profile of the hydroalcoholic extract of *C. langsdorffii* and *n*-butanol fraction after oral administration, it was found that it was not possible to detect any of the isolated compounds in plasma, suggesting that these compounds were metabolized and probably become even more water soluble for disposal renally. Based on the results, it is concluded that quercitrin and galloylquinic are rapidly eliminated and may be related to antilithiatic activity of the leaves of *C. langsdorffii*.

Keywords: *Copaifera langsdorffii*, antilithiatic, quercitrin, galloylquinic, pharmacokinetics, microdialysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Copaifera langsdorffii</i> medindo cerca de 7 m de altura (A). Folhas e sementes (B).	3
Figura 2. Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) (A) e ácido 5',5''-di- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico (galoilquínico) (B).	6
Figura 3. Modelo esquemático de uma sonda de microdiálise (Adaptado de LOOS <i>et al.</i> , 2007).	7
Figura 4. Perfil esquemático da partição realizada com o extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i> com solventes de polaridade crescente.	12
Figura 5. Esquema representativo de um sistema de microdiálise <i>in vitro</i> .	20
Figuras 6a - 6f. Sequência de fotografias com os principais passos para o procedimento cirúrgico de implantação da sonda CMA20 em rins de ratos Wistar.	24
Figura 7a - 7c. Sequência de fotografias com os principais passos para o procedimento cirúrgico de canulação da artéria carótida.	26
Figura 8. Ilustração da sonda de microdiálise modelo CMA20.	27
Figura 9. Ilustração do tubo azul e transparentes conectados.	27
Figura 10. Ilustração de uma bomba de microdiálise acoplada a tubo de sonda CMA20. Exemplificação dos experimentos realizados.	27
Figura 11. Ilustração do experimento realizado para testar a ligação de galoilquínico à membrana e ao tubo de uma sonda de microdiálise modelo CMA20.	28
Figura 12. Modelo mamilário de dois compartimentos, em que k_{10} é a microconstante de eliminação do compartimento central; k_{12} é a microconstante de distribuição do compartimento central (1) para o periférico (2); k_{21} é a microconstante de distribuição do compartimento periférico (2) para o central (1).	34
Figura 13. Modelo mamilário de dois compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten, em que V_m é a velocidade máxima de eliminação; K_m é a constante de Michaelis-Menten; V_1 e V_2 são os volumes de distribuição aparentes nos compartimentos C_1 e C_2 , respectivamente; k_{12} e k_{21} são microconstante de distribuição para fora e dentro do compartimento central (C_1), respectivamente.	35
Figura 14. Perfil esquemático da partição realizada com o extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i> com solventes de polaridade crescente e seus respectivos rendimentos.	38
Figura 15. Perfil cromatográfico em CLAE-UV-DAD do extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i> e suas frações em hexano, diclorometano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e água nos comprimentos de onda 257 nm, 280 nm e 360 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 -	

90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, vazão de 1 mL/min.40

Figura 16. Perfil cromatográfico em CCD das subfrações obtidas por HSCCC da fração em acetato de etila. Fase móvel: água: ácido fórmico: ácido acético: acetato de etila (27: 11: 11: 100, v/v/v/v). Revelado com solução etanólica de NP a 1%.41

Figura 17. Purificação das subfrações ricas em afzelina (**A**) e quercitrina (**B**) por CLAE-preparativa nos comprimentos de onda 257 nm e 365 nm. Coluna preparativa C₁₈ PREP-ODS (H) (20 mm x 25 cm). Fase móvel A: água e B: metanol num gradiente de 30 - 60% de B em 17 min., permanece em 60% até 27 min., 60 - 30% em 28 min. e mais 2 min. em 30% de B, vazão de 9 mL/min. Composto (**1**) quercitrina e (**2**) afzelina.42

Figura 18. Perfil cromatográfico em CLAE-UV-DAD para os compostos isolados afzelina (**A**) e quercitrina (**B**) em 360 nm, com os seus respectivos perfis no ultravioleta. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 µm); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.42

Figura 19. Etapas do processo de separação da fração aquosa no decorrer da mudança de gradiente da fase móvel.43

Figura 20. Perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD das subfrações (**Sph 1 - 10**) proveniente do fracionamento da fração aquosa por coluna *Sephadex*, no comprimento de onda 280 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 µm); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.45

Figura 21. Perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD das subfrações (**Sph 11 - 20**) proveniente do fracionamento da fração aquosa por coluna *Sephadex*, no comprimento de onda 280 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 µm); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.46

Figura 22. Perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD das subfrações (**Sph 21 - 30**) proveniente do fracionamento da fração aquosa por coluna *Sephadex*, no comprimento de onda 280 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 µm); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.47

Figura 23. Perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD das subfrações (**Sph 31 - 35**) proveniente do fracionamento da fração aquosa por coluna *Sephadex*, no comprimento de onda 280 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 µm); Fase

móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.

.....48

Figura 24. Purificação da subfração **Sph 9 (A)** e **Sph 10 (B)** por CLAE-preparativa nos comprimentos de onda 257 nm e 280 nm. Fase estacionária: coluna Polar-RP (250 x 10 mm, 4 µm). Fase móvel A: água e B: metanol num gradiente 15 - 27% de B em 15 min., 27 - 100% de B em 18 min., manutenção em 100% de B até 22 min. e 100 - 15% de B em 23 min., vazão de 3 mL/min. Composto (1) ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico e (2) ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico.....49

Figura 25. Perfís cromatográficos em CLAE-UV-DAD dos compostos (1) e (2) provenientes das subfrações **Sph 9** e **Sph10**. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 µm); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.49

Figura 26. Estrutura química da quercetina-3-*O*-α-L-ramnopiranosídeo.....51

Figura 27. Estrutura química do canferol-3-*O*-α-L-ramnopiranosídeo.....53

Figura 28. Estrutura química do composto (1) galoilquínico: ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico.....55

Figura 29. Estrutura química do composto (2): ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico.57

Figura 30. Espectro de massas da quercitrina (A) e galoilquínico (B).....59

Figura 31. Cromatogramas de amostras de branco, padrão interno (ácido ferúlico), limite inferior de quantificação (LIQ) 3,5 ng/mL e último ponto da curva de linearidade 100 ng/mL, no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) para os analitos galoilquínico, quercitrina e ácido ferúlico.60

Figura 32. Curvas de linearidade de quercitrina (A) galoilquínico (B).....61

Figura 33. Recuperação dos analitos, quercitrina (A) e galoilquínico (B), determinada por retrodiálise em duas taxas de fluxo (1 µL/min e 2 µL/min).....65

Figura 34. Recuperação relativa por diálise e retrodiálise da quercitrina (A), quercitrina na presença de galoilquínico (B), galoilquínico (C), galoilquínico na presença de quercitrina (D) (N=9).66

Figura 35. Análise cromatográfica de um plasma branco analisado na transição do padrão interno ácido ferúlico (193,3 → 133,8).68

Figura 36. Estudo piloto do plasma total (A) e microdialisados renal (B) de quercitrina 1 mg/kg após administração intravenosa em ratos machos Wistar.71

- Figura 37.** Perfis de concentração *versus* tempo de quercitrina em plasma (■) e livre em tecido renal (○). As linhas representam as concentrações preditas por modelo de dois compartimentos em plasma (—), fração livre em plasma (---) e fração livre em tecido (.....). Os pontos representam a média $\pm$ DP de 5 animais. 73
- Figura 38.** Estudo de ligação do composto galoilquínico aos tubos da sonda de microdiálise, testado em diferentes concentrações (25 – 400 μ g/mL). 75
- Figura 39.** Estudo de ligação do composto galoilquínico ao tubo mais sonda e somente ao tubo, testado em duas concentrações (25 e 50 μ g/mL). 76
- Figura 40.** Seleção de íons fragmentos $[MH]^+$ de 523 e 193 com maior intensidade. 78
- Figura 41.** Perfis de concentração *versus* tempo de quercitrina em plasma após administração por via intravenosa de 1 mg/kg (●), 1,5 mg/kg (◆) e 2,0 mg/kg (▲). As linhas representam as concentrações preditas por modelo de dois compartimentos em plasma (—). Os pontos representam a média $\pm$ DP ($N=5$). 82
- Figura 42.** Perfis de concentração *versus* tempo do galoilquínico e da quercitrina em plasma (■) e no tecido renal (●). A linha representa a concentração predita pelo modelo de dois compartimentos em plasma (---). 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente da fase móvel utilizada para o fracionamento da fração aquosa em cromatografia de filtração em gel (<i>Sephadex</i> TM).....	15
Tabela 2. Fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel (<i>Sephadex</i> TM).	44
Tabela 3. Dados dos espectros de RMN obtidos para a quercetina-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo em DMSO- <i>d</i> ₆	51
Tabela 4. Dados dos espectros de RMN obtidos para o canferol-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo em DMSO- <i>d</i> ₆ e dados da literatura.	53
Tabela 5. Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto (1) galoilquínico: ácido 5',5''-di- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico em CD ₃ OD.	55
Tabela 6. Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto (2): ácido 5''- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico em CD ₃ OD.	57
Tabela 7. Otimização dos parâmetros, <i>declustering potential</i> , <i>collision energy</i> , <i>entrance potential</i> e <i>collision exit potential</i> de quercitrina, galoilquínico e AF, em modo negativo.....	59
Tabela 8. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) das concentrações observadas de quercitrina e galoilquínico, solubilizados em salina (<i>N</i> =3).....	61
Tabela 9. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste inter-dia para quercitrina e galoilquínico, solubilizados em salina (<i>N</i> =6).....	62
Tabela 10. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste intra-dia para quercitrina e galoilquínico, solubilizados em salina (<i>N</i> =6).....	63
Tabela 11. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) nos testes de estabilidade para quercitrina e galoilquínico, solubilizados em salina (<i>N</i> =3).....	64
Tabela 12. Valores transcritos da Figura 38, descrevendo a recuperação relativa da diálise (D) e retrodiálise (RD) de quercitrina, quercitrina na presença de galoilquínico (GQ), galoilquínico e galoilquínico na presença de quercitrina. Valores descritos em média $\pm$ DP (<i>N</i> =9).	66
Tabela 13. Eficiência de extração de quercitrina do plasma (%).	68
Tabela 14. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) das concentrações observadas de quercitrina extraída do plasma (<i>N</i> =2).....	69
Tabela 15. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste intra-dia para quercitrina extraída de plasma (<i>N</i> =6).	69
Tabela 16. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste inter-dia para quercitrina extraída de plasma (<i>N</i> =6).	70

Tabela 17. Parâmetros farmacocinéticos plasmáticos após administração de dose única de quercitrina 1 mg/kg em ratos Wistar ($N=5$).	72
Tabela 18. Parâmetros farmacocinéticos teciduais livres após administração de dose única de quercitrina 1 mg/kg em ratos Wistar ($N=5$).	73
Tabela 19. Avaliação da concentração da substância galoilquínico na seringa no início e no final do experimento para a concentração de 50 μ g/mL.	76
Tabela 20. Eficiência de extração de galoilquínico do plasma (%).	77
Tabela 21. Otimização dos parâmetros, <i>declustering potential</i> , <i>collision energy</i> , <i>entrance potential</i> e <i>collision exit potential</i> do galoilquínico e padrão interno (ácido ferúlico), em modo negativo.	78
Tabela 22. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) das concentrações observadas de galoilquínico extraído do plasma ($N=6$).	79
Tabela 23. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste intra-dia para galoilquínico extraído do plasma ($N=6$).	79
Tabela 24. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste inter-dia para galoilquínico extraído de plasma ($N=6$).	80
Tabela 25. Parâmetros farmacocinéticos após administração de dose única de galoilquínico 1 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2 mg/kg em ratos Wistar ($N=5$)	82
Tabela 26. Parâmetros farmacocinéticos estimados no tecido renal e no plasma, após administração do galoilquínico e da quercitrina 1 mg/kg, por via intravenosa, em ratos Wistar. ($N=3$ animais/ tempo).	84

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

A	Intercepto da fase de distribuição
AF	Ácido ferúlico
Afzelina	Kaempferol-3- <i>O</i> -L- α -ramnopiranosídeo
ASC _{0-t}	Área sob a curva do tempo zero ao tempo t
ASC _{0-∞}	Área sob a curva do tempo zero ao infinito
ASC _{ext}	Área sob a curva extrapolada
ASMC _{0-t}	Área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao tempo t
ASMC _{0-∞}	Área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao infinito
ASMC _{ext}	Área sob a curva no primeiro momento extrapolada
B	Intercepto da fase de eliminação
C	Concentração plasmática total
C ₁ e C ₂	Concentrações nos compartimentos 1 e 2
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CLAE-UV-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta com arranjos de diodos.
CLAE-preparativa	Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
CL	Depuração
COSY	<i>Homonuclear correlation spectroscopy</i>
CQ	Controles de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficientes de variação
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação Animal de Laboratório
D	Diálise
DP	Desvio padrão
d.i.	Diâmetro interno
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetil sulfóxido deuterado
ELL	Extração líquido-líquido
ESI	<i>Eletrospray</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Ft	Fator de penetração no tecido
Galoilquínico	Ácido 5', 5"-di- <i>O</i> -metil-3,4-di- <i>O</i> -galoilquínico
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HSCCC	Cromatografia contra corrente de alta velocidade
IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i>
K _m	Constante de Michaelis-Menten
k ₁₀	Eliminação a partir do compartimento central
k ₁₂	Taxa de distribuição do compartimento central para o periférico

k_{21}	Taxa de redistribuição do compartimento periférico para o central
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a detector de massas em tandem
LIQ	Limite inferior de quantificação
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MSC	Critério de seleção do modelo
m/z	Medida da razão massa sobre a carga
NP	Difenilboriloxietilamina
PAES	Poli aril éter sulfona
p/v	Solução preparada em relação peso por volume
PTFE	Politetrafluoretileno
quercitrina	Quercetina-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo
RD	Retrodiálise
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear unidimensional de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear unidimensional de carbono
rpm	Rotações por minuto
RR_D	Recuperações relativas por diálise
RR_{RD}	Recuperações relativas por retrodiálise
R^2	Coefficiente de determinação
s	Desvio Padrão
<i>Sephadex</i> TM	Cromatografia de filtração em gel
Sonda	Membrana de microdiálise
$t_{1/2}$	Meia vida
TRM	Tempo de residência médio
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
V_1 e V_2	Volumes de distribuição aparentes nos compartimentos C_1 e C_2
V_c	Volume de distribuição no compartimento central
V_{dss}	Volume de distribuição no equilíbrio
V_m	Velocidade máxima de eliminação
v/v	Solução preparada em relação volume por volume
a	Constante de eliminação da fase de distribuição
β	Constante de eliminação da fase de eliminação
λ	Constante de velocidade de eliminação
$\bar{x}$	Média dos valores obtidos
$[\text{M-H}]^-$	Molécula desprotonada

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Produtos Naturais: um pouco de sua história no Brasil.	2
1.2 O gênero <i>Copaifera</i>	2
1.2.1 <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	3
1.3 Urolitíase	4
1.4 Estudos farmacocinéticos	6
1.5 Microdiálise	7
1.6 Modelos farmacocinéticos	8
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Preparo do extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i>	12
3.2 Partição do extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i>	12
3.3 Análise Cromatográfica	13
3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada	13
3.3.2 Perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD	13
3.4 Fracionamento por Cromatografia Contra Corrente de Alta Velocidade	13
3.4.1 Fracionamento da fração em acetato de etila por HSCCC	14
3.5 Fracionamento da fração aquosa por Cromatografia de Filtração em Gel (<i>Sephadex</i> TM)	15
3.6 Isolamento e purificação de compostos por CLAE-preparativa	15
3.6.1 Purificação de componentes das subfrações obtidas da fração em acetato de etila por HSCCC	16
3.6.2 Purificação de componentes das subfrações obtidas da fração aquosa por HSCCC e Sephadex	16
3.7 Identificação estrutural das substâncias isoladas	17
3.8 Microdiálise <i>in vitro</i> de quercitrina e galoilquínico	17
3.8.1 Instrumentação e desenvolvimento de método analítico	17
3.8.2 Preparo de amostras	18
3.8.3 Validação de método analítico para análise de microdialisados	18
3.8.4 Microdiálise	19
3.9 Ligação a proteínas de quercitrina e galoilquínico	21
3.10 Estudos farmacocinéticos de quercitrina	21
3.10.1 Extração plasmática	21

3.10.2 Modelo experimental <i>in vivo</i>	22
3.10.3 Validação de método analítico em plasma.....	23
3.10.4 Microdiálise renal.....	23
3.10.5 Calibração da sonda <i>in vivo</i>	24
3.10.6 Coleta de amostras de microdialisados	25
3.10.7 Coleta de amostras de sangue	25
3.11 Estudos farmacocinéticos do galoilquínico	26
3.11.1 Avaliação da ligação de galoilquínico a sonda de microdiálise.....	26
3.11.2 Instrumentação e desenvolvimento de método analítico	28
3.11.3 Extração plasmática	29
3.11.4 Validação de método analítico em plasma.....	29
3.11.5 Modelo experimental <i>in vivo</i>	29
3.12 Distribuição tecidual de quercitrina e galoilquínico	30
3.13 Estudos farmacocinéticos do extrato bruto de <i>C. langsdorffii</i> e da fração butanólica.	31
3.14 Modelagem dos dados farmacocinéticos	31
3.14.1 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos não compartimentais	31
3.14.2 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos compartimentais	33
3.14.3 Determinação da fração livre no tecido renal	34
3.14.4 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos compartimentais com eliminação por Michaelis-Menten.....	35
3.15 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Rendimento e perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de <i>C. langsdorffii</i> e frações.....	38
4.2 Fracionamento da fração em acetato de etila por HSCCC	41
4.3 Fracionamento da fração aquosa por Cromatografia de Filtração em Gel (<i>Sephadex</i>TM)	43
4.3.1 Purificação das subfrações Sph 9 e 10	48
4.4 Determinação estrutural de compostos isolados.....	50
4.4.1 Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (Quercitrina)	50
4.4.2 Canferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (Afzelina)	52
4.4.3 Ácido 5',5''-di-O-metil-3,4-di-O-galoilquínico (composto 1)	54
4.4.4 Ácido 5''-O-metil-3,4-di-O-galoilquínico (composto 2).....	56
4.5 Microdiálise <i>in vitro</i> de quercitrina e galoilquínico.....	58
4.5.1 Otimização das condições cromatográficas	58
4.5.2 Validação de método analítico para análise de microdialisados	59
4.5.3 Microdiálise: influência do fluxo	65
4.6 Ligações à proteínas	67
4.7 Estudos farmacocinéticos de quercitrina <i>in vivo</i>	67
4.7.1 Extração plasmática	68
4.7.2 Validação de método analítico em plasma.....	68
4.7.3 Modelo experimental <i>in vivo</i>	70
4.7.4 Avaliação farmacocinética	71

4.8 Estudos farmacocinéticos do galoilquínico <i>in vivo</i>.....	74
4.8.1 Avaliação da ligação de galoilquínico a sonda de microdiálise.....	74
4.8.2 Extração plasmática	77
4.8.3 Validação de método analítico em plasma.....	77
4.8.4 Modelo experimental <i>in vivo</i>	80
4.8.5 Avaliação farmacocinética	81
4.9 Distribuição tecidual do galoilquínico e da quercitrina	83
4.10 Estudos farmacocinéticos do extrato bruto de <i>C. langsdorffii</i> e da fração butanólica.	
.....	85
5. CONCLUSÕES	86
6. FLUXOGRAMA	88
7. REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICES	95
ANEXOS.....	110

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais: um pouco de sua história no Brasil.

O uso de plantas medicinais é uma prática milenar e utilizada em diversas culturas de povos para prestar os primeiros serviços básicos de saúde à pacientes com os mais variados tipos de doenças (MEHTA *et al.*, 2015). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, 65 - 80% da população mundial utilizam-se de plantas medicinais como primeira forma de tratamento (YAN *et al.*, 2013).

Partindo-se do princípio que o Brasil é um dos países que abriga uma das maiores biodiversidades do mundo com importante fonte de recursos naturais derivadas de animais, plantas e micro-organismos, evidencia-se a importância de preservar e estudar toda essa riqueza (LIMA *et al.*, 2010). Dados atualizados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2016) demonstram que nos últimos anos houve uma redução de mais de 80% do desmatamento da Amazônia Legal. Entretanto, grande parcela do território brasileiro vem sendo desmatado e isso se deve inclusive pela forma de colonização que o país sofreu (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Como forma de conhecer e preservar toda essa biodiversidade, viajantes e naturalistas europeus de séculos passados já relatavam tudo que encontravam (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Um dos manuscritos recentemente descoberto no Arquivo Histórico do Museu Imperial de Petrópolis - RJ, consta de 1.657 páginas com verbetes botânicos agrupados em ordem alfabética (MARCOLIN, 2013). Dentre as mais de 2000 espécies relatadas no manuscrito, as espécies do gênero *Copaifera* foram descritas com uma enorme riqueza de detalhes. Segundo o manuscrito, “Dez variedades de árvores *Copaifera* se encontram no vasto domínio do Brasil, desde os limites do Rio Negro até os da província de São Paulo.” e “*Copaifera langsdorffii* é notável em São Paulo e Minas” (MAST, 2013).

1.2 O gênero *Copaifera*

As plantas do gênero *Copaifera* L. pertencem à família Leguminosae Juss., subfamília Caesalpinioideae Kunth e são caracterizadas pela presença de estruturas secretoras internas que sintetizam e acumulam oleorresina, que por sua vez possuem expressiva atividade biológica e alto valor comercial (RODRIGUES; TEIXEIRA & MACHADO, 2011).

As árvores são popularmente conhecidas como “copaibeiras” ou “pau d’óleo” e são nativas da região tropical da América Latina e da África Ocidental. Possuem o crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura e podem viver até 400 anos. O tronco é áspero,

medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. Suas folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide, envolvida por uma cobertura carnosa abundante e colorida. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares (VEIGA JR. & PINTO, 2002).

De acordo com o Index Kewensis, o gênero *Copaifera* possui 72 espécies, sendo que algumas apenas são encontradas no Brasil. As espécies mais abundantes deste gênero são: *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth., *C. langsdorffii* Desf., *C. coriácea* Mart. e *C. cearensis* Huber ex Ducke (VEIGA JR. & PINTO, 2002).

1.2.1 *Copaifera langsdorffii* Desf.

A espécie *Copaifera langsdorffii* Desf., popularmente conhecida como “copaíba”, distribui-se abundantemente no cerrado brasileiro (Figura 1). As copaibeiras apresentam estruturas secretórias internas, como os canais e cavidades, que acumulam e sintetizam oleorresina. Tais oleorresinas são um valioso remédio na medicina popular, sendo utilizadas no tratamento de dor de garganta, infecções urinárias (PAIVA *et al.*, 1998), como antimicrobiano, anti-inflamatório, antiulcerogênico, antitumoral e cicatrizante (RODRIGUES; TEIXEIRA & MACHADO, 2011).

Os metabólitos secundários majoritários encontrados no oleorresina da *C. langsdorffii* são os sesquiterpenos e os diterpenos da classe dos labdanos e clerodanos (série normal e série enantiomérica) (VEIGA JR. & PINTO, 2002; TAPPIN *et al.*, 2004; VEIGA JR. *et al.*, 2007).

Figura 1. *Copaifera langsdorffii* medindo cerca de 7 m de altura (A). Folhas e sementes (B).

Com relação às partes aéreas de *C. langsdorffii*, nosso grupo de pesquisa vem sendo pioneiro no relato de sua composição química e atividades biológicas. Neste aspecto, em estudos preliminares foi observado que a composição das partes aéreas desta espécie é bastante distinta do oleorresina, uma vez que o extrato hidroalcoólico das folhas é constituído majoritariamente por compostos polares derivados da via do ácido chiquímico, incluindo flavonoides e ácidos galoilquínicos (SOUZA *et al.*, 2011; NOGUEIRA; FURTADO & BASTOS, 2015). Recentemente, 26 derivados de ácidos galoilquínicos foram identificados por nosso grupo de pesquisa, sendo que 16 deles foram isolados (MOTTA, 2014).

O conhecimento do uso popular do chá das folhas de *C. langsdorffii* para tratar pedra nos rins (urolitíase) serviu como base de estudo etnofarmacológico para o nosso grupo de pesquisa. Sendo assim, animais tratados com extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* demonstraram que a média da massa total dos cálculos foi discretamente menor em comparação ao grupo controle (BRANCALION *et al.*, 2012). Em outro estudo foi avaliado o potencial profilático do extrato no tratamento de pedras renais em ratos induzidos a nefrolitíase por etilenoglicol (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

1.3 Urolitíase

Litíase do trato urinário, popularmente conhecido como pedra nos rins, é assumidamente um problema de saúde, afetando milhões de pessoas no mundo e resultando em internações hospitalares, prescrição de medicamentos, tratamento cirúrgico e perda de horas de trabalho (DURNER; BOURDOUMIS & BUCHHOLZ, 2016).

As principais características clínicas da doença são fortes dores, causada principalmente pela obstrução do canal urinário pela pedra, hematúria (sangue na urina) e infecções, que podem ter sido a causa da formação de pedras renais ou estar ocorrendo devido à obstrução do canal urinário (THOMAS & HALL, 2005).

Pedra nos rins têm se tornado um problema crescente, com prevalência entre 2 e 20% em todo o mundo. Fatores raciais e étnicos estão atrelados ao surgimento da doença, ocorrendo com maior prevalência em caucasianos do sexo masculino e menos em mulheres jovens afro-americanas. Nos homens, a incidência de pedras nos rins parece aumentar após os 20 anos, com picos entre 40 e 60 anos. Nas mulheres, a maior taxa de incidência é próxima aos 20 anos e diminui após os 50 anos (DURNER; BOURDOUMIS & BUCHHOLZ, 2016). Pedra nos rins também tem se tornado cada vez mais comum em crianças e jovens, tornando-os susceptíveis a ter cálculos renais com frequência, de modo a necessitarem realizar

múltiplos procedimentos de remoção de pedras renais ao longo de suas vidas (VELÁZQUEZ *et al.*, 2015).

A etiologia exata da urolitíase é desconhecida, podendo ser causada por fatores ambientais e genéticos, pelo estilo de vida, entre outros (DURNER; BOURDOUMIS & BUCHHOLZ, 2016). A maioria das pedras é composta por oxalato de cálcio e, menos frequentemente, fosfato de cálcio, que juntos respondem por aproximadamente 80% de todas as pedras. Em menor proporção, também existem pedras compostas de ácido úrico (5%), estruvita (10% -15%), cistina (1%) e pedras de composição mista. Em raras ocasiões, medicamentos foram responsáveis por precipitar-se na urina para formar pedras. Acredita-se que a maioria das pedras formam-se quando sais dissolvidos na urina atingem um ponto de supersaturação, formando cristais (GRAHAM; LUBER & WOLFSON, 2011).

Atualmente, algumas maneiras de tratamento para pedras grandes são litotripsia extracorpórea por ondas de choque eletrohidráulico, o qual consiste na criação de fortes vibrações para quebrar as pedras e facilitar a excreção. Traqueostomia percutânea, em que as pedras maiores são retiradas por meio de um pequeno corte feito nas costas do paciente. Ureteroscopia, em que o médico insere um tubo muito fino por meio da uretra do paciente para retirar as pedras presentes no trato urinário (THOMAS & HALL, 2005).

Para casos de pedras menores, procedimentos não invasivos são normalmente recomendados, sendo que beber água e seguir uma dieta balanceada são requisitos fundamentais. Medicações como alopurinol e febuxostat também são receitadas em alguns casos (DURNER; BOURDOUMIS & BUCHHOLZ, 2016).

Dessa forma, com o intuito de buscar alternativas menos invasivas para o tratamento de cálculos renais, as substâncias quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) e o ácido 5',5"-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (galoilquínico), presentes no extrato de *C. langsdorffii*, foram isoladas para realização de estudos farmacocinéticos (Figura 2).

Figura 2. Quercetina-3-*O*-α-*L*-ramnopiranosídeo (quercitrina) (A) e ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (galoilquínico) (B).

1.4 Estudos farmacocinéticos

Apesar do pouco conhecimento sobre biodisponibilidade e perfil farmacocinético da maioria das substâncias provenientes de produtos naturais, nas últimas décadas têm-se adquirido mais informações nesta área, juntamente com o avanço de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos (BHATTARAM *et al.*, 2002). De maneira geral, boa parte dos compostos de plantas necessitam ser mais bem avaliados quanto ao perfil farmacocinético, farmacodinâmico, composição química e metabolômica. (MEHTA *et al.*, 2015). Esses estudos são necessários para desenvolvimento e interpretação de estudos tóxicos e clínicos, monitoramento de compostos marcadores e/ou compostos majoritários da droga vegetal no sangue (YAN *et al.*, 2013).

A maioria dos produtos naturais apresenta perfil farmacocinético complexo, sendo crucial entender o percurso realizado por essas substâncias no organismo após serem administradas (MEHTA *et al.*, 2015). Assim, a caracterização da absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de uma substância inédita é fundamental para a descoberta e desenvolvimento de um fármaco (TORRES *et al.*, 2014).

A razão de se avaliar a perfil farmacocinético dos metabólitos secundários presentes no extrato de *C. langsdorffii* é para se ter uma ideia do percurso que as substâncias testadas têm no organismo. De acordo com Schmidt; Gonzalez & Derendorf (2010) é possível prever a atividade farmacológica de uma substância, quando a mesma é encontrada na forma livre no seu sítio de ação. Contextualizando esta afirmação, pode-se inferir que a presença de metabólitos secundário de *C. langsdorffii* nos rins dos animais, pode estar relacionada com a cura/prevenção (BRANCALION *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013) da urolitíase.

1.5 Microdiálise

Microdiálise é uma técnica de recente, minimamente invasiva e de grande utilidade, uma vez que permite a avaliação do fármaco livre no espaço extracelular nos mais diferentes tecidos (CHAURASIA *et al.*, 2007; LOOS *et al.*, 2007). Esta técnica também permite determinar as concentrações livres de compostos exógenos e endógenos, sendo possível obter amostras de múltiplos tecidos de um mesmo animal sem alterar o volume biológico dos mesmos. As amostras coletadas por microdiálise não necessitam de purificação antes da análise e não correm o risco de serem metabolizadas após a captura, uma vez que a membrana de diálise (sonda) só é permeável a moléculas pequenas, excluindo assim as enzimas (ZHANG *et al.*, 2015).

As sondas de microdiálise (Figura 3) são constituídas de uma membrana semipermeável, que obedece aos princípios da difusão passiva e são mantidas constantemente em condição *sink*. Esta condição faz com que o equilíbrio entre os meios, interno e externo da sonda, nunca sejam atingidos (ARAUJO *et al.*, 2008).

Figura 3. Modelo esquemático de uma sonda de microdiálise (Adaptado de LOOS *et al.*, 2007).

As substâncias difundidas pelo tubo de entrada são coletadas na outra extremidade da sonda, para posterior análise. Estas concentrações coletadas no dialisado, no entanto, não são iguais às concentrações livres no tecido, devido à condição *sink* estabelecida. Dessa forma, a concentração no dialisado representa apenas uma parcela da concentração livre no tecido (ARAUJO, 2008).

Para determinar a fração livre tecidual é necessário antes calcular a recuperação relativa (RR), que pode ser medida em testes de retrodiálise (perda) ou diálise (ganho). A RR é utilizada como um fator de correção para se calcular a verdadeira concentração de uma determinada substância livre no tecido.

1.6 Modelos farmacocinéticos

De acordo com os modelos farmacocinéticos, o organismo é dividido em compartimentos, que por sua vez podem ser classificados como: monocompartimental (um compartimento) ou multicompartimental (mais que um compartimento). Tais modelos têm como premissa a homogeneidade de distribuição e o equilíbrio instantâneo das concentrações do fármaco dentro de cada compartimento. É também por meio de modelos, que os processos de absorção, distribuição e eliminação de uma substância do organismo são simulados (STORPIRTS *et al.*, 2011).

Uma vez que se conhece a quantidade de fármaco administrada por uma das vias no organismo, é possível realizar análises compartimentais farmacocinéticas por meio do estudo contínuo das concentrações plasmáticas. A principal análise realizada é o estudo das curvas obtidas (concentrações plasmáticas *versus* tempo), sendo que tais curvas geram as equações exponenciais, que quando representadas em gráficos ortogonais lineares-logarítmicos (*semilog*), mostram-se como segmentos lineares. De acordo com o gráfico gerado é possível prever o provável número de compartimentos em que o fármaco se distribui (STORPIRTS *et al.*, 2011).

Os principais objetivos para a construção de um modelo são: reduzir dados, estimar os parâmetros e suas respectivas precisões, testar hipóteses e também realizar comparações entre os possíveis modelos. No entanto, questionar-se e desafiar o modelo proposto são fatores importantes para se ter uma boa modelagem (GABRIELSSON & WEINER, 2006).

Construir um modelo que descreva bem os parâmetros desejados pode ser um processo longo e complexo. Por isso, é recomendado a pesquisadores construir modelos apenas quando necessário. Há situações em que uma simples análise não compartimental é suficiente para calcular algum parâmetro (BOURNE, 1995; GABRIELSSON & WEINER, 2006).

Finalmente, determinar um bom modelo permite a predição de resultados futuros. Cálculos de dose, por exemplo, contam com a existência de um modelo adequado (BOURNE, 1995).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Realizar o estudo farmacocinético do extrato das folhas de *C. langsdorffii*, bem como dos compostos quercitrina e de um derivado de ácido galoilquínico.

Objetivos Específicos

Obter o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* e realizar a partição do mesmo com solventes de polaridades crescentes, visando o isolamento do flavonoide quercitrina e de derivados galoilquínicos por cromatografia contra corrente de alta velocidade (HSCCC) e por cromatografia de filtração em gel (*Sephadex*), seguida de purificação em cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-preparativa);

Validar método para análise dos compostos quercitrina e derivado galoilquínico por cromatografia líquida acoplada a detector de massas em tandem (LC-MS/MS) no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM), em amostras de microdialisado e plasma sanguíneo;

Avaliar o perfil farmacocinético por meio da quantificação das concentrações plasmáticas, após administração intravenosa de quercitrina e de galoilquínico em ratos Wistar;

Realizar estudo farmacocinético com os microdialisados renais, por meio da quantificação das concentrações renais livres, após administração intravenosa de quercitrina em ratos Wistar;

Avaliar o perfil farmacocinético por meio da quantificação das concentrações plasmáticas após administração oral de quercitrina e do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* em ratos Wistar;

Modelar os resultados provenientes das análises farmacocinéticas utilizando softwares próprios para essa finalidade, como Phoenix e Scientist.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*

Cerca de 5 kg de folhas de *C. langsdorffii* foram coletadas, sendo que o material vegetal foi identificado pelo Prof. Milton Groppo, do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), sob número de exsicata SPFR 10120. As folhas foram secas em estufa a 60 °C e triturados em moinho de facas. A extração hidroalcoólica (álcool 70%) foi realizada utilizando-se 1 kg do pó obtido.

Inicialmente, o pó das folhas foi submetido à maceração por 48 h em um Erlenmeyer com 4 L de álcool 70%. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo e o processo de maceração foi repetido por mais cinco vezes com intervalos de 24 horas, utilizando-se 3 L de álcool 70%.

3.2 Partição do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii*

O extrato hidroalcoólico liofilizado de *C. langsdorffii* foi triturado com auxílio de gral e pistilo e 50 g foram solubilizados em 500 mL de água : metanol (4 : 6, v/v). Inicialmente, particionou-se o extrato hidroalcoólico com hexano (500 mL) e este processo foi repetido por três vezes. A solução hidrometanólica foi concentrada em rotaevaporadosr a vácuo para eliminação do metanol e a fração aquosa remanescente foi particionada com diclorometano (500 mL) e acetato de etila (500 mL), por quatro vezes, respectivamente. Em seguida, particionou-se com *n*-butanol (500 mL) por três vezes (Figura 4).

Figura 4. Perfil esquemático da partição realizada com o extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* com solventes de polaridade crescente.

3.3 Análise Cromatográfica

3.3.1 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada em todas as técnicas de isolamento para verificar o perfil das frações e, posteriormente, reuni-las. Dessa maneira, foram utilizadas cromatoplasas de sílica gel 60 F 254 (Whatman), que foram eluídas com a fase móvel água : ácido fórmico: ácido acético: acetato de etila (27: 11: 11: 100, v/v/v/v) (WAGNER & BLADT, 1996). As cromatoplasas após eluídas foram observadas na luz ultravioleta (UV) nos comprimentos longo (365 nm) e curto (254 nm) e depois foram reveladas com solução etanólica de difenilboriloxietilamina (NP) 1% (p/v) ou anisaldeído.

3.3.2 Perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD

Os perfis cromatográficos do extrato e frações foram obtidos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta com arranjos de diodos (CLAE-UV-DAD). O equipamento Shimadzu utilizado é composto de controlador SLC-10 Avp, detector SPD-M10 Avp, 3 bombas LC-10 Avp, auto-injetor SIL-10 Avp e degaseificador DGU-14 A. O software ClassVP versão 5.02 foi utilizado no processamento dos dados cromatográficos.

Para as análises realizadas por CLAE-UV-DAD utilizou-se um sistema binário composto por solventes A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e outros 5 min. em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min. O sinal cromatográfico foi monitorado de 190 a 800 nm e os cromatogramas foram obtidos em 257 nm e 360 nm para os flavonóides e 280 nm para os derivados galoilquínicos. A coluna analítica utilizada foi de fase reversa Synergi Polar-RP (150 x 4,60 mm, 4 µm) (Phenomenex) e a pré-coluna apresentava o mesmo preenchimento da coluna. Dessa maneira, as amostras foram solubilizadas em água : metanol (1 : 1, v/v) numa concentração final de 1 mg/mL e filtradas em filtro de 0,45 µm. Dessa solução foram injetadas 20 µL no cromatógrafo.

3.4 Fracionamento por Cromatografia Contra Corrente de Alta Velocidade

No fracionamento das frações em acetato de etila e aquosa empregou-se a técnica previamente padronizada em nosso laboratório, utilizando cromatografia contra corrente de alta velocidade (HSCCC) (NOGUEIRA; FURTADO & BASTOS, 2015). O modelo de equipamento utilizado foi o Quatro CCCTM MK 5 & MK 6 (AECS-QuickPrepTM Ltd.) que é equipado com duas bobinas, sendo que cada uma contém duas colunas PTFE com volumes e

diâmetro internos (d.i.) distintos. Durante o fracionamento foram utilizadas as colunas C (volume: 102 mL e d.i. 2,0 mm) e D (volume: 105 mL e d.i. 2,0 mm), que foram conectas entre si no sentido cauda-cabeça-cauda-cabeça e referem-se ao modo normal de eluição, ou seja, utilizou-se fase orgânica como fase móvel. A velocidade de rotação do aparelho foi de 850 rpm e a temperatura foi ajustada para 35°C.

Antes de ligar o HSCCC as colunas C e D foram preenchidas com a fase estacionária. Assim, como o volume total das colunas é de 208 mL, foram bombeados cerca de 250 mL de fase estacionária para garantir o preenchimento das mesmas. Após esta etapa, o HSCCC foi ligado e ao atingir a velocidade de 850 rpm, a fase móvel começou a ser injetada numa vazão de 2,0 mL/min. Aguardou-se cerca de 1 h para que ocorresse a estabilização entre as fases móvel e estacionária no interior da coluna e, com o auxílio de uma proveta, verificou-se o volume de retenção de fase estacionária. Assim que as fases móvel e estacionária apresentaram-se estáveis no interior da coluna, a amostra foi injetada no equipamento e iniciou-se a coleta de frações com volumes de 10 mL.

3.4.1 Fracionamento da fração em acetato de etila por HSCCC

No fracionamento da fração em acetato de etila, as fases móvel e estacionária foram preparadas no dia anterior ao da eluição cromatográfica para favorecer a saturação dos solventes. Dessa maneira, hexano : *n*-butanol : metanol : água acidificada (5% de ácido fórmico) na proporção 1 : 1 : 0,4 : 1 (v/v/v/v) foram misturados em um funil de separação para um volume final de 1360 mL. No dia seguinte, as fases foram separadas, sendo a fase aquosa utilizada como fase estacionária e a fase orgânica como fase móvel.

Dois gramas da fração em acetato de etila foram pesados e solubilizados na proporção 1 : 1 (v/v) de fase móvel e fase estacionária para um volume final máximo de 8 mL, devido ao tamanho do loop utilizado no equipamento. A amostra solubilizada foi previamente filtrada com algodão antes de ser injetada no aparelho.

Após a coleta de 54 subfrações a rotação do equipamento foi desligada e iniciou-se a coleta do "*wash off*", que refere-se a amostra residual no interior das colunas. As frações foram reunidas de acordo com a similaridade apresentada por CCD, conforme descrito no item 3.3.1 e, posteriormente, foram purificadas em CLAE-preparativa.

3.5 Fracionamento da fração aquosa por Cromatografia de Filtração em Gel (*Sephadex*TM)

A fração aquosa além de ter sido fracionada por HSCCC, também foi fracionada por cromatografia de filtração em gel (*Sephadex*TM). Dessa forma, uma coluna com 4 cm d.i. x 70 cm foi empacotada com 300 g de gel de *Sephadex*TM LH 20 (25 - 100 μ) (Sigma-Aldrich®) em 100% de metanol. Em seguida foi estabilizada com a fase móvel inicial água : metanol (9 : 1) e o seguinte gradiente foi realizado:

Tabela 1. Gradiente da fase móvel utilizada para o fracionamento da fração aquosa em cromatografia de filtração em gel (*Sephadex*TM).

Proporção (H ₂ O : MeOH)	Volume (mL)
(9 : 1)	1000
(8 : 2)	400
(7 : 3)	250
(6 : 4)	600
(5 : 5)	640
(4 : 6)	400
(3 : 7)	400
(2 : 8)	300
MeOH	4410

Assim, 5,0 g de fração aquosa foram solubilizados em água : metanol (12 : 5, v/v) e foram centrifugados por 10 min. à 5000 rpm (AvantiTM J-25 centrifuge, Beckman). O sobrenadante foi filtrado em algodão e o precipitado foi seco e pesado para se calcular a quantidade real de amostra que havia sido adicionada na coluna. Com auxílio de uma pipeta *Pasteur* a amostra foi lentamente adicionada na coluna e, em seguida, deu-se início o gradiente água : metanol (Tabela 1).

Um total de 420 frações, com 20 mL cada, foram coletadas e reunidas de acordo com a similaridade apresentada por CCD, conforme item 3.3.1. Em seguida, essas subfrações foram evaporados em *SpeedVac* (Thermo Savant) e reanalisadas por CLAE-UV-DAD, conforme item 3.3.2. As subfrações que se apresentaram com perfil cromatográfico mais simplificado foram repurificadas em CLAE-preparativa.

3.6 Isolamento e purificação de compostos por CLAE-preparativa

Após verificar o perfil cromatográfico por CLAE-UV-DAD das amostras reunidas por CCD, as subfrações de interesse foram repurificadas em CLAE-preparativa. Dessa forma, utilizou-se o cromatógrafo preparativo modelo Proeminence (Shimadzu) com controlador CBM-20 A, detector UV/Visível SPD-20 A, 2 bombas LC-6 AD, coletor automático FCR-10

A e degaseificador DGU-20 A5. O software *LC-Solution Single* foi utilizado no processamento dos dados cromatográficos.

As amostras coletadas contendo as substâncias isoladas foram evaporadas em *SpeedVac* e foram novamente analisadas por CLAE-UV-DAD, como descrito no item 3.3.2. As estruturas químicas das substâncias isoladas foram confirmadas após análises por ressonância magnética nuclear (RMN).

3.6.1 Purificação de componentes das subfrações obtidas da fração em acetato de etila por HSCCC

A purificação das subfrações obtidas da fração em acetato de etila foi realizada em coluna C₁₈ PREP-ODS (H) (20 mm x 25 cm; Shimadzu). Cerca de 80 mg dessas subfrações foram solubilizadas em 500 µL de metanol : água na proporção 1 : 1 (v/v). Estas amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm e, em seguida, injetadas no cromatógrafo. Os cromatogramas foram registrados em 257 e 365 nm. A fase móvel utilizada foi A: água e B: metanol num gradiente de polaridade de 30 - 60% de B em 17 min., manutenção em 60% até 27 min., 60 - 30% em 28 min. e mais 2 min. em 30% de B, vazão de 9 mL/min.

3.6.2 Purificação de componentes das subfrações obtidas da fração aquosa por HSCCC e Sephadex

As subfrações de interesse obtidas por HSCCC e *Sephadex* foram repurificadas em CLAE-preparativa utilizando-se respectivamente coluna preparativa C₁₈ PREP-ODS (H) (20 mm x 25 cm; Shimadzu) e Synergi Polar-RP (250 x 10 mm, 4 µm) acoplada a pré-coluna semi-preparativa Polar-RP (10 x 10 mm, 4 µm). As amostras foram solubilizadas em até 500 µL da fase móvel inicial e foram filtradas em filtro de 0,45 µm. Os cromatogramas foram registrados em 257 e 280 nm. Os eluentes utilizados inicialmente foram A: água e B: metanol e, com o decorrer das análises verificou-se a necessidade de adicionar ácido fórmico (0,1%) ou ácido trifluoroacético (0,01%) na água para se obterem picos mais resolvidos e, conseqüentemente, compostos mais puros. O gradiente da fase móvel foi estabelecido individualmente para cada subfração de acordo com o perfil cromatográfico apresentado por CLAE-UV-DAD, numa vazão de 9 mL/min para a coluna preparativa e 3 mL/min para a coluna semi-preparativa.

3.7 Identificação estrutural das substâncias isoladas

Os flavonoides isolados da fração em acetato de etila foram identificados por RMN unidimensional de hidrogênio (^1H) e de carbono (^{13}C). Já os derivados galoilquínicos isolados a partir da fração aquosa foram elucidados por técnica de RMN unidimensional de ^1H e de ^{13}C e bidimensionais (HMBC, HMQC e COSY). O espectrômetro de massas utilizado foi Brucker–Avance DRX₅₀₀, operando em 400 MHz (RMN de ^1H e ^{13}C) para os flavonoides e em 500 MHz (RMN de ^1H e HMBC), 400 MHz (HSQC) e 125 MHz (RMN de ^{13}C e DEPT-135) para os derivados galoilquínicos. As amostras de flavonóides foram preparadas em tubos de RMN solubilizadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) Aldrich® e os derivados galoilquínicos foram solubilizados em metanol deuterado (CD₃OD).

3.8 Microdiálise *in vitro* de quercitrina e galoilquínico

Após estudos farmacodinâmicos, nosso grupo de pesquisa constatou o potencial do extrato de *C. langsdorffii* no tratamento e prevenção de pedras renais. Assim, surgiu a necessidade da realização dos estudos farmacocinéticos com o intuito de conhecermos o perfil dessas substâncias quanto à absorção, distribuição e eliminação no organismo. Para isso, a técnica de microdiálise foi empregada nesse trabalho, visando encontrar nos rins as porções não ligadas a proteínas das substâncias presentes no extrato.

Porém, antes de dar início aos estudos farmacocinéticos foi necessário o prévio desenvolvimento de um método analítico sensível o bastante para quantificar as baixas concentrações presentes no plasma e nos microdialisados.

3.8.1 Instrumentação e desenvolvimento de método analítico

Os instrumentos utilizados consistiam em um *Ultra Fast Liquid Chromatography* (UFLC) com bombas binárias e auto injetor (Shimadzu), acoplados a um quadrupolo Ab Sciex QTRAP 5500 (Ab Sciex) com ionização em *eletrospray* (ESI). A separação cromatográfica foi realizada em coluna que apresenta uma fase estacionária de éter ligado a fenil com recobrimento polar, Phenomenex Synergi Polar-RP (100 × 3,0 mm, 2,5 μm) e a pré-coluna apresentando o mesmo preenchimento da coluna. O gradiente de fase móvel consistia de água acidificada com 0,5% (v/v) de ácido fórmico no reservatório A e acetonitrila no reservatório B. A percentagem do reservatório B foi de 15% em 0 min., 40% em 2,0 min., 40% em 4,0 min., 15% em 4,1 min. e 15% em 6,0 min. A temperatura do auto injetor foi acondicionada a 4°C, a vazão da fase móvel foi ajustada para 0,4 μL/min e o volume das injeções foi de 10 μL por análise. Ambas as fases móveis foram filtradas com filtros de

membrana de nylon 0,22 μm (Millipore) e degaseificadas em ultrassom por 20 min. Com o intuito de preservar o detector da presença de sal na amostra, a fase móvel foi direcionada ao descarte nos intervalos de tempos 0 – 2,2 min. e 5,0 – 6,0 min.

3.8.2 Preparo de amostras

Quercitrina e o galoilquínico foram pesados separadamente para o preparo das soluções estoque, soluções de calibração e amostras de controle de qualidade. As soluções estoque foram preparadas na concentração de 0,1 mg/mL, sendo que quercitrina e o padrão interno ácido ferúlico (AF) foram solubilizados em metanol : salina (1:1) e o galoilquínico foi solubilizado apenas em salina. Uma série de diluições foi realizada a partir das soluções estoque a fim de se obterem concentrações no intervalo entre 3,5 – 100 ng/mL .

As respectivas concentrações dos controles de qualidade (CQ) foram: controle de qualidade baixo (CQB) 10,5 ng/mL , controle de qualidade médio (CQM) 40 ng/mL e controle de qualidade alto (CQA) 80 ng/mL .

O padrão interno AF, foi preparado numa concentração final de 60 ng/mL em acetonitrila : salina (6 : 4), a partir da solução mãe. Antes de serem analisadas as amostras foram misturadas com o padrão interno na proporção 2 : 1.

3.8.3 Validação de método analítico para análise de microdialisados

Os métodos analíticos foram validados em conformidade com as orientações do guia para métodos bioanalíticos, estabelecido pelo FDA (FDA, 2001). Os parâmetros avaliados foram especificidade, linearidade, limite inferior de quantificação, precisão (intra e inter-dia), exatidão e estabilidade.

Os padrões de calibração foram preparados diariamente e as curvas de linearidade foram obtidas traçando a relação entre a área da banda cromatográfica da substância (quercitrina ou galoilquínico) e do padrão interno (AF) contra as concentrações nominais (3,5, 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 ng/mL). Os resultados foram obtidos por análise de regressão linear, sem utilização de pesos.

O teste de especificidade foi realizado para avaliar a presença de picos contaminantes nos cromatogramas ao comparar as amostras de dialisados branco com as amostras de dialisados fortificados com as substâncias de interesse.

O estudo de precisão (intra e inter-dia) e exatidão foram estimadas por análise de seis repetições do limite inferior de quantificação (LIQ) 3,5 ng/mL e dos CQ's em diferentes concentrações: baixa, média e alta. Os resultados foram aceitos quando os coeficientes de

variação (CV) e exatidão (Equações 1 e 2) foram menores do que 20% para o LIQ e menores de que 15% para as amostras de CQ.

$$CV (\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}} \times 100 \right) \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Exatidão (\%)} = \left(\frac{C_{\text{Observada}}}{C_{\text{Nominal}}} \times 100 \right) \quad \text{Equação 2}$$

Em que, s refere-se ao desvio padrão e $\bar{x}$, a média dos valores obtidos.

Os estudos de estabilidade foram determinados utilizando as amostras de CQ em seis repetições de cada nível de concentração. Área das bandas cromatográficas de quercitrina, galoilquínico e padrão interno (AF) no tempo 0 h foram escolhidos como referência para determinar a estabilidade das amostras nos tempos subsequentes. Foram realizados testes de estabilidade de bancada à temperatura ambiente durante 24 h. Também foram avaliados três ciclos de congelamento-descongelamento, em que as amostras foram congeladas durante pelo menos 12 h a -80°C antes do ciclo seguinte. A estabilidade a longo prazo da quercitrina e do galoilquínico foi determinada após o congelamento das amostras a -80°C durante 30 dias. As amostras foram consideradas estáveis quando apresentaram precisão dentro da faixa de $\pm 15\%$ de desvio padrão em relação ao valor nominal.

3.8.4 Microdiálise

O sistema de microdiálise utilizado consistiu de uma bomba peristáltica Harvard modelo 22 (Harvard Apparatus). Seringas de 5 mL, com um diâmetro interno de 12,06 mm (Becton Dickinson) foram utilizadas para fornecer a solução de perfusão. A sonda de microdiálise empregada foi a CMA-20 (comprimento da membrana de 4 mm e diâmetro de poros de 20 kDa; Microdialysis AB), que é a sonda mais apropriada para ser utilizada em estudos de tecidos. Solução salina 0,9% p/v de NaCl foi preparada sempre imediatamente antes de sua utilização.

Inicialmente foi avaliada a influência da velocidade de perfusão sobre a recuperação relativa de quercitrina e galoilquínico nos fluxos 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para isso, o ensaio de retrodiálise (RD) foi realizado perfundindo pela sonda três concentrações diferentes: 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quercitrina e galoilquínico, preparadas separadamente em solução salina. Durante o ensaio de retrodiálise a sonda foi inserida num frasco contendo solução salina isenta de fármaco a 37°C . Considera-se importante salientar que a sonda foi deixada

equilibrando por 30 min. para cada concentração diferente testada, sendo que após esse período as amostras foram coletadas a cada 30 min. durante 1h30 min.

Após escolha do fluxo que apresentou melhor recuperação relativa dos compostos, foram realizados ensaios de diálise (D) em que a sonda passou a ser perfundida por solução salina e foi colocada em contato com as diferentes concentrações de quercitrina e galoilquínico.

Também foram realizados estudos das recuperações relativas de uma solução contendo a mistura de quercitrina e galoilquínico pelos testes de RD e D. Para tanto, as mesmas condições relatadas anteriormente foram utilizadas.

Os resultados foram calculados utilizando as Equações 3 e 4 para obtenção dos valores das recuperações relativas por retrodiálise (RR_{RD}) e diálise (RR_D), respectivamente. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

$$RR_{RD} (\%): \left(\frac{C_{perf} - C_{dial}}{C_{perf}} \times 100 \right) \quad \text{Equação 3}$$

Em que C_{perf} correspondem à concentração do fármaco na solução de perfusão e C_{dial} no dialisado (Figura 5).

$$RR_D (\%): \left(\frac{C_{dial}}{C_{ext}} \times 100 \right) \quad \text{Equação 4}$$

Em que C_{ext} corresponde à concentração de droga na parte externa da sonda de microdiálise (Figura 5).

Figura 5. Esquema representativo de um sistema de microdiálise *in vitro*.

3.9 Ligação a proteínas de quercitrina e galoilquínico

A ligação a proteínas de quercitrina e galoilquínico em plasma de rato foi determinada utilizando a técnica de ultrafiltração. Diferentes concentrações que variaram de 50 - 500 $\mu\text{g/mL}$ de quercitrina e 25 - 500 $\mu\text{g/mL}$ de galoilquínico foram preparadas em um pool de plasma de ratos Wistar (Heparina Na, lote 16063; Innovative Research). Em resumo, quercitrina e galoilquínico foram adicionados ao plasma em uma proporção de 1 : 9 (v/v), para um volume final de 1 mL. Em seguida, as amostras de plasmas foram agitadas em vórtex e incubadas a 37°C durante 30 min. Os plasmas foram inseridos na parte superior do dispositivo de ultrafiltração (Centrifree®, diâmetro dos poros de 30 kDa; Millipore Corp.), centrifugados a $1000 \times g$ durante 20 min. em temperatura ambiente. Ao ultrafiltrado foi adicionado o padrão interno (AF) e as análises foram realizadas por UFLC-MS/MS, como descrito na seção 3.8.1. Dessa maneira, a fração livre, ou seja, a porcentagem de substâncias que não se ligou as proteínas foi quantificada pela relação entre a concentração das soluções adicionadas ao plasma e a concentração das substâncias no ultrafiltrado.

Também foi igualmente determinado se quercitrina e galoilquínico apresentavam ligação ao dispositivo de ultrafiltração, em que as amostras foram solubilizadas em água ao invés de plasma. Todas as análises foram realizadas em duplicatas para cada concentração.

3.10 Estudos farmacocinéticos de quercitrina

3.10.1 Extração plasmática

O método de desproteïnização foi aplicado para extrair quercitrina e o padrão interno kaempferol-3-*O*-L- α -ramnopiranosídeo (afzelina) a partir de plasma de rato.

A fim de definir qual o método de desproteïnização seria o melhor, os seguintes procedimentos foram testados:

1º) Adicionou-se uma concentração conhecida de quercitrina em 200 μL de plasma de rato. A este plasma também foram adicionados 20 μL de vitamina C (100 mg/mL) e 20 μL de afzelina (padrão interno), sendo que tal mistura foi agitada por 30 segundos em vórtex. Para extração dos compostos foram adicionados 20 μL de ácido clorídrico (1 M), agitando vigorosamente durante outros 30 segundos. Em seguida, este plasma foi incubado a 80°C durante 30 min. e extraído sob agitação com 1 mL de acetato de etila (SUN *et al.*, 2014).

2º) O mesmo procedimento foi realizado como descrito no 1º procedimento. No entanto, o plasma não foi incubado a 80°C durante 30 min.

3º) Adicionou-se uma concentração conhecida de quercitrina em 200 µL de plasma de rato e realizou-se extração líquido-líquido (ELL) utilizando como solvente orgânico 1 mL de acetato de etila.

4º) Adicionou-se uma concentração conhecida de quercitrina em 200 µL de plasma de rato e realizou-se desproteïnização utilizando como solvente orgânico 1 mL de acetonitrila.

5º) Adicionou-se uma concentração conhecida de quercitrina em 200 µL de plasma de rato e realizou-se desproteïnização utilizando como solvente orgânico 1 mL de metanol.

Ao final de todos os procedimentos as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. e o sobrenadante foi coletado e seco em evaporador à vácuo a 37°C. Os resíduos foram reconstituídos em fase móvel e injetados em UFLC-MS/MS, de acordo com a seção 3.8.1.

3.10.2 Modelo experimental *in vivo*

Grupos de cinco ratos Wistar (pesando entre 295 – 310 g foram comprados dos Laboratórios Harlan). Estes animais receberam intravenosamente uma dose de 1 mg/kg de quercitrina. As concentrações plasmáticas e concentrações renais livres foram quantificadas por 2 h.

Antes de iniciar qualquer estudo em animais, um protocolo foi enviado e aprovado pelo comitê de ética *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) da Universidade da Flórida (Protocolo número 201408355, Anexo 1).

A fim de se conhecer a faixa de concentração que o método em plasma deveria ser validado, um estudo piloto foi realizado. Os animais foram mantidos em caixas ventiladas no biotério da Universidade da Flórida e mantidos de acordo com os procedimentos padrões institucionais. Como os testes *in vivo* se tratavam de experimentos terminais, todos os animais foram eutanasiados ao final dos estudos.

Nos dias de experimento os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano 4% por 5 min. em uma câmara de indução. A anestesia dos animais foi mantida durante todo o experimento com cerca de 2% de isoflurano, utilizando um dispositivo acoplado ao nariz. Os animais foram imobilizados em posição supina e a anestesia foi confirmada pela ausência de reflexos nas patas e nos olhos. A temperatura corporal do animal foi mantida a 36 - 37°C com o auxílio de uma manta aquecedora.

3.10.3 Validação de método analítico em plasma

Após escolha do melhor método extrativo da quercitrina em plasma e da realização do estudo piloto, o método analítico em plasma foi validado. As mesmas condições cromatográficas desenvolvidas para o método de análises *in vitro* (item 3.8.1.) foram utilizadas para as análises em plasma. Devido à mudança de matriz de salina para plasma alguns testes foram revalidados, como especificidade, precisão (intra-dia e inter-dia) e exatidão, sendo que os dois últimos testes foram estimados após análises de seis replicatas do LIQ e amostras de CQ's em diferentes concentrações: CQB 15 $\mu\text{g/mL}$, CQM 40 $\mu\text{g/mL}$ e CQA 80 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados foram aceitos quando o CV e a exatidão (Equações 1 e 2) foram menores que 20% para o LIQ e 15% para os CQ's.

3.10.4 Microdiálise renal

A mesma sonda de microdiálise CMA20 utilizada no ensaio *in vitro* foi também utilizada *in vivo*, pois é a sonda apropriada para ser utilizada nos estudos de microdialisados em tecidos. Em um primeiro momento, após o animal não apresentar reflexos de dor, a barriga do mesmo foi raspada 1 - 1,5 cm abaixo da costela direita. Esta região foi desinfetada com etanol 70% e a pele foi removida cirurgicamente (Figura 6a). O rim foi exposto (Figura 6b e 6c) e a sonda foi inserida no córtex renal com a ajuda de uma seringa calibre 21G (Figura 6d e 6e). Uma fita cirúrgica foi usada a fim de manter a sonda na posição correta durante todo o experimento (Figura 6f).

Figuras 6a - 6f. Sequência de fotografias com os principais passos para o procedimento cirúrgico de implantação da sonda CMA20 em rins de ratos Wistar.

3.10.5 Calibração da sonda *in vivo*

Para realização do estudo de calibração da sonda *in vivo*, inicialmente ligou-se um dos tubos da sonda à bomba peristáltica e a membrana no córtex renal do animal. A estabilização da sonda foi realizada por 1 h ao infundir quercitrina numa concentração de $50 \text{ } \mu\text{g/mL}$, num fluxo de $1 \text{ } \mu\text{L/min}$. Após equilíbrio, a recuperação da sonda foi determinada por RD, perfundindo a mesma concentração de quercitrina ($50 \text{ } \mu\text{g/mL}$) num mesmo fluxo ($1 \text{ } \mu\text{L/min}$), sendo que foram coletadas três amostras a cada 30 min., totalizando 1h30 min. de experimento. O processo de RD foi seguido por 1 h de limpeza da sonda com solução salina para garantir ausência de quercitrina na sonda e nos rim antes de iniciar o experimento de dosagem do dialisado. A fim de comprovar a ausência de quercitrina no rim, uma amostra foi coletada como linha de base durante os 30 min. finais de limpeza da sonda (*washout*).

3.10.6 Coleta de amostras de microdialisados

Após a administração intravenosa de quercitrina (1 mg/kg) no animal, as amostras de dialisados foram coletadas a cada 30 min. durante 3 h. As amostras de microdialisados foram mantidas em freezer -80 °C até o momento de análise e foram analisadas conforme o método descrito na seção 3.8.1.

3.10.7 Coleta de amostras de sangue

Para coleta de sangue a artéria carótida foi canulada. Dessa maneira, a região cervical ventral do animal foi raspada e a pele foi desinfetada com etanol 70%. Uma incisão na pele foi feita na altura dos músculos omo-hióideo e esterno hióideo (Figura 7a). O músculo esterno hióideo foi separado por dissecação a fim de se localizar a artéria carótida. Com o apoio de uma pinça, a artéria carótida foi isolada, sendo que duas linhas cirúrgicas de sutura foram passadas por debaixo da mesma. Em referência ao coração, a linha mais distal foi amarrada firmemente para ocluir o sangue que flui na região da cabeça. Um grampo microvascular foi colocado na artéria para parar o fluxo sanguíneo a partir do coração e um pequeno orifício foi feito na carótida entre as duas ligaduras, com o auxílio de uma agulha (Figura 7b). Um catéter ligado a uma seringa contendo salina heparinizada a 2% foi inserido na artéria carótida. A linha proximal foi apertada em volta da artéria e do catéter para impedir o deslocamento de ambos. Em seguida, o grampo microvascular foi removido, confirmando o sucesso da canulação da artéria carótida (Figura 7c).

Amostras de sangue (200 µL) foram coletadas em tubos heparinizados nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 min. após a administração intravenosa de quercitrina 1 mg/kg na veia femural do rato. As amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min. e os plasmas foram mantidos em freezer -80°C até o momento de análise.

Figura 7a - 7c. Sequência de fotografias com os principais passos para o procedimento cirúrgico de canulação da artéria carótida.

3.11 Estudos farmacocinéticos do galoilquínico

Em experimentos realizados na Universidade da Flórida nos Estados Unidos verificou-se que o composto galoilquínico apresentava ligação à sonda de microdiálise. Com o intuito de buscar solução para esse problema e dar continuidade aos estudos farmacocinéticos no Brasil, foi estabelecida colaboração com a Prof. Dra. Bibiana Verlindo de Araujo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.11.1 Avaliação da ligação de galoilquínico a sonda de microdiálise

Uma sonda modelo CMA20 (Microdialysis AB) constitui-se de 200 mm de tubulação azul (volume interno 1,4 μ L) e 200 mm de tubulação transparente (volume interno 0,3 μ L) conectados a uma membrana de PAES (poli aril éter sulfona) de 4 mm e com poros de 20 KDa (Figura 8).

Figura 8. Ilustração da sonda de microdiálise modelo CMA20.

Como estratégia para calcular a quantidade de droga que se ligava à sonda, inicialmente foi testada a ligação do galoilquínico aos tubos. Para isso, com o auxílio de conectores próprios de sondas o tubo azul foi ligado diretamente ao transparente (Figura 9).

Figura 9. Ilustração do tubo azul e transparentes conectados.

Devido ao alto custo das sondas, foram utilizados três pares de tubos antigos em que as membranas já não eram funcionais. Soluções com diferentes concentrações de galoilquínico (25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$) juntamente com as soluções coletadas em eppendorf foram quantificadas por UFLC-MS/MS, conforme descrito a seguir no item 3.11.2. A diferença entre essas concentrações representariam a ligação do galoilquínico aos tubos (Figura 10).

Figura 10. Ilustração de uma bomba de microdiálise acoplada a tubo de sonda CMA20. Exemplificação dos experimentos realizados.

Como os resultados apresentaram-se muito inconstantes entre as diferentes concentrações testadas, foi necessário utilizar uma sonda nova para certificar-se que as variações encontradas não eram devido a sondas já usadas.

Uma vez que o tubo azul é constituído do mesmo material que o tubo transparente, a sonda foi cortada em apenas uma parte (Figura 11). Dessa maneira, foi possível testar a ligação do galoilquínico ao tubo transparente e a membrana.

Figura 11. Ilustração do experimento realizado para testar a ligação de galoilquínico à membrana e ao tubo de uma sonda de microdiálise modelo CMA20.

3.11.2 Instrumentação e desenvolvimento de método analítico

O aparelho utilizado consistiu em um UFLC (Shimadzu) de bomba binária e injetor automático, acoplado a um detector de massas API 5000 (Applied Biosystems). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Waters XTerra (2,1 mm x 100 mm, em 3,5 μ m), com uma pré-coluna contendo o mesmo material. O método analítico utilizado no modo gradiente consistia de 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água no reservatório A e 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila no reservatório B. A percentagem do reservatório B foi de 5% em 0 min., 5% em 4,0 min., 90% em 4,0 min., 90% em 8,0 min., 5% em 9,0 min. e 5% em 10 min. A vazão da fase móvel foi ajustada para 0,3 mL/min e o volume injeções foi de 10 μ L por análise. Ambas fases móveis foram filtradas previamente em membrana de nylon 0,22 μ m (Millipore) e degaseificadas por equipamento de ultrassom durante 20 min. As concentrações da curva de linearidade foram 1,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 μ g/mL.

3.11.3 Extração plasmática

Um método de ELL foi desenvolvido para extração do galoilquínico e do padrão interno (AF) do plasma de ratos. Com o objetivo de definir o melhor solvente extrator, os seguintes testes foram realizados:

Foram adicionados 10 µL de uma concentração conhecida de galoilquínico em 90 µL de plasma de rato, agitou-se por 10 segundos em vórtex. Em seguida, adicionaram-se 10 µL de padrão interno (AF) e agitou-se novamente. Por fim, 200 µL de metanol ou acetonitrila foram utilizados como solventes extratores, seguidos de agitação em vórtex por 5 min. e centrifugação por 15 min. a 12000 rpm.

Em busca de se verificar a melhor maneira para uma boa ionização do galoilquínico, os sobrenadantes das amostras centrifugadas foram injetados da seguinte maneira:

- Injetado diretamente;
- Diluído com água contendo 0,1% de ácido fórmico nas proporções 1 : 1 e 1 : 5.

3.11.4 Validação de método analítico em plasma

O método analítico em plasma foi validado utilizando as mesmas condições cromatográficas desenvolvidas para o método de análises de galoilquínico *in vitro* (item 3.11.2). Devido à mudança de matriz de salina para plasma alguns testes foram revalidados, como especificidade, precisão (intra-dia e inter-dia) e exatidão, sendo que os dois últimos testes foram estimados após análises de seis replicatas do LIQ e amostras de CQ's em diferentes concentrações: CQB 4,5 µg/mL, CQM 150 µg/mL e CQA 350 µg/mL. Os resultados foram aceitos quando o CV e a exatidão (Equações 1 e 2) foram menores que 20% para o LIQ e 15% para os CQ's.

3.11.5 Modelo experimental *in vivo*

Novo projeto de comitê de ética foi escrito e aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Projeto número 29547, Anexo 2). Grupos de cinco ratos Wistar (250 – 300 g) foram comprados do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Estes animais receberam por via intravenosa doses de 1 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2 mg/kg de galoilquínico. As concentrações plasmáticas foram quantificadas até 3 h.

A fim de se conhecer a faixa de concentração que o método em plasma deveria ser validado, um estudo piloto foi realizado. Os animais foram mantidos em caixas ventiladas no biotério da UFRGS de acordo com os procedimentos padrões institucionais. Como os testes *in*

vivo se tratavam de experimentos terminais, todos os animais foram eutanasiados ao final dos estudos.

Nos dias de experimento, os animais foram inicialmente anestesiados com carbamato de etila 1,25 g/kg por via intraperitoneal. Os animais foram imobilizados em posição supina e a anestesia foi confirmada pela ausência de reflexos nas patas e nos olhos. A temperatura corporal do animal foi mantida a 36 - 37°C com o auxílio de uma manta aquecedora.

A coleta de amostras de sangue foi realizada pela artéria carótida, conforme descrito no item 3.10.7. Amostras de sangue (200 µL) foram coletadas em tubos heparinizados nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min. após a administração intravenosa de galoilquínico na veia femural do rato. As amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min. e os plasmas foram mantidos em freezer -80°C até o momento de análise.

3.12 Distribuição tecidual de quercitrina e galoilquínico

A distribuição tecidual de quercitrina e do galoilquínico foi determinada após dose única de 1 mg/kg, administrada por via intravenosa em ratos Wistar. Subsequentemente a administração, os animais foram eutanasiados por decapitação nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 min. para quercitrina e 5, 15, 45, 60, 90, 120 e 180 min. para o galoilquínico ($N=3$ animais/ tempo). Os seguintes tecidos foram coletados: rins, cérebro, fígado, pulmão, coração, baço e porções de gordura perirenal. Tais tecidos após removidos foram colocados sob uma gaze para remoção do sangue superficial. Amostras de sangue também foram coletadas no momento da decaptação e o plasma foi separado por centrifugação. Tanto os tecidos quanto os plasmas foram imediatamente armazenados em freezer -80°C até o momento de análise.

Para quantificação do galoilquínico e quercitrina, homogenatos de tecido foram preparados pesando-se 1 g de tecido para cada 2,5 mL de salina. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por dois minutos utilizando Ultraturrax (Marconi). Os homogenatos foram então transferidos para eppendorf e o galoilquínico e a quercitrina foram extraídos e quantificados conforme descrito nas seções 3.11.3 e 3.11.2, respectivamente.

Curvas de calibração foram preparadas utilizando o respectivo tecido obtido a partir de animais não tratados. A análise de tecido branco também foi realizada para assegurar a ausência de qualquer composto contaminante. As quantidades de galoilquínico e quercitrina no tecido foram expressas em termos de µg/g de tecido.

3.13 Estudos farmacocinéticos do extrato bruto de *C. langsdorffii* e da fração butanólica.

Após conhecer o perfil farmacocinético dos compostos quercitrina e galoilquínico por via intravenosa, foram realizados testes piloto em ratos Wistar ($N=4$) para se conhecer o perfil desses compostos por via oral. Inicialmente foi testado a dose 20 mg/kg de extrato e de fração butanólica, solubilizados em 5% de DMSO em água. A técnica de gavagem foi empregada para administração da solução por via oral e as coletas de sangue foram feitas pelas veias laterais caudal. Quercitrina também foi administrada por via oral nas doses 10 mg/kg e 50 mg/kg ($N=4$ para cada dose), solubilizada em 5% de DMSO em água.

Amostras de sangue (200 μ L) foram coletadas em tubos heparinizados nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 300 min. após a administração das doses por via oral. As amostras de sangue foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min. e os plasma foram mantidos em freezer -80°C até o momento de análise.

Os plasmas foram extraídos e quantificados como descrito nas seções 3.11.3 e 3.11.2, respectivamente.

3.14 Modelagem dos dados farmacocinéticos

As análises dos perfis individuais de quercitrina e do galoilquínico foram analisadas pelo método não compartimental utilizando o software Excel[®] (Microsoft[®]) e Phoenix v.64 (Pharsight). Já as análises compartimentais foram feitas pelo software *Scientist*[®] v. 2.01 (MicroMath[®]), a fim de se obter uma estimativa dos parâmetros farmacocinéticos.

3.14.1 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos não compartimentais

Os parâmetros farmacocinéticos estimados por análises não compartimentais foram determinados usando as equações descritas a seguir (BENET & WILLIAMS, 1990).

A constante de velocidade de eliminação (λ) foi determinada pela inclinação da fase terminal da curva log-linear dos perfis de concentração por tempo, empregando-se os últimos três pontos dos perfis. A partir da λ , foi calculada a meia-vida plasmática ($t_{1/2}$) de acordo com a Equação 5:

$$t_{1/2} = \left(\frac{0,693}{\lambda} \right) \quad \text{Equação 5}$$

A área sob a curva do tempo zero ao tempo t (ASC_{0-t}) foi calculada pelo método trapezoidal, em que t foi o último tempo de coleta (Equação 6). Já a área sob a curva dos

tempos zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$) foi obtida somando-se ASC_{0-t} e área sob a curva extrapolada (ASC_{ext}), que por sua vez foi determinada conforme a Equação 7.

Equação 6

$$ASC_{(0-t)} = \left(\frac{(C_0 + C_1)}{2} \right) \times (t_1 - t_0) + \left(\frac{(C_1 + C_2)}{2} \right) \times (t_2 - t_1) + \dots + \left(\frac{(C_{t-1} + C_t)}{2} \right) \times (t_t - t_{t-1})$$

$$ASC_{ext} = \left(\frac{C_t}{\lambda} \right) \quad \text{Equação 7}$$

Em que C_t representa a última concentração medida.

Igualmente, a área sob a curva no primeiro momento do tempo zero ao infinito ($ASMC_{0-\infty}$) foi calculada pelo método trapezoidal, adicionando-se $ASMC_{0-t}$ e $ASMC_{ext}$, (Equações 8 e 9).

Equação 8

$$ASMC_{(0-t)} = \left(\frac{(C_0 \times t_0) + (C_1 \times t_1)}{2} \right) \times (t_1 - t_0) + \dots + \left(\frac{(C_{t-1} \times t_{t-1}) + (C_t \times t)}{2} \right) \times (t_t - t_{t-1})$$

$$ASMC_{ext} = \left(\frac{C_t \times t}{\lambda} \right) + \left(\frac{C_t}{\lambda^2} \right) \quad \text{Equação 9}$$

O tempo de residência médio (TRM) foi calculado a partir da razão entre $ASMC_{0-\infty}$ e $ASC_{0-\infty}$ (Equação 10).

$$TRM_{i.v.} = \left(\frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \right) \quad \text{Equação 10}$$

A depuração (CL) foi determinada pelo quociente entre dose e $ASC_{0-\infty}$, para substâncias com administração intravenosa (Equação 11).

$$CL_{i.v.} = \left(\frac{Dose}{ASC_{0-\infty}} \right) \quad \text{Equação 11}$$

O volume de distribuição no estado de equilíbrio (V_{dss}) foi estimado pelo produto entre TRM e CL, para substâncias com administração intravenosa (Equação 12).

$$V_{dss} = (TRM \times CL) \quad \text{Equação 12}$$

3.14.2 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos compartimentais

Nas análises dos parâmetros farmacocinéticos compartimentais realizadas pelo software *Scientist*[®], modelos de um, dois e três compartimentos, com ou sem esquema de pesos, foram avaliados com os dados farmacocinéticos de quercitrina e galoilquínico obtidos experimentalmente. O modelo que melhor se ajustou aos dados foi escolhido com base na distribuição aleatória dos resíduos, no coeficiente de correlação e pelo critério de seleção de modelo (MSC), bem como pela inspeção visual dos gráficos gerados pelos modelos e pelos valores dos parâmetros farmacocinéticos determinados.

O perfil plasmático individual de quercitrina, após administração intravenosa, foi mais bem descrito pelo modelo de dois compartimentos (Equação 13). As equações foram descritas de acordo com Gibaldi & Perrier (1989).

$$C = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad \text{Equação 13}$$

Em que C representa a concentração plasmática total no tempo t, A e B são os interceptos das fases de distribuição e eliminação no tempo zero, α e β são as macroconstantes das fases de distribuição e eliminação, respectivamente.

A $ASC_{0-\infty}$ foi calculada utilizando a Equação 14:

$$ASC_{0-\infty} = \left(\frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta} \right) \quad \text{Equação 14}$$

O volume de distribuição no compartimento central (V_c) e V_{dss} de acordo com as Equações 15 e 16.

$$V_c = \left(\frac{Dose}{A + B} \right) \quad \text{Equação 15}$$

$$V_{dss} = \frac{(A \cdot \beta^2 + B \cdot \alpha^2)}{(A \cdot \beta + B \cdot \alpha)^2} \cdot Dose \quad \text{Equação 16}$$

As microconstantes k_{21} , k_{10} e k_{12} estão expostas na Figura 12 no modelo mamilário de dois compartimentos e foram calculadas pelas Equações 17, 18 e 19, respectivamente.

Figura 12. Modelo mamilário de dois compartimentos, em que k_{10} é a microconstante de eliminação do compartimento central; k_{12} é a microconstante de distribuição do compartimento central (1) para o periférico (2); k_{21} é a microconstante de distribuição do compartimento periférico (2) para o central (1).

$$k_{21} = \frac{(A \cdot \beta + B \cdot \alpha)}{(A + B)} \quad \text{Equação 17}$$

$$k_{10} = \frac{(\alpha \cdot \beta)}{(k_{21})} \quad \text{Equação 18}$$

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10} \quad \text{Equação 19}$$

A $t_{1/2}$ e CL foram calculados pelas Equações 20 e 21, respectivamente.

$$t_{1/2} = \left(\frac{0,693}{\lambda} \right), \text{ sendo que } \lambda = \left(\frac{k_{10} \cdot k_{21}}{(k_{21} + k_{12})} \right) \quad \text{Equação 20}$$

$$CL = \lambda \cdot V_{dss} \quad \text{Equação 21}$$

3.14.3 Determinação da fração livre no tecido renal

Para se calcular a penetrabilidade dos compostos no rim, a seguinte razão foi estabelecida (Equação 22). $ASC_{0-t \text{ tecido}} / fu \cdot ASC_{0-\infty \text{ plasma}}$.

$$F_t = \frac{ASC_{0-t(tecido)}}{fu \cdot ASC_{0-\infty(plasma)}} \quad \text{Equação 22}$$

Em que fu representa a fração não ligada a proteínas plasmáticas.

3.14.4 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos compartimentais com eliminação por Michaelis-Menten

Por se tratar de um composto inédito, não havia na literatura informações sobre a cinética do galoilquínico. Dessa maneira, tal composto foi avaliado por via intravenosa em três concentrações.

Com os valores obtidos, diversos modelos compartimentais foram testados, sendo que o que melhor se ajustou aos dados foi escolhido com base na distribuição aleatória dos resíduos, no coeficiente de correlação e pelo critério de seleção de modelo (MSC), bem como pela inspeção visual dos gráficos gerados pelos modelos e pelos valores dos parâmetros farmacocinéticos determinados. Assim, determinou-se que o perfil plasmático individual do galoilquínico foi mais bem descrito pelo modelo de dois compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten (Figura 13). As equações diferenciais utilizadas foram descritas de acordo com Fujimiya, Yamaoka & Fukui (1989) (Equações 23 e 24).

Figura 13. Modelo mamilário de dois compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten, em que V_m é a velocidade máxima de eliminação; K_m é a constante de Michaelis-Menten; V_1 e V_2 são os volumes de distribuição aparentes nos compartimentos C_1 e C_2 , respectivamente; k_{12} e k_{21} são microconstante de distribuição para fora e dentro do compartimento central (C_1), respectivamente.

$$\frac{dC_1}{dt} = -(k_{12} + \left[\frac{Vm}{(Km + C_1)} \right])C_1 + \frac{(k_{21} \cdot V_2)C_2}{V_1} \quad \text{Equação 23}$$

$$\text{Equação 24}$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{(K_{12} \cdot V_1)C_1}{V_2} - k_{21}C_2$$

Em que, C_1 e C_2 são as concentrações nos compartimentos 1 e 2, respectivamente; V_m é a velocidade máxima de eliminação; K_m é a constante de Michaelis-Menten; V_1 e V_2 são os volumes de distribuição aparentes nos compartimentos C_1 e C_2 , respectivamente; k_{12} e k_{21} são microconstante de distribuição para fora e dentro do compartimento central (C_1), respectivamente.

3.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5 (GraphPad software), sendo que o teste t foi utilizado para comparar os parâmetros farmacocinéticos não compartimentais dos compartimentais. Quando foi necessário fazer a comparação de vários grupos, realizou-se análise de variância com um fator (ANOVA) seguido de teste posterior de Tukey. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor que 0,05 e, conseqüentemente, o nível de confiança de 95%.

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento e perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* e frações

Partindo de 1 kg de folhas de *C. langsdorffii*, foram obtidos 340,04 g de extrato hidroalcoólico, correspondendo ao rendimento de 34,04%.

A partir de 50 g do extrato hidroalcoólico realizou-se a partição com solventes de polaridade crescente e as frações resultantes apresentaram os seguintes rendimentos (Figura 14):

Figura 14. Perfil esquemático da partição realizada com o extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* com solventes de polaridade crescente e seus respectivos rendimentos.

O extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* apresenta perfil metabólico bastante complexo e, uma vez que buscavam-se compostos das classes dos flavonoides e dos derivados galoilquínicos, utilizou-se o equipamento CLAE-UV-DAD para verificar quais frações eram as mais ricas nessas substâncias (Figura 15).

Extrato Bruto *C. langsdorffii* Desf. Fração em Diclorometano Fração em Hexano Fração em Acetato de Etila

Figura 15. Perfil cromatográfico em CLAE-UV-DAD do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* e suas frações em hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e água nos comprimentos de onda 257 nm, 280 nm e 360 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, vazão de 1 mL/min.

De acordo com o perfil UV, o composto majoritário do extrato hidroalcoólico absorve energia nos comprimentos de onda 257 nm e 360 nm, demonstrando ser da classe dos flavonoides. Esse mesmo composto foi verificado majoritariamente na fração em acetato de etila, sendo a mesma utilizada para o isolamento de compostos da classe dos flavonoides (NOGUEIRA; FURTADO & BASTOS, 2015).

Já os derivados galoilquínicos, que absorvem energia em um comprimento de onda máximo de 280 nm, mostraram-se majoritários nas frações *n*-butanólica e aquosa. Tais frações foram repurificadas por outros processos cromatográficos a fim de se obterem as substâncias isoladas (NOGUEIRA; FURTADO & BASTOS, 2015).

4.2 Fracionamento da fração em acetato de etila por HSCCC

Para que compostos se separem eficientemente por HSCCC, a técnica preconiza que não haja grande extrusão da fase estacionária durante a estabilização da coluna e após a aplicação da amostra, uma vez que o volume de fase estacionária retido durante a corrida cromatográfica está diretamente ligado à boa separação dos compostos (ITO, 2005; SHI, S. *et al.*, 2012). Nas três vezes em que se utilizou a técnica, o volume de fase estacionária retido foi de 69,8%, 67,1% e 67,1%, respectivamente. O ideal é ter uma retenção a cima de 50% (ITO, 2005).

A quantidade de amostra que ficou retida nas colunas do HSCCC foi medida pelo "wash off", coletado após o término da eluição cromatográfica. Nos três fracionamentos por HSCCC a quantidade de amostra retida foi em torno de 1,39 g, o que representam 69,5% da amostra inicialmente injetada (2,0 g).

Após a coleta de 54 subfrações com volumes de 10 mL, verificou-se por CCD o perfil cromatográfico das mesmas, as quais posteriormente foram reunidas de acordo com a semelhança apresentada, conforme demonstrado na Figura 16. O primeiro composto a ser eluído pelo método de HSCCC desenvolvido foi o canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina) e o composto seguinte foi quercitrina.

Figura 16. Perfil cromatográfico em CCD das subfrações obtidas por HSCCC da fração em acetato de etila. Fase móvel: água: ácido fórmico: ácido acético: acetato de etila (27: 11: 11: 100, v/v/v/v). Revelado com solução etanólica de NP a 1%.

As subfrações reunidas por CCD foram afzelina: 18 a 28 (91,6 mg), afzelina + quercitrina: 29 a 33 (91,5 mg) e quercitrina: 34 a 48 (206,3 mg). Tais subfrações foram purificadas por CLAE-preparativa em coluna C₁₈ PREP-ODS (H) (20 mm x 25 cm), obtendo-se 45,7 mg de afzelina e 118,4 mg de quercitrina (Figura 17).

Figura 17. Purificação das subfrações ricas em afzelina (A) e quercitrina (B) por CLAE-preparativa nos comprimentos de onda 257 nm e 365 nm. Coluna preparativa C₁₈ PREP-ODS (H) (20 mm x 25 cm). Fase móvel A: água e B: metanol num gradiente de 30 - 60% de B em 17 min., permanece em 60% até 27 min., 60 - 30% em 28 min. e mais 2 min. em 30% de B, vazão de 9 mL/min. Composto (1) quercitrina e (2) afzelina.

Após purificação o perfil cromatográfico em CLAE-UV-DAD foi registrado para os compostos afzelina e quercitrina no comprimento de onda 360 nm (Figura 18).

Figura 18. Perfil cromatográfico em CLAE-UV-DAD para os compostos isolados afzelina (A) e quercitrina (B) em 360 nm, com os seus respectivos perfis no ultravioleta. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 µm); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.

4.3 Fracionamento da fração aquosa por Cromatografia de Filtração em Gel (*Sephadex*TM)

Com a finalidade de isolar mais eficientemente os derivados galoilquínicos presentes na fração aquosa, realizou-se o fracionamento da mesma por coluna *Sephadex*. Dessa maneira, 5,0 g de fração aquosa foram solubilizados em água : metanol (12 : 5, v/v) e, após centrifugação o precipitado (0,797 g) foi descartado. Assim, 4,20 g foram filtrados e adicionados lentamente na coluna cromatográfica (Figura 19).

Figura 19. Etapas do processo de separação da fração aquosa no decorrer da mudança de gradiente da fase móvel.

Após coleta de 420 frações (20 mL), estas foram reunidas pela semelhança apresentada por CCD, conforme descrito no item 3.3.1. Dessas frações reunidas, foram obtidas 35 subfrações (Tabela 2) que foram evaporadas em *SpeedVac* e apresentaram rendimento de 98,2%.

Analisando a Tabela 2 observou-se que grande parcela da massa coletada da coluna *Sephadex* havia sido proveniente das subfrações iniciais (Sph 1 - 4) e, de acordo com as análises em CLAE-UV-DAD essas subfrações não apresentavam bandas cromatográficas absorvendo energia em 280 nm, ou seja, não se tratavam de derivados galoilquínicos (Figura 20). Porém, pelo odor adocicado e dificuldade que tais subfrações apresentavam para secar, pode-se inferir que eram açúcares.

Assim, constatou-se por análises em CLAE-UV-DAD que o fracionamento por coluna *Sephadex* foi muito mais eficiente do que o apresentado por HSCCC (Figuras 20 - 23). Subfrações mais simplificadas foram obtidas e puderam resultar no isolamento de compostos após purificação por CLAE-preparativa. Também foi observado que não havia necessidade de

se coletarem mais do que 175 subfrações, pois a partir dessa fração o perfil cromatográfico não apresentou substâncias de interesse e os rendimentos foram baixos. Dessa maneira, nos fracionamentos seguintes em coluna *Sephadex* uma menor quantidade de subfrações foram coletadas, otimizando o processo de isolamento.

Tabela 2. Fracionamento da fração aquosa por cromatografia de filtração em gel (*Sephadex*TM).

MeOH : H ₂ O	Sph (subfrações reunidas)	Peso (mg)	Rendimento (%)
(1 : 9)	Sph 1 (19-29)	165,8	3,9
	Sph 2 (30 e 31)	147,4	3,5
	Sph 3 (32-35)	602,3	14,3
	Sph 4 (36-40)	1.388,4	33,0
	Sph 5 (41-43)	149,4	3,6
(2 : 8)	Sph 6 (44-49)	183,1	4,4
	Sph 7 (50-53)	182,0	4,3
	Sph 8 (54-58)	74,6	1,8
(3 : 7)	Sph 9 (59-73)	112,6	2,7
	Sph 10 (74-82)	74,1	1,8
(4 : 6)	Sph 11 (83-93)	112,1	2,7
	Sph 12 (94-103)	141,0	3,4
	Sph 13 (104-123)	177,3	4,2
(5 : 5)	Sph 14 (124-127)	27,5	0,7
	Sph 15 (128-130)	16,6	0,4
	Sph 16 (131-135)	22,7	0,5
	Sph 17 (136-138)	10,7	0,3
	Sph 18 (139-145)	34,8	0,8
(6 : 4)	Sph 19 (146-152)	40,6	1,0
	Sph 20 (153-160)	66,5	1,6
	Sph 21 (161-169)	49,1	1,2
(7 : 3)	Sph 22 (170-174)	94,8	2,3
	Sph 23 (175-184)	42,8	1,0
(8 : 2)	Sph 24 (185-193)	36,5	0,9
	Sph 25 (194-200)	30,3	0,7
MeOH	Sph 26 (201-217)	23,4	0,6
	Sph 27 (218-228)	17,4	0,4
	Sph 28 (229-247)	16,8	0,4
	Sph 29 (248-289)	14,3	0,3
	Sph 30 (290-370)	32,0	0,8
	Sph 31 (371-380)	7,0	0,2
	Sph 32 (381-386)	2,0	0,05
	Sph 33 (387-391)	15,3	0,4
	Sph 34 (392-395)	10,8	0,3
	Sph 35 (396-420)	6,3	0,1

Figura 20. Perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD das subfrações (Sph 1 - 10) proveniente do fracionamento da fração aquosa por coluna *Sephadex*, no comprimento de onda 280 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.

Figura 21. Perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD das subfrações (Sph 11 - 20) proveniente do fracionamento da fração aquosa por coluna *Sephadex*, no comprimento de onda 280 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.

Figura 22. Perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD das subfrações (Sph 21 - 30) proveniente do fracionamento da fração aquosa por coluna *Sephadex*, no comprimento de onda 280 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.

Figura 23. Perfis cromatográficos em CLAE-UV-DAD das subfrações (Sph 31 - 35) proveniente do fracionamento da fração aquosa por coluna *Sephadex*, no comprimento de onda 280 nm. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.

4.3.1 Purificação das subfrações Sph 9 e 10

A partir das subfrações coletadas em coluna *Sephadex* foi possível realizar o isolamento de algumas substâncias com o auxílio da CLAE-preparativa. As subfrações inicialmente escolhidas foram Sph 9 e Sph 10, para as quais, com o auxílio da coluna semi-preparativa fenil Polar-RP (250 x 10 mm, 4 μ m) e com a fase móvel A: água e B: metanol num gradiente 15 - 27% de B em 15 min., 27 - 100% de B em 18 min., outros 4 min. em 100% de B e 100 - 15% de B em 23 min., numa vazão de 3 mL/min, foi possível isolar dois compostos (Figura 24).

Figura 24. Purificação da subfração **Sph 9** (A) e **Sph 10** (B) por CLAE-preparativa nos comprimentos de onda 257 nm e 280 nm. Fase estacionária: coluna Polar-RP (250 x 10 mm, 4 μ m). Fase móvel A: água e B: metanol num gradiente 15 - 27% de B em 15 min., 27 - 100% de B em 18 min., manutenção em 100% de B até 22 min. e 100 - 15% de B em 23 min., vazão de 3 mL/min. Composto (1) ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico e (2) ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico.

Os compostos isolados (1) (31,4 mg) e (2) (29,2 mg) provenientes das subfrações **Sph 9** e **Sph 10** foram analisados por CLAE-UV-DAD (Figura 25). Os perfis no UV desses compostos são compatíveis com os de derivados galoilquínicos e a confirmação foi realizada por análises de RMN.

Figura 25. Perfís cromatográficos em CLAE-UV-DAD dos compostos (1) e (2) provenientes das subfrações **Sph 9** e **Sph10**. Fase estacionária: coluna analítica Polar RP (150 x 4,60 mm, 4 μ m); Fase móvel A: água acidificada (0,01% de ácido trifluoroacético) e B: metanol, eluídos em modo gradiente na proporção de 15 - 50% de B em 45 min., 50 - 90% de B em 65 min., 90 - 15% de B em 70 min. e mais 5 min. estabilizando a coluna em 15% de B, numa vazão de 1 mL/min.

4.4 Determinação estrutural de compostos isolados

Com o auxílio das análises dos espectros de RMN unidimensionais (^1H e ^{13}C) e dos bidimensionais (HMBC, HSQC e COSY), dois compostos foram identificados (afzelina e quercitrina) e outros dois, provenientes das subfrações Sph 9 e Sph 10 (1 e 2), foram elucidados.

4.4.1 Quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (Quercitrina)

De acordo com as análises de espectros feitas por RMN a estrutura identificada trata-se da quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) (Figura 26). Os valores de deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios estão descritos na Tabela 3. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão nos Apêndices 1 e 2.

Os sinais com deslocamentos químicos δ 6,07 (d; 1,58 Hz; 1H) e δ 6,26 (d; 1,58 Hz; 1H) referem-se aos hidrogênios aromáticos H-6 e H-8 do anel A com substituições nas posições 5 e 7, geralmente apresentando uma constante de acoplamento pequena referente aos hidrogênios meta correlacionados. Já os sinais δ 6,73 (d; 8,31 Hz; 1H), δ 7,12 (dd; 1,91 e 8,31 Hz; 1H) e δ 7,16 (d; 1,91 Hz; 1H) são relativos aos hidrogênios orto e meta do anel B que juntamente com os sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C , confirmam a substituição em C-3' (δ 145,32) e C-4' (δ 148,56), característicos do flavonol quercetina (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

No espectro de RMN de ^{13}C (Apêndice 2) foram observados 21 sinais de carbono, sendo 15 atribuídos ao flavonol quercetina e os outros 6 da molécula de açúcar, que foram confirmados por RMN de ^1H . Outra comprovação da presença do açúcar na estrutura foi o deslocamento químico do C-2 passar de δ 146,9 para δ 156,57, pois a glicosilação do C-3 aumenta o deslocamento químico de C-2 em até 9 ppm (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

O deslocamento químico do carbono C-6'' δ 17,62 aliado aos dados da literatura (PURI *et al.*, 1994) permitiram determinar que o açúcar corresponde à ramnose. Em ramnosídeos, a configuração da ligação glicosídica é do tipo α e o açúcar ocorre na forma piranosídica.

Figura 26. Estrutura química da quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo.

Tabela 3. Dados dos espectros de RMN obtidos para a quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo em DMSO- d_6 .

Nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
Flavonol		
2	156,57	
3	134,29	
4	177,84	
5	161,40	
6	98,84	6,07 (d; 1,58 Hz; 1H)
7	164,40	
8	93,78	6,26 (d; 1,58 Hz; 1H)
9	157,05	
10	104,15	
1'	120,82	
2'	115,57	7,16 (d; 1,91 Hz; 1H)
3'	145,32	
4'	148,56	
5'	115,73	6,73 (d; 8,31 Hz; 1H)
6'	121,25	7,12 (dd; 1,91 e 8,31 Hz; 1H)
Açúcar (ramnose)		
1''	101,91	5,12 (s; 1H)
2''	70,43	3,84 (sl; 1H)
3''	70,72	3,07 (m; 1H)
4''	71,25	3,05 (m; 1H)
5''	70,16	3,03 (m; 1H)
6''	17,62	0,67 (d; 5,56 Hz; 3H)
OH (C-5)		12,52 (s, 1H)

4.4.2 Canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (Afzelina)

De acordo com as análises de espectros feitas por RMN a estrutura identificada trata-se da canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina) (Figura 27). Os valores de deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios estão descritos na Tabela 4. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão nos Apêndices 3 e 4.

Semelhantemente à quercitrina, pode-se observar a presença de sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ 6,08 (d; 2,0 Hz; 1H) e δ 6,28 (d; 2,0 Hz; 1H), indicando substituições em C-5 e C-7. Porém, diferentemente da quercitrina, a afzelina apresentou sinais em δ 6,78 (d; 8,8 Hz; 1H) e δ 7,62 (d; 8,8 Hz; 1H) no anel B. Esses sinais integram para dois hidrogênios e indicam substituição em C-4'. A hidroxilação na posição 4' exerce efeito mesomérico doador de elétrons na posição orto. Assim, atribuiu-se o sinal de deslocamento químico δ 6,78 aos hidrogênios simétricos das posições 3' e 5' do anel B, enquanto que o sinal de deslocamento químico δ 7,62 foi atribuído aos hidrogênios simétricos das posições 2' e 6'. Os sinais característicos de açúcar no espectro de RMN ^1H e a quantidade de carbonos detectada no espectro de RMN ^{13}C permitiram a identificação da porção de açúcar. O deslocamento químico acentuado em C-2 confirmou *O*-hidroxilação em C-3. O deslocamento químico do carbono C-6'' δ 17,58, juntamente com os dados da literatura (PURI *et al.*, 1994) permitiram determinar que o açúcar corresponde à ramnose.

Figura 27. Estrutura química do canferol-3-*O*-α-L-ranopiranosídeo.

Tabela 4. Dados dos espectros de RMN obtidos para o canferol-3-*O*-α-L-ranopiranosídeo em DMSO-*d*₆ e dados da literatura.

Nº C	δ ¹³ C	δ ¹ H
Flavonol		
2	156,62	
3	134,28	
4	177,82	
5	161,38	
6	98,86	6,08 (d; 2,0 Hz; 1H)
7	164,39	
8	93,89	6,28 (d; 2,0 Hz; 1H)
9	157,39	
10	104,22	
1'	120,61	
2'	130,75	7,62 (d; 8,8 Hz; 1H)
3'	115,52	6,78 (d; 8,8 Hz; 1H)
4'	160,11	
5'	115,52	6,78 (d; 8,8 Hz; 1H)
6'	130,75	7,62 (d; 8,8 Hz; 1H)
Açúcar (ramnose)		
1''	101,86	3,84 (sl; 1H)
2''	70,40	2,98 (m; 1H)
3''	70,76	2,96 (m; 1H)
4''	71,18	2,94 (m; 1H)
5''	70,18	3,0 (m; 1H)
6''	17,58	0,67 (d; 5,96 Hz; 3H)
OH (C-5)		12,49 (s, 1H)

4.4.3 Ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (composto 1)

De acordo com as análises feitas por RMN a estrutura proposta para composto (1), trata-se do ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (Figura 28), denominado de galoilquínico no presente trabalho e que foi o selecionado para realização de ensaios farmacocinéticos juntamente com a quercitrina. Os valores de deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios, bem como a correlação entre eles pelo HMBC estão descritos na Tabela 5. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC estão nos Apêndices 5 a 9, respectivamente. A presença de duas unidades galoil foi determinada pelos sinais dos carbonos com deslocamentos químicos entre 70,41 ppm e 76,74 ppm (Apêndice 6), bem como pelos sinais de hidrogênios meta correlacionados H-2' e H-6' δ 7,22 e 7,24 (d; 1,8 Hz; 1H) e, H-2'' e H-6'' δ 6,83 e 6,99 (d; 1,9 Hz; 1H) (Apêndice 5). Também foram observadas correlações no HMBC (Apêndice 9) entre esses hidrogênios meta correlacionados com os carbonos carbonílicos C-7' (δ 167,47) e C-7'' (δ 165,59), respectivamente. Além disso, tais carbonos carbonílicos também correlacionaram-se com os hidrogênios H-3 δ 5,77 (ddd; 3,0; 3,7; 7,4 Hz; 1 H_{eq}) e H-4 (δ 5,16; 3,0 e 8,9 Hz; 1 H_{ax}), indicando que as unidades de galato encontravam-se ligadas nas posições C-3 e C-4, respectivamente do ácido quínico. Outra correlação importante feita com o auxílio do HMBC foi entre os hidrogênios metílicos de H-8' δ 3,83 (s; 3 H) e H-8'' δ 3,56 (s; 3 H) com os carbonos C-5' (δ 146,27) e C-5'' (δ 146,15) respectivamente, indicando metoxilação nessas posições.

A presença de dois carbonos metilênicos, C-2 (δ 37,16) e C-6 (δ 42,01), três carbonos metínicos próximos a oxigênio, C-3 (δ 70,41), C-4 (δ 76,74) e C-5 (δ 66,08), observados nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (Apêndices 6 e 7), e um carbono quaternário, C-1 (δ 75,27) observado no espectro de ^{13}C , juntamente com a presença do carbono carboxílico em campo baixo, C-7 (δ 178,24), sugeriram a estrutura do ácido quínico. Esta foi confirmada a partir das correlações obtidas por HSQC e HMBC (Apêndices 8 e 9). A configuração dos hidrogênios metilênicos presentes em C-2 e dos hidrogênios metínicos presentes em C-3 foram determinadas de acordo com a multiplicidade e constantes de acoplamento obtidas pelo espectro de RMN de ^1H ($J_{2\text{ax}-2\text{eq}} = 14,8$ Hz; $J_{2\text{ax}-3\text{eq}} = 7,4$ Hz; $J_{2\text{eq}-3\text{eq}} = 3,7$ Hz; $J_{3\text{eq}-4\text{ax}} = 3,0$ Hz) (Apêndice 5 e Tabela 5). A mesma correlação foi possível determinar para os hidrogênios metilênicos presentes em C-6 e dos hidrogênios metínicos presentes em C-5 ($J_{6\text{ax}-6\text{eq}} = 12,3$ Hz; $J_{6\text{ax}-5\text{ax}} = 9,5$ Hz; $J_{6\text{eq}-5\text{ax}} = 4,2$ Hz; $J_{5\text{ax}-4\text{ax}} = 8,9$ Hz), facilitando assim a determinação da estereoquímica relativa da estrutura.

Figura 28. Estrutura química do composto (1) galoilquínico: ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico.

Tabela 5. Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto (1) galoilquínico: ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD₃OD.

	Nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
Ácido quínico	1	75,27	-
	2	37,16	2,18 (dd; 7,4; 14,8 Hz; 1 H _{ax}) 2,43 (dd; 3,7; 14,8 Hz; 1 H _{eq})
	3	70,41	5,77 (ddd; 3,0; 3,7; 7,4 Hz; 1 H _{eq})
	4	76,74	5,16 (dd; 3,0; 8,9 Hz; 1 H _{ax})
	5	66,08	4,48 (ddd; 4,2; 8,9; 9,5 Hz; 1 H _{ax})
	6	42,01	2,14 (dd; 9,5; 12,3 Hz; 1 H _{ax}) 2,28 (dd; 4,2; 12,3 Hz; 1 H _{eq})
Ácido gálico	-COOH (7)	178,24	-
	1'	121,62	-
	2'	106,42	7,22 (d; 1,8 Hz; 1H)
	3'	149,08	-
	4'	140,61	-
	5'	146,27	-
	6'	112,17	7,24 (d; 1,8 Hz; 1H)
	-COO- (7')	167,47	-
Ácido gálico	-CH ₃ (8')	56,56	3,83 (s; 3 H)
	1''	121,38	-
	2''	106,14	6,83 (d; 1,9 Hz; 1 H)
	3''	148,85	-
	4''	140,55	-
	5''	146,15	-
	6''	112,09	6,99 (d; 1,9 Hz; 1 H)
	-COO- (7'')	165,59	-
	-CH ₃ (8'')	56,22	3,56 (s; 3 H)

4.4.4 Ácido 5''-O-metil-3,4-di-O-galoilquínico (composto 2)

De acordo com as análises feitas por RMN, a estrutura proposta para composto (2) trata-se do ácido 5''-O-metil-3,4-di-O-galoilquínico (Figura 29). Os valores de deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios, bem como a correlação entre eles pelo HMBC estão descritos na Tabela 6. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 135, HSQC e HMBC estão nos Apêndices 10 ao 14, respectivamente. A presença de duas unidades galoil foi determinada pelos sinais dos carbonos com deslocamentos químicos entre 70,43 ppm e 76,97 ppm (Apêndice 11), bem como pelos sinais de hidrogênios meta correlacionados H-2' e H-6' δ 7,14 (s; 2H) e, H-2'' e H-6'' δ 6,97 e 7,15 (d; 1,5 Hz; 1H) (Apêndice 10). Também foram observadas correlações no HMBC (Apêndice 14) entre esses hidrogênios meta correlacionados com os carbonos carbonílicos C-7' (δ 167,72) e C-7'' (δ 167,61), respectivamente. Além disso, tais carbonos carbonílicos também correlacionaram-se com os hidrogênios H-3 δ 5,73 (ddd; 3,1; 3,3; 6,8 Hz; 1 H_{eq}) e H-4 (δ 5,15; 3,3 e 9,3 Hz; 1 H_{ax}), indicando que os ácidos galoilquínicos encontravam-se ligados nas posições C-3 e C-4, respectivamente do ácido quínico. Outra correlação importante feita com o auxílio do HMBC foi entre o hidrogênio metílico de H-8'' δ 3,52 (s; 3 H) com o carbono C-5'' (δ 146,45) respectivamente, indicando metoxilação nessas posições.

A presença de dois carbonos metilênicos, C-2 (δ 37,09) e C-6 (δ 42,19), três carbonos metínicos próximos a oxigênio, C-3 (δ 70,43), C-4 (δ 76,97) e C-5 (δ 65,90), observados nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (Apêndices 11 e 12), e um carbono quaternário, C-1 (δ 75,29) observado no espectro de ^{13}C , juntamente com a presença do carbono carboxílico em campo baixo, C-7 (δ 178,14), permitiram sugerir a estrutura do ácido quínico. Esta foi confirmada a partir das correlações obtidas por HSQC e HMBC (Apêndices 13 e 14). A configuração dos hidrogênios metilênicos presentes em C-2 e dos hidrogênios metínicos presentes em C-3 foram determinadas de acordo com a multiplicidade e constantes de acoplamento obtidas pelo espectro de RMN de ^1H ($J_{2\text{ax}-2\text{eq}} = 15,0$ Hz; $J_{2\text{ax}-3\text{eq}} = 6,8$ Hz; $J_{2\text{eq}-3\text{eq}} = 3,1$ Hz; $J_{3\text{eq}-4\text{ax}} = 3,3$ Hz) (Apêndice 10 e Tabela 6). A mesma correlação foi possível determinar para os hidrogênios metilênicos presentes em C-6 e dos hidrogênios metínicos presentes em C-5 ($J_{6\text{ax}-6\text{eq}} = 11,1$ Hz; $J_{6\text{ax}-5\text{ax}} = 9,7$ Hz; $J_{6\text{eq}-5\text{ax}} = 4,2$ Hz; $J_{5\text{ax}-4\text{ax}} = 9,3$ Hz), facilitando assim a determinação da estereoquímica relativa da estrutura.

Figura 29. Estrutura química do composto (2): ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico.

Tabela 6. Dados dos espectros de RMN obtidos para o composto (2): ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD₃OD.

	Nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
Ácido quínico	1	75,29	-
	2	37,09	2,20 (dd; 6,8; 13,8 Hz; 1 H _{ax}) 2,42 (dd; 3,1; 15,0 Hz; 1 H _{eq})
	3	70,43	5,73 (ddd; 3,1; 3,3; 6,8 Hz; 1 H _{eq})
	4	76,97	5,15 (dd; 3,3; 9,3 Hz; 1 H _{ax})
	5	65,90	4,52 (ddd; 4,2; 9,3; 9,7 Hz; 1 H _{ax})
	6	42,19	2,12 (dd; 9,7 11,1 Hz; 1 H _{ax}) 2,29 (dd; 4,2; 11,1 Hz; 1 H _{eq})
Ácido gálico	-COOH (7)	178,14	-
	1'	121,63	-
	2'	110,44	7,14 (1H; s)
	3'	146,02	-
	4'	139,83	-
	5'	146,02	-
Ácido gálico	6'	110,44	7,14 (1H; s)
	-COO- (7')	167,72	-
	1''	121,31	-
	2''	106,05	6,97 (d; 1,5 Hz; 1 H)
	3''	148,77	-
	4''	140,45	-
	5''	146,45	-
	6''	112,01	7,15 (d; 1,5 Hz; 1 H)
	-COO- (7'')	167,61	-
	-CH ₃ (8'')	56,13	3,52 (s; 3 H)

4.5 Microdiálise *in vitro* de quercitrina e galoilquínico

Nos estudos de microdiálise a calibração da sonda *in vitro* é essencial antes da realização do estudo *in vivo*. Condições experimentais devem ser testadas a fim de se obter alta recuperação do analito pela sonda, como: fluxo do perfusado, temperatura, composição da sonda e sua área de superfície, tecido a ser analisado, bem como as propriedades físico-químicas do analito de interesse. De modo geral, têm-se maior recuperação, quanto menor for o fluxo e maior for a temperatura e a área de superfície da membrana (CHAURASIA *et al.*, 2007).

Com o intuito de verificarem-se essas condições ideais, diversos testes foram realizados no presente trabalho. Entretanto, para que tais testes pudessem ser quantificados, inicialmente um método analítico sensível foi desenvolvido.

4.5.1 Otimização das condições cromatográficas

A fim de se obter boa resolução das bandas cromatográficas e menor tempo de análise, uma nova coluna analítica com menor comprimento e tamanho de partículas foi utilizada. Assim, análises de 75 min. realizadas com a coluna Synergi Polar-RP (150 x 4,6 mm, 4 μ m) foram substituídas por análises de 6 min., utilizando uma coluna analítica com o mesmo preenchimento, mas com menores dimensões (100 x 3,0 mm, 2,5 μ m). Os métodos analíticos desenvolvidos serviram para quantificar quercitrina, galoilquínico e o padrão interno (AF). Diferentes gradientes foram testados para otimizar as separações cromatográficas, mas a melhor condição de gradiente está descrita no item 3.8.1.

Todas as análises foram realizadas por UFLC-MS/MS. A calibração da quercitrina (m/z 447), galoilquínico (m/z 523) e AF (m/z 193) no espectrômetro de massas foi realizada manualmente, no modo negativo. As moléculas desprotonadas $[M-H]^-$ com maiores intensidades foram selecionados (Figura 30) e o modo MRM foi usado para monitorar ambos os íons precursores e íons produtos de cada substância, o que tornou o método mais seletivo.

A otimização dos parâmetros para cada composto foi alcançada por rampeamento manual para se obter maior intensidade do sinal, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Otimização dos parâmetros, *declustering potential*, *collision energy*, *entrance potential* e *collision exit potential* de quercitrina, galoilquínico e AF, em modo negativo.

Analito	Transição	<i>Declustering potential</i>	<i>Collision energy</i>	<i>Entrance potential</i>	<i>Collision exit potential</i>
Quercitrina	447 → 300	-56	-28	-8	-11
Galoilquínico	523 → 338.9	-5	-26	-10	-11
AF	193.3 → 133.8	-54	-25	-14	-8

A temperatura na fonte foi estabelecida em 350°C e a voltagem do *ion spray* em -3500 v. O *curtain gas* (CUR), *collision-activated dissociation gas* (CAD), *nebulizer gas* (GS1) e o *turbo heater gas* (GS2) foram ajustados em 30, médio, 60 e 60, respectivamente.

O software *Analyst* versão 1.6.2 (AB Sciex) foi usado para aquisição e quantificação dos dados.

Figura 30. Espectro de massas da quercitrina (A) e galoilquínico (B).

4.5.2 Validação de método analítico para análise de microdialisados

O teste de especificidade do método analítico desenvolvido foi satisfatório, uma vez que a amostra branco não apresentou nenhum contaminante correspondente aos analitos investigados. Na Figura 31 estão demonstrados os cromatogramas obtidos para as amostras de branco, padrão interno (AF) e microdialisados. Os tempos de retenção do galoilquínico, da quercitrina e do AF foram de 2,73 min., 3,43 min. e 3,67 min., respectivamente.

Tabela 8. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) das concentrações observadas de quercitrina e galoilquínico, solubilizados em salina ($N=3$).

	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$, Média $\pm$ DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Quercitrina	3,5	$3,12 \pm 0,05$	1,58	89,05
	5	$4,60 \pm 0,29$	6,39	91,93
	10	$9,74 \pm 0,25$	2,58	97,43
	15	$15,07 \pm 0,31$	2,07	100,47
	20	$20,01 \pm 0,52$	2,60	100,05
	25	$25,19 \pm 0,59$	2,34	100,75
	50	$51,51 \pm 2,44$	4,74	103,01
	100	$99,24 \pm 0,95$	0,95	99,24
Galoilquínico	3,5	$3,72 \pm 0,23$	6,06	106,29
	5	$4,97 \pm 0,28$	5,68	99,40
	10	$10,24 \pm 0,22$	2,14	102,40
	15	$14,84 \pm 0,29$	1,97	98,91
	20	$19,74 \pm 1,19$	6,01	98,68
	25	$25,08 \pm 0,93$	3,72	100,31
	50	$51,63 \pm 1,72$	3,32	103,25
	100	$99,31 \pm 0,74$	0,75	99,31

Figura 32. Curvas de linearidade de quercitrina (A) galoilquínico (B).

As porcentagens dos valores de exatidão e precisão para as análises inter-dia e intra-dia de quercitrina e galoilquínico estão apresentadas nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Os resultados indicam que os valores de ambos os testes estão de acordo com as variações aceitáveis pelo FDA.

Tabela 9. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste inter-dia para quercitrina e galoilquínico, solubilizados em salina ($N=6$).

	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$, Média$\pm$DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Quercitrina	3,5 (LIQ)			
	Dia 1	2,94 $\pm$ 0,11	3,80	83,95
	Dia 2	3,01 $\pm$ 0,18	6,09	85,90
	Dia 3	3,07 $\pm$ 0,16	5,24	87,71
	10,5 (CQB)			
	Dia 1	9,21 $\pm$ 0,42	4,60	87,75
	Dia 2	10,45 $\pm$ 0,52	4,94	99,52
	Dia 3	10,47 $\pm$ 0,45	4,26	99,68
	40 (CQM)			
	Dia 1	38,22 $\pm$ 2,03	5,32	95,54
	Dia 2	39,25 $\pm$ 0,81	2,07	98,13
	Dia 3	40,70 $\pm$ 2,72	6,69	101,75
	80 (CQA)			
	Dia 1	74,28 $\pm$ 2,81	3,78	92,85
	Dia 2	75,80 $\pm$ 2,21	2,91	94,75
	Dia 3	78,82 $\pm$ 5,33	6,77	98,52
Galoilquínico	3,5 (LIQ)			
	Dia 1	3,91 $\pm$ 0,09	2,31	111,81
	Dia 2	3,89 $\pm$ 0,10	2,58	111,24
	Dia 3	3,77 $\pm$ 0,09	2,34	107,67
	10,5 (CQB)			
	Dia 1	11,05 $\pm$ 0,29	2,61	105,24
	Dia 2	10,60 $\pm$ 0,82	7,71	100,95
	Dia 3	10,47 $\pm$ 0,45	4,26	99,68
	40 (CQM)			
	Dia 1	42,72 $\pm$ 1,49	3,49	106,79
	Dia 2	41,07 $\pm$ 1,75	4,26	102,67
	Dia 3	40,70 $\pm$ 2,72	6,69	101,75
	80 (CQA)			
	Dia 1	76,43 $\pm$ 2,03	2,66	95,54
	Dia 2	84,42 $\pm$ 3,32	3,93	105,52
	Dia 3	78,82 $\pm$ 5,33	6,77	98,52

Tabela 10. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste intra-dia para quercitrina e galoilquínico, solubilizados em salina ($N=6$).

	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$, Média$\pm$DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Quercitrina	3,5	$2,97 \pm 0,16$	5,48	84,90
	10,5	$9,16 \pm 0,53$	5,76	87,25
	40	$37,82 \pm 2,43$	6,43	94,54
	80	$76,12 \pm 2,85$	3,74	95,15
Galoil- quínico	3,5	$3,83 \pm 0,08$	2,12	109,33
	10,5	$9,91 \pm 0,10$	1,01	94,35
	40	$37,03 \pm 1,01$	2,73	92,58
	80	$76,43 \pm 2,41$	3,16	95,54

Os estudos de estabilidade demonstraram que as amostras não apresentaram degradação significativa ao serem expostas ao teste de estabilidade de bancada, ciclos de congelamento e descongelamento e estabilidade prolongada. Os resultados estão descritos na Tabela 11, com os valores de precisão e exatidão variando menos do que 15%.

Tabela 11. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) nos testes de estabilidade para quercitrina e galoilquínico, solubilizados em salina ($N=3$).

	Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Estudos de estabilidade	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$, Média $\pm$ DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Quercitrina	10,5 (CQB)	Bancada (24 h)	10,20 $\pm$ 0,10	0,98	97,14
		1x gelo - degelo	10,70 $\pm$ 0,44	4,07	101,90
		2x gelo - degelo	11,03 $\pm$ 1,44	13,08	105,08
		3x gelo - degelo	11,53 $\pm$ 0,31	2,65	109,84
		30 dias a -80 °C	10,23 $\pm$ 0,06	0,56	97,46
	40 (CQM)	Bancada (24 h)	38,17 $\pm$ 0,35	0,92	95,42
		1x gelo - degelo	42,10 $\pm$ 0,92	2,18	105,25
		2x gelo - degelo	42,37 $\pm$ 1,07	2,52	105,92
		3x gelo - degelo	39,13 $\pm$ 2,63	6,72	97,83
		30 dias a -80 °C	45,27 $\pm$ 0,51	1,13	113,17
	80 (CQA)	Bancada (24 h)	77,27 $\pm$ 1,00	1,30	96,58
		1x gelo - degelo	79,47 $\pm$ 1,61	2,02	99,33
		2x gelo - degelo	85,47 $\pm$ 4,05	4,73	106,83
		3x gelo - degelo	81,50 $\pm$ 0,70	0,86	101,88
		30 dias a -80 °C	92,27 $\pm$ 6,32	6,85	115,33
Galoilquínico	10,5 (CQB)	Bancada (24 h)	9,85 $\pm$ 0,33	3,30	93,78
		1x gelo - degelo	10,22 $\pm$ 0,80	7,80	97,30
		2x gelo - degelo	10,12 $\pm$ 1,00	9,92	96,41
		3x gelo - degelo	11,17 $\pm$ 0,42	3,73	106,35
		30 dias a -80 °C	9,94 $\pm$ 0,14	1,43	94,63
	40 (CQM)	Bancada (24 h)	38,27 $\pm$ 0,50	1,32	95,67
		1x gelo - degelo	39,80 $\pm$ 1,47	3,70	99,50
		2x gelo - degelo	35,60 $\pm$ 2,96	8,32	89,00
		3x gelo - degelo	38,33 $\pm$ 2,65	6,91	95,83
		30 dias a -80 °C	39,57 $\pm$ 0,40	1,02	98,92
	80 (CQA)	Bancada (24 h)	82,33 $\pm$ 3,73	4,53	102,92
		1x gelo - degelo	73,40 $\pm$ 3,93	5,36	91,75
		2x gelo - degelo	76,90 $\pm$ 2,89	3,76	96,13
		3x gelo - degelo	76,60 $\pm$ 4,86	6,34	95,75
		30 dias a -80 °C	88,13 $\pm$ 3,40	3,86	110,17

Como pode ser observado, o método analítico desenvolvido passou por todos os critérios estabelecidos pelo FDA (FDA, 2011) e os testes *in vitro* de microdiálise puderam ser realizados.

4.5.3 Microdiálise: influência do fluxo

Como descrito anteriormente, quanto menor for a taxa de fluxo do perfusado, maior será a recuperação relativa do analito pela sonda (CHAURASIA *et al.*, 2007). Isso se deve ao fato de que um composto perfundido a um fluxo elevado terá menos tempo para atravessar os poros da membrana, diminuindo assim sua recuperação. O oposto também é verdadeiro, o que significa que num fluxo mais baixo, a recuperação tenderá a ser maior.

De maneira a confirmar tal conceito, testes de retrodiálise foram realizados com dois fluxos diferentes, 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. e 2 $\mu\text{L}/\text{min}$., a fim de se verificar qual apresentaria maior recuperação (Figura 33).

Figura 33. Recuperação dos analitos, quercitrina (A) e galoílquínico (B), determinada por retrodiálise em duas taxas de fluxo (1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 2 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Uma vez que o fluxo 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ foi o que apresentou melhor recuperação, testes de diálise e retrodiálise foram realizados com quercitrina e galoílquínico juntos e separados, com o intuito de verificar se ocorreria alguma variação nos resultados de recuperação.

Partindo do princípio que a técnica de microdiálise ocorre por um processo de difusão e que quantidades iguais dos analitos devem atravessar a membrana em ambos os sentidos, a recuperação relativa por retrodiálise deve ser semelhante a por diálise (CHOOLOCK *et al.*, 2012).

Como demonstrado na Figura 34 e na Tabela 12, três concentrações (25, 50 e 100 ng/mL) foram testadas para calcular as recuperações relativas, sendo que os valores médios de RD e D foram de 57,9% e 46,7% para quercitrina e 60,5% e 26,2% para galoílquínico, respectivamente. Isso demonstra que houve uma variação de aproximadamente 10% para quercitrina nos valores de RD e D, o que é aceitável considerando os erros analíticos da técnica. Por outro lado, a variação foi cerca de 35% para o galoílquínico, sugerindo que este composto estaria se ligando à sonda.

Figura 34. Recuperação relativa por diálise e retrodiálise da quercitrina (A), quercitrina na presença de galoílquínico (B), galoílquínico (C), galoílquínico na presença de quercitrina (D) ($N=9$).

Tabela 12. Valores transcritos da Figura 34, descrevendo a recuperação relativa da diálise (D) e retrodiálise (RD) de quercitrina, quercitrina na presença de galoílquínico (GQ), galoílquínico e galoílquínico na presença de quercitrina. Valores descritos em média $\pm$ DP ($N=9$).

Conc (ng/mL)	Quercitrina		Quercitrina + GQ		GQ		GQ + Quercitrina	
	RD(%)	D(%)	RD(%)	D(%)	RD(%)	D(%)	RD(%)	D(%)
25	52,4 $\pm$ 13,0	42,3 $\pm$ 6,7	42,9 $\pm$ 11,8	41,0 $\pm$ 5,6	69,0 $\pm$ 11,5	27,7 $\pm$ 4,1	69,4 $\pm$ 8,3	28,0 $\pm$ 3,5
50	60,1 $\pm$ 6,8	44,2 $\pm$ 6,6	44,2 $\pm$ 10,0	38,4 $\pm$ 10,0	64,3 $\pm$ 12,9	22,2 $\pm$ 3,5	56,9 $\pm$ 14,8	26,7 $\pm$ 1,2
100	61,4 $\pm$ 11,6	53,7 $\pm$ 10,6	59,7 $\pm$ 12,6	31,1 $\pm$ 3,8	49,0 $\pm$ 10,8	22,7 $\pm$ 2,3	55,3 $\pm$ 10,0	23,8 $\pm$ 1,7
Média	57,9	46,7	48,9	36,8	60,7	24,2	60,5	26,2

Também foi possível verificar com o ensaio de microdiálise *in vitro* que não houve diferença entre a recuperação relativa dos compostos testados isoladamente ou numa mesma solução, o que significa que estes compostos podem ser analisados por uma única sonda sem causarem interferências nos resultados um do outro.

4.6 Ligações à proteínas

Frações livres de quercitrina e galoilquínico foram calculadas utilizando dispositivo de ultrafiltração. Para tanto, concentrações de 50, 100, 150, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ de quercitrina e 25, 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ de galoilquínico foram preparadas em 1 mL de plasma. Após serem incubadas durante 30 min. a 37°C as amostras foram centrifugadas em um dispositivo apropriado, que separou a fração do composto não ligada a proteínas.

Quercitrina e galoilquínico são substâncias que tem alta afinidade por proteínas, se ligando $91,4 \pm 0,5\%$ e $89,8 \pm 0,5\%$, respectivamente. O resultado de quercitrina corrobora com o valor de 89% encontrado na literatura (HUANG *et al.*, 2013). Entretanto, o galoilquínico por se tratar de uma substância inédita, não há relatos para que se possa utilizar para comparação. É importante ressaltar que ambos os compostos não apresentaram ligação ao sistema de ultrafiltração.

Alguns fatores são responsáveis pela taxa de ligação às proteínas, com a afinidade entre a substância e a proteína, a concentração da substância no sangue e a concentração de proteínas no plasma. À medida que a concentração dos compostos aumenta no sangue, a sua fração livre também pode aumentar, pois a capacidade de ligação às proteínas pode estar saturada. No entanto, numa vasta gama de concentrações, a fração livre não é alterada (STORPIRTIS *et al.*, 2011).

A ligação às proteínas afeta fortemente o comportamento farmacocinético dos medicamentos, como na regulação da distribuição, eliminação e na ação farmacológica (HUANG *et al.*, 2013). A maioria dos fármacos liga-se reversivelmente às proteínas do plasma como, por exemplo, substâncias com pH baixo, as quais têm alta afinidade por albumina do soro humano (SCHIMIDT; GONZALEZ & DERENDORF, 2010).

4.7 Estudos farmacocinéticos de quercitrina *in vivo*

Como recomendado pelo IACUC da Universidade da Flórida, diversos treinamentos *on line* e presenciais foram realizados e um protocolo foi submetido e aprovado antes de dar início aos experimentos em animais.

A princípio havia sido proposto coletar sangue pela cauda dos ratos, por via intravenosa. Porém, como eram muitas coletas a serem feitas e o animal estava anestesiado devido à sonda implantada no rim, tal procedimento foi impraticável. Dessa maneira, o procedimento de escolha foi a canulação da artéria carótida, que apresentava melhor fluxo sanguíneo durante todo o experimento.

4.7.1 Extração plasmática

De acordo com Sun *et al.* (2014), um método de ELL eficiente foi desenvolvido para extrair flavonóides, ácido gálico e quinonas de plasma de rato. No entanto, verificou-se que uma simples ELL com acetato de etila foi ideal para extrair eficientemente quercitrina, como descrito na Tabela 13.

Tabela 13. Eficiência de extração de quercitrina do plasma (%).

Métodos de extração*	Eficiência de extração de quercitrina do plasma (%)
1º)	44,3
2º)	65,75
3º)	109,5
4º)	44,55
5º)	2,07

* Todos os métodos estão descritos detalhadamente no item 3.10.1.

Já era de se esperar que o melhor solvente extrator fosse acetato de etila, uma vez que durante a partição do extrato bruto de *C. langsdorffii* com os solventes a quercitrina apresentou-se majoritariamente na fração de acetato de etila.

4.7.2 Validação de método analítico em plasma

Após definir o melhor método de extração plasmática, o método analítico em UFLC-MS/MS foi validado. O primeiro desafio encontrado durante os procedimentos de validação foi uma contaminação do plasma com o padrão interno AF.

Durante muitas semanas foram realizados diversos testes para se descobrir a origem da contaminação. A princípio acreditava-se ser erro do analista, mas o teste foi repetido por diversas vezes, inclusive com diferentes analistas, lotes de plasmas e reservatórios de solventes novos. Também foi utilizada uma transição do AF diferente (193,3 → 177,6), mas a intensidade do pico era muito baixa para obtenção de um método analítico de qualidade (Figura 35).

Figura 35. Análise cromatográfica de um plasma branco analisado na transição do padrão interno ácido ferúlico (193,3 → 133,8).

Devido à persistência do problema de contaminação, afzelina foi escolhida como um novo padrão interno (Figura 27). Tal substância foi escolhida por apresentar elevada similaridade com quercitrina e por ter sido isolada durante a execução deste projeto, como descrito nas seções 3.4.1 e 3.6.1.

Os parâmetros *declustering potential* (-56), *collision energy* (-28), *entrance potential* (-8) e *collision exit potential* (-11) no modo negativo foram semelhantes aos valores para quercitrina. O único parâmetro diferente foi a transição em modo MRM, 431 → 285.

As curvas de calibração foram lineares e tiveram R^2 de pelo menos 0,999. As curvas foram construídas utilizando-se cinco padrões de calibração. A porcentagem de precisão variou entre 0,98% - 7,96%, enquanto a exatidão variou menos que 15%, quando os padrões de calibração foram comparados as concentrações nominais (98,15% - 114,2%), como apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) das concentrações observadas de quercitrina extraída do plasma ($N=2$).

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$, Média $\pm$ DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
5	5,71 $\pm$ 0,01	0,25	114,2
10	9,82 $\pm$ 0,08	0,79	98,6
50	50,25 $\pm$ 3,18	6,33	100,5
75	76,75 $\pm$ 6,01	7,83	102,3
100	101,30 $\pm$ 8,06	7,96	101,3

As porcentagens de precisão e exatidão nos testes de variação intra-dia e inter-dia estão apresentadas nas Tabelas 15 e 16, respectivamente. Os resultados indicam que todos os valores encontram-se dentro da faixa aceitável.

Tabela 15. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste intra-dia para quercitrina extraída de plasma ($N=6$).

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$, Média $\pm$ DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
5	5,57 $\pm$ 0,46	8,24	111,37
15	14,77 $\pm$ 0,64	4,34	98,44
40	37,18 $\pm$ 3,99	10,73	92,96
80	77,97 $\pm$ 7,80	10,01	97,46

Tabela 16. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste inter-dia para quercitrina extraída de plasma ($N=6$).

Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração observada ($\mu\text{g/mL}$, Média $\pm$ DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
3,5 (LIQ)			
Dia 1	4,65 $\pm$ 0,47	10,11	92,93
Dia 2	4,51 $\pm$ 0,39	8,58	90,13
10,5 (CQB)			
Dia 1	14,73 $\pm$ 0,69	4,70	98,22
Dia 2	14,78 $\pm$ 0,54	3,67	98,56
40 (CQM)			
Dia 1	37,25 $\pm$ 2,58	6,92	93,13
Dia 2	38,37 $\pm$ 1,59	4,15	95,92
80 (CQA)			
Dia 1	78,93 $\pm$ 6,46	8,19	98,67
Dia 2	77,63 $\pm$ 6,45	8,31	97,04

Como pode ser observado, todo o método analítico foi aprovado pelos critérios estabelecidos pelo FDA (FDA, 2011). Assim, os testes farmacocinéticos *in vivo* puderam ser realizados.

4.7.3 Modelo experimental *in vivo*

Um total de cinco animais pesando cerca de 300 g foram testados farmacocineticamente. Inicialmente os animais foram anestesiados e seus reflexos foram verificados antes de dar início à cirurgia de implantação da sonda no córtex renal. Como a inserção da sonda causa certo trauma, a sonda ficou perfusando por mais de 30 min. com salina para que o tecido pudesse se restabelecer (CHAURASIA *et al.*, 2007).

Após estabilização da sonda, a recuperação foi determinada por retrodiálise *in vivo*, que permitiu a conversão das concentrações dos dialisados em concentrações livres no tecido (ARAUJO *et al.*, 2008). Em seguida, a sonda e o tecido renal foram perfusados com salina por 30 min. – 1 hora para retirar a quercitrina. Ao final da limpeza da sonda e do tecido a artéria carótida foi canulada e quercitrina foi administrada por via intravenosa, dando início as coletas de sangue e microdialisados.

O estudo piloto foi crucial como maneira de verificar a faixa de concentração que deveria ser utilizada para validação dos métodos de microdialisados e plasma.

Como apresentado na Figura 36, a concentração de quercitrina no plasma estava excedendo a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, que havia sido escolhida como a maior concentração do método analítico a ser validado. Com o intuito de colocar todas as concentrações dentro da faixa estabelecida, as quatro primeiras amostras de plasma coletados foram diluídas com plasma branco de rato numa proporção de 1 : 9.

Diferentemente do plasma, as amostras de microdialisados não necessitaram diluição.

Os estudos pilotos também contribuíram para a definição do tempo de coleta das amostras, verificando-se que 2 h foi o correspondente a três meias vidas da substância, tempo suficiente para obtenção das informações necessárias.

Figura 36. Estudo piloto do plasma total (A) e microdialisados renal (B) de quercitrina 1 mg/kg após administração intravenosa em ratos machos Wistar.

4.7.4 Avaliação farmacocinética

Os dados foram inicialmente analisados utilizando-se o modelo não compartimental nos softwares Excel e Phoenix, a fim de se ter uma noção básica do perfil farmacocinético de quercitrina, como os valores de alguns parâmetros e também a provável quantidade de compartimentos. Em seguida, alguns testes foram realizados no software *Scientist* para se verificar quais dos modelos comportamentais descreviam melhor os dados. De acordo com os perfis individuais de plasma, o modelo de dois compartimentos foi o que mais bem descreveu os dados segundo o critério de seleção do modelo (MSC), que apresentou valores entre 5,7 - 3,67 e R^2 que variou entre 0,99 - 0,98. Em outros modelos testados, as faixas de MSC e R^2 foram menores.

De acordo com o modelo mamilar de dois compartimentos, observa-se a distribuição da dose administrada nos compartimentos central e periférico (GABRIELSSON & WEINER, 2006). A fim de se conhecer o percurso de quercitrina no organismo e calcular seu volume de

distribuição, fez-se necessário o cálculo das microconstantes k_{10} , k_{12} e k_{21} , que estabeleceram a taxa de eliminação a partir do compartimento central, a taxa de distribuição do compartimento central para o periférico e a taxa de redistribuição do compartimento periférico para o central, respectivamente.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos por análises não compartimental e compartimental após administração intravenosa de dose única de quercitrina 1 mg/kg estão resumidos na Tabela 17. Ambas as análises não demonstraram diferenças estatísticas, confirmando que o modelo de dois compartimentos descreveu bem os dados experimentais.

Tabela 17. Parâmetros farmacocinéticos plasmáticos após administração de dose única de quercitrina 1 mg/kg em ratos Wistar ($N=5$).

Parâmetros	Quercitrina	
	Não compartimental (Média $\pm$ DP)	2 compartimentos (Média $\pm$ DP)
A (ng/mL)	-	931,05 $\pm$ 292,86
B (ng/mL)	-	119,00 $\pm$ 32,81
α (h^{-1})	-	11,32 $\pm$ 1,90
β ou λ (h^{-1})	1,44 $\pm$ 0,26	1,79 $\pm$ 0,32
$t_{1/2}$ (h)	0,49 $\pm$ 0,11	0,40 $\pm$ 0,07
$\text{ASC}_{0-\infty}$ (ng h/mL)	134,15 $\pm$ 10,78	146,93 $\pm$ 14,30
CL (L/h/kg)	7,36 $\pm$ 0,58	6,85 $\pm$ 0,62
Vc (L/kg)	-	1,01 $\pm$ 0,29
Vdss (L/kg)	2,51 $\pm$ 0,23	2,10 $\pm$ 0,52
TRM (h)	0,34 $\pm$ 0,009	-
k_{21} (h^{-1})	-	2,92 $\pm$ 0,68
k_{12} (h^{-1})	-	3,12 $\pm$ 0,50
k_{10} (h^{-1})	-	7,09 $\pm$ 1,52

Em que A e B, são os interceptos das fases de distribuição e eliminação, respectivamente; α e β , são macroconstantes de distribuição e eliminação, respectivamente; $t_{1/2}$, meia vida; $\text{ASC}_{0-\infty}$, área sob a curva de zero ao infinito; CL, depuração; Vc, volume de distribuição no compartimento central; Vdss, volume de distribuição no estado de equilíbrio; TRM, tempo de residência média; k_{21} , microconstante de distribuição do compartimento periférico (2) para o central (1); k_{12} , microconstante de distribuição do compartimento central (1) para o periférico (2) e k_{10} , microconstante de eliminação do compartimento central.

De acordo com os valores dos parâmetros, o composto quercitrina demonstrou meia vida curta ($t_{1/2} = 0,40 \pm 0,07$ h), uma rápida ($\alpha = 11,32 \pm 1,90 \text{ h}^{-1}$) e boa ($\text{Vdss} = 2,10 \pm 0,52$ L/kg) distribuição tecidual e alta depuração ($\text{CL} = 6,85 \pm 0,62$ L/h/kg) (Tabela 17).

Com relação à análise dos microdialisados renais, verificou-se pela Equação 22 que a fração livre nos rins foi cerca de 13 vezes maior que a concentração livre no plasma (Tabela 18), demonstrando a alta afinidade desse composto pelos rins.

A rápida absorção também pode ser devido à lipofilicidade moderada da quercitrina ($\text{LogP} = 1,31$), podendo ser o fator responsável pela habilidade de atravessar membranas biológicas. Essa mesma habilidade foi observada para o voriconazol, que também apresenta lipofilicidade moderada (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Tabela 18. Parâmetros farmacocinéticos teciduais livres após administração de dose única de quercitrina 1 mg/kg em ratos Wistar ($N=5$).

Parâmetros	Média $\pm$ DP
$ASC_{0-\infty \text{ plasma}}$ (ng h/mL)	$146,93 \pm 14,30$
$ASC_{0-t \text{ tecido}}$ (ng h/mL)	$163,21 \pm 50,09$
Ft	$12,59 \pm 4,64$

$ASC_{0-\infty \text{ plasma}}$, área sob a curva de zero ao infinito no plasma; $ASC_{0-t \text{ tecido}}$, área sob a curva de zero ao tempo t no tecido; Ft, penetração no rim pela razão $ASC_{0-t \text{ tecido}} / fu \cdot ASC_{0-\infty \text{ plasma}}$.

É importante ressaltar que para cada animal foi realizada calibração da sonda *in vivo* por RD, e que o valor médio encontrado de RR_{RD} foi de 36%, ou seja, menor que o encontrado quando testado *in vitro* (57,9%). O experimento de RR_{RD} *in vitro* em geral não substitui as determinações de RR_D *in vivo*, uma vez que o efeito da resistência a difusão no tecido pode ser muito diferente da resistência de difusão no meio *in vitro* (CHAURASIA *et al.*, 2007). Assim, o valor da RR_{RD} *in vivo* foi utilizado para corrigir as concentrações de quercitrina determinadas no rim.

O perfil farmacocinético médio de quercitrina no plasma e livre no tecido renal, após administração de 1 mg/kg por via intravenosa, pode ser observado na Figura 37.

Figura 37. Perfis de concentração *versus* tempo de quercitrina em plasma (■) e livre em tecido renal (○). As linhas representam as concentrações preditas por modelo de dois compartimentos em plasma (—), fração livre em plasma (---) e fração livre em tecido (.....). Os pontos representam a média $\pm$ DP de 5 animais.

4.8 Estudos farmacocinéticos do galoilquínico *in vivo*

Dentre os mais diversos derivados galoilquínicos presentes no extrato bruto de *C. langsdorffii*, o composto 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (Figura 28), denominado no presente trabalho como galoilquínico, foi o escolhido para ser estudado farmacocineticamente, visto que foi o que apresentou maior rendimento no processo de isolamento.

Por se tratar de uma substância inétda, não havia informações na literatura para que se pudesse basear. Dessa maneira, três diferentes concentrações foram administradas por via intravenosa, para se ter uma ideia do tipo de comportamento da amostra.

Assim, para dar continuidade aos estudos farmacocinéticos no Brasil, novo protocolo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (Anexo 2).

Antes de dar início aos estudos *in vivo* foi avaliada a ligação do galoilquínico à sonda de microdiálise.

4.8.1 Avaliação da ligação de galoilquínico a sonda de microdiálise

Em busca de quantificar a ligação do composto galoilquínico na sonda de microdiálise, realizou-se o experimento proposto por Araujo *et al.* (2008). Assim, diferentes concentrações de galoilquínico (25, 50, 100, 200 e 400 μ g/mL) foram testadas conforme descrito no item 3.11.1.

Três tubos de sondas conectados foram testados e os resultados podem ser observados na Figura 38.

Figura 38. Estudo de ligação do composto galoilquínico aos tubos da sonda de microdiálise, testado em diferentes concentrações (25 – 400 ng/mL).

De acordo com a Figura 38, o resultado foi dado em porcentagem de recuperação, ou seja, calculou-se a diferença da concentração antes e após a solução passar pelo tubo. Os resultados demonstraram uma enorme variação da ligação do composto galoilquínico aos tubos, sendo que essa variação foi ainda maior para as concentrações mais baixas. Dessa maneira, optou-se por utilizar tubos de uma sonda nova para fazer os testes de ligação, uma vez que tal problema podia estar ocorrendo pelo fato dos tubos serem já usados. Assim, cortou-se uma sonda nova em duas partes, sendo que uma delas consistia do tubo azul (inlet) mais a sonda e a outra parte era constituída apenas do tubo transparente (outlet) (Figura 11).

O experimento foi realizado com um fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e foram analisadas as concentrações de 25 ng/mL e 50 ng/mL (Figura 39).

Figura 39. Estudo de ligação do composto galoilquínico ao tubo mais sonda e somente ao tubo, testado em duas concentrações (25 e 50 ng/mL).

Com esses resultados, verificou-se a inscontância da ligação dos compostos galoilquínico nas diferentes partes da sonda, pois em alguns momentos a ligação estava ocorrendo no tubo e em outros momentos ocorria no tubo mais sonda. Porém, neste mesmo experimento foi analisada a concentração da substância galoilquínico na seringa no início e no final do estudo. Assim, foi constatado que a ligação podia estar ocorrendo em uma das seringas utilizadas (Tabela 19).

Tabela 19. Avaliação da concentração da substância galoilquínico na seringa no início e no final do experimento para a concentração de 50 ng/mL .

Seringa	Conc. Inicial (ng/mL)	Conc. Final (ng/mL)
TUBO	52,2	52,3
TUBO + SONDA	48,1	4,2

Como observado na Tabela 19, a concentração inicial da solução de aproximadamente 50 ng/mL de galoilquínico variou muito para a seringa que estava conectada ao tubo + sonda, uma vez que no início a concentração foi de 48,1 ng/mL e ao final foi de 4,2 ng/mL . Assim, foi possível compreender que as variações nos resultados anteriores poderiam ser provenientes da ligação do composto galoilquínico à seringa.

Para se ter certeza da origem do problema diversos testes foram refeitos e alguns outros foram realizados. Entretanto, não foi possível chegar a uma conclusão do local em que o composto galoilquínico poderia estar se aderindo. Dessa maneira, foi considerado substituir o teste de microdiálise renal pelo teste de distribuição tecidual para avaliar a quantidade de galoilquínico presente no rim.

4.8.2 Extração plasmática

Já era esperado que metanol fosse o melhor solvente extrator para o galoilquínico, uma vez que durante a partição do extrato de *C. langsdorffii* tal composto foi mais bem extraído em solventes polares (Tabela 20).

Nos testes de extração em plasma realizados, verificou-se que o composto galoilquínico apresentou melhor eficiência de extração quando a solução extraída foi analisada diretamente. Entretanto, foi constatado que as amostras diluídas 1 : 1 com água ácida apresentaram pouca diferença percentual. Além disso, suas curvas de calibração ficaram mais lineares e as bandas cromatográficas mais definidas, certamente devido à presença de ácido. Dessa maneira, optou-se por utilizar o método de extração com metanol, seguido de diluição com água acidificada 0,1% com ácido fórmico.

Tabela 20. Eficiência de extração de galoilquínico do plasma (%).

Métodos de extração*	Eficiência de extração de galoilquínico do plasma (%)
Acetonitrila 100%	85,4%
Metanol 100%	92,8%
Acetonitrila (diluição água ácida 1 : 1)	78,3%
Metanol (diluição água ácida 1 : 1)	84,3%
Acetonitrila (diluição água ácida 1 : 5)	42,6%
Metanol (diluição água ácida 1 : 5)	47,2%

* Todos os métodos estão descritos detalhadamente na seção 3.11.3.

4.8.3 Validação de método analítico em plasma

Após definir o melhor método de extração plasmática, o método analítico em UFLC-MS/MS foi validado. Para isso, a calibração das substâncias galoilquínico (m/z 523) e do padrão interno AF (m/z 193) foi realizada no modo negativo por rampeamento dos parâmetros. Os íons fragmentos $[MH]^+$ de 523 e 193 com maior intensidade foram selecionados (Figura 40). O modo MRM foi utilizado para monitorar os fragmentos de íons, o que tornou o método mais seletivo. A otimização dos parâmetros para cada composto foi alcançada para obter a maior intensidade do sinal, conforme descrito na Tabela 21.

Figura 40. Seleção de íons fragmentos $[MH]^-$ de 523 e 193 com maior intensidade.

Tabela 21. Otimização dos parâmetros, *declustering potential*, *collision energy*, *entrance potential* e *collision exit potential* do galoilquínico e padrão interno (ácido ferúlico), em modo negativo.

Analito	Transição	<i>Declustering potential</i>	<i>Collision energy</i>	<i>Entrance potential</i>	<i>Collision exit potential</i>
Galoilquínico	523,05 $\rightarrow$ 339	-185	-28	-10	-19
	523,05 $\rightarrow$ 183	-185	-42	-10	-11
Ácido ferúlico	193,15 $\rightarrow$ 134	-105	-24	-10	-7
	193,15 $\rightarrow$ 178	-105	-18	-10	-9

A temperatura foi estabelecida em 600°C e a voltagem do *ion spray* em -4500 v. Os parâmetros *curtain gas* (CUR), *collision-activated dissociation gas* (CAD), *nebulizer gas* (GS1) e *turbo heater gas* (GS2) foram estabelecidos em 30, 8, 55 e 55, respectivamente.

O programa *Analyst* versão 1.6.2 (AB Sciex) foi utilizado para obtenção dos dados e quantificação.

As curvas de calibração foram lineares e tiveram R^2 de pelo menos 0,998. As curvas foram construídas utilizando-se cinco padrões de calibração. A porcentagem de precisão variou entre 0,87% - 10,31%, enquanto a exatidão variou menos que 15%, quando os padrões de calibração foram comparados as concentrações nominais (95,92% - 113,64%), como apresentado na Tabela 22.

Tabela 22. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) das concentrações observadas de galoilquínico extraído do plasma ($N=6$).

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração observada (ng/mL , Média $\pm$ DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
1,5	1,57 $\pm$ 0,03	2,18	104,69
10	11,36 $\pm$ 0,69	6,08	113,64
25	26,71 $\pm$ 1,84	6,89	106,84
50	50,27 $\pm$ 5,18	10,31	100,54
100	96,07 $\pm$ 3,25	3,38	96,07
250	239,80 $\pm$ 8,50	3,54	95,92
500	507,23 $\pm$ 4,42	0,87	101,45

As porcentagens de precisão e exatidão nos testes de variação intra-dia e inter-dia estão apresentadas nas Tabelas 23 e 24, respectivamente. Os resultados indicam que todos os valores encontram-se dentro da faixa aceitável.

Tabela 23. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste intra-dia para galoilquínico extraído do plasma ($N=6$).

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração observada (ng/mL , Média $\pm$ DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
1,5	1,69 $\pm$ 0,17	10,16	112,47
4,5	4,20 $\pm$ 0,19	4,47	93,40
150	141,96 $\pm$ 3,70	2,60	94,64
450	431,83 $\pm$ 13,99	3,24	95,96

Tabela 24. Valores de precisão (CV%) e exatidão (%) no teste inter-dia para galoilquínico extraído de plasma ($N=6$).

Concentração nominal (ng/mL)	Concentração observada (ng/mL , Média $\pm$ DP)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
1,5 (LIQ)			
Dia 1	1,76 $\pm$ 0,14	7,88	117,44
Dia 2	1,71 $\pm$ 0,18	10,50	113,90
4,5 (CQB)			
Dia 1	4,10 $\pm$ 0,14	3,33	91,21
Dia 2	4,27 $\pm$ 0,20	4,68	94,99
150 (CQM)			
Dia 1	143, 61 $\pm$ 3,99	2,78	95,74
Dia 2	140,63 $\pm$ 3,02	2,15	93,76
450 (CQA)			
Dia 1	427,67 $\pm$ 13,80	3,23	95,04
Dia 2	440,00 $\pm$ 8,89	2,02	97,78

Como pode ser observado, todo o método analítico foi aprovado pelos critérios estabelecidos pelo FDA (FDA, 2011). Assim, os testes farmacocinéticos *in vivo* puderam ser realizados.

4.8.4 Modelo experimental *in vivo*

Um total de cinco animais por grupo, pesando cerca de 300 g, foram testados farmacocineticamente frente ao galoilquínico. Inicialmente os animais foram anestesiados e seus reflexos foram verificados antes de dar início à cirurgia de canulação da artéria carótida. Em seguida, o galoilquínico foi administrado por via intravenosa nas concentrações (1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2,0 mg/kg), dando início as coletas de sangue nos tempos previamente estipulados.

O estudo piloto foi crucial como maneira de verificar a faixa de concentração que deveria ser utilizada para validação dos métodos em plasma. Além disso, também contribuiu para a definição do tempo de coleta das amostras, verificando-se que 3 h foi o correspondente a três meias vidas da substância, tempo suficiente para obtenção das informações necessárias.

4.8.5 Avaliação farmacocinética

O perfil do plasma total das concentrações do galoilquínico versus tempo, após administração das doses 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2,0 mg/kg em ratos Wistar, estão demonstrados na Figura 41. As concentrações do plasma total foram calculadas utilizando a Equação 23. O modelo farmacocinético que mais bem descreveu os dados foi o de dois compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten (FUJIMIYA; YAMAOKA & FUKUI, 1989), que se ajustou para todos os grupos avaliados com diferentes concentrações do galoilquínico. Os valores de MSC variaram entre 2,22 e 3,24 e o coeficiente de correlação variou entre 0,97 e 0,99.

Através do modelo desenvolvido e utilizando os dados cinéticos dos três grupos de animais, foi possível determinar a constante de Michaelis-Menten (K_m), que foi de 541,19 $\mu\text{g/mL}$ e da velocidade de máxima de eliminação (V_m), que foi de 3390,8 $\mu\text{g/h}$, em média.

Os parâmetros farmacocinéticos estimados pela modelagem individual do plasma, estão resumidos na Tabela 25. A média das $ASC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g h/mL}$) plasmáticas aumentaram $113,15 \pm 26,08$; $289,76 \pm 84,60$ e $386,1 \pm 151,0$, respectivamente para as concentrações de 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2,0 mg/kg, demonstrando comportamento de farmacocinética não-linear.

Diferentes fatores podem estar atrelados a cinética não linear, sendo que alguns deles são saturação de transportadores, enzimas ou da ligação a proteínas (GABRIELSSON & WEINER, 2006). O princípio da sobreposição, em que alterações nas doses administradas modificam proporcionalmente alguns parâmetros farmacocinéticos, também não é característico das substâncias com cinética não linear (STORPIRTS *et al.*, 2011).

Figura 41. Perfis de concentração *versus* tempo de quercitrina em plasma após administração por via intravenosa de 1 mg/kg (●), 1,5 mg/kg (◆) e 2,0 mg/kg (▲). As linhas representam as concentrações previstas por modelo de dois compartimentos em plasma (—). Os pontos representam a média $\pm$ DP ($N=5$).

Tabela 25. Parâmetros farmacocinéticos após administração de dose única de galoilquínico 1 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2 mg/kg em ratos Wistar ($N=5$)

Parâmetros	Galoilquínico					
	Não compartimental (Média $\pm$ DP)	2 Compartimentos (Média $\pm$ DP)	Não compartimental (Média $\pm$ DP)	2 Compartimentos (Média $\pm$ DP)	Não compartimental (Média $\pm$ DP)	2 Compartimentos (Média $\pm$ DP)
Dose (mg/kg)	1,0	1,0	1,5	1,5	2,0	2,0
ASC _{0-∞} (ng h/mL)	113,15 $\pm$ 26,08	103,85 $\pm$ 23,90	289,76 $\pm$ 84,60	273,7 $\pm$ 81,6	386,1 $\pm$ 151,0	363,6 $\pm$ 142,32
CL (L/h/kg)	10,55 $\pm$ 1,88	10,01 $\pm$ 2,07	5,87 $\pm$ 2,01	6,00 $\pm$ 2,24	6,27 $\pm$ 0,33	6,56 $\pm$ 3,63
t _{1/2} (h)	1,33 $\pm$ 0,30	0,97 $\pm$ 0,20	0,74 $\pm$ 0,27	0,85 $\pm$ 0,17	0,71 $\pm$ 0,23	0,77 $\pm$ 0,28
Vdss (L/kg)	6,90 $\pm$ 0,81	6,93 $\pm$ 1,22	3,52 $\pm$ 0,78	3,79 $\pm$ 0,74	2,81 $\pm$ 1,30	3,25 $\pm$ 1,54
λ (h ⁻¹)	0,54 $\pm$ 0,17		1,00 $\pm$ 0,27		1,06 $\pm$ 0,37	
TRM _{iv} (h)	0,66 $\pm$ 0,11		0,62 $\pm$ 0,13		0,46 $\pm$ 0,09	

4.9 Distribuição tecidual do galoilquínico e da quercitrina

A avaliação da distribuição tecidual foi realizada em virtude de alguns resultados obtidos no decorrer do presente trabalho. Um dos motivos foi a ligação do galoilquínico à sonda de microdiálise, impossibilitando a quantificação da fração livre dessa substância no rim. Outra razão foi o fato de ter encontrado treze vezes mais quercitrina no rim do que no plasma após administração intravenosa, levando-nos a buscar outra técnica para confirmar esse resultado.

Diversos tecidos foram coletados durante a execução da técnica. Porém, o tecido de interesse no presente trabalho foi o rim. Assim, todos os demais tecidos encontram-se congelados em *freezer* -80°C para posterior análise, se necessário. A Figura 42 demonstra o perfil farmacocinético plasmático e o tecidual, após administração por via intravenosa de dose única de 1 mg/kg do galoilquínico e de quercitrina, em ratos Wistar.

Figura 42. Perfis de concentração *versus* tempo do galoilkínico e da quercitrina em plasma (■) e no tecido renal (●). A linha representa a concentração predita pelo modelo de dois compartimentos em plasma (---).

O resumo dos parâmetros farmacocinéticos no tecido renal e no plasma estão descritos na Tabela 26. Tanto para o galoilquínico quanto para a quercitrina, a concentração mais alta quantificada nos tecidos foi logo no primeiro instante, cinco minutos após a administração das substâncias.

Tabela 26. Parâmetros farmacocinéticos estimados no tecido renal e no plasma, após administração do galoilquínico e da quercitrina 1 mg/kg, por via intravenosa, em ratos Wistar. (N=3 animais/ tempo).

	Amostra	C _{max} (µg/g)	t _{max} (h)	ASC _{0-t} (µg h/g)	Razão Tecido/Plasma
Galoilquínico	Rim	15,84	0,083	1,24	12,4
	Plasma	0,61	0,083	0,1	
Quercitrina	Rim	4,02	0,083	3,32	23,7
	Plasma	0,38	0,083	0,14	

Esta é a primeira vez em que se realiza o estudo das substâncias quercitrina e galoilquínico no tecido renal e, pode-se constatar que ambas as substâncias apresentam alta afinidade pelos rins, imediatamente após serem administradas por via intravenosa. Tal característica é importante para o presente trabalho, pois deve-se considerar que para o tratamento da urolitíase, tais substâncias precisam chegar até o seu local de ação, de preferência na forma livre (não ligada a proteínas) (SCHIMIDT; GONZALEZ & DERENDORF, 2010).

Todavia, é importante ressaltar que o cálculo da concentração no tecido pode ser impreciso quando a técnica de distribuição tecidual é empregada, levando a uma superestimação das concentrações no fluido extracelular, uma vez que nos homogenatos de tecidos estão presentes as formas livres e ligadas à proteínas das substâncias nos órgãos (ARAÚJO *et al.*, 2013).

4.10 Estudos farmacocinéticos do extrato bruto de *C. langsdorffii* e da fração butanólica.

Uma vez que os parâmetros farmacocinéticos haviam sido estabelecidos para quercitrina e galoilquínico por via intravenosa, buscou-se avaliar tais parâmetros por via oral. Dessa maneira, inicialmente o extrato de *C. langsdorffii* e a fração butanólica foram testados na concentração de 20 mg/kg para cada animal ($N=4$ para cada amostra). Entretanto, nenhuma das duas substâncias foram encontradas no plasma. Assim, testou-se administrar por via oral a substância pura de quercitrina nas concentrações 10 mg/kg e 50 mg/kg ($N=4$ para cada dose), mas mesmo assim não foi possível detectar a quercitrina e nem alguns possíveis metabólitos.

Segundo Bhattaram *et al.* (2002), quercitrina ao ser administrada é rapidamente hidrolizada em sua aglicona (quercetina). Dessa maneira, seria plausível acreditar que toda quercitrina glicosilada se hidrolizaria e o mesmo conjugado de quercetina estaria presente no plasma. Porém, resultados demonstram que diferentes quantidades de conjugados de quercetina foram encontradas no plasma de acordo com a quercetina glicosilada administrada.

Em um estudo em ratos Wistar foi relatado que após a administração oral do extrato de *Cortex Juglandis*, algumas substâncias foram detectadas no plasma, dentre elas o ácido gálico, quercitrina e quercetina e, suas respectivas meias-vidas foram 11,11 h, 6,20 h e 11,09 h (SUN *et al.*, 2014). O valor de meia vida relatado para quercitrina chega a ser seis vezes maior do que o encontrado no presente trabalho após administração intravenosa. Em contra partida, em um estudo realizado em cães foi encontrado a mesma meia vida para quercitrina após administração intravenosa do extrato de *Polygonum orientale* (HUANG *et al.*, 2014).

É possível afirmar que pouco se sabe sobre a farmacocinética da quercitrina apesar de existirem muitas publicações acerca do assunto. Entretanto, muitas das informações que constam na literatura, apresentam dados inconsistentes e contraditórios (BHATTARAM, *et al.*, 2012). Muito menos se sabe sobre a farmacocinética do galoilquínico, principalmente do estudado no presente trabalho, por tratar-se de um composto inédito.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Verificou-se que o perfil metabólico do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* é bastante complexo e, a partir do seu fracionamento isolaram-se os flavonoides: quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) e canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina) pela técnica de HSCCC seguida de purificação por CLAE-preparativa. Isolaram-se também dois ácidos galoilquínicos: ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico e ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico por *Sephadex*, seguida de purificação por CLAE-preparativa.

Para realização dos testes farmacocinéticos, métodos analíticos para as substâncias quercitrina e ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico foram validados de acordo com as recomendações do FDA, em matriz de plasma e de microdialisados. Na calibração da sonda de microdiálise *in vitro*, quercitrina apresentou por retrodiálise uma recuperação relativa em torno de 57,9%. Todavia, a recuperação do galoilquínico não pode ser calculada, visto que esta substância se ligou a alguma parte do sistema de microdiálise.

De acordo com os dados plasmáticos, quercitrina se ajustou ao modelo farmacocinético de dois compartimentos após administração por via intravenosa de 1 mg/kg e, a fração livre de quercitrina encontrada nos rins foi 13 vezes maior do que a concentração livre no plasma. Já o composto galoilquínico se ajustou bem ao modelo de dois compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten, após administração por via intravenosa em três concentrações 1 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2 mg/kg.

No estudo de distribuição tecidual foi demonstrado que tanto quercitrina quanto o galoilquínico apresentavam alta penetrabilidade nos rins. Entretanto, com relação ao perfil farmacocinético do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* e da fração butanólica após administração por via oral, verificou-se que não foi possível detectar nenhum dos isolados no plasma.

Frente aos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que quercitrina e galoilquínico são substâncias que apresentam rápida eliminação e que foram encontrados em grande quantidade no tecido renal, podendo-se inferir que tais substâncias estão relacionadas à atividade antilitiásica descrita para o extrato das folhas de *C. langsdorffii*.

Fluxograma

6. FLUXOGRAMA

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, O. M. & MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Flórida: Taylor & Francis, 2006, p. 1212.
- ARAUJO, B. V.; SILVA, C. F.; HAAS, S.E.; DALLA COSTA, T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 876 - 881, 2008.
- ARAUJO, B. V.; SILVA, C. F.; HAAS, S. E.; DALLA COSTA, T. Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida* sp.-infected Wistar rats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p.154-159, 2009.
- ARAUJO, B. V.; LAUREANO, J. V.; GRÜNSPAN, L. D.; DALLA COSTA, T.; TASSO, L., Validation of an efficient LC-microdialysis method for gemifloxacin quantitation in lung, kidney and liver of rats. **Journal of Chromatography B**, v. 919-920, p. 62-66, 2013.
- BENET, L. Z.; WILLIAMS, R. L. **Design and optimization of dosage regimens: pharmacokinetic data**. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W., NIES, A. S. The pharmacological basis of therapeutics. New York: Pergamon, 1990, p.1650–1735.
- BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. **Phytomedicine**, v. 9, p. 1 - 33, 2002.
- BOURNE, D. W. A. **Mathematical modeling of pharmacokinetic data**. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1995, p. 1028.
- BRANCALION, A. P. S.; OLIVEIRA, R. B.; SOUSA, J. P. B.; GROPPPO, M.; BERRETA, A. A.; BARROS, M. E.; BOIM, M. A.; BASTOS, J. K. Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urological Research**, v. 40, p. 475-481, 2012.
- CHAUURASIA, C. S.; MÜLLER, M.; BASHAW, E. D.; BENFELDT, E.; BOLINDER, J.; BULLOCK, R.; BUNGAY, P. M.; DELANGE, E. C. M.; DERENDORF, H.; ELMQUIST, W. F.; UDENAES, M. H.; JOUKHADAR, C.; KELLOGG JR., D. L.; LUNTE, C. E.; NORDSTROM, C. H.; ROLLEMA, H.; SAWCHUK, R. J.; CHEUNG, B. W. Y.; SHAH, V. P.; STAHL, L.; UNGERSTEDT, U.; WELTY, D. F.; YEO, H. AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 1014-1025, 2007.
- CHOOOLUCK, K.; SINGH, R. P.; SATHIRAKUL, K.; DERENDORF, H. Dermal pharmacokinetics of terpinen-4-ol following topical administration of *Zingiber cassumunar* (plai) Oil. **Planta Medica**, v. 78, p. 1761- 1766, 2012.
- DURNER, L.; BOURDOUMIS, A.; BUCHHOLZ, N.; Metabolic syndrome and urolithiasis. **Comptes Rendus Chimie**, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2015.04.002>

FDA, **Guidance for Industry**, Bioanalytical Method Validation, May 2001.

FUJIMIYA, T.; YAMAOKA, K.; FUKUI, Y. Parallel First-order and Michaelis-Menten elimination kinetics of ethanol. Respective role of alcohol dehydrogenase (ADH), Non-ADH and First-order pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 249, p. 311-317, 1989.

GABRIELSSON, J. & WEINER, D. **Pharmacokinetic & Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications**, Suécia: Printografen AB, 2006, 4. ed., p. 1254.

GIBALDI, M. & PERRIER, D. **Pharmacokinetics**, Nova Iorque: Marcel Dekker, 1989, 2. ed.

GRAHAM, A.; LUBER, S.; WOLFSON, A. B. Urolithiasis in the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v.29, p. 519-538, 2011.

HUANG, Y.; CHEN, H.; HE, F.; ZHANG, Z-R.; ZHENG, L.; LIU, Y.; LAN, Y-Y., LIAO, S-G.; LI, Y-J, WANG, Y-L. Simultaneous determination of human plasma protein binding of bioactive flavonoids in *Polygonum orientale* by equilibrium dialysis combined with UPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, p. 376-381, 2013.

HUANG, Y.; ZHANG, P.; HE, F.; ZHENG, L.; WANG, Y.; WU, J. Simultaneous determination of four bioactive flavonoids from *Polygonum orientale* L. in dog plasma by UPLC–ESI-MS/MS and application of the technique to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B**, v. 957, p. 96-104, 2014.

INDEX KEWENSIS, suppl. XX; Claredon Press: Oxford, 1996.

INPE. INPE apresenta taxa de desmatamento consolidada do PRODES 2014. Disponível em: < <http://www.inpe.br/noticias>>. Acesso em: 02 Jan. 2016.

ITO, N. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p.145-168, 2005.

LIMA, M. E.; FORTES-DIAS, C. L.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Toxinology in Brasil: A big challenge for a rich biodiversity. **Toxicon**, v. 56, p. 1084-1091, 2010.

LOOS, W. J.; ZAMBONI, W. C.; ENGELS, F. K.; BRUIJN, P.; LAM, M. H.; WIT, R.; VERWEIJ, J.; WIEMER, E. A. C. Pitfalls of the application of microdialysis in clinical oncology: Controversial findings with docetaxel. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 288-294, 2007.

MARCOLIN, N. **Uma boa relação: Dicionário anônimo botânico do século XIX tinha forte ligação com a química**. Pesquisa FAPESP, v. 204, p. 72-73, 2013.

MAST. A química e o dicionário anônimo de botânica. Disponível em: <www.mast.br>. Acesso em: 02 Mai. 2013.

- MEHTA, P.; SHAH, R.; LOHIDASAN, S.; MAHADIK, K. R. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants - A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, p. 207-227, 2015.
- MOTTA, E V. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii***. 2014. 212 f. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Produtos Naturais e Sintéticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- NOGUEIRA, M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; Flavonoids and Methoxy-galloylquinic. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.63, p.6939-6945, 2015.
- NUGROHO, A.; CHOI, J.; PARK, J.; LEE, K.; CHA, B.; PARK, H. Two new flavonols glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their *in vitro* free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities. **Planta Medica**, v. 75, p. 364-366, 2009.
- OLIVEIRA, R. B.; COELHO, E. B.; RODRIGUES, M. R.; COSTA-MACHADO, A. R. M.; SOUSA, J. P. B.; BERRETTA, A. A.; BASTOS, J. K. Effect of the *Copaifera langsdorffii* Desf. leaf extract on the ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013. doi: 10.1155/2013/131372
- OLIVEIRA, V B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170-179, 2012.
- PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 62, p. 73-78, 1998.
- PURI, R.; WONG, T. C.; PURI, R. K. ¹H- and ¹³C-NMR Assignments and Structural Determination of a Novel Glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 587-596, 1994.
- RODRIGUES, T. M.; TEIXEIRA, S. P.; MACHADO, S. R. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–Caesalpinioideae). **Flora**, v. 206, p. 585-594, 2011.
- SCHMIDT, S.; GONZALEZ, D.; DERENDORF, H. Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 1107-1122, 2010.
- SHI, S.; MA, Y.; ZHANG, Y.; LIU, L.; LIU, Q.; PENG, M.; XIONG, X. Systematic separation and purification of 18 antioxidants from *Pueraria lobata* flower using HSCCC target-guided by DPPH–HPLC experiment. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 225-233, 2012.
- SOUZA, A. B.; MARTINS, C. H. G.; SOUZA, M. G. M.; FURTADO, N. A. J. C.; HELENO, V. C. G.; DE SOUSA, J. P. B.; ROCHA, E. M. P.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.;

- VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* desf. Against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 215-220, 2011.
- STORPIRTS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- SUN, Z.; ZHAO, L.; ZUO, L.; QI, C.; ZHAO, P.; HOU X. A UHPLC–MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids, gallic acid and 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of Cortex Juglandis Mandshuricae extract. **Journal of Chromatography B**, v. 958, p. 55 - 62, 2014.
- TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Análise química para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, p. 236-240, 2004.
- THOMAS, B.; HALL, J. Urolithiasis. **Renal and Urology**, v. 23, p.129-133, 2005.
- TORRES, B. G. S.; UCHÔA, F. D. T.; PIGATTO, M. C.; AZEREDO, F. J.; HAAS, S. E.; DALLEGRAVE, E.; CANTO, R. F. S.; EIFLER-LIMA, V. L.; COSTA, T. D. Pre-clinical pharmacokinetics and acute toxicological evaluation of a monastrol derivative anticancer candidate LaSOM 65 in rats. **Xenobiotica**, v. 44, p. 254-263, 2014.
- VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.
- VEIGA JR., V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of opaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Haynea comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248-254, 2007.
- VELÁZQUEZ, N.; ZAPATA, D.; WANG, H. S.; WIENER, J. S.; LIPKIN, M. E.; ROUTH, J. C. Medical expulsive therapy for pediatric urolithiasis: Systematic review and metaanalysis. **Journal of Pediatric Urology**, v. 11, p. 321-327, 2015.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996, 2. ed., p. 368.
- YAN, Z.; LI, T.; LV, P.; LI, X.; ZHOU, C.; YANG, X. Sensitive and reliable multianalyte quantitation of herbal medicine in rat plasma using dynamic triggered multiple reaction monitoring. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 22-31, 2013.
- ZHANG, Q.; WU, D.; WU, J.; OU, Y.; MU, C.; HAN, B.; ZHANG, Q. Improved blood–brain barrier distribution: Effect of borneol on the brain pharmacokinetics of kaempferol in rats by *in vivo* microdialysis sampling. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, p. 270 - 277, 2015.

Apêndices

Apêndice 1. Espectro de RMN de ^1H do composto quercitrina em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

Apêndice 2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto quercitrina em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

Apêndice 3. Espectro de RMN de ^1H do composto afzelina em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

Apêndice 4. Espectro de RMN de ^{13}C do composto afzelina em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

Apêndice 5. Espectro de RMN de ^1H do composto (1), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 6. Espectros de RMN de ^{13}C do composto (1), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 7. Espectros de RMN de DEPT-135 do composto (1), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD₃OD (125 MHz).

Apêndice 8. Mapas de contorno de HSQC do composto (1), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD₃OD (500 MHz).

Apêndice 9. Mapas de contorno de HMBC do composto (1), ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD₃OD (500 MHz).

Apêndice 10. Espectro de RMN de ^1H do composto (2), ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD_3OD (500 MHz).

Apêndice 11. Espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 do composto (2), ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD_3OD (125 MHz).

Apêndice 12. Espectros de RMN de DEPT-135 do composto (2), ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD₃OD (125 MHz).

Apêndice 13. Mapas de contorno de HSQC do composto (2), ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD₃OD (500 MHz).

Apêndice 14. Mapas de contorno de HMBC do composto (2), ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico em CD₃OD (500 MHz).

Anexos

Anexo 1. Carta de Aprovação do *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) da Universidade da Flórida

6/10/2014

<https://my.iacuc.ufl.edu/UFL/Doc/0/NKL48J5MTV0KP00RN08OV/8723E/fromString.html>

Notification of Initial Approval

From: [Michael Katovich](#)
To: [Hartmut Derendorf](#)
CC: [Juliana da Costa](#)
Re: IACUC Protocol #: [201408355](#)

Title: Pharmacokinetic evaluation of secondary metabolites from the leaves of *Copaifera langsdorffii* Desf.

The above referenced study was APPROVED on 4/17/2014. This approval has been granted by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the University of Florida. Animals may be purchased and used for the above project and housed in any IACUC approved facility. Any significant change in this approved animal project must occur through a modification procedure and be approved by the IACUC before instituting the change. You are required to return to this site 60 days prior to the Expiration Date of 4/16/2015 and file a Continuation. If you fail to submit your Continuation and have it approved before this date, your study will automatically expire, and you will no longer be able to work with these animals. The study can only be reactivated with submission and approval of a Continuation.

If this IACUC protocol pertains to a sponsored research project it is the responsibility of the PI to forward a copy of IACUC approval and associated PeopleSoft Project number to the Office of Award Administration via Fax at (352)392-4522 or email at ufawards@ufl.edu

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads 'Michael J. Katovich'.

[Michael Katovich](#)

IACUC Chair

**Institutional Animal Care & Use Committee
PO Box 100142**

Anexo 2. Carta de Aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29547

Título: AVALIAÇÃO FARMACOCINETICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DAS FOLHAS DE COPAIFERA LANGSDORFFII DESF

Vigência: 01/11/2015 à 31/07/2016

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

BIBIANA VERLINDO DE ARAUJO - coordenador desde 01/11/2015

Equipe Externa:

Juliana de Carvalho da Costa - pesquisador desde 01/11/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de utilização de 42 ratos machos Wistar de 250 + 10 g, provenientes do CREAL da UFRGS, Porto Alegre, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 20 de Janeiro de 2016

BRUNO CASSEL NETO
Vice Pró-Reitor de Pesquisa