

UNIVERSIDADE
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

OK LILACS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

**Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em
extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq.
administrado a ratos Sprague Dawley**

KÊNIA ROCHA REZENDE

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientadora:

Prof^a. Dr^a Sílvia B. de Moraes Barros

SÃO PAULO

2002

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

**Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em
extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq.
administrado a ratos Sprague Dawley**

Kênnia Rocha Rezende

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientadora:

Profª. Drª Sílvia B. de Moraes Barros

SÃO PAULO

2002

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004513

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Rezende, Kênnia Rocha
R467b Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. administrado a ratos Sprague Dawley / Kênnia Rocha Rezende. -- São Paulo, 2002.
74p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Barros, Sílvia Berlanga de Moraes

1. Farmacocinética 2. Produtos naturais : Farmacognosia
3. Produtos naturais : Química orgânica I. T. II. Barros, Sílvia Berlanga de Moraes, orientador.

615.7f CDD

KÊNIA ROCHA REZENDE

“Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. administrado a ratos Sprague Dawley”

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor.

Profª. Drª. Sílvia Berlanga de Moraes Barros

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Prof. Dr. Manoel Jorge Kato

Profª. Drª. Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo, 19 de Abril de 2002

*Aos meus pais,
Maria Luiza e Arnaldo pelo exemplo de força e determinação*

*Aos meus irmãos
Kélia e André, com carinho.*

Agradecimentos

A orientadora Sílvia Berlanga de Moraes Barros pela oportunidade concedida ,

Ao professor Hartmut Derendorf da University of Florida pelo ensino em Farmacocinética,

Ao professor Massuo Jorge Kato do Instituto de Química pela colaboração em Fitoquímica,

Ao professor Mário Politi do Instituto de Química pelo apoio de sempre,

Aos amigos de longo convívio Fernando e Noemi ,

Ao Fábio Weber, pelo positivismo e atenção especial dedicada,

Ao Sr Acácio A. S. Lima da empresa Ophthalmos pelo fornecimento de HP- β -CD,

Aos colegas do Laboratório de Patologia:

Alberto, Cris, César, Gabriel, Henrique, Leandra, Paula, Pekey, Sônia e Tânia

Aos colegas do Department of Pharmaceutics, University of Florida: Cioli, Virna, Edgar,

Pyn, Arya e Julia,

Ao pessoal das secretarias, em especial à Marcinha e Jim,

À FAPESP/CAPES pelos auxílios e bolsas concedidas,

A todos aqueles que alguma maneira possam ter auxiliado no desenvolvimento deste trabalho,

Meu muito obrigada!

*“O pensador investiga as leis que regem os fenômenos;
seu esforço se concentra em penetrar, pelo pensar, os
fenômenos que a observação lhe transmite.
No entanto, somente depois de fazer do conteúdo do
mundo o conteúdo de nosso pensamento é que
reencontramos a conexão da qual nós mesmo nos
desprendemos.”*

Rudolf Steiner.

RESUMO

O 4-nerolidilcatecol é o metabólito secundário mais abundante do extrato hidroalcoólico liofilizado de raízes de *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae), representando 21,5% deste. Doses únicas de 10 mg/kg da substância isolada foram administradas via intravascular e oral a ratos Sprague Dawley, pesando entre 300-325 g. Paralelamente à obtenção dos parâmetros farmacocinéticos, realizou-se a avaliação da biodisponibilidade do extrato de raízes com a administração de dose oral única de 100 mg/kg. A quantificação das concentrações plasmáticas foi realizada por CLAE-EM/EM, com limite de quantificação de 2,5 ng/mL. O coeficiente de variação da precisão intraensaio e interensaio variou entre 2,9-10,1 e 4,2-16,3 %, respectivamente. A exatidão do método oscilou entre 84,4 e 92,4 %. Os parâmetros farmacocinéticos foram gerados no programa Kinetica 2000™ (Innaphase), a partir de dados experimentais. Para administração intravascular do 4-nerolidilcatecol (10 mg/kg) obteve-se um volume de distribuição de 0,47 litro, meia-vida ($t_{1/2c}$) e ($t_{1/2\beta}$) de 6,08 e 47,63 min, respectivamente. A área sob a curva de concentração plasmática vs tempo (AUC) foi de 187,06 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$ e o "clearance" de 53,46 mL/min. O pico de concentração plasmática máxima (C_{max}) alcançado foi de 34,90 ng/mL, com t_{max} de 23 min após administração oral do 4-NRC isolado. Este apresentou biodisponibilidade oral média de 2,7 %. Valor próximo foi obtido para o extrato de *Pothomorphe umbellata* com biodisponibilidade de 1,1 %, ou seja, um terço do valor obtido para a substância isolada. Boa correlação entre os dados teóricos e experimentais foi obtida. Tais dados estão de acordo com o perfil de drogas lipossolúveis, as quais apresentam-se amplamente distribuídas e com baixos níveis plasmáticos.

ABSTRACT

4-nerolidylcatechol (4-NRC) is the major constituent of a Piperaceae shrub, *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. Standardization of dry hydroalcoholic roots extract showed 21,5% of 4-NRC contents. The isolated compound was administrated intravenously or orally to rats Sprague Dawley at 10 mg/kg single dose. The crude extract was given at 100 mg/kg. Both pure compound and extract was dissolved in 30 % hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The purpose of this work was to investigate the pharmacokinetic profile and the bioavailability of 4-NRC after oral administration. The assesment of plasma concentration was done with CLAE-EM/EM and the quantification limit was found to be 2.5 ng/mL. Linear response was done between 2.5-100 ng/mL and correlation coefficients were not lower than 0.98. Between batch and within-batch variation coefficient ranged from 2,9-10,1 and 4,2-16,3 %, respectively. Accuracy showed values between 84.4-92.4%. The pharmacokinetic parameters following intravenous and oral administration were calculated using Kinetica 2000™ (Innaphase). Reported values for *i.v.* bolus volume of distribution was 0.47 L, and 6.08 min for elimination half-life ($t_{1/2c}$). Area under the curve (AUC) was 187.06 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$ and total body clearance (CL) measured was 53.46 mL/min. The absorption peak plasma concentration (C_{max}) was 34.90 ng/mL, reached after 23 min after oral dose administration. The calculated bioavailability for 4-NRC was 2,7%. Despite higher dose of 4-NRC in roots' extract (21.5 mg/kg), its bioavailability was lower (1.1%). In fact, it was around one third of that one for pure compound. The data could be described with good fits indicating the drug is well distributed and highly metabolized. Plasma levels were found to be low as expected for lipophilic phenolic drug.

SUMÁRIO

Símbolos e abrevlaturas.....	I
Índice de tabelas	II
Índice de figuras	IV
Prefácio.....	VI

CAPÍTULO 1

1- Obtenção e análise quantitativa do 4-NRC em <i>Pothomorphe umbellata</i>	01
1.1- Introdução.....	02
1.2- Experimental.....	05
1.2.1- Material e Instrumentos utilizados.....	05
1.2.2- Coleta e processamento da espécie vegetal.....	06
1.2.3- Isolamento do 4-nerolidilcatecol a partir do extrato de folhas.....	08
1.2.4- Padronização do extrato hidroalcóolico de raízes.....	09
1.3- Resultados e discussão.....	10
1.4- Referências.....	18

CAPÍTULO 2

2- Validação de metodologia analítica do 4-NRC em CLAE-UV.....	19
2.1-Introdução.....	20
2.2- Experimental.....	21
2.2.1- Material e instrumentos utilizados.....	21
2.2.2- Condições cromatográficas.....	22
2.2.3- Preparo das soluções.....	22
2.2.4- Procedimento de extração em plasma.....	23
2.2.5- Cálculos.....	23
2.3- Resultados e discussão.....	23
2.3.1- Linearidade	24
2.3.2- Eficiência da recuperação em plasma.....	25
2.3.3- Avaliação da estabilidade do 4-NRC.....	28

2.3.4- Associação eritrocitária do 4-NRC medida em tampão fosfato.....	31
2.3.5- Precisão e exatidão das curvas de calibração.....	35
2.3.6- Aplicação do método.....	37
2.4- Referências.....	38

CAPÍTULO 3

3- Validação analítica e avaliação farmacocinética do 4-nerolidilcatecol em CLAE-EM.....	41
3.1- Introdução.....	42
3.2.1- Materiais e instrumentos utilizados.....	43
3.2.2- Condições analíticas.....	45
3.2.3- Preparo das soluções	45
3.2.4- Método de extração	46
3.2.5- Validação do método analítico.....	46
3.2.6- Metodologia de manipulação dos animais.....	48
3.2.7- Modelagem farmacocinética.....	48
3.3- Resultados e discussão	49
3.3.1- Validação do método analítico.....	49
3.3.2- Concentrações plasmáticas de 4-NRC.....	53
3.3.3- Avaliação farmacocinética.....	59
3.3.3.1- Parâmetros farmacocinéticos.....	62
3.3.3.2- Parâmetros farmacocinéticos do 4-NRC.....	64
3.4- Conclusão.....	68
3.5- Referências.....	72
4- Conclusões finais.....	77

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

δ - Deslocamento químico

μ - Unidade de massa

J- Constante de acoplamento

$[\alpha]_D$ - Rotação específica

p.f- Ponto de fusão

t- tripleto

d- dubleto

s- singleto

m- multipletto

dq- duplo quadrupletto

IV- Infravermelho

Hex- Hexano

CLAE-UV-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à detecção Ultravioleta

CLAE/EM/EM Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de

Massas com duplo quadrupolo

APCI- Atmospheric Pressure Chemical Ionization

m/z (X⁻)- Relação massa carga (íon)

RMN ¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio um

RMN ¹³C- Ressonância magnética nuclear de carbono treze

CCs- Curva de calibração

CQs- Controles de qualidade

SUs- Soluções de Uso

SEs- Soluções estoque

AUC- área sobre a curva (Area under the time versus concentration curve)

MRT- Mean Residence Time

C_{max} : Concentração plasmática máxima

T_{max} - Tempo para a concentração plasmática máxima

α - Constante de velocidade de distribuição

β - Constante de velocidade de eliminação terminal

$t_{1/2 c}$ - meia-vida do fármaco no compartimento central

$t_{1/2 \alpha}$ - meia-vida de distribuição do fármaco

$t_{1/2 \beta}$ - meia-vida de eliminação plasmática do fármaco

V_c - Volume do compartimento central

V_{ss} - Volume no estado estacionário ("steady state")

CL- "clearance" ou depuração plasmática

F- Biodisponibilidade (fração da dose que alcança a circulação sanguínea)

LQ- Limite de quantificação

LD- Limite de detecção

DP- Desvio padrão da média

CV- Coeficiente de variação

BHT- 2,6-Di-*terc*-butil-*p*-hidroxitolueno

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente eluotrópico para purificação do 4-nerolidilcatecol em cromatografia radial.....	08
Tabela 2: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para o 4-nerolidilcatecol.....	11
Tabela 3: Avaliação da extração do analito e padrão interno em plasma e água.....	26
Tabela 4: Validação da recuperação do 4-nerolidilcatecol	27
Tabela 5: Estabilidade do analito em sangue total.....	28
Tabela 6: Porcentagem de ligação do 4-NRC na suspensão eritrocitária	31
Tabela 7: Exatidão da recuperação em plasma, por CLAE-UV.....	35
Tabela 8: Dados de precisão e exatidão do método analítico por CLAE-UV.....	34
Tabela 09: Dados de triplicatas de controle de qualidade durante validação do método em CLAE-EM.....	51
Tabela 10: Dados de duplicatas de curvas de calibração durante validação do método em CLAE-EM.....	52
Tabela 11: Curvas de calibração(CCs) e controles de qualidade (CQs) utilizadas na avaliação das amostras de concentração desconhecidas, obtidas após dosagem dos animais.....	55
Tabela 12: Concentrações plasmáticas de 4-NRC após administração intravascular (10 mg/kg) a ratos Sprague-Dawley.....	56
Tabela 13: Concentrações plasmáticas de 4-NRC após administração oral (10 mg/kg) a ratos Sprague-Dawley, em jejum por 15h.....	57
Tabela 14: Concentrações plasmáticas de 4-nerolidilcatecol após administração oral do extrato hidroalcolólico de <i>Pothomorphe umbellata</i> (100 mg/kg) a ratos Sprague-Dawley.....	58
Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos do 4-nerolidilcatecol.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metabólicos secundários de <i>Pothomorphe spp</i>	04
Figura 2: A espécie <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq.....	07
Figura 3: Quantificação do 4-nerolidilcatecol presente no extrato hidroalcolólico de raízes, segundo a curva de linearidade em CLAE-UV.....	12
Figura 4: Espectro de RMN de ¹ H para o 4-nerolidilcatecol (CDCl ₃ , 300 MHz).....	13
Figura 5: Espectro de RMN de ¹³ C para o 4-nerolidilcatecol (CDCl ₃ , 75 MHz).....	14
Figura 6: Cromatograma do extrato padronizado de raízes <i>Pothomorphe umbellata</i> , em CLAE-UV (282 nm)	15
Figura 7: Linearidade do 4-NRC, e da razão 4-NRC/BHT em solução metanólica.....	24
Figura 8: Delineamento do experimento de recuperação do analito e PI	25
Figura 9: Análise do tempo de incubação do 4-NRC na recuperação plasmática.....	29
Figura 10: Estabilidade após 3 ciclos de congelamento/descongelamento	30
Figura 11: Perfil da concentração média de 4-NRC na suspensão celular, em função do tempo de incubação.....	32
Figura 12: Correlação entre a concentração do 4-NRC adicionado e a concentração ligada aos eritrócitos em diferentes concentrações e tempos de incubação.....	32
Figura 13: Concentrações plasmáticas após administração intravascular (IV) de 10 mg/kg 4-NRC em CLAE-UV.....	35
Figura 14: Precisão do método em CLAE-EM/EM.....	50
Figura 15: Exatidão do método em CLAE-EM.....	50
Figura 16: Concentrações plasmáticas de 4-nerolidilcatecol após administração IV (10 mg/kg).....	56
Figura 17: Concentrações plasmáticas de 4-nerolidilcatecol após administração oral (10 mg/kg)	57
Figura 18: Concentrações plasmáticas de 4-nerolidilcatecol após administração oral do extrato hidroalcolólico de raízes de <i>Pothomorphe umbellata</i> (10 mg/kg) e expansão da região do gráfico entre 0-50 min.....	58
Figura 19: Ajuste dos dados de Log Cp X t, após administração intravascular e oral do 4-NRC utilizando KINETICA.....	66
Figura 20: Cromatogramas da curva de calibração em plasma, por CLAE/EM/EM.....	68

Figura 21: Espectro de massas do 4-NRC em CLAE/EM/EM.....	69
Figura 22: Curva de calibração do 4-nerolidilcatecol em plasma, por CLAE-EM/EM....	70

Prefácio

Produtos naturais de origem vegetal são utilizados no tratamento de enfermidades desde primórdios da existência humana. Hipócrates e Galeno detêm os relatos mais antigos, os quais submetem-nos à Grécia e Roma antiga. A primeira compilação das propriedades e usos de plantas medicinais foi realizada pelo grego Dioscórides, em 1 a.C. Conhecida como *Materia Medica de Dioscorides*, esta representou um marco na prática da medicina curativa natural.

Do grego também deriva-se o nome *pharmacognosia*, surgido entre os anos de 1811-1815, sendo que o termo *pharmacon* refere-se a fármaco e *gignosko*, a aquisição de conhecimento (Evans, 1996). A farmacognosia praticada em meados do século passado, caracterizou-se por pertencer ao ramo da farmácia que investiga produtos naturais na sua forma bruta ou derivada como em óleos, ceras, gomas e resinas (Wallis, 1967). Baseado nas atividades científicas do século XX, esta tem sido referida como “a ciência molecular que explora a relação estrutura-atividade de produtos de ocorrência natural como potenciais fármacos” (Bruhn & Bohlin, 1997).

Tal evolução da farmacognosia como ferramenta na busca racional de medicamentos pode ser apontada como um reflexo da prática do herbalismo ressurgido durante o século XX, especificamente no período pós-guerra. Tal modalidade terapêutica, de longa tradição também entre as comunidades dos continentes asiático, africano e sul-americano (Elvin-Lewis, 2001) têm sido aplicada como uma alternativa ao tratamento alopático (Greger, 2001) em decorrência de amplos fatores sociais (Elvin-Lewis, 2001) e econômicos (Chang, 2000). Observa-se uma crescente busca de conhecimento nas “farmacopéias” indígenas (De Smet et al., 1992a) com conseqüente incorporação de medicamentos de origem natural pela indústria farmacêutica (De Smet, 1997).

Mercados anteriormente céticos à medicina natural, como Estados Unidos e Reino Unido, hoje comercializam ampla variedade de produtos naturais derivados de plantas. Nos EUA estes são encontrados sob a denominação de “suplementos alimentares”(Talalay, 2001), com faturamento exponencial anual na cifra de \$ 4.0 bilhões em 2000, contra \$1.5 bilhões de 1994 (Mahady, 2001) (Raiten, 1999). O mesmo perfil de mercado é também observado em alguns países europeus (De Smet et al., 2000).

Paralelamente ao crescimento do mercado consumidor, observa-se um ritmo acelerado na busca de informações sobre química, bioquímica e farmacologia /

farmacocinética de produtos naturais. Nos países europeus já verifica-se amplo controle sobre a segurança e eficácia de ervas medicinais com base em triagens clínicas, descrição de casos e literatura científica (Lavy *et al.*, 2000; Vogel, 1991; Wagner, 1999).

No Brasil, autoridades federais têm buscado a regulamentação da eficácia do uso de fitoterápicos através do Conselho Nacional de Saúde CNS (Resoluções 196/96 e 251/97) embora apenas recentemente, o governo brasileiro tem incentivado a parceria empresa-universidade visando desenvolvimento das pesquisas de produtos fitoterápicos já comercializados (ANVISA RDC 17/2000).

Considerando a pesquisa de potenciais produtos derivados de plantas, observa-se que esta é ainda bastante limitada perante a biodiversidade brasileira. Estima-se que existam 700 mil espécies no inventário botânico mundial, sendo que apenas 250 mil são conhecidas. Destas, apenas uma pequena porcentagem foi fitoquimicamente investigada, e uma parcela ainda menor — cerca de 5000 espécies — foram submetidas a avaliação farmacológica. O Brasil, com 120 mil espécies genuinamente nacionais, investigou-se quimicamente 0,4% destas, sendo que sobre as demais nada se sabe (Gottlieb & Mors, 1980).

Fortuitamente, as estratégias de descobertas de novos fármacos tem sido revolucionadas, ampliadas e robotizadas com o advento da química combinatória, praticada por grandes companhias farmacêuticas (Cordell, 2000). Assim, a avaliação da disposição de fármacos nos organismos vivos incorporou novas técnicas. A biodisponibilidade oral e a fração de fármaco livre no plasma, proveniente de uma mistura de fármacos candidatas, pode ser avaliada em um único animal através da administração de um coquetel de substâncias (White & Manitpisitkul, 2001), (Christ, 2001), limitando assim o uso de animais. Dispõe-se ainda do método de agrupamento de amostras (“sample pooling”) (Kuo *et al.*, 1998), (Atherton *et al.*, 1999), (Hop *et al.*, 1998) o qual previne a interação biológica entre as substâncias, diminuindo expressivamente o número e tempo de análise de amostras (Humphreys *et al.*, 1998).

No entanto, a farmacocinética clássica envolvendo amostragem serial de sangue, com subsequente determinação da concentração da fármaco, em plasma ou sangue, continua sendo a metodologia de escolha nos principais centros de pesquisa, devido à precisão dos dados obtidos e à adequação à infra-estrutura disponível. Esta técnica pode ser ainda complementada pela avaliação tecidual da fármaco não ligada,

por meio de microdiálise (Davies & Lunte, 1996; Kurosaki *et al.*, 1998; McKim *et al.*, 1993; Scott & Lunte, 1993). Por fim, os dados são analisados através de modelagem computacional, para verificação do modelo compartimental que melhor explica o comportamento de absorção, distribuição e excreção observado *in vivo* (Krishna *et al.*, 2001; Nagaraja *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2000).

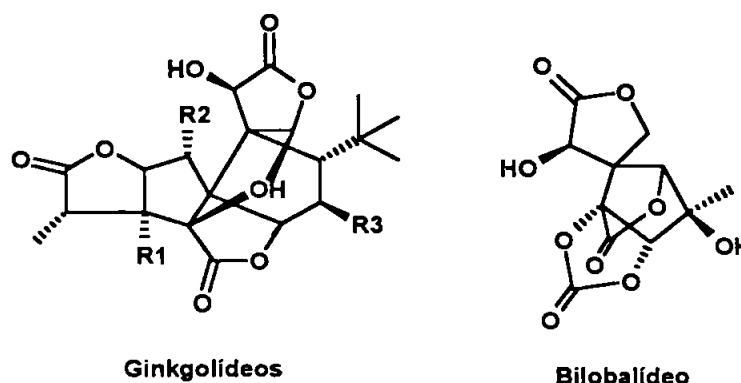
Farmacocinética de fitoterápicos largamente comercializados.

O uso racional de fitoterápicos pressupõe o conhecimento dos constituintes ativos existentes para uma determinada atividade, assim como das concentrações plasmáticas alcançadas após sua administração. Questiona-se, principalmente, acerca do grau de biodisponibilidade e rapidez de ação farmacológica do agente terapêutico administrado.

No entanto, a geração de dados farmacocinéticos e de biodisponibilidade não raro, são polêmicos e contraditórios. Os fatores de variabilidade relacionados à planta incluem desde a identificação e origem do vegetal, parte utilizada, idade do vegetal, época de colheita, local de coleta, condições climáticas próximas à época de coleta até a estabilização e preparo do extrato. Incluem-se ainda, as variações metodológicas dos procedimentos farmacotécnicos de obtenção dos extratos, influenciando na composição destes, e ainda fatores relativos à veiculação do produto final. Necessário mencionar ainda, os modelos de experimentação farmacocinética, se animal ou humano, a especificação da indicação farmacológica e ainda, as doses empregadas no estudo (Simões *et al.*, 2000).

Embora haja um crescente interesse na temática de plantas medicinais, observa-se um número limitado de plantas com estudo farmacocinético (De Smet & Brouwers, 1997). No entanto, as interações medicamentosas advindas do uso concomitante entre fitoterápicos e fármacos sintéticos, e conseqüente possibilidade de perda da eficácia e/ou toxicidade medicamentosa tem suscitado crescente interesse, de médicos e farmacologistas, no estudo destes. Assim, fitoterápicos de maior impacto popular e, conseqüentemente mercadológico foram selecionados para exemplificação de alguns perfis farmacocinéticos.

Folhas de *Ginkgo biloba*, por exemplo, foi uma das drogas vegetais mais comercializadas nos EUA no ano de 1999 (Ndjoko *et al.*, 2000). A maioria de suas formulações farmacêuticas contém 40 mg de extrato, cujo conteúdo apresenta 24% flavonóides e 6% de terpenos (ginkgolídeos e bilobalídeos) (Kleijnen & Knipschild, 1992). É amplamente empregado no tratamento de disfunções de memória, linguagem, atividades motoras e pensamentos abstratos (Kleijnen & Knipschild, 1992). Farmacologicamente possui ação antagonizadora do fator agregante de plaquetas (anti PAF), a qual estaria envolvida na melhoria do fluxo sanguíneo cardiovascular (Smith *et al.*, 1996).



Estudos clínicos apontam para elevada biodisponibilidade dos princípios ativos (70-80%), com picos de concentração plasmática máxima após 2-3h de sua administração oral. A farmacocinética destes apresentou-se linear para a faixa compreendida entre 50 e 300 mg/kg (Fourtillan *et al.*, 1995). Os ginkgolídeos A e B apresentaram meia-vida de 4 e 6 h respectivamente, enquanto que para o bilobalídeo, $t_{1/2\beta}$ foi de 3h (Li & Wong, 1997).

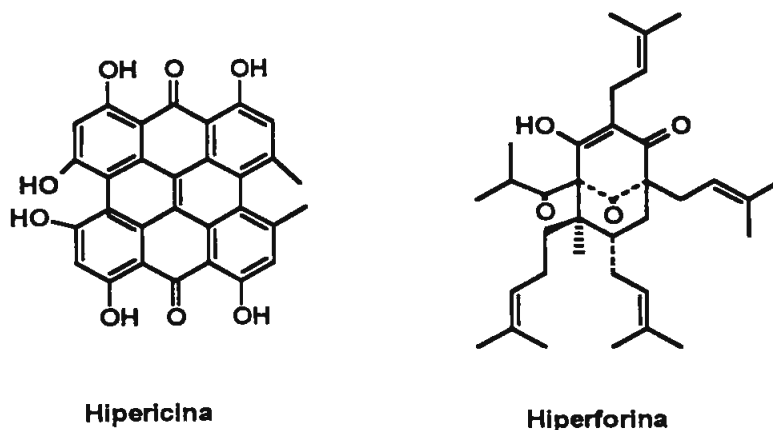
Doses similares (30-100 mg/kg) do extrato padronizado foram administradas *per os* a animais, embora menor biodisponibilidade (60%) tenha sido demonstrada com meia vida plasmática de 1,7, 2,0 e 2,2 h para os ginkgolídeos A, B e o terpenóide bilobalídeo, respectivamente (Biber & Koch, 1999).

No entanto, foram os produtos de biotransformação a principal diferença entre os dois modelos de experimentação. Em humanos, observa-se metabolização mais intensa dos princípios ativos, quando comparada aos ratos. Nos primeiros, a metabolização levou à formação de produtos derivados do ácido benzóico e hipúrico em ambas as formas, livre e conjugados (Pietta *et al.*, 1997), enquanto que em animais, a metabolização foi mais branda gerando apenas ácidos fenilalquílicos (Pietta *et al.*, 1995) (Duche *et al.*, 1989).

Estudos relacionados à interações medicamentosas não provou efeito na farmacocinética dos ativos, tendo apenas elevado o efeito gabaérgico e a função CYP 3A4 em níveis subclínicos (Galluzzi et al., 2000), e prolongado tempo de sangramento quando tricloplidina foi coadministrada (Kim et al., 1998).

O *Hypericum perforatum*, também conhecido popularmente por “Erva de São João” representa outro fitoterápico amplamente comercializado. Este produto representa 20% do total de antidepressivos prescritos na Alemanha, sendo 4 vezes mais comercializado que o Prozac (O'Hara et al., 1998). Em 1997, nos EUA já era responsável por um mercado de U\$ 200 milhões/ano, com popularidade crescente entre profissionais da saúde devido a seus benéficos efeitos antidepressivos e baixos efeitos colaterais comparativamente àqueles sintéticos (Greeson et al., 2001).

Seus componentes químicos são diversificados, embora as preparações fitoterápicas disponíveis apresentem-se padronizadas apenas segundo o conteúdo de hipericina, normalmente a 0,3 % (Draves & Walker, 2000). Observa-se também a presença de naftodiantronas (hipericina e pseudohypericina), flavonóides (rutina, hiperosídeo, isoquercitrina, quercitrina e quercetina) e ainda floroglucinóis (hiperforina, adhiperforina) e biflavonóides (biapigenina e amentoflavona) (Liu et al., 2000).



O exato mecanismo de ação do efeito antidepressivo ainda não é bem conhecido. Sabe-se no entanto, que o extrato apresenta afinidade a uma variedade de receptores da neurotransmissão, como adenosina, GABA_A, GABA_B, serotonina e às enzimas MAO_A e MAO_B (Linde et al., 1996), (Muller et al., 1997; Muller et al., 1998).

A avaliação farmacocinética do extrato padronizado de hipérico (WS 5572, 5% hiperforina) após administração oral de 300 mg/kg em ratos, evidenciou C_{max} de 370 ng/mL, 3h após a sua administração, com $t_{1/2}$ de 6h e clearance de 70 mL/min/kg (Biber et al., 1998).

A administração do extrato de hipérico (115 µg hipericina e 38 µg pseudohipericina) na forma de infusão constante de 1 ml.min⁻¹ /12 min demonstrou baixa depuração (“clearance”), com meia-vida de 40 h para a hipericina e 25 h para a pseudohipericina, ambas com baixo volume de distribuição (4-5 L). Realizou-se também a avaliação da administração oral de doses únicas do extrato de hipérico (LI 160, hipericina a 0,3%) com doses escalonadas (300, 600, 900 mg). Neste demonstrou-se a não linearidade para os parâmetros de C_{max} e AUC (Kerb et al., 1996).

Vários tratamentos com doses múltiplas do extrato (300, 900, 1800 mg de LI 160; 5 h / 5h; 14 dias) foram realizados em humanos resultando em “lag time” de 1,9 h na absorção da hipericina. As concentrações de equilíbrio (C_{ss}) foram atingidas após 6-7 dias para a hipericina e em 4 dias para a pseudohipericinada, após administração do extrato. A faixa de valores de $t_{1/2\beta}$ e biodisponibilidade sistêmica das mesmas foram de 24,8-26,5 h e 16,3-36 h e, 14 e 21%, respectivamente. Nestes estudos não foram detectados metabólitos de excreção urinária para nenhum dos princípios ativos, nem em sua forma livre, tampouco na forma conjugada (Staffeldt et al., 1994).

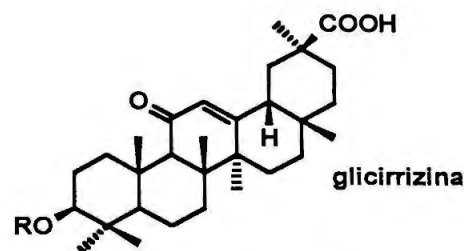
A farmacocinética do extrato de hipérico pode ser também influenciada pelas características da formulação. Neste estudo a área sob a curva (AUC) obtida para cápsulas moles foi 2,5 vezes superior àquela para cápsulas duras, devido à natureza do excipiente empregado (gel lipofílico mole) (Agrosi et al., 2000).

Os efeitos adversos descritos para o extrato de hipérico incluem a reação fototóxica relatada para a hipericina, porém não relacionada à elevação da dose do extrato (900, 1800, 3600 mg). Especula-se assim, que outros constituintes presentes no extrato apresentem propriedades protetoras (Brockmoller et al., 1997).

Interações medicamentosas do extrato de hipérico com drogas sintéticas têm sido descritas, sendo principalmente correlacionadas à capacidade indutora da metabolização hepática via CYP 3A4 em humanos (Durr et al., 2000; Obach, 2000). Observa-se diminuição significativa de 18-25% da AUC para a digoxina (Johne et al., 1999), e elevação da taxa de rejeição de transplantes devido à diminuição dos níveis

de ciclosporina circulante (Ruschitzka *et al.*, 2000). O extrato de hipérico também reduziu AUC do indinavir, um inibidor de proteases do HIV-1, por cerca de $57 \pm 19\%$ em indivíduos sãos e pacientes em terapêutica clínica (Piscitelli *et al.*, 2000). Constatou-se ainda sangramento intermenstrual em mulheres em tratamento com contraceptivos orais, dentre outras interações de prejuízo à eficácia clínica (Yue *et al.*, 2000).

A glicirrizina, um glicosídeo do ácido glicirrético, é um dos principais fármacos utilizados pela tradicional medicina chinesa. É também o principal ingrediente ativo das raízes da *Glycyrrhiza glabra*, representando 2,4-4,0 % do licor de alcaçuz (Wang *et al.*, 1995). Sua aplicação terapêutica inclui o tratamento da hepatite crônica (van Rossum *et al.*, 1998), doenças alérgicas, inflamação (Fujisawa *et al.*, 2000) e recentemente, contra o vírus HIV (De Clercq, 2000), (Vlietinck *et al.*, 1998).



R=β-D-ácido glicurônico- (2-1)-β-D-ácido glicurônico

O comportamento farmacocinético da glicirrizina e seus metabólitos após administração oral (100 mg) e intravascular (40, 80, 120 mg) em humanos sadios foi investigado. Obteve-se um modelo farmacocinético biexponencial para a glicirrizina após administração intravascular. Os valores obtidos para $t_{1/2\beta}$, V_c , V_{ss} e CL foram de 27-48 h; 37-64 mL/kg, 59-98 mL/kg e 16-25 mL/kg/h, respectivamente. Observou-se uma farmacocinética independente de dose. Após a administração oral, seu principal metabólito i.e., ácido glicirrético foi detectado em plasma, atribuindo-se a isto a pobre absorção da substância original no trato gastrointestinal ou clivagem bacteriana. Cerca de 0,8 % da dose foi excretada na urina como glicirrizina, tendo resultado ainda em baixa biodisponibilidade após doses terapêuticas desta (Raggi *et al.*, 1994).

A farmacocinética da glicirrizina também foi estudada em 2 grupos de pacientes, um com hepatite aguda e outro com cirrose hepática, aos quais

administrou-se infusão de 120 mg de glicirrizina/dia durante 1-2 meses. Nestes tratamentos, as concentrações plasmáticas variaram amplamente para os dois grupos tratados (n=6). Os valores de $t_{1/2}$ para a glicirrizina no grupo com hepatite e cirrose foi de 2,7-7,6 h e 6,2-40,1 h; enquanto que o "clearance" (CL) variou entre 2,8-23,2 mL/h/kg e 1,4-12,9 mL/h/kg, respectivamente.

Portanto, o $t_{1/2}$ da glicirrizina no grupo com hepatite e cirrose, foi cerca de 2 vezes e 8 vezes os valores obtidos com sujeitos saudáveis; respectivamente. Já o CL foi de 0,7 a 0,23 vezes menor que os valores em sujeitos normais, respectivamente. Após a melhora da função hepática, o CL da glicirrizina elevou-se de 2,8 mL/min/kg para 11,4 mL/min/kg e a meia vida diminuiu de 7,6 para 3,4 h (Yamamura *et al.*, 1992).

Significante mudança na farmacocinética da glicirrizina foi observada quando esta foi administrada isoladamente, comparativamente ao licor de alcaçuz, indicando possíveis interações entre os componentes do licor (Cantelli-Forti *et al.*, 1994).

No metabolismo da glicirrizina em humanos, observa-se a formação do ácido glicirrético como o principal metabólito. Este é formado pré-sistemicamente por hidrólise enzimática no intestino, na presença de *Streptococcus* LJ-22. A presença deste último é fundamental, pois é responsável pela inibição da conversão do cortisol em cortisona. Este mecanismo é consequência da inibição competitiva da 11- β -hidroxi-esteróide desidrogenase (Akao, 2000; Kim *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1993).

A ocorrência de reciclagem enterohepática foi avaliada após administração de suspensão oral de 130 mg/dia/5 dias em voluntários saudáveis. Nestes, observou-se um pico de absorção na fase terminal de eliminação, afirmando a hipótese de reabsorção para os metabólitos biliares excretados (Ploeger *et al.*, 2000; Ploeger *et al.*, 2000). Observou-se ainda que a reciclagem enterohepática da glicirrizina em ratos ocorre extensamente (Ichikawa *et al.*, 1986) após administração *i.v.*. Estima-se que 80% do montante de excreção biliar seja reabsorvida, via trato gastrointestinal. A reabsorção de ácido glicirrético (3,5%) também foi confirmada pela administração *i.v.* de 2, 5, 10 e 20 mg/kg de ácido glicirrético (Kawakami *et al.*, 1993).

Várias vias de administração foram comparadas para avaliação do perfil de absorção farmacocinética da glicirrizina em ratos. Para as doses (2, 10, 50 mg/kg *i.v.*), os parâmetros como $t_{1/2}$, CL e V_{ss} não mostraram diferenças significativas. Já a biodisponibilidade da glicirrizina, após administração oral e *i.p.* foi de 1% e 65-90%,

respectivamente. Infere-se assim, pobre absorção através do intestino, uma vez que esta foi estável por 3 h em suco gástrico (Yamamura et al., 1995).

A biodisponibilidade oral de 200 mg/kg de glicirrizina, comparativamente à administração *i.v.* (100 mg/kg) e *oral* (20 mg/kg) do ácido glicirrético foi avaliada em ratos. Os valores de biodisponibilidade e T_{max} encontrados foram de 4 % e 0,5 h e 14,2 % e 12 h para a glicirrizina e ácido glicirrético, respectivamente. Estudos de estabilidade e absorção demonstraram que o ácido glicirrético é melhor absorvido no intestino delgado, embora a hidrólise da glicirrizina não ocorra no mesmo local (Wang et al., 1994).

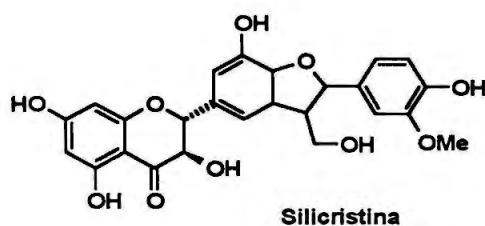
A relevância da hidrólise intestinal bacteriana foi inferida para a glicirrizina após observação de completa biodisponibilidade oral do ácido glicirrético. A avaliação do tempo médio de residência (MRT) do ácido glicirrético após administração *i.v.* e *oral* foi de 1,1 e 9,3 h, respectivamente, sugerindo lenta conversão da glicirrizina em ácido glicirrético no intestino (Takeda et al., 1996), (Akao, 1998).

As interações medicamentosas da glicirrizina foram pesquisadas, evidenciando-se um aumento das concentrações plasmáticas de prednisolona através da sua ação inibitória sobre a 11- β -HSD (Chen et al., 1990). Neste estudo observa-se ainda, o aumento do ácido UDP-glicurônico em 484%, com maior excreção do conjugado do AAP-glicuronídeo do acetoaminofenol, indicando assim, que a glicirrizina ativa a glicuronidação e pode influenciar na detoxificação de xenobióticos no fígado.

Provável potencialização dos efeitos tóxicos da digoxina e diuréticos tiazídicos pela glicirrizina são descritos, podendo ainda elevar riscos de sangramento em tratamento concomitante com warfarin (Miller, 1998). Possíveis interações medicamentosas podem resultar da aceleração do metabolismo de drogas coadministradas via citocromo P450 (Paolini et al., 1998).

O cardo (*Silybum marianum*) é uma das drogas vegetais bastante utilizadas na Alemanha, com vendas anuais de cerca de U\$ 180 milhões. A composição química das sementes é representada por uma mistura de flavonolignanas denominadas silimarina (4-6% peso da planta), cujo principal constituinte é a silibina (50-70%). Outros isômeros presentes na silimarina incluem a taxifolina, silicristina e silidianina (Venkataramanan et al., 2000), (Quaglia et al., 1999).

Suas aplicações farmacológicas incluem uso na hepatite e cirrose (Angulo et al., 2000), como também aplicação como antídoto na intoxicação com cogumelos do tipo *Amanita phalloides* (Chaiear et al., 1999).



A farmacocinética dos diastereoisômeros da silibina foi estudada após doses únicas de 102, 153, 203, 254 mg em indivíduos sãos, cujas AUCs apresentaram correlação linear. Cerca de 10% do total da silibina presente em plasma apresentou-se na forma conjugada. A meia-vida das formas livre e conjugada foram cerca de 6 h, com 5 % da dose sendo excretada na urina (Weyhenmeyer et al., 1992).

Na tentativa de melhorar a biodisponibilidade da silibina, preparou-se o complexo silipina-fosfatidilcolina. Doses únicas de 80 g do extrato padronizado (IdB 1016) foram estudadas em voluntários sadios. Picos de absorção plasmática máxima das formas livre e conjugadas deste complexo foram atingidos após 2,4 h e 3,8 h, com meia-vida de 1,6 e 3,4 h, respectivamente. Após administração do silipídeo, a silibina sofre extensa conjugação, ficando desta forma retida na circulação em concentrações relativamente altas (Gatti & Perucca, 1994).

Pacientes submetidos a drenagem biliar foram avaliados após administração oral do silipídeo e silimarina (120 mg). Após 48 h, as formas conjugadas e livre recuperadas na bile somaram 11 e 3 % da dose administrada, respectivamente. A biodisponibilidade do silipídeo, baseada nos valores de excreção biliar foram, em média, 4,2 vezes superior àqueles da silimarina (Schandalik *et al.*, 1992).

Estudos em animais foram realizados com IdB 1016 e silibina isolada. Os níveis plasmáticos da forma conjugada e total de silibina foram medidos, assim como a excreção biliar e urinária em ratos. Cerca de 94% da silibina plasmática apresentou-se na forma conjugada, sendo que a excreção biliar e urinária totalizaram 3,7 e 3,3 % da dose do extrato administrado, respectivamente. Após a administração de silibina isolada, a excreção biliar e urinária totalizaram apenas 0,001 e 0,032 % da dose, respectivamente. Os resultados apontam biodisponibilidade superior para a silibina, quando administrada na forma de extrato (Morazzoni *et al.*, 1993).

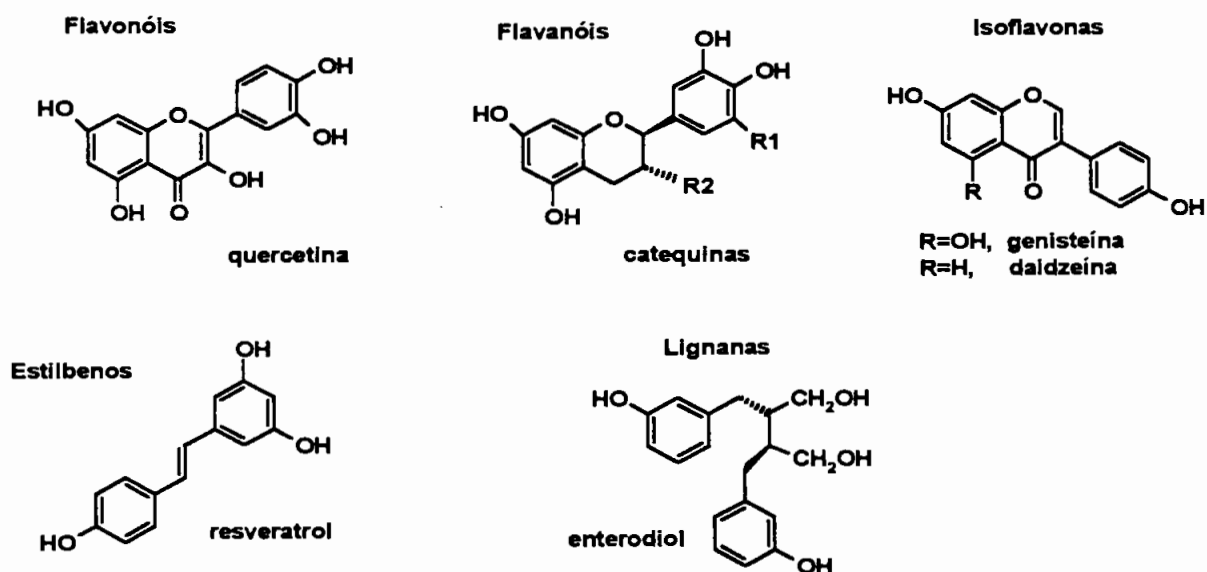
Outro estudo de biodisponibilidade foi realizado para um complexo de inclusão entre silibina e β -ciclodextrina. Os resultados demonstraram um dramático aumento na taxa de dissolução (90 % em 5 min) relativamente à silibina, a qual apresentou taxa de dissolução de apenas 5 %. Após a administração oral do complexo inclusão, a concentração de silibina na bile foi 20 vezes superior à administração da silibina como substância pura ou em formulação tradicional (Arcari *et al.*, 1992).

A formação de conjugados e o padrão de distribuição tecidual foi investigado em fígado, pulmão, estômago, pele, próstata e pâncreas, na dose de 50 mg/kg. Avaliou-se ainda, o efeito sobre enzimas metabolizadoras da fase II, tendo sido demonstrada elevação da atividades da glutathione-S-transferase, assim como da quinona redutase nos vários tecidos em doses mais elevadas (100 mg e 200 mg/kg). Os tecidos avaliados demonstraram níveis de silibina livre e conjugada que declinaram exponencialmente após 1 h, com meia vida de eliminação de 57-127 min para a forma livre e 45-94 min para a forma conjugada (Zhao & Agarwal, 1999).

As interações medicamentosas detectadas para a silimarina foram a redução significativa da atividade das enzimas CYP3A4 e UGT1 A6/9 (Venkataramanan *et al.*, 2000). Outros estudos também apontam para a redução na glicuronidação (Chungroo *et al.*, 1997). Efeito inibitórios discretos foram observados em microsomas de fígado sobre os substratos CYP2E1, CYP2D6, CYP2C19, CYP1A2 e CYP2A6 (Beckmann-Knopp *et al.*, 2000).

Grande variedade de substâncias polifenólicas ocorrem também na dieta vegetal humana. Dentre os flavonóis, a *quercetina* têm merecido destaque especial. Sua distribuição é ubíqua na dieta humana, principalmente na forma de O-glicosídeos, com mais de 170 diferentes glicosídeos atualmente descritos, e particularmente abundante em cebolas. Estão presentes ainda em alimentos e bebidas derivadas de frutas (Macheix *et al.*, 1990), legumes (Haslam, 1996), cereais e verduras, como maçãs, chás e vinho tinto (Scalbert & Williamson, 2000), (Yang *et al.*, 2001). Fisiologicamente, são importantes na proteção das plantas contra estresse oxidativo e ainda como defesa contra ataque de insetos e herbívoros.

Já em chocolates, vinhos (270 mg/mL) e também em chás ocorrem *flavanóis*, principalmente as catequinas, (-)-epicatequina e (+)-catequina, cuja ocorrência está geralmente associada à presença simultânea de *protoantocianidinas* (oligomeros de flavonóis com 4-8 unidades), responsáveis pela adstringência de certos alimentos/bebidas. Nos sucos de frutas cítricas há ocorrência de *flavanonas*, como a hesperidina do suco de laranja (125-250 mg/mL). Conferindo pigmentação às frutas como amora, ameixa, cereja, groselha, framboesa, morango e também às uvas encontram-se as *antocianinas*, cujo conteúdo na fruta fresca varia entre 0,15 (morango) a 4,5 mg/g (cerejas). Na soja observa-se a presença das *isoflavonas*, genisteína e daidzeína (1,0 mg/g grão seco), as quais são amplamente investigadas por suas propriedades preventivas do câncer, da osteoporose e ainda por suas propriedades estrogênicas (Scalbert & Williamson, 2000).



Outras substâncias fenólicas não flavonoídicas com reconhecido interesse farmacológico são os estilbenos, as lignanas e alguns derivados fenólicos prenilados.(Scalbert & Williamson, 2000).

Paradoxalmente aos compostos flavonoídicos, estes são de ocorrência restrita. A maioria dos estilbenos são fitoalexinas antifúngicas de plantas, ou seja, são produzidas em resposta ao ataque de fungos. O *transresveratrol* presente em vinhos tintos (1.5-3.0 mg/mL) têm recebido crescente interesse nos últimos 5 anos. Mais de 180 artigos foram publicados tratando-se dos benefícios do *transresveratrol* no tratamento do câncer e na proteção do sistema cardiovascular (De Santi *et al.*, 2000).

Já as lignanas, dímeros de fenil propanóides derivados do ácido cinâmico, como o diglicosídeo do *secoisolariciresinol* e *matairesinol*, estão presente nas fibras da dieta humana. Tais compostos podem ser convertidos às lignanas de mamíferos, *enterodiol* e *enterolactona*. A conversão destes ocorre através da ação de enzimas da flora bacteriana intestinal, gerando substâncias ativas na proteção contra tipos de câncer dependente de hormônios e doenças cardiovasculares (Kilkinen *et al.*, 2001), (Denis *et al.*, 1999).

Dados epidemiológicos apontam que o consumo de alimentos e bebidas ricas em compostos polifenólicos pode prevenir certas patologias. Frutas e vegetais previnem câncer (Steinmetz & Potter, 1996) e derrame cerebral (Ness & Powles, 1997), enquanto o consumo de vinho pode estar associado a proteção contra doenças coronárias (Renaud & de Lorgeril, 1992), (Criqui & Ringel, 1994). Tais substâncias em associação com outros produtos da dieta humana como Vitamina C, E e carotenóides são indicados para proteção dos tecidos do corpo contra o estresse oxidativo (Diaz *et al.*, 1997), (McCall & Balz, 1998). Para estes, a medida da biodisponibilidade é um importante fator na determinação de sua ação biológica, pois a falta de informação sobre este aspecto tem levado a excessivas afirmativas de atividades biológicas baseadas em extrapolação de estudos *in vitro*.

A farmacocinética clínica, aliada à farmacodinâmica realiza a correlação da resposta farmacológica com a concentração da droga no sítio de ação, através da monitoração da eficácia e segurança terapêuticas para o indivíduo. Nestes, os parâmetros farmacocinéticos e de biodisponibilidade descritos para substâncias polifenólicas variam amplamente entre os diferentes grupos de substâncias antioxidantes (Tabela 1).

Tabela 1: Alguns parâmetros farmacocinéticos de substâncias químicas fenólicas presentes na dieta alimentar humana.

Parâmetros farmacocinéticos	Catequinas	Flavonóis (agliconas)	Flavonóis (glicosilados)	Antocianinas (aglicona)	Antocianinas (glicosiladas)	Estilbenol
Subst. marcadora	catequina e epi-catequina.	quercetina	Quercetina glicosilada	wogonina	Cianidina (-3-glicosídeo e -3-sambubiosídeo)	resveratrol
Dose oral	5000 mg/kg	50 mg/kg	64-200 mg	5 mg/kg	720 mg	28,2 µg
C _{max}	15-112 mg	16-258 ng/mL	90-224 ng/mL	----	38,9-168,3 nmol/L	----
T _{max}	1,9-2,1 h	3-4 h	0,7-9,3 h	----	1,1-1,2 h	----
AUC	143-2900 mg/L	----	----	52,4 nmol/L/h	----	6,5-77,8 ng.h/mL
V _d	1,1-2,8 L/kg	----	----	0,83 L/kg	----	102-533 mL/kg
t _{1/2 α}	0,75-6,03 h	----	3,8 h	2,9 min	----	0,48 h
t _{1/2 β}	7,5-7,98 h	3,8-19 h	16,8 h	23,1 min	1,6-2,2 h	25 h
CL	0,046-0,091 L/min/kg	----	----	0,096 L/kg/min	----	519-755 mL/min
F	6-40%	8,6 ± 3,8 %	17-52 %	----	----	----
Referência	(Zhu <i>et al.</i> , 2000)	(Ader <i>et al.</i> , 2000), (Graefe <i>et al.</i> , 1999)	(Graefe <i>et al.</i> , 2001), (Hollman <i>et al.</i> , 1996)	(Tsai <i>et al.</i> , 1996)	(Cao <i>et al.</i> , 2001)	(Bertelli <i>et al.</i> , 1998)

Fatores como suas propriedades físico-químicas, susceptibilidade à conjugação, desconjugação e reconjugação nos intestinos, absorção intestinal e disponibilidade enzimática para a metabolização, são apenas alguns elementos de variabilidade. Para os flavonóides observa-se baixa biodisponibilidade, exceto para seus derivados glicosilados, os quais são mais rapidamente absorvidos. Flavonóis, em geral, apresentam baixa meia-vida de absorção e eliminação lenta (Tabela 1)

Dentre as classes de substâncias químicas discutidas neste prefácio, citamos os terpenos da *Ginkgo biloba*, as naftodiantronas e floroglucinóis do *Hypericum perforatum*, as flavonolignanas de *Silybum marianum*, as saponinas da *Glycyrrhiza glabra*, e ainda variado grupo de flavonóides. Dentre estas substâncias, a saponina glicirrizina é a mais hidrofílica tendo apresentado a meia-vida mais elevada, rápida absorção ($T_{max} = 0,5$ h), embora com baixa biodisponibilidade (1%). Para a naftodiantrona hipericina relata-se uma biodisponibilidade mediana (14-21%), com tempo de meia-vida próximo àquele da saponina. O "clearance" ou depuração plasmática mostrou-se igualmente baixo com lenta absorção ($T_{max} = 3$ h). Já as flavonolignanas da silimarina (polaridade média), estas apresentaram-se com os menores valores de $t_{1/2}$ (1,6-3,4 h), baixa biodisponibilidade (1 %) e T_{max} da mesma amplitude que a substância anterior. Dentre estas classes químicas mais lipossolúveis, os terpenos de *Ginkgo biloba* apresentaram maior biodisponibilidade (80%), com meia-vida superior às flavonolignanas (4-6 h) e médio T_{max} (2-3 h). Os dados sumarizados confirmam a tendência de absorção facilitada para substâncias mais lipossolúveis, embora não determine sua biodisponibilidade final.

Desta maneira, suscitam-se modelos farmacocinéticos experimentais aplicáveis ao estudo de plantas medicinais. No caso do catecol prenilado de *Pothomorphe umbellata*, depara-se com uma substância fenólica de elevada lipofilicidade e com importantes propriedades hepatoprotetoras e antioxidantes. Desta maneira, os dados farmacológicos disponíveis convergem para estudos de investigação acerca de suas propriedades cinéticas *in vivo*.

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da biodisponibilidade oral do 4-NRC, comparativamente ao extrato bruto. Para tanto realizou-se a padronização do extrato hidroalcolico de *Pothomorphe umbellata* e a validação de metodologia analítica para acesso aos dados farmacocinéticos do 4-nerolidilcatecol em plasma de ratos.

Referências

- Ader, P., Wessmann, A. & Wolfram, S. (2000). Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1056-67.
- Agrosi, M., Mischiatti, S., Harrasser, P.C. & Savio, D. (2000). Oral bioavailability of active principles from herbal products in humans. A study on *Hypericum perforatum* extracts using the soft gelatin capsule technology. *Phytomedicine*, **7**, 455-62.
- Akao, T. (2000). Differences in the metabolism of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and glycyrrhetic acid monoglucuronide by human intestinal flora. *Biol Pharm Bull*, **23**, 1418-23.
- Akao, T. (1998). Distribution of enzymes involved in the metabolism of glycyrrhizin in various organs of rat. *Biol Pharm Bull*, **21**, 1036-44.
- Angulo, P., Patel, T., Jorgensen, R.A., Therneau, T.M. & Lindor, K.D. (2000). Silymarin in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis with a suboptimal response to ursodeoxycholic acid. *Hepatology*, **32**, 897-900.
- Arcari, M., Brambilla, A., Brandt, A., Caponi, R., Corsi, G., Di Rella, M., Solinas, F. & Wachter, W.P. (1992). A new inclusion complex of silibin and beta-ciclodextrins: *in vitro* dissolution kinetics and *in vivo* absorption in comparison with traditional formulations. *Boll Chim farm*, **131**, 205-9.
- Atherton, J.P., Van Noord, T.J. & Kuo, B.S. (1999). Sample pooling to enhance throughput of brain penetration study. *J Pharm Biomed Anal*, **20**, 39-47.
- Beckmann-Knopp, S., Rietbrock, S., Weyhenmeyer, R., Bocker, R.H., Beckurts, K.T., Lang, W., Hunz, M. & Fuhr, U. (2000). Inhibitory effects of silibinin on cytochrome P-450 enzymes in human liver microsomes. *Pharmacol Toxicol*, **86**, 250-6.
- Bertelli, A.A., Giovannini, L., Stradi, R., Urien, S., Tillement, J.P. & Bertelli, A. (1998). Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. *Drugs Exp Clin Res*, **24**, 51-5.
- Biber, A., Fischer, H., Romer, A. & Chatterjee, S.S. (1998). Oral availability of hyperforin from *hypericum* extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry*, **31**, 36-43.

- Biber, A. & Koch, E. (1999). Bioavailability of ginkgolides and bilobalide from extracts of ginkgo biloba using GC/MS. *Planta Med*, **65**, 192-3.
- Brockmoller, J., Reum, T., Bauer, S., Kerb, R., Hubner, W.D. & Roots, I. (1997). Hypericin and pseudohypericin: pharmacokinetics and effects on photosensitivity in humans. *Pharmacopsychiatry*, **30**, 94-101.
- Bruhn, J.G. & Bohlin, L. (1997). Molecular pharmacognosy: an explanatory model. *Drug Discovery Today*, **2**, 243-246.
- Cantelli-Forti, G., Maffei, F., Hrelia, P., Bugamelli, F., Bernardi, M., D'Intino, P., Maranesi, M. & Raggi, M.A. (1994). Interaction of licorice on glycyrrhizin pharmacokinetics. *Environ Health Perspect*, **102**, 65-8.
- Cao, G., Muccitelli, H.U., Sanchez-Moreno, C. & Prior, R.L. (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr*, **73**, 920-6.
- Chaiear, K., Limpaboon, R., Meechai, C. & Poovorawan, Y. (1999). Fatal mushroom poisoning caused by *Amanita virosa* in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **30**, 157-60.
- Chang, J. (2000). Medicinal herbs: drugs or dietary supplements? *Biochem Pharmacol*, **59**, 211-9.
- Chen, M.F., Shimada, F., Kato, H., Yano, S. & Kanaoka, M. (1990). Effect of glycyrrhizin on the pharmacokinetics of prednisolone following low dosage of prednisolone hemisuccinate. *Endocrinol Jpn*, **37**, 331-41.
- Christ, D.D. (2001). Cassette dosing pharmacokinetics: valuable tool or flawed science? *Drug Metab Dispos*, **29**, 935.
- Chungroo, J.V., Reen, K.R., Singh, K. & Singh, J. (1997). Effects of silymarin on UDP-glucuronic acid and glucuronidation activity in the rat isolated hepatocytes and in liver in relation to D-galactosamine activity. *Indian J Exp Biol*, **35**, 256-263.
- Cordell, G.A. (2000). Biodiversity and drug discovery--a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, **55**, 463-80.
- Criqui, M.H. & Ringel, B.L. (1994). Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet*, **344**, 1719-23.
- Davies, M.I. & Lunte, C.E. (1996). Simultaneous microdialysis sampling from multiple sites in the liver for the study of phenol metabolism. *Life Sci*, **59**, 1001-13.

- De Clercq, E. (2000). Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Med Res Rev*, **20**, 323-49.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F. & Pacifici, G.M. (2000). Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica*, **30**, 1047-54.
- De Smet, P.A., Bonsel, G., Van der Kuy, A., Hekster, Y.A., Pronk, M.H., Brorens, M.J., Lockefeer, J.H. & Nuijten, M.J. (2000). Introduction to the pharmacoeconomics of herbal medicines. *Pharmacoeconomics*, **18**, 1-7.
- De Smet, P.A.G.M. (1997). The role of plant-derived drugs and herbal medicines in health care. *Drugs*, **54**, 801-840.
- De Smet, P.A.G.M. & Brouwers, J.R.B.J. (1997). Pharmacokinetic evaluation of herbal remedies - Basic introduction, applicability, current status and regulatory needs. *Clinical Pharmacokinetics*, **32**, 427.
- De Smet, P.A.G.M., Keller, K., Hansel, & R., C., R. F. (1992a). Adverse effects of Herbal Drugs I and II. ed. Verlag, S. New York.
- Denis, L., Morton, M.S. & Griffiths, K. (1999). Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol*, **35**, 377-87.
- Diaz, M.N., Frei, B., Vita, J.A. & Keaney, J.F., Jr. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med*, **337**, 408-16.
- Draves, A.H. & Walker, S.E. (2000). Determination of hypericin and pseudohypericin in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **749**, 57-66.
- Duche, J., Barre, J., Guinot, P., Duchier, J., Cournot, A. & Tillement, J. (1989). Effect of *Ginkgo biloba* extract on microsomal enzyme induction. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, **9**, 165-168.
- Durr, D., Steiger, B., Kullack-Ublick, G., Rentsch, K.M., Steinert, H.C., meiree, P.J. & Fattering, K. (2000). St. John Wort induces intestinal P-glicoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol and Ther*, **38**, 598-604.
- Elvin-Lewis, M. (2001). Should we be concerned about herbal remedies. *J Ethnopharmacol*, **75**, 141-64.
- Evans, W.C. (1996). *Trease and Evans' Pharmacognosy*. London.: W. N. Saunders.
- Fourtillan, J.B., Brisson, A.M., Girault, J., Ingrand, I., Decourt, J.P., Drieu, K., Jouenne, P. & Biber, A. (1995). [Pharmacokinetic properties of Bilobalide and Ginkgolides A
-

- and B in healthy subjects after intravenous and oral administration of Ginkgo biloba extract (EGb 761)]. *Therapie*, **50**, 137-44.
- Fujisawa, Y., Sakamoto, M., Matsushita, M., Fujita, T. & Nishioka, K. (2000). Glycyrrhizin inhibits the lytic pathway of complement - possible mechanism of its anti-inflammatory effect on liver cells in viral hepatitis. *Microbiol Immunol*, **44**, 799-804.
- Galluzzi, S., Zanetti, O., Binetti, G., Trabucchi, M. & Frisoni, G.B. (2000). Coma in a patient with Alzheimer's disease taking low dose trazodone and ginkgo biloba. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **68**, 679-80.
- Gatti, G. & Perucca, E. (1994). Plasma concentrations of free and conjugated silybin after oral intake of a silybin-phosphatidylcholine complex (silipide) in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **32**, 614-7.
- Gottlieb, O.R. & Mors, W.B. (1980). Potential utilization of Brazilian wood extractives. *J Agric Food Chem*, **28**, 196-215.
- Graefe, E.U., Derendorf, H. & Veit, M. (1999). Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **37**, 219-33.
- Graefe, E.U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A.K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H. & Veit, M. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, **41**, 492-9.
- Greenson, J.M., Sanford, B. & Monti, D.A. (2001). St. John's wort(*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological and clinical literature. *Psychopharmacol*, **153**, 402-14.
- Greger, J.L. (2001). Dietary supplement use: consumer characteristics and interests. *J Nutr*, **131**, 1339S-43S.
- Haslam, E. (1996). *Chemistry of Vegetable Tanins*. London: Academic Press.
- Hollman, P.C., vd Gaag, M., Mengelers, M.J., van Trijp, J.M., de Vries, J.H. & Katan, M.B. (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med*, **21**, 703-7.
- Hop, C.E., Wang, Z., Chen, Q. & Kwei, G. (1998). Plasma-pooling methods to increase throughput for in vivo pharmacokinetic screening. *J Pharm Sci*, **87**, 901-3.
- Humphreys, W.G., Obermeier, M.T. & Morrison, R.A. (1998). Continuous blood withdrawal as a rapid screening method for determining clearance of oral bioavailability in rats. *Pharm Res*, **15**, 1257-61.
-

- Ichikawa, T., Ishida, S., Sakiya, Y., Sawada, Y. & Hanano, M. (1986). Biliary excretion and enterohepatic cycling of glycyrrhizin in rats. *J Pharm Sci*, **75**, 672-5.
- Johne, A., Brockmoller, J., Bauer, S., Maurer, A., Langheinrich, M. & Roots, I. (1999). Pharmacokinetic interaction of digoxin with herbal extract from St. John's Wort. *Clin Pharm Ther*, **66**, 338-45.
- Kawakami, J., Yamamura, Y., Santa, T., Kotaki, H., Uchino, K., Sawada, Y. & Iga, T. (1993). Kinetic analysis of glycyrrhetic acid, an active metabolite of glycyrrhizin, in rats: role of enterohepatic circulation. *J Pharm Sci*, **82**, 301-5.
- Kerb, R., Brockmoller, J., Staffeldt, B., Ploch, M. & Roots, I. (1996). Single-dose and steady-state pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 2087-93.
- Kilkinen, A., Stumpf, K., Pietinen, P., Valsta, L.M., Tapanainen, H. & Adlercreutz, H. (2001). Determinants of serum enterolactone concentration. *Am J Clin Nutr*, **73**, 1094-100.
- Kim, D.H., Lee, S.W. & Han, M.J. (1999). Biotransformation of glycyrrhizin in 18-beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-D-glucuronide by *Streptococcus* LJ-22, a human intestinal bacterium. *Biol Pharm Bull*, **22**, 320-2.
- Kim, Y.S., Pyo, M.K., Park, K.M., Park, P.H., Hahn, B.S., Wu, S.J. & Yun-Choi, H.S. (1998). Antiplatelet and antithrombotic effects of a combination of ticlopidine and ginkgo biloba ext (EGb 761). *Thromb Res*, **91**, 33-8.
- Kleijnen, J. & Knipschild, P. (1992). Ginkgo biloba. *Lancet*, **340**, 1136-9.
- Krishna, S., Nagaraja, N.V., Planche, T., Agbenyega, T., Bedo-Addo, G., Ansong, D., Owusu-Ofori, A., Shroads, A.L., Henderson, G., Hutson, A., Derendorf, H. & Stacpoole, P.W. (2001). Population pharmacokinetics of intramuscular quinine in children with severe malaria. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1803-9.
- Kuo, B.S., Van Noord, T., Feng, M.R. & Wright, D.S. (1998). Sample pooling to expedite bioanalysis and pharmacokinetic research. *J Pharm Biomed Anal*, **16**, 837-46.
- Kurosaki, Y., Nakamura, S., Shiojiri, Y. & Kawasaki, H. (1998). Lipo-microdialysis: a new microdialysis method for studying the pharmacokinetics of lipophilic substances. *Biol Pharm Bull*, **21**, 194-6.
- Lavy, T., Haran, B., Shemer, J. & Shani, S. (2000). [Regulation of natural medicines in Israel and abroad]. *Harefuah*, **139**, 339-44, 408, 407.

- Li, C.L. & Wong, Y.Y. (1997). The bioavailability of ginkgolides in Ginkgo biloba extracts. *Planta Med*, **63**, 563-5.
- Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W. & Melchart, D. (1996). St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *Bmj*, **313**, 253-8.
- Liu, F.F., Ang, C.Y., Heinze, T.M., Rankin, J.D., Beger, R.D., Freeman, J.P. & Lay, J.O. (2000). Evaluation of major active components in St. John's Wort dietary supplements by high-performance liquid chromatography with photodiode assay detection and electrospray mass spectrometric confirmation. *J Chromatogr A*, **888**, 85-92.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A. & Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics*. Boca Raton: CRC Press.
- Mahady, G.B. (2001). Global harmonization of herbal health claims. *J Nutr*, **131**, 1120S-3S.
- McCall, M. & Balz, F. (1998). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage to humans? *Free Radical in Biology and Medicine*, **20**, 933-956.
- McKim, J.M., Jr., McKim, J.M., Sr., Naumann, S., Hammermeister, D.E., Hoffman, A.D. & Klaassen, C.D. (1993). In vivo microdialysis sampling of phenol and phenyl glucuronide in the blood of unanesthetized rainbow trout: implications for toxicokinetic studies. *Fundam Appl Toxicol*, **20**, 190-8.
- Miller, L.G. (1998). Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. *Arch Intern Med*, **158**, 2200-11.
- Morazzoni, P., Montalbetti, A., Malandrino, S. & Pifferi, G. (1993). Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **18**, 289-97.
- Muller, W.E., Rolli, M., Schafer, C. & Hafner, U. (1997). Effects of hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, **30** Suppl 2, 102-7.
- Muller, W.E., Singer, A., Wonnemann, M., Hafner, U., Rolli, M. & Schaefer, C. (1998). Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of Hypericum extract. *Pharmacopsychiatry*, **31**, 16-21.
- Nagaraja, N.V., Pechstein, B., Erb, K., Klipping, C., Hermann, R., Niebch, G. & Derendorf, H. (2000). Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of

- cetorelix, an LH-RH antagonist, after subcutaneous administration in healthy premenopausal women. *Clin Pharmacol Ther*, **68**, 617-25.
- Ndjoko, K., Wolfender, J.L. & Hostettmann, K. (2000). Determination of trace amounts of ginkgolic acids in Ginkgo biloba L. leaf extracts and phytopharmaceuticals by LC/EM. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **744**, 249-55.
- Ness, A.R. & Powles, J.W. (1997). Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *Int J Epidemiol*, **26**, 1-13.
- Obach, R.S. (2000). Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther*, **294**, 88-95.
- O'Hara, M.A., Kiefer, D., Frrell, K. & Kemper, K. (1998). A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Family Medicine*, **7**, 523-36.
- Paolini, M., Pozzetti, L., Sapone, A. & Cantelli-Forti, G. (1998). Effect of licorice and glycyrrhizin on murine liver CYP-dependent monooxygenases. *Life Sci*, **62**, 571-82.
- Pietta, P.G., Gardana, C. & Mauri, P.L. (1997). Identification of Ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **693**, 249-55.
- Pietta, P.G., Gardana, C., Mauri, P.L., Maffei-Facino, R. & Carini, M. (1995). Identification of flavonoid metabolites after oral administration to rats of a Ginkgo biloba extract. *J Chromatogr B Biomed Appl*, **673**, 75-80.
- Piscitelli, S.C., Burstein, A.H., Chaitt, D., Alfaro, R.M. & Falloon, J. (2000). Indinavir concentrations and St John's Wort. *Lancet*, **355**, 547-8.
- Ploeger, B., Mensinga, T., Sips, A., Meulenbelt, J. & DeJongh, J. (2000). A human physiologically-based model for glycyrrhizic acid, a compound subject to presystemic metabolism and enterohepatic cycling. *Pharm Res*, **17**, 1516-25.
- Ploeger, B.A., Meulenbelt, J. & DeJongh, J. (2000). Physiologically based pharmacokinetic modeling of glycyrrhizic acid, a compound subject to presystemic metabolism and enterohepatic cycling. *Toxicol Appl Pharmacol*, **162**, 177-88.
- Quaglia, M.G., Bossu, E., Donati, E., Mazzanti, G. & Brandt, A. (1999). Determination of silymarine in the extract from the dried silybum marianum fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, **19**, 435-42.

- Raggi, M.a., Bugamelli, F., Nobile, L., Schiavone, P. & Cantelli-Forti, G. (1994). HPLC determination of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in biological fluids, after licorice extract administration to human and rats. *Boll Chim Farm*, **133**, 704-8.
- Raiten, D.J. (1999). Introduction. *J Nutr*, **129**, 223S-4S.
- Renaud, S. & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**, 1523-6.
- Rojas, C., Nagaraja, N.V. & Derendorf, H. (2000). In vitro recovery of triamcinolone acetonide in microdialysis. *Pharmazie*, **55**, 659-62.
- Ruschitzka, F., Neier, P.J., Turina, M., Luscher, T.F. & Noll, G. (2000). Acute heart rejection due to St. John's Wort. *Lancet*, **355**.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, **130**, 2073S-85S.
- Schandalik, R., Gatti, G. & Perucca, E. (1992). Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silipide and silymarin in cholecystectomy patients. *Arzneimittelforschung*, **42**, 964-8.
- Scott, D.O. & Lunte, C.E. (1993). In vivo microdialysis sampling in the bile, blood, and liver of rats to study the disposition of phenol. *Pharm Res*, **10**, 335-42.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. & Petrovick, P.R. (2000). *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFSC.
- Smith, P.F., MacLennan, K. & Darlington, C.L. (1996). The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol*, **50**, 131-9.
- Staffeldt, B., Kerb, R., Brockmoller, J., Ploch, M. & Roots, I. (1994). Pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin after oral intake of the hypericum perforatum extract LI 160 in healthy volunteers. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, **7 Suppl 1**, S47-53.
- Steinmetz, K.A. & Potter, J.D. (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc*, **96**, 1027-39.
- Takeda, S., Ishihara, K., Wakui, Y., Amagaya, S., Maruno, M., Akao, T. & Kobashi, K. (1996). Bioavailability study of glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats; relevance to the intestinal bacterial hydrolysis. *J Pharm Pharmacol*, **48**, 902-5.

- Talalay, P. (2001). The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. *Acad Med*, **76**, 238-47.
- Tanaka, N., Yamamura, Y., Santa, T., Kotaki, H., Uchino, K., Sawada, Y., Aikawa, T., Osuga, T. & Iga, T. (1993). Pharmacokinetic profiles of glycyrrhizin in patients with chronic hepatitis. *Biopharm Drug Dispos*, **14**, 609-14.
- Tsai, T.H., Chou, C.J., Tsai, T.R. & Chen, C.F. (1996). Determination of wogonin in rat plasma by liquid chromatography and its pharmacokinetic application. *Planta Med*, **62**, 263-6.
- van Rossum, T.G., Vulto, A.G., de Man, R.A., Brouwer, J.T. & Schalm, S.W. (1998). Glycyrrhizin as a potential treatment for chronic hepatitis C. *Aliment Pharmacol Ther*, **12**, 199-205.
- Venkataramanan, R., Ramachandran, V., Komoroski, B.J., Zhang, S., Schiff, P.L. & Strom, S.C. (2000). Milk thistle, a herbal supplement, decreases the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos*, **28**, 1270-3.
- Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S. & Pieters, L.A. (1998). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med*, **64**, 97-109.
- Vogel, H.G. (1991). Similarities between various systems of traditional medicine. Considerations for the future of ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol*, **35**, 179-90.
- Wagner, H. (1999). Phytomedicine research in Germany. *Environ Health Perspect*, **107**, 779-81.
- Wallis, T.E. (1967). *Textbook of Pharmacognosy*. London: J. & A. Churchill Ltd.
- Wang, Z., Kurosaki, Y., Nakayama, T. & Kimura, T. (1994). Mechanism of gastrointestinal absorption of glycyrrhizin in rats. *Biol Pharm Bull*, **17**, 1399-403.
- Wang, Z., Nishioka, M., Kurosaki, Y., Nakayama, T. & Kimura, T. (1995). Gastrointestinal absorption characteristics of glycyrrhizin from glycyrrhiza extract. *Biol Pharm Bull*, **18**, 1238-41.
- Weyhenmeyer, R., Mascher, H. & Birkmayer, J. (1992). Study on dose-linearity of the pharmacokinetics of silibinin diastereomers using a new stereospecific assay. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, **30**, 134-8.

- White, R.E. & Manitpisitkul, P. (2001). Pharmacokinetic theory of cassette dosing in drug discovery screening. *Drug Metab Dispos*, **29**, 957-66.
- Yamamura, Y., Kawakami, J., Santa, T., Kotaki, H., Uchino, K., Sawada, Y., Tanaka, N. & Iga, T. (1992). Pharmacokinetic profile of glycyrrhizin in healthy volunteers by a new high-performance liquid chromatographic method. *J Pharm Sci*, **81**, 1042-6.
- Yamamura, Y., Santa, T., Kotaki, H., Uchino, K., Sawada, Y. & Iga, T. (1995). Administration-route dependency of absorption of glycyrrhizin in rats: intraperitoneal administration dramatically enhanced bioavailability. *Biol Pharm Bull*, **18**, 337-41.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T. & Newmark, H.L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*, **21**, 381-406.
- Yue, Q.Y., Bergquist, C. & Gerden, B. (2000). Safety of St John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Lancet*, **355**, 576-7.
- Zhao, J. & Agarwal, R. (1999). Tissue distribution of silibin, the major active constituent of silimarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implications in cancer chemoprevention. *Carcinogenesis*, **20**, 2101-8.
- Zhu, M., Chen, Y. & Li, R.C. (2000). Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med*, **66**, 444-7.

Capítulo 1

*Obtenção e análise quantitativa do 4- nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq*

1- Obtenção e análise quantitativa do 4-nerolidilcatecol em *Pothomorphe umbellata* (L) Miq.

1.1- Introdução

O gênero *Pothomorphe* foi estabelecido em 1840 por Miquel para representar cerca de dez espécies. Neste estão inclusas plantas de porte arbustivo ou herbáceo, providas de folhas largas de contorno arredondado, base cordiforme ou peltada e ápice acuminado. As flores apresentam-se reunidas em inflorescências densas, situadas nas axilas de pecíolos dilatados em bainhas.

No Brasil existem apenas duas espécies deste gênero: *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. e *P. peltata* (L) Miq. popularmente denominadas caapeba ou pariparoba-do-sul e do norte, devido às suas respectivas localizações (Desmachelier & Schaus, 2000) .

A diferenciação destas com *Piper regnelli* realiza-se pela observação das folhas do vegetal. A *Pothomorphe umbellata* apresenta folhas grandes e cordadas com pecíolo inserido marginalmente em bainha alargada, na região do nó caulicular (Moraes, 1986). A inflorescência é em forma de umbela de espigas com flores aclamídeas, hermafroditas e protegidas por brácteas peltadas triangulares e marginalmente ciliadas. Seus frutos são pequenos e obpiramidais assemelhando-se aqueles do gênero *Piper* e *Peperomia*. Vale ressaltar, que em *Piper regnelli* não se observa a presença de rafídeos, enquanto que em *P. umbellata* e *Piper angustifolium* ("mático" do Peru e Colômbia) nota-se a presença de pêlos cuticulares.

As sinonímias científicas de *Pothomorphe umbellata* são *Peperomia umbellata* Kunth.; *Peperomia sidaefolia* A. Dietr.; *Lepianthes umbellatum* Rap.; *Heckeria umbellata* L. Kuntz, *Heckeria sidaefolia* Kunth.; *Pothomorphe sidaefolia* Miq.; *Pothomorphe sidaefolia* Miq. var. *subglabrata* Miq.; *Pothomorphe donbeyana* Miq.; *Piper subpeltatum* Willd. Var. *sidaefolium*; *Pothomorphe allemi* Trei.; *Piper umbellatum* L. var. *mayus*; *Piper hilarianum* Stend (Moraes et al., 1986-1987).

Sua distribuição geográfica é espontânea desde a Amazônia até o sul do Brasil (Yunker, 1973), como o vale do rio Amazonas e Pará, nas orlas da Mata Atlântica, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. O habitat preferencial desta espécie é representado por locais úmidos, sombreados e ricos de húmus.

Os usos etnofarmacológicos descritos para *Pothomorphe umbellata* (Hammer & Johns, 1993), (Freise, 1933) são vários, destacando-se o emprego na epilepsia (Coimbra & Silva, 1958), disfunção hepática, bronquite asmática, cicatrizante e antiinflamatório (De Feo, 1991), febrífugo (Di Stasi et al., 1993) e como repelente de insetos (Chartol, 1964).

A Farmacopéia Brasileira (Silva, 1926) preconiza a utilização das raízes de *P. umbellata*, embora a planta inteira rasurada seja amplamente comercializada, ou até mesmo substituída por outras espécies (Akisue et al., 1984). As formas farmacêuticas oficializadas pelo Código Farmacêutico Brasileiro (1ª edição) são o extrato fluido (etanol/H₂O 1:1), a tintura hidroalcolólica, o xarope e o xarope composto. Peckolt (Peckolt, 1929) preconiza a utilização de extrato fluido na dose de 4 a 8 g/dia, 2 - 5 g/dia de tintura ou ainda o xarope na dose de 60 a 80 g/dia.

Na avaliação da composição química do óleo essencial identificou-se a azarona como principal constituinte (Freise, 1933), cuja porcentagem foi de 2,25% v/m, enquanto outros autores observaram a presença majoritária dos fenilpropanóides apiol (Silva & Baver, 1972) e dilapiol (Bernard & Tieli, 1978) como majoritários no óleo essencial (Figura 1). Do extrato de raízes, (Kijoa et al., 1980) isolou-se o 4-nerolidilcatecol como constituinte majoritário, tendo observado ainda, a presença de sitosterol. Posteriormente (Gustafson et al., 1992) isolaram três dímeros de catecol prenilados em concentrações que variaram de 0,0003% (peltatol B e C) e 0,2% (peltatol A). e ainda do sesquiterpeno nerolidol (Bastos, 1998). Este último autor descreve ainda, a presença de um flavonóide e duas lignanas nas folhas de *Pothomorphe umbellata* (Figura 1).

Dentre as substâncias presentes na espécie *P. umbellata*, o catecol prenilado vem merecendo atenção especial devido às suas propriedades antioxidantes. Tanto *in vitro* (Barros et al., 1997) quanto *in vivo* (Ropke, 1999), esta substância exibiu atividade antioxidante superior ao α -tocoferol, indicando-a como potencial fármaco para condições patológicas onde ocorra participação de estresse oxidativo (Barros et al., 1997), (Desmarchelier et al., 1997), (Desmarchelier et al., 1997). Dentre as ações biológicas podemos citar sua ação antimalárica (Amorim et al., 1988), (de Ferreira-da-Cruz et al., 2000) e inibidora da replicação do HIV (Gustafson et al., 1992). Outras propriedades farmacológicas incluem ainda, a ação analgésica (Bioka & Abena, 1990), tranqüilizante (Bernard & Tieli, 1978), ação antimicrobiana (Mongelli et al.,

1995) e citotóxica (Mongelli *et al.*, 1999), com destaque especial à ausência de mutagenicidade em *Salmonella typhimurium* e ausência de mutagênese micronuclear em eritrócitos (Barros *et al.*, 2001).

Neste capítulo, é apresentado a preparação dos extratos vegetais e o isolamento do 4-nerolidilcatecol visando a posterior investigação do perfil farmacocinético do 4-NRC, comparativamente ao extrato hidroalcolólico padronizado.

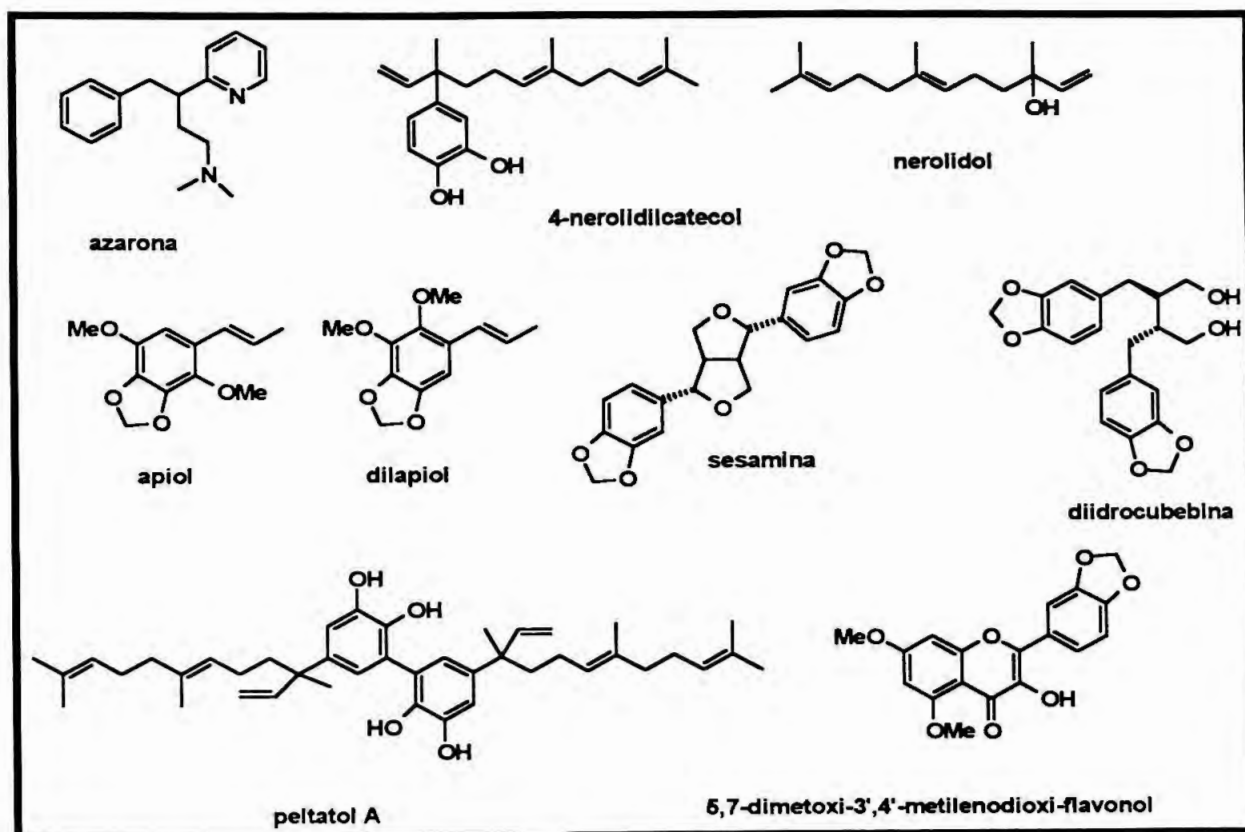


Figura 1: Metabólitos secundários isolados de *Pothomorphe* spp.

1.2-Experimental

1.2.1- Material e instrumentos utilizados

1. O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para a preparação do extrato e execução das cromatografias em coluna aberta, utilizou-se solventes submetidos a destilação fracionada. Na extração das substâncias adsorvidas à sílica durante as etapas de purificação, utilizou-se somente solventes de grau P.A., Merck. Para análise em CLAE, os solventes utilizados foram de grau espectroscópico (Fischer), filtrados através de membrana filtrante Teflon (Phenomenex; 0,22 μm) e desaerados sob sonicação à vácuo (15 min/L).
2. A fase estacionária empregada para cromatografia em coluna filtrante (CF) sob vácuo foi sílica gel 60 com partículas de 63-210 μm (Merck).
3. A separação cromatográfica preparativa foi realizada em Chromatotron modelo 7924 T (Harrison Research) em sílica gel PF₂₅₄ (Merck) com gesso e partículas de 5-45 μm , sob placa de vidro de 2 mm de espessura (artigo 7749, Merck)
4. Após cromatografia em camada delgada comparativa, a revelação dos cromatogramas foi efetuada com irradiações na região do UV (254 e 366 nm), borrifação de solução de vanilina / ácido fosfórico seguido de aquecimento a 70° C / 15 min.
5. Os espectros na região do ultravioleta foram obtidas em espectrofotômetro Beckman DU 60, utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.
6. Os espectros de RMN - ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetros Bruker 300 MHz utilizando como solvente CDCl₃ (Aldrich). A referência interna utilizada foi o sinal de TMS (0 δ). Os dados são expressos em deslocamento químico δ (ppm) e constante de acoplamento J em Hz.

7. O critério de pureza adotado para o 4-nerolidilcatecol foi de 96% aferido através da análise dos cromatogramas em:

- Cromatógrafo a gás, mod. HP- 5890 series II, com coluna capilar HP-5 de silicone derivatizada com 5% de fenil em metilsilicone medindo 30 m x 0,32 mm x 0,25 mm utilizando N₂ como gás de arraste e detector FID.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Modelo Constametric 3500 com detector UV (WATERS) em 282 nm acoplado a coluna analítica Luna Phenomenex (250 x 4,6 mm) e "loop" de injeção Reodyne de 20 µL.

1.2.2- Coleta e processamento da espécie vegetal

A espécie *Pothomorphe umbellata* foi coletada em março de 1998 no jardim de espécies cultivadas de Piperaceae do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Visando aproveitamento máximo da planta, folhas e raízes do material vegetal foram separadas previamente à secagem em estufa (40° C) e moagem em moinho de facas, sendo que a obtenção do extrato de folhas destinava-se unicamente à obtenção do 4-nerolidilcatecol purificado.

As folhas (1,00 kg) foram maceradas em metanol (10 L) a frio até a exaustão, obtendo-se 184,19 g (18,42 %) de extrato seco, após evaporação do solvente. Previamente, realizou-se análise quantitativa do processo de maceração, utilizando alíquotas de 1g de pó do vegetal em 10 mL solvente (hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol). O rendimento da extração de 4-NRC foi avaliado por cromatografia gasosa.

As raízes (822,45 g) foram submetidas a percolação em 18 L de etanol/água (3:2), segundo o método A da Farmacopéia Brasileira. Posteriormente evaporou-se o solvente, seguindo-se a liofilização da solução aquosa e obtenção do extrato seco de raízes (78,54 g / 9,5%)

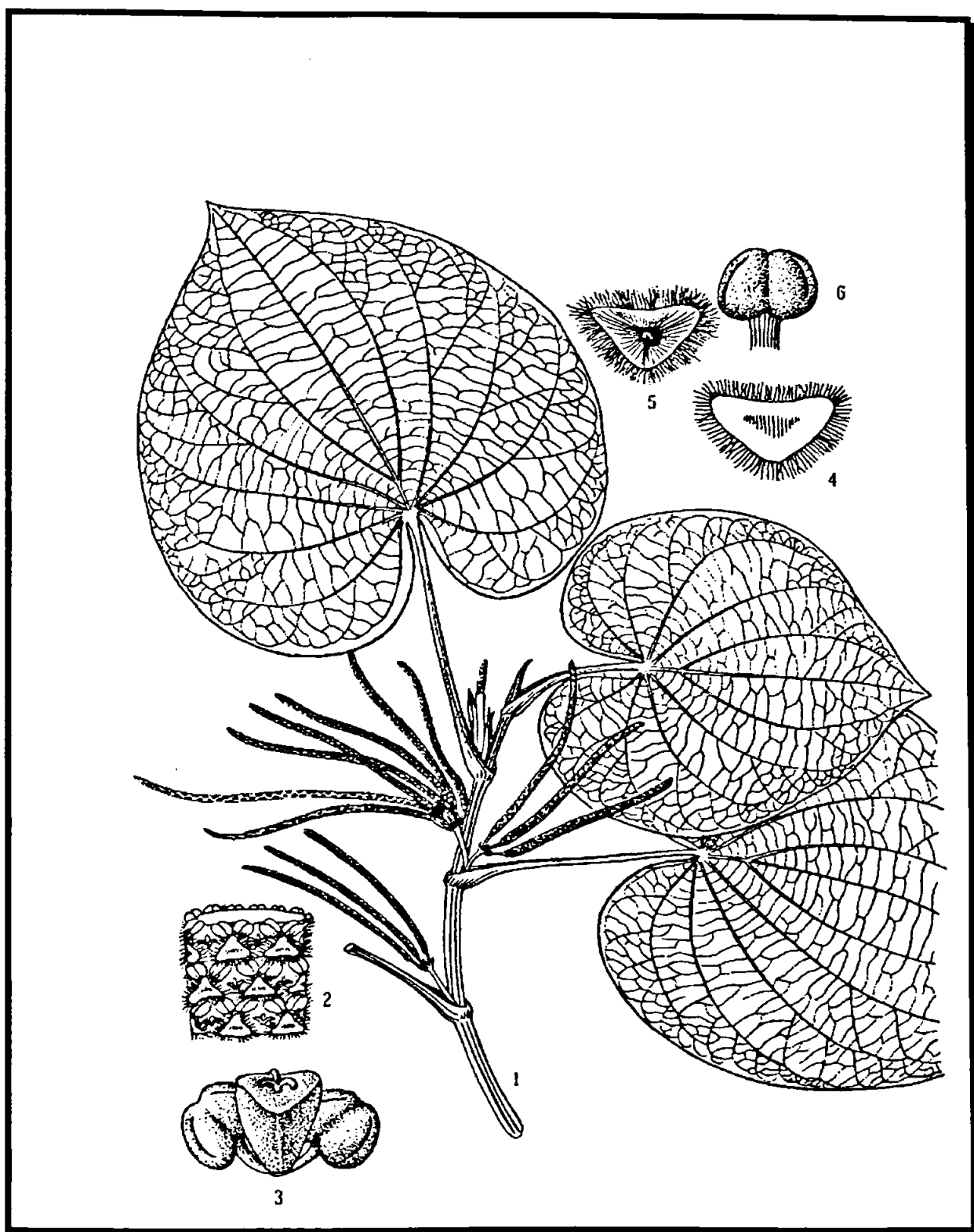


Figura 2: A espécie *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. - 1. Ramo florido - 2. Inflorescência - 3. Flores - 4. Vista abaxial da bráctea - 5. Vista adaxial da bráctea - 6. Estame. (FOC.128; FRPS 20(1): 15. pl. 5. 1982. Huang Sharong).

1.2.3- Isolamento do 4-nerolidilcatecol (4-NRC) a partir do extrato de folhas.

O extrato metanólico das folhas (184,2 g) de *Pothomorphe umbellata* foi ressuspendido em metanol:água (8:2) e submetido a etapas de filtração em celite (180,0 g) para remoção de matriz lipofílica e pigmentos interferentes. As frações obtidas foram reunidas após análise por cromatografia planar, resultando na recuperação de 84,1 g / 45,7% do extrato clarificado.

Alíquotas (3 x 10 g) do extrato clarificado foram submetidas a pré-tratamento através de coluna "filtrante" de sílica, utilizando-se funil de fundo esmerilhado (10 x 10 cm) e clorofórmio como eluente. O resíduo de evaporação (6,1 g) foi solubilizado em 20 mL de hexano, tendo sido fracionado (6x) e aplicado em cromatografia radial preparativa (110,0 x 5,0 mm) com fluxo de 8,0 mL/min, segundo o gradiente de eluição abaixo descrito (Tabela 1).

Tabela 1: Gradiente eluotrópico para purificação do 4-NRC em cromatografia radial.

Mistura eluotrópica	proporção mistura (v/v)	volume (mL)
hexano/diclorometano/metanol	10:5:1	200
	5:5:1	200
	2,5:5:1	150
	1:5:1	100
Diclorometano/metanol	5:1	100

Após comparação com amostra autêntica, as frações contendo 4-NRC foram reunidas e repurificadas por cromatografia radial (110,0 x 5,0 mm). Utilizou-se eluição isocrática com hexano/acetato etila (80:20) e fluxo de 8,0 mL/min.

Os resíduos de evaporação quando agrupados, totalizaram 1,2 g (0,7%) de um óleo amarelo claro, identificados por cromatografia em camada delgada como o 4-NRC. Os dados espectrométricos de RMN de ^1H e ^{13}C utilizados na identificação estrutural da substância são apresentados a seguir (Tabela 2, Figuras 4 e 5) e discutidos no item 1.4.

1.2.4- Padronização do extrato hidroalcolólico de raízes

Sextuplicatas de alíquotas de extrato bruto de raízes foram preparadas em fase móvel na concentração de 0,5 mg/mL e submetidas a pré-tratamento, anteriormente à injeção em CLAE.

Realizou-se aplicação destas em mini-colunas Sep-Pak C18 (Waters, Part Nº 51910), previamente condicionadas com 2 mL da fase móvel. Posteriormente, as amostras foram filtradas em discos de membrana filtrante (Millipore; PTFE-F; 0,22 µm), para eliminação de possíveis materiais particulados.

As injeções das amostras foram realizadas em um único dia, sendo que a quantificação do 4-NRC presente realizou-se segundo curva de linearidade do composto isolado, também dissolvido em fase móvel.

A análise quantitativa da substância majoritária no extrato hidroalcolólico de raízes foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Utilizou-se coluna de fase reversa (C18; 4,6 X 250 mm), MeOH/H₂O 90:10 como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min e detector UV ajustado em 282 nm.

Os dados obtidos são apresentados a seguir (Figura 3) e discutidos no item 1.4.

1.4- Resultados e discussão

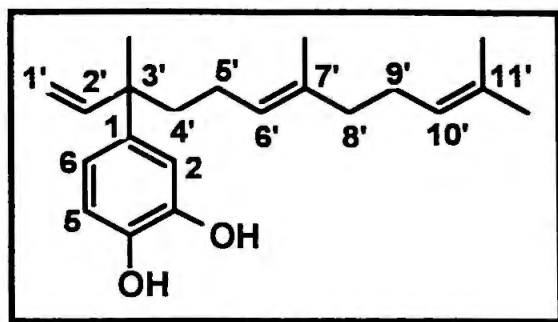
Na obtenção de 4-NRC a partir de extrato vegetal de folhas empregou-se sílica de fase normal, combinada à cromatografia radial preparativa como alternativa metodológica de purificação. Várias etapas de purificação seguiram-se, acarretando consideráveis perdas por adsorção e fotosensibilidade da substância, em parte comprometendo a obtenção de pureza adequada e quantidade suficiente de amostra para avaliação *in vivo*. No entanto, esta técnica demonstrou-se relativamente mais rápida, eficaz e reprodutível, quando comparada à cromatografia em camada delgada preparativa.

Idealmente, a purificação do catecol prenilado alcançaria maior êxito utilizando-se sílica de fase reversa (Hostettman et al., 1988), no entanto a indisponibilidade deste material no mercado durante realização do experimento, inviabilizou tal alternativa. No procedimento utilizado, a purificação do 4-NRC em sílica apresentou rendimento de 1,2 g, ou seja, 0,7% do extrato metanólico seco de folhas. Neste assegurou-se 96% como um grau de pureza satisfatório para a amostra, tendo sido aferido por CLAE-UV, nas mesmas condições descritas para padronização do extrato de raízes.

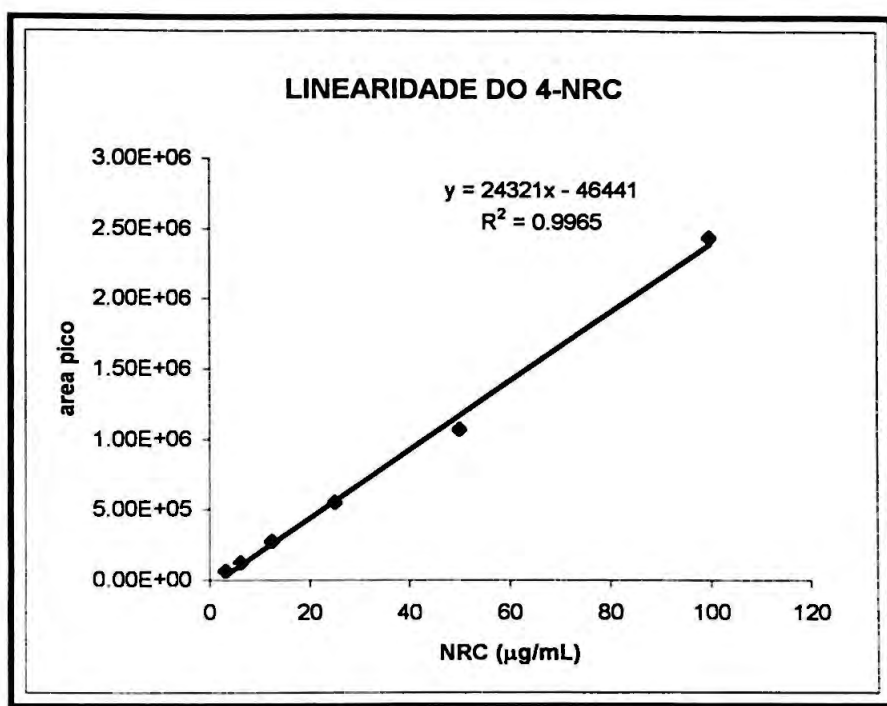
O identificação estrutural do 4-nerolidilcatecol presente em folhas de *Pothomorphe umbellata* foi realizada mediante obtenção de dados de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. A análise comparativa e o estudo espectroscópico dos deslocamentos químicos da amostra evidenciou valores idênticos àqueles publicados anteriormente para o 4-NRC (Kijoa et al., 1980), (Gustafson et al., 1992) confirmando assim, a identidade da substância isolada (Tabela 2).

O 4-NRC foi identificado como principal componente do extrato hidroalcolico seco de raízes (21,5%; SD=3,33; n=6), com tempo de retenção de 11,60 (SD=0,073, n=12). A identidade da substância detectada foi confirmada após a coinjeção do padrão, sendo que a quantificação deste foi realizada por CLAE acoplada a espectrometria ultravioleta (282 nm), em coluna de fase reversa C18 (250 X 4,6 mm) utilizando-se metanol/água 90/10 como fase móvel e fluxo de 1,0 mL / min (Figura 6). Nestas condições, a curva de calibração do 4-NRC em metanol apresentou excelente coeficiente de correlação ($r^2=0,997$), sustentando os resultados obtidos.

Tabela 2: Deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do 4-nerolidilcatecol.



Tipo C (Nº)	Literatura (270 MHz, CDCl_3)	Experimental (CDCl_3 , 300 MHz)	Literatura (22,5 MHz)	Exp. (75,0 MHz)
	^1H	^1H	^{13}C	^{13}C
$\text{CH}_3(3')$	1,30 (s)	1,30 (s; 3H)	25,0	24,9
C (3')	—	—	43,8	43,8
$\text{CH}_3(11')$	1,51 (s)	1,51 (s; 3H)	17,7	17,7
$\text{CH}_3(11')$	1,59 (s)	1,59 (s; 3H)	25,7	25,7
C (11')	—	—	131,4	131,4
$\text{CH}_3(7')$	1,67 (s)	1,67 (s; 3H)	15,9	15,9
C (7')	—	—	135,1	135,0
$\text{CH}_2(5')$	1,9-2,1 (m; 4H)	1,92-2,06 (m; 4H)	23,2	23,2
$\text{CH}_2(9')$			26,8	26,7
$\text{CH}_2(4')$	1,6-1,9 (m; 4H)	1,62-1,88 (m; 4H)	41,2	41,1
$\text{CH}_2(8')$			39,7	39,7
$\text{CH}_2(1a')$	5,00 (dd; J=17,0 e 1,3 Hz)	5,00 (d; J=16,6 e 1,2 Hz)	111,6	111,5
$\text{CH}_2(1b')$	5,05 (dd; J=10,5 e 1,3 Hz)	5,05 (d; J=9,7 e 1,2 Hz)		
CH(6')	5,09 (2t; J=7,5 Hz)	5,09 (2t; J=6,3 Hz)	124,5	124,4
CH(10')			124,7	124,6
CH(2')	5,97 (dd; J=17,0 e 10,5 Hz)	5,97 (dd; J=17,4 e 10,8 Hz)	147,1	147,1
CH(5)	6,78 (d; J= 8,0 Hz)	6,78 (d; 8,3 Hz)	119,3	119,1
CH(6)	6,73 (dd; J= 8,0 e 2,0 Hz)	6,73 (dd; 8,3 e 1,6 Hz)	114,4	114,2
CH(2)	6,83 (d, J=2,0 Hz)	6,84 (d, 1,6 Hz)	143,2	143,1
C(3)	—	—	115,1	115,0
C(1)	—	—	141,1	141,0
C(4)	—	—	141,4	141,3



Extrato bruto	NRC ($\mu\text{g/mL}$)	% final
E1	90.7	18.1
E2	107.7	21.5
E3	93.0	18.6
E4	136.0	27.2
E5	103.0	20.6
E6	115.0	23.0
média	107.6	21.5 \pm 3,33

Figura 3: Quantificação do 4-nerolidilcatecol presente no extrato hidroalcolico de raízes, segundo curva de linearidade em CLAE-UV.

Current Data Parameters
 NAME 4-NHC-11
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 980820
 Time 15.29
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG zg30
 TO 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 16
 DS 2
 SMH 3360.215 Hz
 FIDRES 0.102546 Hz
 AQ 4.8759284 sec
 RG 71.8
 DM 148.800 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 P1 13.80 usec
 DE 6.00 usec
 SFO1 300.1316225 MHz
 NUC1 1H
 PL1 4.00 dB

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 300.1300124 MHz
 EM
 MDW 0
 SSB 0.30 Hz
 LB 0
 GB 0
 PC 1.00

ID NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 7.325 ppm
 F1 2198.34 Hz
 F2P -0.079 ppm
 F2 -23.80 Hz
 PPMCH 0.37020 ppm/cm
 HZCH 111.10699 Hz/cm

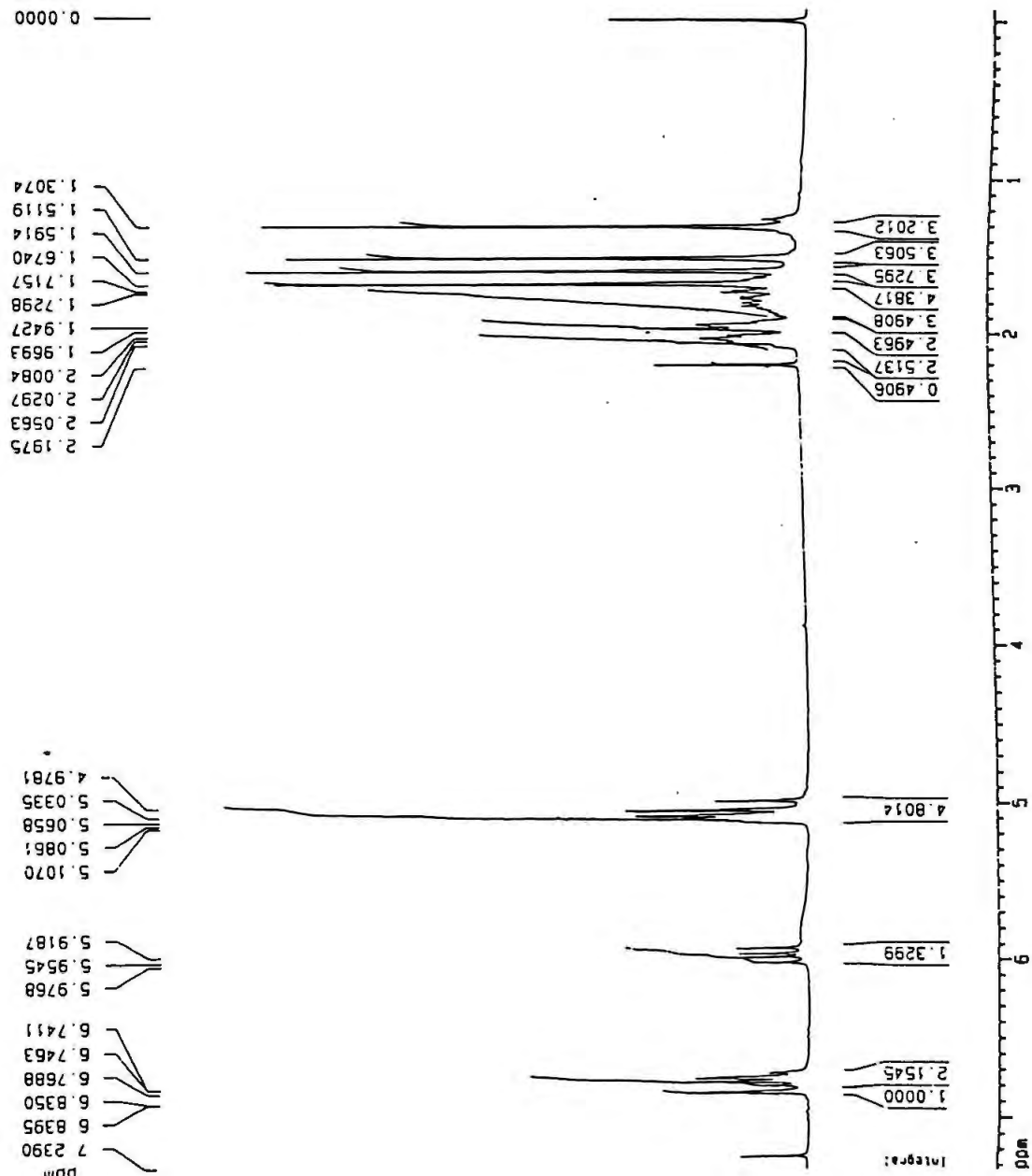


Figura 4: Espectro de RMN de ¹H do 4-nerolidiacetol (CDCl₃, 300 MHz)

Current Data Parameters
 NAME 4-NCC-c13
 ECPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 960820
 Time 16 51
 INSTRUM spect
 PROBM4 5 mm Multinu
 PULPROG zgpg30
 TO 65536
 SOLVENT CDC13
 NS 1024
 DS 2
 SM 16776.523 Hz
 FIDRES 0.256020 Hz
 AQ 1.9530228 sec
 RG 32768
 CW 29.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 300.0 K
 D12 0.00002000 sec
 PL13 24.00 dB
 D1 2.00000000 sec
 CPTPRG2 waltz16
 PCPD2 95.00 usec
 SF02 300.1312005 MHz
 NU2 1H
 PL2 3.00 dB
 PL12 24.00 dB
 P1 14.00 usec
 DE 6.00 usec
 SF01 75.4759523 MHz
 NU1 13C
 PL1 1.00 dB
 D11 0.03000000 sec

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 75.4677502 MHz
 MV EN
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 ca
 F1F 150.613 ppm
 F1 11366.43 Hz
 F2P -1.519 ppm
 F2 -114.63 Hz
 PPRNCH 7.60680 ppm/ca
 HZCA 574.05280 Hz/ca

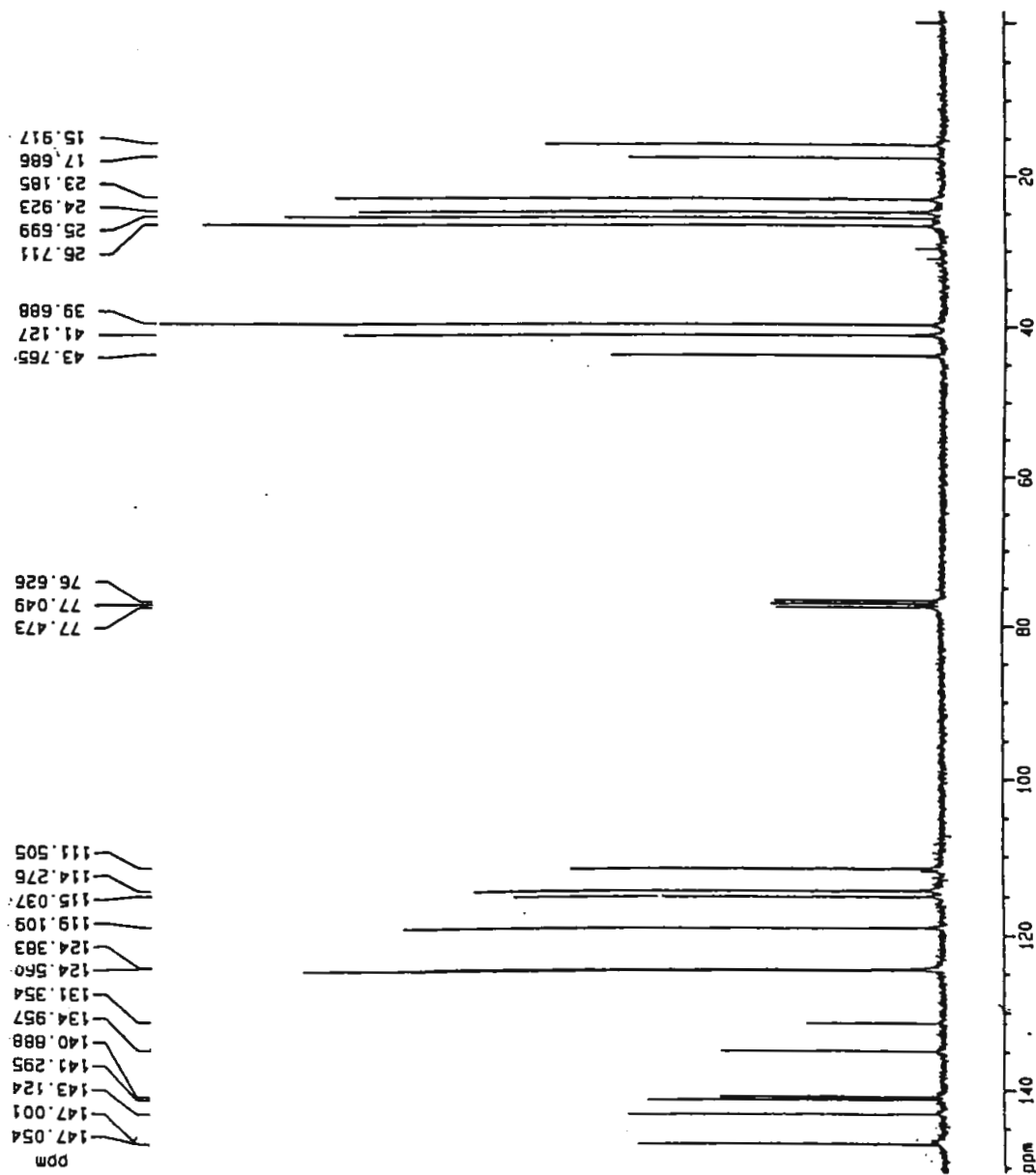
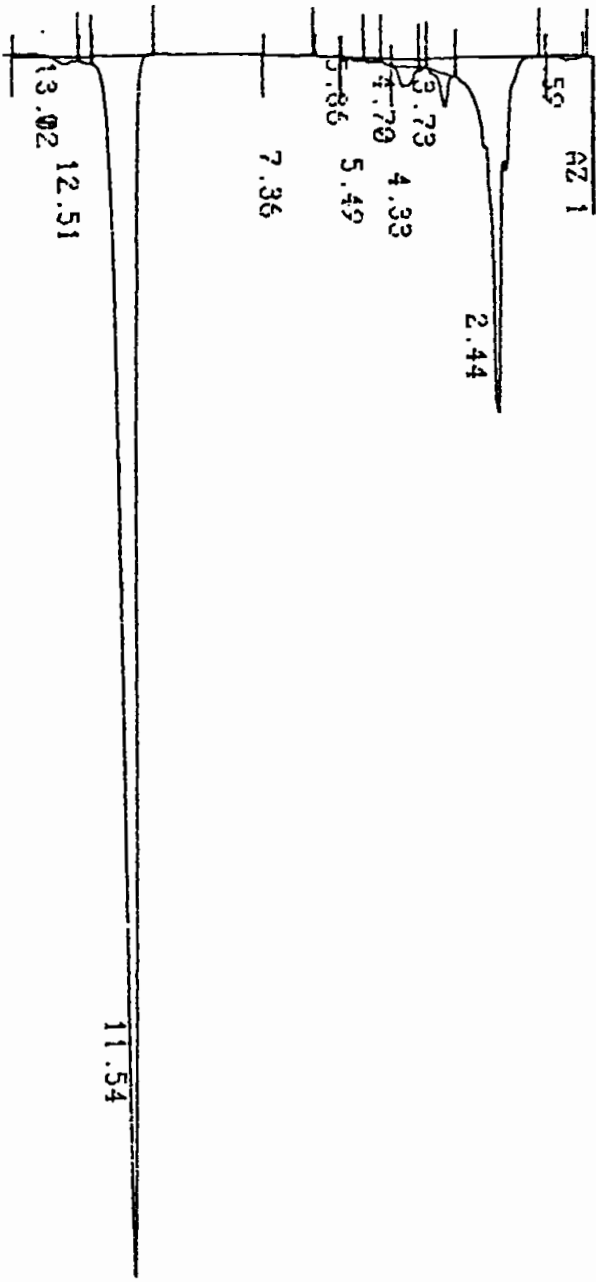


Figura 5: Espectro de RMN de ¹³C do 4-nerolidic acid (CDC1₃, 75 MHz)



TESTE 11/28/01 14:17:14 CH= "A" PS=

FILE 1. METHOD 0. RUN 16 INDEX 16

PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.292	0.59	10803	01
2	26.036	2.44	962101	08
3	1.085	3.73	40076	06
4	0.106	4.33	3907	06
5	1.137	4.7	42009	07
6	0.13	5.49	4818	06
7	0.118	5.86	4367	07
8	0.13	7.36	4818	01
9	69.605	11.54	2572158	02
10	0.472	12.51	17446	02
11	0.889	13.02	32835	03

Figura 6: Cromatograma do extrato padronizado de raízes de *Pothomorphe umbellata*, em CLAE-UV (282 nm)

1.5- Referências

- Akisue, M.K., Oliveira, F. & Akisue, G. (1984). Caracterização cromatográfica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. *An. Farm. Quím.*, **24**, 1.
- Amorim, C.Z., Flores, C.A., Gomes, B.E., Marques, A.D. & Cordeiro, R.S. (1988). Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe*. *J Ethnopharmacol*, **24**, 101-6.
- Barros, S., Sawada, T.C.H., Ropke, C.D., Silva, V.V., Pereira, S.M.M. & Barros, S.B.M. (2001). Avaliação mutagênica do extrato hidroalcoólico de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. In *XII Congresso Brasileiro de Toxicologia*. Porto Alegre - RS.
- Barros, S.M., Teixeira, D.S., Aznar, A.E., Moreira Jr., J.A., Ishii, I. & Freitas, P.C.D. (1997). Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* (L) Miq (pariparoba). *J. Braz. Assoc. Adv. Sci.*, **48**, 114.
- Bastos, W.L. (1998). Metabolismo secundário de *Pothomorphe umbellata*. In *Química Orgânica*. pp. 95. Araraquara: Universidade Estadual Paulista.
- Bernard, H.O. & Tieli, K. (1978). Isolierung von 1-Allyl-2,3-dimethoxy-4,5-methylendioxybenzol(=Dill-Apiol) aus *Heckeria umbellata* (L) Kunth (Piperaceae). *Helv. Chim. Acta*, **61**, 2273.
- Bioka, D. & Abena, A. (1990). Psychopharmacological profile of *Piper umbellatum* aqueous extract. *Encephale*, **16**, 205-208.
- Chartol, A. (1964). *Piper umbellatum* a vegetable insect repellent. *Med. Trop.*, **24**, 743.
- Coimbra, R. & Silva, E.D. (1958). Notas de Fitoterapia. pp. 292. Rio de Janeiro.
- De Feo, V. (1991). Uso di piante ad azione antiinfiammatoria nell'Alto Ucayali, Peru Orientale. *Fitoterapia*, **LXII**, 481-494.
- de Ferreira-da-Cruz, M., Adami, Y.L., da Espinola-Mendes, E., Figueiredo, M.R. & Daniel-Ribeiro, C.T. (2000). The intraperitoneal Plasmodium berghei-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. *Exp Parasitol*, **94**, 243-7.

- Desmarchelier, C. & Schaus, F.W. (2000). *Pothomorphe peltata* (L) Miq. In *Sessenta plantas medicinales la Amazonia Peruana: Ecología, Ethomedicina y Bioactividad*. pp. 212-215.
- Desmarchelier, C., Barros, S., Repetto, M., Latorre, L.R., Kato, M., Coussio, J. & Ciccía, G. (1997). 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. *Planta Med.*, 63, 561-3.
- Desmarchelier, C., Mongelli, E., Coussio, J. & Ciccía, G. (1997). Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L). Miq. *Braz J Med Biol Res*, 30, 85-91.
- Di Stasi, L.C., Hiruma, C.A., Guimarães, E.M. & Santos, C.M. (1993). Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia*, LXV, 529-540.
- Freise, F.W. (1933). Plantas medicinais brasileiras. In *Biol. Agríc.* pp. 428. São Paulo: Secretaria da Agricultura Indústria e Comércio do Estado de São Paulo.
- Gustafson, K.R., Cardelina II, J.H., McMahon, J.B., Pannell, L.H., Cragg, G.M. & Boyd, M.R. (1992). HIV inhibitory natural products. 6. The peltatois, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. *J. Org. Chem.*, 57, 2809-2811.
- Hammer, M.L.A. & Johns, E.A. (1993). Tapping an Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará (Brazil). *J. Ethnopharmacol.*, 40, 53.
- Hostettman, K., Hostettman, M. & Marston, A. (1988). *Preparative Chromatographic Techniques. Applications in Natural Product Isolation*. New York: Springer-Verlag.
- Kijoa, A., Giesbrecht, A.M., Akisue, M.K., Gottlieb, O.R. & Gottlieb, H.E. (1980). The chemistry of Brazilian Piperaceae. 2. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Med.*, 39, 85-87.
- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Coussio, J. & Ciccía, G. (1995). Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the Peruvian Amazon region. *Rev. Argent. Microbiol.*, 27, 199-203.
- Mongelli, E., Romano, A., Desmarchelier, C., Coussio, J. & Ciccía, G. (1999). Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. *Planta Med.*, 65, 376-8.

- Moraes, M.S. (1986). Considerações sobre a pariparoba oficial *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Rev. Bras. Farmacog.*, 1, 101.
- Moraes, M.S., Oliveira, F., Mancini, B., Akisue, M.B. & Akisue, G. (1986-1987). Morfodiagnose das folhas e sumidades floridas da droga Pariparoba (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.). *Rev. Ciênc. Farm.*, 8/9, 77-90.
- Peckolt, W. (1929). Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil: Estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. In *Mem. Inst. Butantan*. pp. 1.
- Ropke, C.D. (1999). Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* L. Miq na pele. In *Fármaco e Medicamentos*. pp. 83. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Silva, G.A.A.B. & Baver, L. (1972). Contribuição ao estudo do óleo essencial de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. *Rev. Bras. Farm. Rio de Janeiro*, 53, 59-61.
- Silva, R.A.D. (1926). *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Cia Ed. Nacional.
- Yunker, T.G. (1973). The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*, 3, 29-284.
-

Capítulo 2
Validação analítica do
4-nerolidilcatecol por CLAE-UV

2- Validação de metodologia analítica do 4-NRC por CLAE-UV

2.1- Introdução

A investigação cinética de substâncias, sejam elas um medicamento alopático, um toxicante ou mesmo extratos vegetais de plantas, todos necessitam de aprimoramento ou mesmo desenvolvimento de uma metodologia analítica sensível e, acima de tudo, específica que assegure a quantificação do analito em questão. Assim, o processo de validação de métodos bioanalíticos para geração de dados farmacocinéticos e de biodisponibilidade requer a utilização de critérios normatizados, como estudos de linearidade do analito em solvente e em matriz biológica, porcentagem de recuperação, assim como sua estabilidade e conseqüentemente, a exatidão e precisão de suas medidas (Shah *et al.*, 1991), (Karnes *et al.*, 1991).

Várias metodologias de análise de catecóis são disponíveis, dentre elas podemos citar a cromatografia líquida acoplada a detecção eletroquímica (Cai *et al.*, 1999), (Stremetzne *et al.*, 1997), (van Acker *et al.*, 1996), (Holmes *et al.*, 1994), (Ohshima *et al.*, 1998), e detecção ultravioleta (El-Shafae & El-Domiaty, 2001), (Castagnetta *et al.*, 1992), (Lunte, 1987), (Lee *et al.*, 1993) como as técnicas mais freqüentemente utilizadas.

O método de detecção ultravioleta para catecóis é amplamente utilizado, devido não apenas à maior disponibilidade destes equipamentos, mas também devido à sua relativa facilidade de manuseio. Tais metodologias, geralmente apresentam boa sensibilidade e seletividade na detecção de substâncias em plasma (Romanova *et al.*, 2000), (Rouseff *et al.*, 1992), (Ruperez *et al.*, 1999), (Stecher *et al.*, 2001), (Pade *et al.*, 1995).

Assim, o objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação preliminar do 4-nerolidilcatecol em plasma de ratos tratados, assim como a avaliação dos fatores biológicos interferentes do método.

2.2- Experimental

2.2.1- Materiais e instrumentos utilizados

1. Na análise em CLAE, os solventes utilizados foram de grau espectroscópico (Fischer), filtrados através de membrana filtrante Teflon (Phenomenex; 0,22 μ m) e desaerados sob sonicação à vácuo (15 min/L).
2. Cromatógrafo líquido de alta eficiência Mod. Constametric 3500 com detector UV (WATERS) em 282 nm acoplado a coluna analítica Luna Phenomenex (250x4,6 mm) e "loop" de injeção Rheodyne de 20 μ L.
3. Na Universidade da Flórida, Gainesville-USA, utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo Constametric 3200 com detector UV mod LDC Milton Ray (em 282 nm), coluna analítica Zorbax SB-C18 (4,6 X 150 mm), amostrador automático HP 3396 series III e "loop" de injeção Rheodyne de 20 μ L.
4. As amostras analisadas em CLAE foram mantidas em frascos de vidro de 250 μ L de capacidade, cobertos com tampa metálica. A prevenção da oxidação das amostras frente a ação luminosa foi realizada utilizando-se papel alumínio, durante preparação e espera para amostragem automática.
5. As substâncias utilizados foram provenientes de diferentes fornecedores: 2,6-Di-*terc*-butil-*p*-hidroxitolueno (BHT, Sigma), Etanol (Sigma), halotano (Metophane®, Sigma), etilcarbamato (Uretano, Sigma).
6. As amostras de plasma utilizadas na validação do método foram de origem humana, a não ser quando especificado ao contrário.
7. Na análise estatística utilizou-se os programas Excel (Win 2000).

2.2.2- Condições cromatográficas

As condições analíticas empregadas durante o processo de validação do método por CLAE-UV constituíram-se na fase móvel isocrática de Metanol / Acetonitrila / H₂O (62 / 20 / 18), utilizando-se coluna Zorbax SB-C18 (4,6 mm X 150 mm), fluxo de 1,6 mL/min e detecção ultravioleta em 282 nm. Os tempos de retenção observados para o BHT (\pm DP) e 4-NRC (\pm DP) foram, respectivamente 3,55 (\pm 0,09) e 5,16 (\pm 0,23) min.

2.2.3- Preparo das soluções

As soluções estoque do analito e padrão interno (PI) foram preparadas em metanol e armazenadas à - 20°C, tendo sido denominadas SE1 (4-NRC; 10,0 μ g/mL), SE2 (4-NRC, 100,0 μ g/mL) e SE3 (PI, 100,0 μ g/mL). Estas foram utilizadas na preparação das curvas de linearidade em metanol, assim como na curva de calibração em plasma.

A linearidade do 4-NRC foi aferida pela análise em duplicata de cinco pontos na faixa entre 1,0 e 80,0 μ g/mL, pipetados a partir das soluções estoque com diluições e homogeneização diretamente em metanol. A avaliação dos dados realizou-se através de regressão linear, relativamente à razão das alturas dos picos do analito e padrão interno (4-NRC/BHT), assim como do analito apenas.

Cinco soluções de calibração na faixa de 1,0-80,0 μ g/mL foram preparadas a partir de alíquotas apropriadas das soluções estoque. Estas foram transferidas para tubos de vidro (borossilicato), evaporadas sob nitrogênio e homogeneizadas em plasma (250 μ L). As alturas dos picos versus concentração nominal foram inseridas em gráfico para obtenção da regressão linear para a curva de calibração, após prévia análise utilizando-se área de picos. Os dados obtidos foram aferidos através do método de análise dos quadrados mínimos.

A solubilização do 4-NRC para administração em animais foi realizada em hidroxipropil- β -ciclodextrina a 30% (w/w), com auxílio de ultra-som (5 min). A solução obtida (2,5 mg/mL) permaneceu em repouso por 12 h/ -15 °C até obtenção do complexo de inclusão.

2.2.4- Procedimento de extração do 4-NRC em plasma¹

A extração do 4-NRC foi baseada em procedimento previamente descrito para α -tocoferol (Ruperez *et al.*, 1999). O volume de 1 mL da mistura metanol/etanol (1:1) foi adicionada a 250 μ L de plasma, seguida da adição de 50 μ L de BHT (SE3) e 0,5 mL de água. Após homogeneização da solução em vortex, adicionou-se 3 mL de hexano (2X), submetendo-se os tubos à agitação horizontal por 15 min. As fases foram separadas por centrifugação a 3500 rpm/ 15 min, os sobrenadantes reunidos (fase hexânica) e evaporados sob fluxo de nitrogênio, à temperatura ambiente. O resíduo foi reconstituído em 250 μ L de metanol/água (85:15). A seguir a solução foi transferida para frascos de injeção automática e alocados em carrossel acoplado ao cromatógrafo líquido.

2.2.5- Cálculos

As razões das alturas dos picos do 4-NRC relativas àquelas do padrão interno (BHT) foram calculadas para o 4-NRC em metanol. Comparou-se ainda, os dados de linearidade do 4-NRC na ausência de padrão interno. As concentrações desconhecidas de 4-NRC foram determinadas, a partir das equações de regressão linear das curvas de calibração, relacionando as alturas do picos das curvas de calibração às suas concentrações nominais.

¹ A validação do método foi realizada em plasma humano, exceto quando especificado ao contrário.

2.3- Resultados e discussão

2.3.1- Linearidade

As soluções de 4-NRC assim como a razão entre os picos do 4-NRC/BHT em metanol mostraram-se lineares, uma vez que os coeficientes de correlação linear nas 5 concentrações analisadas (1-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adequados. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estabelecidos em 1,0 e 3,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram fixados mediante coeficiente de variação inferior a 20% (Shah *et al.*, 1991).

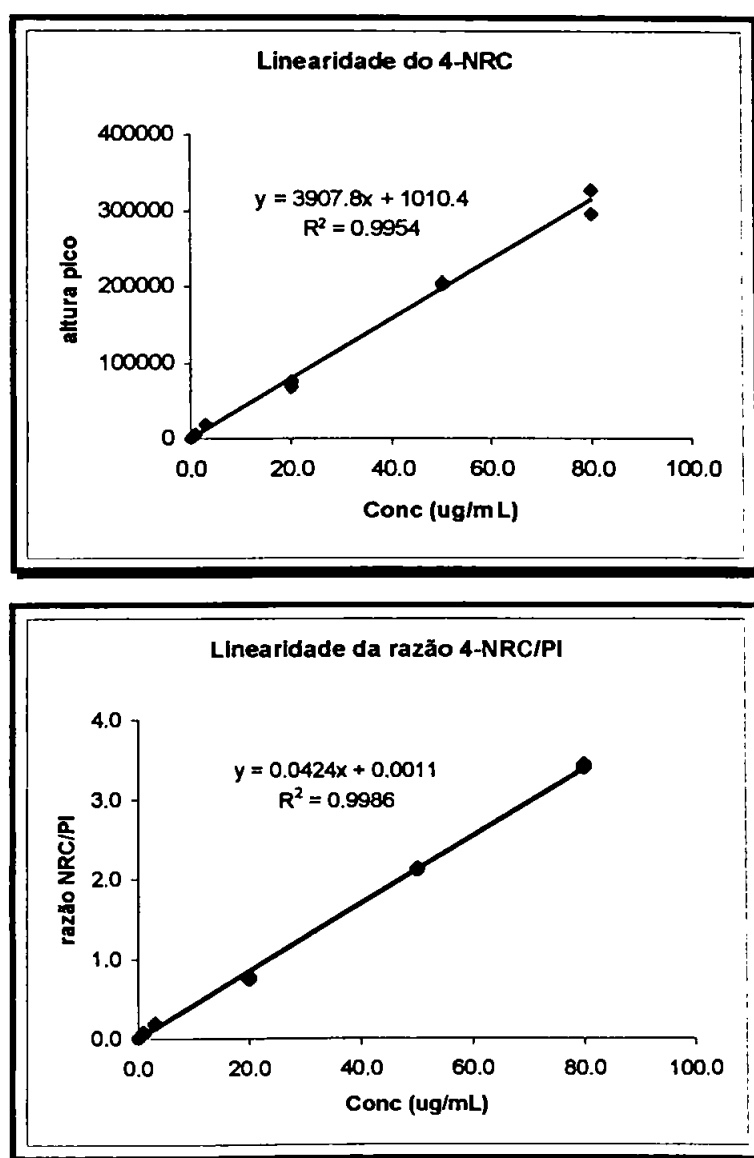


Figura 7: Linearidade do 4-NRC, e da razão 4-NRC/BHT em solução metanólica.

2.3.2-Eficiência da recuperação em plasma.

A pesquisa dos fatores interferentes da recuperação do BHT foram realizadas segundo esquematizado na Figura 8. Nestes experimentos, a razão entre as concentrações C/A (ou C/B) referem-se à recuperação relativa do 4-NRC (91,0%), enquanto que a razão B/A (ou D/A) representa o valor de recuperação do BHT (12%). Subtraindo-se a razão entre F/G e D/E da unidade, podemos inferir sobre o efeito da matriz sobre o 4-NRC (25%) e BHT (290%) ,respectivamente (Tabela 3).

A quantidade de BHT recuperado em plasma e em meio aquoso foi igualmente baixa (1-3%), tendo oscilado consideravelmente, após evaporação sob N₂ (figura 8, itens B/A, D/A e E/A= 1; 3,5; 12,3%). Resultados similares foram obtidos após a reconstituição do resíduo de evaporação da solução estoque (SE3), no volume e solvente originais (MeOH). Testes de solubilidade foram efetuados com solventes de polaridade média (éter etílico, clorofórmio), mas houve incompatibilidade com a fase móvel, durante análise cromatográfica. Em contrapartida, a adição de SE3 ao plasma branco extraído resultou em 81-86% de recuperação absoluta (Figura 8, itens A e C). Infelizmente, a causa provável da baixa recuperação não pode ser confirmada, pois não foi possível a avaliação da aderência do BHT a tubos de vidros silanizados.

Conseqüentemente, o BHT (2, 6-Di-*terc*-butil-*p*-hidroxitolueno) foi considerado ineficaz como padrão interno da curva de calibração em plasma, devido ao elevado valor de desvio padrão (n= 30; RSD= 42,84 %) e insatisfatório valor do coeficiente de correlação linear ($R^2 < 0,95$.) para a razão 4-NRC/PI (<http://www.fda.gov/guidance>). No entanto, este continuou presente nas amostras como antioxidante do meio.

Após avaliação prévia da extração do 4-NRC em plasma, esta foi confirmada durante os três dias de validação do método. Os cálculos foram efetuados comparativamente à curva de linearidade do padrão (4-NRC) em solvente orgânico ($y = 3901x + 1422,3$), ou seja, estabelecendo-se a razão entre analito extraído e analito não extraído (solvente)

A precisão das medidas de recuperação interensaio do 4-NRC variaram entre um máximo e mínimo de 12,66 e 6,25 %, respectivamente (Tabela 4), enquanto que a exatidão da recuperação absoluta do 4-NRC em plasma foi quantitativa (106,33%; SD=9,81,) e linear na faixa de 1-80 µg/mL.

Tabela 3: Avaliação da extração do analito e padrão interno em plasma e água.

Teste ¹	BHT média ² ($\mu\text{g/mL}$)	NRC média ² ($\mu\text{g/mL}$)	Razão	Significado
A	16,2 ($\pm 1,6$)	42,5 ($\pm 4,5$)		analito e BHT (100%)
B	2,0 ($\pm 1,2$)	46,1 ($\pm 2,3$)	B/A=0,12	Recuperação relativa do BHT
C	17,3 ($\pm 0,2$)	38,6 ($\pm 0,6$)	C/A=0,91	Recuperação relativa do 4-NRC
D(plasma)	0,7 ($\pm 0,2$)	—	D/E=2,9	Efeito da matriz sobre BHT
E (H ₂ O)	0,2 ($\pm 0,1$)	—		
F(plasma)	—	37,5 ($\pm 3,8$)	F/G=0,75	Efeito da matriz sobre 4-NRC
G(H ₂ O)	—	50,1 ($\pm 5,3$)		

1- Letras correspondem aos experimentos da figura 8.

2- Recuperação relativa às soluções padrões de 4-NRC (40 $\mu\text{g/mL}$) e BHT (20 $\mu\text{g/mL}$).

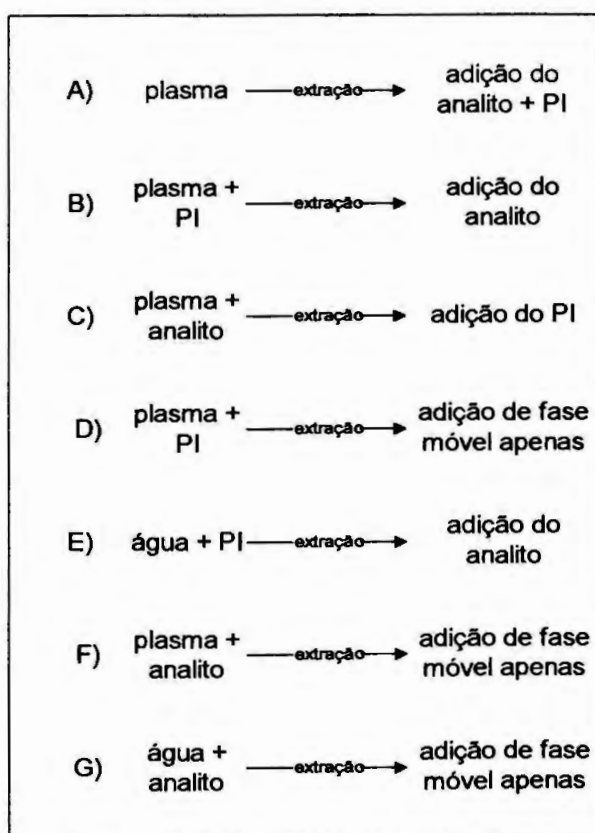


Figura 8: Delineamento experimental da recuperação do analito e padrão interno (PI).

Tabela 4: Validação da recuperação do 4-NRC durante 3 dias da validação do método.

ANALITO: 4-NEROLIDILCATECOL		Equipamento: HPLC-UV				
Fase móvel: Metanol:Acetonitrila:H ₂ O (62 / 20 / 18)		Fluxo: 1,6 mL/min		Coluna: RP-18		
		Unidade: µg/mL				
Data	1,00 µg/mL	3,0 µg/mL	20,0 µg/mL	50,0 µg/mL	80,0 µg/mL	
<i>Dia 1</i>	0,99	3,74	20,72	53,14	89,17	
	0,87	3,50	19,05	50,08	83,25	
<i>Dia 2</i>	1,05	3,37	18,06	54,16	97,52	
	1,11	4,00	14,95	60,48	93,28	
<i>Dia 3</i>	1,02	3,38	18,44	54,85	75,93	
	1,31	3,44	18,61	50,93	76,01	
Concentração média	1,06	3,57	18,31	53,94	85,86	
Desvio padrão	0,13	0,23	1,72	3,37	8,21	
Coef. variação interensaio (%)	12,7	6,4	9,4	6,3	9,6	
Exatidão	105,8	119,1	91,5	107,9	107,3	

2.3.3- Avaliação da estabilidade do 4-NRC

2.3.3.1- Extração a partir de contaminação em sangue total de rato (200 µg/mL), com análise em plasma.

Estes dados foram baseados em experimento onde um “pool” de sangue heparinizado (hematócrito=0,5) foi contaminado com solução de 4-NRC para concentração teórica de 200 µg/mL (em 250 µL de plasma). Este foi fracionado e incubado à temperatura e tempos variados. Considerou-se completa solubilidade do analito em *plasma*, ao qual aplicou-se procedimento de extração padrão (item 2.2.4).

A estabilidade do 4-NRC presente em plasma, frente ao armazenamento sob refrigeração a -17 °C ou 0°C, é favorecida relativamente à extração e análise, imediatamente após a contaminação do sangue. Nos primeiros casos, as recuperações foram de 32,9 e 22,0 %, respectivamente, contra 24,4% obtido após extração imediata.

Adicionalmente, quando o sangue é mantido à temperatura ambiente (25°C), observa-se decréscimo de 32% na recuperação em plasma, comparativamente à extração imediata. Este decréscimo sugere a existência de degradação enzimática e/ou intervalo de tempo necessário para haver o equilíbrio hidrófilo/lipófilo da droga entre plasma e células sangüíneas.

Tabela 5: Estabilidade do analito em sangue total

Experimento	4-NRC (µg/mL)	recuperação (%)
(imediato)	48,7	24,4
(-17 °C)/12h	65,7	32,9
(0 °C)/12 h	43,9	22,0
(+ 25 °C)/1h	32,9	16,5

2.3.3.2- Tempo de incubação e análise em sangue total

A análise da estabilidade do 4-NRC foi realizada a partir de 5 mL de sangue fresco heparinizado, ao qual adicionou-se 100 μL da solução estoque de 4-NRC (2,5 mg/mL) até concentração final de 50,0 $\mu\text{g/mL}$. Em tubos de ensaio de vidro procedeu-se o fracionamento do sangue, em porções contendo 0,5 mL cada. Duplicatas dos tubos de ensaio foram mantidas em banho de gelo (0°C) e o analito extraído de sangue total após 5, 20 e 35 min do início do período de incubação (1 min / 15000 rpm).

As concentrações plasmáticas de 4-NRC após 5, 20 e 35 min foram de 41,2; 37,3 e 33,5 representando perdas de 17,5; 25,3 e 33,1 %, respectivamente, relativamente à amostra inicial à 50 $\mu\text{g/mL}$.

A análise em sangue total, ao final dos 35 min do período de incubação, aponta para perdas de 33% , referentes à instabilidade do analito em sangue total de rato (Figura 9).

Portanto, as amostras devem ser centrifugadas imediatamente após coleta mantidas resfriadas (0°C), como demonstrado em experimento prévio (item 2.3.3.1) com sangue total.

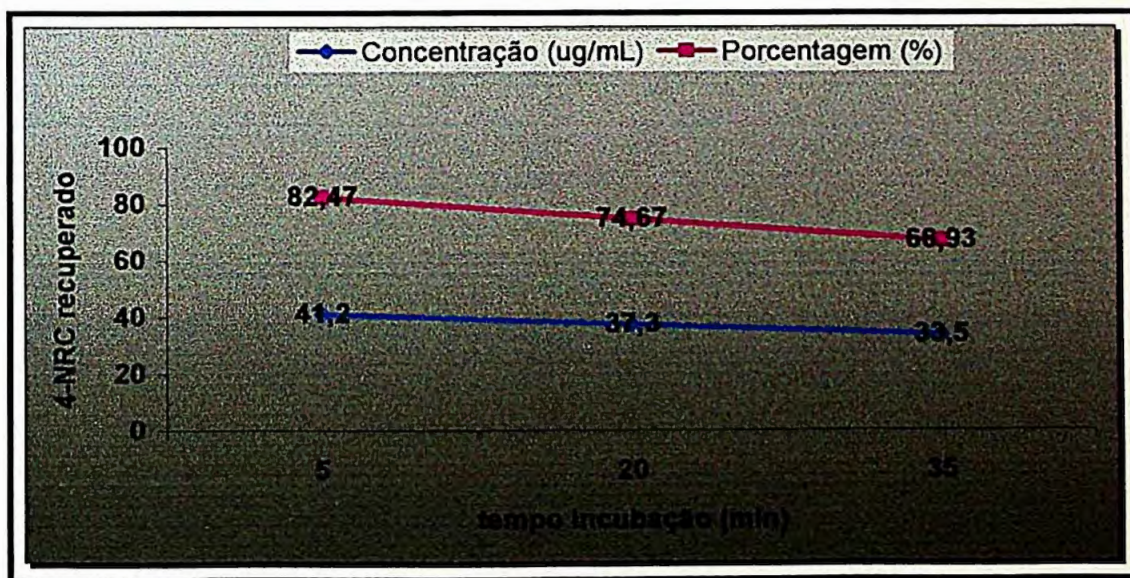


Figura 9: Análise do tempo de incubação do 4-NRC (NRC; 50 $\mu\text{g/mL}$) na recuperação.

2.3.3.3- Armazenamento em freezer (- 80 °C)

A estabilidade em freezer foi avaliada após três ciclos de armazenamento (congelamento / descongelamento). As amostras foram mantidas sob banho de gelo e abrigo da luz. No primeiro dia procedeu-se incubação e extração do analito em sangue total. Ao final do dia, estas amostras foram congeladas (- 80 °C, 15h) e avaliadas no dia seguinte (dia 2). As mesmas amostras, foram então recongeladas ao final do dia 2 (15 h, 80 °C), descongeladas no dia 3 e reavaliadas.

A estabilidade do 4-NRC durante três dias de análise foi de 100,9 % \pm 0,8; 94,0 % \pm 5,2 e 96,3 % \pm 4,0 para os dia 1, 2 e 3, respectivamente. A variabilidade máxima de 5,2% para o segundo dia de análise, foi avaliada como um erro randômico qualquer, podendo ser considerada dentro da variabilidade intrínseca ao método.

Conclui-se que 3 ciclos de congelamento/descongelamento não levam à degradação de quantidade significativa de 4-NRC.

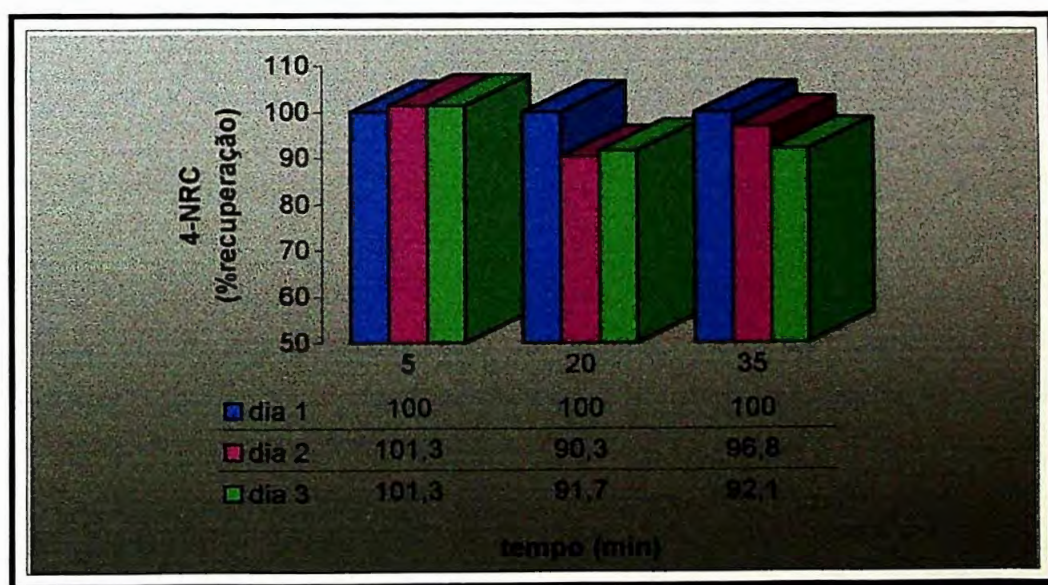


Figura 10: Estabilidade do 4NRC após 3 ciclos (dias) de congelamentos/descongelamentos das amostras reconstituídas.

Adicionalmente, pode ser realizada uma abordagem complementar acerca da estabilidade em *freezer*. Analisa-se estabilidade frente ao congelamento da amostra com a solução recém-preparada, comparativamente a longos períodos de estocagem.

2.3.4- Associação eritrocitária do 4-NRC medida em tampão salina/fosfato.

Um “pool” de sangue fresco coletado em heparina (hematócrito 0,4) por punção da aorta abdominal de ratos anestesiados em éter. Este foi centrifugado (15 min/3000 rpm), o plasma descartado, seguindo-se 5 ciclos de lavagem das células sangüíneas em solução tampão salina/fosfato pH 7,4. O volume plasmático foi reconstituído com solução tampão até hematócrito inicial, produzindo uma nova suspensão celular, livre de proteínas plasmáticas.

Alíquotas da solução estoque de 4-NRC (< 2% do vol. final da suspensão) foram adicionadas para obtenção de suspensões celulares de 4-NRC a 20, 50 e 100 µg/mL. Estas foram então fracionadas em tubos de vidro contendo 0,5 mL cada. Duplicatas das concentrações foram mantidas a 37°C, retiradas e centrifugadas após 5, 30 e 60 min. O sobrenadante resultante foi submetido à extração e quantificado por CLAE-UV (Tabela 6).

A difusão do 4-NRC para os eritrócitos foi investigada após lavagem das células sangüíneas e homogeneização da substância no tampão da nova suspensão celular, livre de proteínas plasmáticas, isolando-se assim o efeito da ligação às proteínas plasmáticas (Boulton *et al.*, 1999).

Os dados obtidos demonstraram porcentagem média de ligação do 4-NRC às células sangüíneas de 95 %; 77% e 41% respectivamente, para as concentrações de 20, 50 e 100 µg/mL, e após uma hora de incubação (Tabela 6).

Tabela 6: Ligação do 4-NRC na suspensão eritrocitária (hematócrito = 0,4).

Tempo incubação	(%) Ligação		
	20.0 µg/mL	50.0 µg/mL	100.0 µg/mL
5 min	89.3%	66.6%	34.2%
	88.6%	71.3%	26.7%
30 min	89.1%	75.1%	38.7%
	94.0%	86.5%	34.6%
60 min	94.9%	75.8%	40.1%
	95.3%	77.3%	40.8%
% Média após 1h	95,1 %	76,6 %	40,5 %

Verificou-se que a quantidade de substância recuperada depende da concentração da suspensão eritrocitária, assim como da substância a ela adicionada. Neste caso, observou-se um decréscimo na proporção de substância associada, com o aumento da concentração da mesma. Estes valores são geralmente lineares para determinada faixa de concentração da substância, até o ponto de saturação dos eritrócitos (Derendorf *et al.*, 1984). Nestas situações, a quantidade de substância associada é proporcional ao valor de hematócrito, ou seja, ao número de células sangüíneas, e não à quantidade adicionada.

Neste experimento, observou-se que o ponto de saturação encontra-se entre 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pois, após 30 min de incubação, a *quantidade* da substância recuperada é similar para ambas as suspensões (Figura 12). Observou-se ainda que nas concentrações mais baixas (20 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o tempo de incubação não mostrou exercer diferença significativa podendo este fato, ser atribuído à não saturação das células do sangue, e à dependência da concentração do analito na difusão para os eritrócitos (Figura 11 e 12).

O 4-NRC apresenta elevada lipofilicidade decorrente do alto coeficiente de partição *n*-butanol/água=6,032 (Freitas, 1999), (Leo, 1990) reforçando assim, a extensa ligação eritrocitária obtida.

Portanto, pode-se concluir que em condições de equilíbrio (não saturação), a ligação média do 4-NRC aos eritrócitos é bastante elevada, podendo ser superior à 95,1% para concentrações inferiores a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. É interessante ressaltar que o percentual de substância solúvel pode ainda ligar-se às proteínas plasmáticas, ficando uma parcela ainda menor da droga na forma livre.

A completa determinação da ligação eritrocitária incluiria determinação do coeficiente de partição da droga (D) entre eritrócitos e a parte aquosa do plasma, o qual é definido pela seguinte equação (Derendorf & Garrett, 1983):

$$D = C_{\text{RBC}}/C_{\text{pw}} = (A_{\text{RBC}}/A_{\text{pw}}) * [V_{\text{pw}}/(V_{\text{b}} - V_{\text{pw}})]$$

Onde:

C_{RBC} e C_{pw} = concentração da droga nos eritrócitos e na parte aquosa do plasma, respectivamente.

A_{RBC} ; A_{pw} = quantidade droga nos eritrócitos e na parte aquosa, respectivamente.

V_{pw} ; V_{b} = volume aquoso do plasma e de sangue, respectivamente.

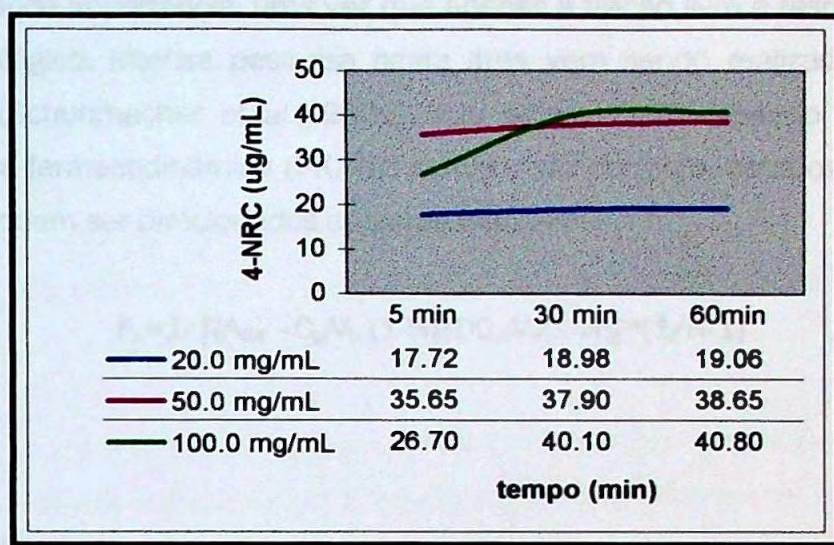


Figura 11: Perfil da concentração média (n=2) de 4-NRC na suspensão eritrocitária, em função do tempo de incubação.

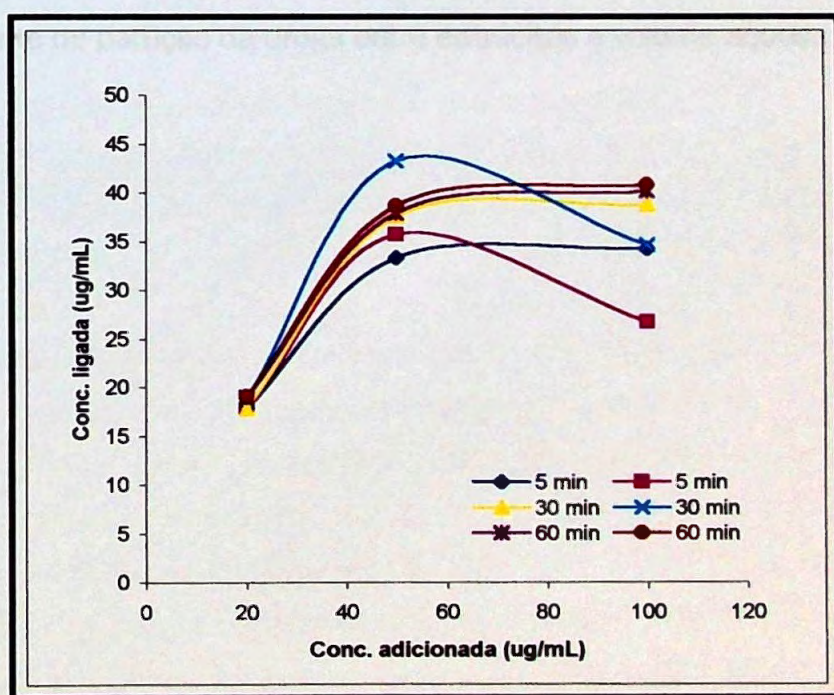


Figura 12: Correlação entre a concentração do 4-NRC adicionado e a concentração ligada aos eritrócitos, em diferentes tempos de incubação (hematócrito=0,4).

O estudo da porcentagem da substância ligada às proteínas plasmáticas é também de grande importância, uma vez que apenas a fração livre é responsável pelo efeito farmacológico. Intensa pesquisa nesta área vem sendo realizada (Pacifici & Viani, 1992), (Schuhmacher *et al.*, 2000), (Liu *et al.*, 1995) visando a correlação farmacocinética-farmacodinâmica (PK/PD) justificando portanto, estudos posteriores. Tais estudos podem ser direcionados segundo equação:

$$F_b = 1 - [(A_{tot} - C_{pl}V_b(1-H))/DC_{pl}V_b(1-H)]*(1/H-1)$$

Onde:

F_b = fração ligada;

A_{tot} = quantidade total da droga adicionada;

C_{pl} = concentração da droga no plasma;

V_b = volume da alíquota de sangue;

H = hematócrito

D = Coeficiente de partição da droga entre eritrócitos e volume aquoso.

2.3.5- Precisão e exatidão das curvas de calibração

A precisão intraensaio (repetibilidade) e interensaio (reprodutibilidade) da curva de calibração foram avaliadas durante três dias consecutivos. Na precisão interensaio considerou-se a razão entre o desvio padrão das sextuplicatas e suas médias globais ($n=6$). O coeficiente de variação da precisão intraensaio obteve-se pela razão entre desvio padrão e as médias diárias ($n=2$). A exatidão do método foi obtida pela razão entre as concentrações experimentais médias e a nominal do analito, multiplicada por 100% (Tabela 7).

O limite de detecção (LD) foi estabelecido como sendo cinco vezes o valor S/R e o limite de quantificação (LQ) foi estabelecido quando o coeficiente de variação das replicatas não ultrapassava 20%. Obte-se assim, valores de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ ($1,74 \pm 39,86\%$; $n=6$) e 3,0 $\mu\text{g/mL}$ ($4,16 \pm 13,57\%$; $n=6$), respectivamente (Tabela 8).

Os coeficientes de correlação linear para a curva de calibração do 4-NRC em plasma, foram maiores que 0,994 em todas as situações avaliadas, justificando assim a ausência do padrão interno.

Tabela 7: Exatidão da recuperação em plasma, por CLAE-UV.

$C_{\text{teórica}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	1,0	3,0	20,0	50,0	80,0
Exatidão (%)	105,83%	119,06%	91,53%	107,88%	107,33%

Os coeficientes de variação na faixa dinâmica oscilaram diferentemente em cada concentração, e obviamente em maior grau para as baixas (Tabela 7). A variabilidade interensaio do LD apresentou valores superiores a 20%, máximo regulamentado pelas normas do FDA (Shah *et al.*, 2000).

Quando os dados de exatidão da recuperação (Tabela 7) e da curva de calibração (Tabela 8) são comparados, observa-se que alguns dados estão superestimados em relação aos demais, demonstrando um erro randômico, possivelmente identificável através da inserção de amostras de controle de qualidade. A prática da validação analítica baseada em amostras de controle de qualidade (Statland & Westgard) permite estabelecer, entre outras vantagens, os critérios de identificação e correção de erros pessoais e/ou analíticos, freqüentes em qualquer análise.

Tabela 8: Dados de precisão e exatidão analítica do 4-NRC por CLAE-UV.

ANALITO: 4-NEROLIDILCATECOL		Coluna: RP-18	Fase móvel: Metanol / Acetonitrila / H ₂ O (62 / 20 / 18)				
Equipamento: HPLC-UV		Fluxo: 1,6 mL/min	Unidade: µg/mL				
Data	inclinação	intercepto	1,0	3,0	20,0	50,0	80,0
Dia 1	4176,5	- 621,26	1,42	3,98	19,84	50,12	83,78
Dia 2	4682,2	- 7051,6	2,68	4,61	16,85	46,93	83,06
Dia 3	3793,3	1581,1	1,01	3,43	14,28	56,36	78,04
Interensaio (média, n=6)			1,74±0,69	4,16±0,56	17,10±2,20	50,87±3,24	80,13±2,39
Coef variação (%)			39,86	13,57	12,85	6,38	2,98
Dia 1 (média ,n=2, DP)			1,37±0,08	3,87±0,16	19,06±1,1	48,70±2,2	81,02±3,91
Dia 2 (média,n=2, DP)			2,71±0,04	4,86±0,37	15,56±1,83	49,56±3,73	81,29±2,5
Dia 3 (média, n=2, DP)			1,16±0,21	3,73±0,42	16,69±2,33	54,35±2,84	78,09±0,06
Média (n=3)			1,74±0,11	4,16±0,32	17,10±1,75	50,87±2,86	80,13±2,16
Coef.variação intraensaio (%)			6,32	7,69	10,23	5,62	2,70
Exatidão			174,33	138,56	85,51	101,74	100,16

2.3.6- Aplicação do método analítico

A sensibilidade alcançada pelo método analítico desenvolvido em CLAE-UV (LD=3,0 µg/mL, item 2.3.5), não possibilitou a quantificação de todas as concentrações plasmáticas obtidas após a administração intravascular de 10 mg/kg de 4-NRC (Figura 13), tampouco daquelas coletadas após administração oral da substância isolada (10 mg/Kg, (dados não apresentados). Conseqüentemente, os parâmetros farmacocinéticos como $t_{1/2}$, C_{max} e T_{max} foram comprometidos, impossibilitando a avaliação da biodisponibilidade.

No entanto, a metodologia desenvolvida foi importante na caracterização da instabilidade do 4-NRC em sangue total (item 2.3.3.2) e na determinação de sua estabilidade em plasma, após o armazenamento em freezer (item 2.3.3.3). Constatou-se ainda, elevada associação eritrocitária do 4-NRC (item 2.3.4), da ordem de 95% ou superior, para concentrações plasmáticas iguais ou inferiores a 20 µg/mL, justificando assim, as baixas concentrações plasmáticas obtidas após administração intravascular.

O estudo do 4-NRC em CLAE-UV possibilitou avaliação preliminar do analito *in vivo*, tendo apontado para necessidade de maior sensibilidade analítica para determinação de sua biodisponibilidade oral em plasma.

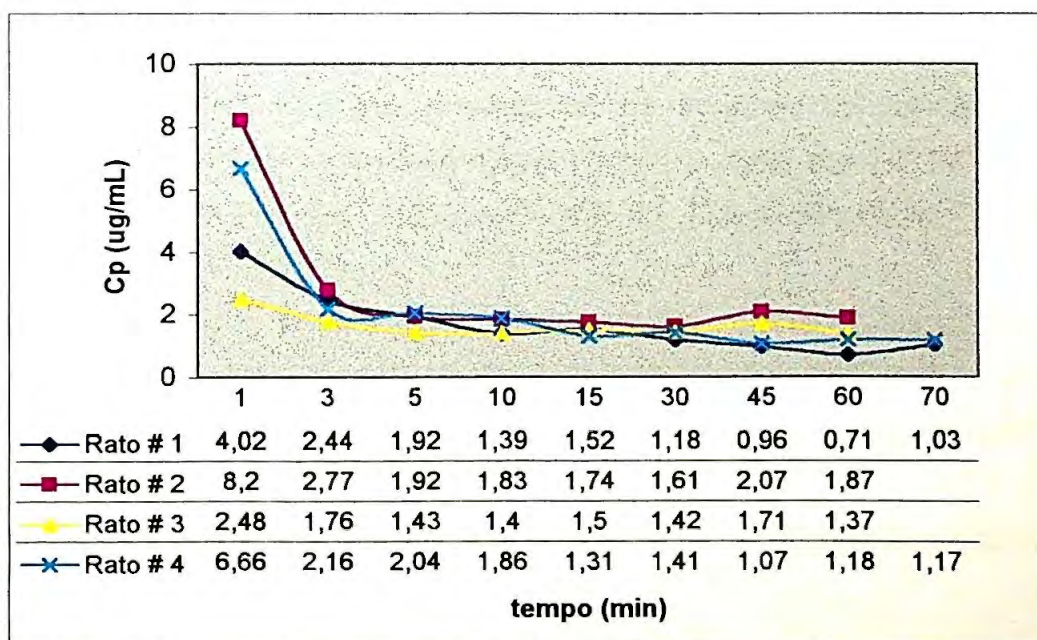


Figura 13: Concentrações plasmáticas após administração intravascular (IV) de 10 mg/Kg 4-NRC (sol. de 2,5 mg/mL 4-NRC em hidroxipropil-β-ciclodextrina à 30 %).

2.4- Referências

- Boulton, D.W., Walle, U.K. & Walle, T. (1999). Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J Pharm Pharmacol*, 51, 353-9.
- Cai, X., Woo, M.H., Edick, M.J. & Relling, M.V. (1999). Simultaneous quantitation of etoposide and its catechol metabolite in human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 728, 241-50.
- Castagnetta, L.A., Granata, O.M., Arcuri, F.P., Polito, L.M., Rosati, F. & Cartoni, G.P. (1992). Gas chromatography/mass spectrometry of catechol estrogens. *Steroids*, 57, 437-43.
- Derendorf, H., El-Din, A., El-Koussi, A. & Garrett, E.R. (1984). Electrochemical chromatographic determinations of morphine antagonists in biological fluids, with applications. *J Pharm Sci*, 73, 621-4.
- Derendorf, H. & Garrett, E.R. (1983). High-performance liquid chromatographic assay of methadone, phencyclidine, and metabolites by postcolumn ion-pair extraction and on-line fluorescent detection of the counterion with applications. *J Pharm Sci*, 72, 630-5.
- El-Shafae, A.M. & El-Domiaty, M.M. (2001). Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 26, 539-45.
- Freitas, P.C.D. (1999). Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *Piper regnellii* (Miq)C. In *Tese Doutorado em Fármaco e Medicamentos*. pp. 115 p. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- Holmes, C., Eisenhofer, G. & Goldstein, D.S. (1994). Improved assay for plasma dihydroxyphenylacetic acid and other catechols using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 653, 131-8.
- Karnes, H.T., Shiu, G. & Shah, V.P. (1991). Validation of bioanalytical methods. *Pharm Res*, 8, 421-6.

- Lee, B.L., Ong, H.Y., Shi, C.Y. & Ong, C.N. (1993). Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and phenol in urine using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr*, 619, 259-66.
- Leo, A.J. (1990). Methods of calculating partition coefficients. In *Comprehensive Medicinal Chemistry*. ed. Hansch, C., Sammes, P.G. & Taylor, J.B. pp. 295-319. Oxford: Pergamon Press.
- Liu, B., Earl, H.M., Poole, C.J., Dunn, J. & Kerr, D.J. (1995). Etoposide protein binding in cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 36, 506-512.
- Lunte, S.M. (1987). Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet-visible and electrochemical detection. *J Chromatogr*, 384, 371-82.
- Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S. & Gilibert, I. (1998). Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radic Biol Med*, 25, 1057-65.
- Pacifici, G.M. & Viani, A. (1992). Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. *Clin Pharmacokinet*, 23, 449-468.
- Pade, V., Aluri, J., Manning, L. & Stavchansky, S. (1995). Bioavailability of pseudoephedrine from controlled release formulations in the presence of guaifenesin in human volunteers. *Biopharm Drug Dispos*, 16, 381-91.
- Romanova, D., Grancai, D., Jozova, B., Bozek, P. & Vachalkova, A. (2000). Determination of apigenin in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 870, 463-7.
- Rouseff, R.L., Dettweiler, G.R., Swaine, R.M., Naim, M. & Zehavi, U. (1992). Solid-phase extraction and HPLC determination of 4-vinyl guaiacol and its precursor, ferulic acid, in orange juice. *J Chromatogr Sci*, 30, 383-7.
- Ruperez, F.J., Barbas, C., Castro, M. & Herrera, E. (1999). Determination of alpha-tocopherol and alpha-tocopherol acetate in diets of experimental animals. Study of stability in the diets. *J Chromatogr A*, 839, 93-9.
- Schuhmacher, J., Bühner, K. & Witt-Laido, A. (2000). Determination of the free fraction and relative free fraction of drugs strongly bound to plasma proteins. *J Pharm Sci*, 89, 1008-1021.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., McDowall, R.D. & et al. (1991). Analytical

- methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **16**, 249-55.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powell, M.L, Tonelli, A, Viswanathan, C.T. & Yacobi, A. (2000). Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharm Res*, **17**, 1551-7.
- Statland, B.E. & Westgard, J.O. Quality Management. In *Clinical Diagnosis & Management Laboratory Methods*. ed. Henry, J.B. pp. 81. Philadelphia, PA: W. D. Saunders Company.
- Stecher, G., Huck, C.W., Popp, M. & Bonn, G.K. (2001). Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS. *Fresenius J Anal Chem*, **371**, 73-80.
- Stremetzne, S., Jaehde, U. & Schumack, W. (1997). Determination of the cytotoxic catechol metabolite of etoposide (3'O-demethyletoposide) in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, **703**, 209-215.
- van Acker, S.A., de Groot, M.J., van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Donne-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W.J. & Bast, A. (1996). A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem Res Toxicol*, **9**, 1305-12.

Capítulo 3

Validação analítica e avaliação farmacocinética do 4-nerolidilcatecol por CLAE-EM/EM

3.1- Introdução

A abordagem corrente para medida da biodisponibilidade de plantas, ou mesmo de medicamentos alopáticos, é realizada pela administração de doses elevadas do fármaco, ou alternativamente, pela administração de substâncias deuteradas (Shargel & Yu, 1999). Na primeira abordagem, as doses elevadas do fármaco facilitam a medida das concentrações plasmáticas, no entanto, questiona-se a validade deste enfoque, uma vez que tanto a absorção, quanto o metabolismo podem ser diferentes daqueles em condições fisiológicas. Em relação à segunda abordagem, questiona-se acerca da manutenção das propriedades físico-químicas das substâncias quando deuteradas.

Desta maneira, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM) representa uma atual e poderosa ferramenta para análise de substâncias fitoquímicas de matrizes complexas, uma vez que esta apresenta-se como uma técnica com elevada sensibilidade e especificidade analítica, e relativamente ágil para desenvolvimento do método. Neste campo, são descritas análises de ginsenosídeos de *Panax ginseng* (Wang *et al.*, 1999), de naftodiantronas e floroglucínóis da Erva de São João (Mauri & Pietta, 2000), de carotenóides como β -caroteno e retinol (Wang *et al.*, 2000), da epicatequina do chocolate (Baba *et al.*, 2000), algumas lactonas terpênicas de *Ginkgo biloba* (Mauri *et al.*, 2001), entre outros fármacos disponíveis comercialmente. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas é também o método de escolha em grandes indústrias farmacêuticas durante a etapa de seleção farmacocinética de novos fármacos (Korfmacher *et al.*, 1999), (Olah *et al.*, 1997), (Allen *et al.*, 1998). Tais estudos são diferenciais, pois viabilizam a identificação dos possíveis metabólitos formados *in vivo*, com elevada sensibilidade e especificidade relativamente ao analito selecionado.

Neste capítulo descreve-se a validação analítica do 4-NRC de *Pothomorphe umbellata* em plasma de ratos por CLAE-EM/EM, visando a determinação dos parâmetros farmacocinéticos deste extrato vegetal para fins terapêuticos, abordagem esta, inédita no Brasil.

3.2- Experimental

Estes estudos foram realizados no *Department of Pharmaceutics*, University of Florida, USA; sob orientação do Prof. Dr. Hartmurt Derendorf e em colaboração com Prof. Güenter Hocchaus.

3.2.1- Materiais e instrumentos utilizados

1. Para análise em CLAE-EM, os solventes utilizados foram de grau espectroscópico (Fischer), filtrados através de membrana filtrante Teflon (Phenomenex; 0,22 μm) e deaerados com gás Hélio (5 min/L).
2. As amostras analisadas em CLAE-EM foram mantidas em frascos de polipropileno de fundo cônico com 250 μL de capacidade, cobertos com tampa metálica. A prevenção da oxidação das amostras frente a ação luminosa foi realizada pela adição de BHT às amostras.
3. Na análise em CLAE/EM-APCI empregou-se espectrômetro de massas Micromass (UK) modelo Quatro-LC acoplado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência Mod. Constametric 3500 acoplado a coluna analítica C_{18} Waters e "loop" de injeção Rheodyne de 20 μL .
4. Alíquotas de 80 μL de amostra foram introduzidas no sistema através de injetor automático Perkin Elmer ISS200. A separação cromatográfica foi desenvolvida em coluna Symetry C_{18} Waters (3,5 μm ; 4,6 X 50 mm), utilizando-se sistema isocrático Metanol/água 90/10 como fase móvel e fluxo de 1,0 mL/min. O tempo de retenção do 4-NRC foi de 1,6-1,8 min e tempo de corrida total de 3 min.
5. As substâncias e solventes utilizados foram provenientes de diferentes fornecedores: 2, 6-Di-*terc*-butil-*p*-hidroxitolueno (BHT, Sigma). Etanol (Sigma), halotano (Metophane®, Sigma), etilcarbamato (Uretano, Sigma).

6. A execução dos experimentos em animais desenvolveu-se conforme protocolo aprovado por *Institucional Animal Care & Use Committee* da Universidade da Flórida.
7. As amostras de plasma utilizadas na validação do método são originárias de um “pool” de plasma animal, provenientes do banco de sangue do *Shands Hospital*, Florida, USA; a não ser quando especificado ao contrário.
8. Na cirurgia de exposição da artéria carótida e da veia femural empregou-se a seguinte instrumentação: tesouras padrão, hemostática e modelo Metzenbaum, pinças modelo Oehler (1:2 dentes) e um par de pinças de ponta curva serrilhada, escalpe padrão nº 3 e lâminas nº. 11.
9. Na administração intravascular do 4-nerolidilcatecol (10,0 mg/Kg) utilizou-se seringas tipo tuberculina (1 mL) e agulhas 27 G x ½”. O extrato de *P. umbellata* foi administrado na dose de 100 mg/Kg, considerando 21,5% de 4-NRC no extrato total. Os volumes administrados variaram conforme dose, peso do animal e concentração das soluções preparadas, mas não excederam 0,1% do peso do animal.
10. Na centrifugação do sangue, utilizou-se microcentrífuga Eppendorf mod. 235V Fisher Scientific.
11. O ajuste de dados de concentração plasmática foi realizado utilizando-se o programa KINETICA 2000®, Innaphase Co.
12. Na análise estatística utilizou-se o programa Excel (Windows 2000)

3.2.2- Condições analíticas

A separação cromatográfica em CLAE/EM/EM foi desenvolvida em coluna Symetry C₁₈ Waters (3,5 µM; 4,6 X 50 mm), utilizando-se sistema isocrático metanol:água 9:1 como fase móvel e fluxo de 1,0 mL/min. O tempo de retenção do 4-NRC foi de 1,6-1,8 min, com tempo de corrida total de 3 min.

Na análise em CLAE/EM-APCI empregou-se interface com probe nebulizador mantido aquecido a 500 °C. A pressão do gás nebulizador (N₂) e dessolvatador foram fixadas em 1,0 kL/h e 614 L/h, respectivamente. A ionização química (APCI) foi obtida utilizando-se corona ajustada a 2.5 kV operando com um potencial de orifício (cone) a 90 eV. A quantificação do analito realizou-se no modo MRM para ganho de seletividade nas análises. A detecção do 4-NRC em espectrômetro de massas foi monitorada através da reação de fragmentação do íon molecular (m/z 313,2) em seu íon mais abundante (m/z 161,9). As curvas de calibração foram construídas com 6 amostras (SUs) utilizando-se análise ponderada. As concentrações das amostras desconhecidas foram determinadas por interpolação a partir da curva padrão apropriada.

3.2.3- Preparo das soluções

A solução estoque do 4-NRC (SE, 10,0 µg/mL) foi preparada em metanol, e utilizada em diluições apropriadas, para obtenção de seis soluções de uso (SU1-SU6): 10,0; 5,0; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/mL, todas mantidas à -80 °C.

As amostras para curvas de calibração (CCs) e controle qualidade (CQs) foram preparadas adicionando-se quantidades conhecidas das SUs anteriormente descritas (alíquota <1 % do volume final), a tubos de ensaio de vidro contendo um "pool" de plasma de ratos, para concentrações finais de 100,0; 50,0; 25,0, 10,0; 5,0 e 2,5 ng/mL, respectivamente.

Um conjunto de três amostras de CQs nas concentrações alta (100 ng/mL), média (50 ng/mL) e baixa (2,5 ng/mL) foram preparadas e intercaladas a cada doze amostras diárias analisadas.

As soluções de 4-nerolidilcatecol (10,0 mg/mL) e do extrato bruto das raízes de *Pothomorphe umbellata* (62,5 mg/mL) foram preparados em hidroxipropil- β -ciclodextrina 30 % (p/p), utilizando-se água deionizada em módulo de filtração mili-Q.

3.2.4-Método de extração

Plasma controle e adicionados (SUs) foram aliqüotados em porções de 100 μ L, estocadas e mantidos sob refrigeração (- 80 °C) até momento de análise. Após o descongelamento da amostra, adicionou-se 200 μ L de etanol 70%, 100 μ L de água e (2X) 500 μ L de hexano. Procedeu-se a homogeneização em vortex por 10 seg, seguida de centrifugação (30000 rpm / 2 min) e congelamento rápido (“snap-freezing”) da solução em nitrogênio líquido. Os sobrenadantes reunidos foram evaporados sob nitrogênio e o resíduo reconstituído com 200 μ L de fase móvel. Esta metodologia foi baseada em técnica de extração de beta-carotenos, empregando CLAE/EM (Wang et al., 2000).

3.2.5- Validação do método analítico (Shah et al., 1991; Shah et al., 2000)

3.2.5.1- Linearidade e recuperação

A linearidade da resposta foi verificada na faixa dinâmica compreendida entre 2,5 e 100,0 ng/mL, através da avaliação de regressão linear obtida com soluções de uso preparadas na fase móvel e plasma. A escolha da faixa dinâmica foi baseada no estudo prévio de administração oral do 4-NRC, os quais sugeriram níveis plasmáticos inferiores ao LD do método em CLAE-UV, da ordem de 1 μ g/mL .

O limite de detecção (LD) analítica aponta a menor quantidade de fármaco mensurável nas condições instrumentais estabelecidas, o qual é expresso pela menor área do pico correspondente à três vezes a linha base. O limite de quantificação (LQ) foi definido como a menor concentração de calibração medida com precisão inferior a 15%. Diferentemente do LD, este pode apresentar CV até o limite de 20%. Na metodologia desenvolvida, a linearidade mostrou-se dentro destes limites (Shah et al., 2000).

A recuperação absoluta foi determinada com amostras de controle qualidade, durante os três dias de validação do método, comparando-se triplicatas dos controles (B, M, A; n=9) após extração com soluções do 4-NRC, não submetidas à extração.

3.2.5.2- Exatidão e precisão

A exatidão do método, também conhecida como erro sistemático ou tendência, corresponde à diferença entre o valor obtido e o aceitável como referência. A partir de amostras de controle de qualidade, calculou-se a razão entre a diferença da concentração nominal e a experimental e a respectiva concentração nominal $[(C_{exp} - C_{nominal})/C_{exp} * 100]$.

A precisão relaciona-se com a dispersão das medidas ao redor de um valor médio, os quais correspondem ao grau de concordância entre os ensaios individuais. Assim, a precisão intra e interensaio foram avaliadas segundo a equação abaixo, sendo expressas pelo coeficiente de variação (%).

Os dados cromatográficos das curvas de calibração e controles de qualidade obtidos durante três dias de validação analítica, são apresentados nas tabelas 9-10.

- Precisão intraensaio (ou repetibilidade)

$$CV = \frac{\text{desvio padrão das triplicatas diárias (3 dias)}}{\text{média das triplicatas diárias}} * 100\%$$

- Precisão interensaio (ou reprodutibilidade)

$$CV = \frac{\text{desvio padrão das replicatas de 3 dias (n=9)}}{\text{média das replicatas (n=9)}} * 100\%$$

3.2.6- Metodologia de manipulação dos animais

Ratos Sprague-Dawley (300-350g) provenientes da empresa Harlan Sprague Dawley-USA foram pré-anestesiados utilizando-se halotano (Methophane®) em câmara fechada e, a seguir sedados, através injeção *intrapertoneal* (preparadas no momento de uso) de etilcarbamato (Urethane®; 1,5 g/Kg).

Os animais foram canulados através de microcirurgia na artéria carótida, empregando-se catéter de 22 G (FEP; 25 mm x 0.95mm x 38 mL/min), imobilizado com fios de seda na porção distal e proximal da artéria. Seringa tipo tuberculina foi acoplada ao catéter para reposição do volume plasmático (0,5 mL a cada tempo) e heparinização da artéria (5 UI de heparina em solução salina). Após a canulação, administrou-se 1 mL de solução de heparina 5%, previamente ao início da coleta de amostras. A droga foi administrada por via intravascular (IV) utilizando-se a veia femural, ou por via *per oral* (po) através de *gavage*. As doses administradas foram de 10,0 mg/kg para a substância pura (*iv* e *p.o.*), enquanto que para o extrato bruto de *Pothomorphe umbellata*, a dose foi de 100,0 mg/kg (*p.o.*). As soluções administradas foram preparadas conforme descrito no item 3.2.3 (Preparo das Soluções).

O regime de coleta de amostras de sangue foi aferido através da administração única de solução salina ao animal (Davies & Morris, 1993). Alíquotas de sangue (300 µL; IV: 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 30, 45, 60, 90 e 180 min, po: 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 30; 45; 60; 120; 180 min) foram coletadas a partir da artéria carótida, em tubos Eppendorf previamente heparinizados; e imediatamente centrifugados por 2 min/5000 rpm. O plasma obtido foi mantido a -80 °C até o momento da análise.

3.2.7- Modelagem Farmacocinética

O programa KINETICA 2000 foi aplicado na modelagem farmacocinética dos dados de concentração plasmática do 4-NRC. Aplicou-se o modelo bicompartimental para avaliação das 12 amostras de sangue coletadas após administração endovenosa e oral do 4-NRC e extrato bruto. Os dados obtidos *in vivo* foram ajustados segundo métodos pré-codificados (“hard coded methods”) do programa KINETICA. Selecionou-se “FitMicroIVbolus” e “FitmicroExtravascular” para obtenção dos parâmetros farmacocinéticos após administração intravascular e oral, respectivamente.

3.3- Resultados e discussão

3.3.1- Validação do método analítico

As análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização química (APCI) foram monitoradas pela presença do íon [M-1] em m/z 313,2 e seu íon filho em m/z 161,9 (Figura 21). Cromatogramas de amostras de plasma de ratos, branco e contaminados com 4-NRC foram inspecionados. Nestes demonstrou-se ruído suficientemente baixo, possibilitando a quantificação do analito em 2,5 ng/mL (LQ). A faixa dinâmica compreendeu as concentrações entre 2,5 – 100 ng/mL (Figura 20).

A metodologia de extração do 4-NRC mostrou-se satisfatória para a avaliação das amostras dos animais tratados. Estas apresentaram boa reprodutibilidade, como demonstrado na precisão de suas medidas (Figura 14). A recuperação para as amostras de controle de qualidade em nível baixo (2,5 ng/mL), médio (25,0 ng/mL) e alto (100,0 ng/mL) foram de $92,4 \pm 14,4\%$, $88,1 \pm 3,8\%$ e $84,4 \pm 14,7\%$, respectivamente.

A precisão do método (repetibilidade) é dada pelo coeficiente de variação (% CV) do limite de quantificação. Este foi de 16,3 % e 10,1% para a precisão interensaio e intraensaio, respectivamente (Fig. 14, Tab. 09). A proximidade dos valores obtidos com os valores nominais (exatidão), medidas pelo método analítico por CLAE/EM/EM, oscilou entre máximo e o mínimo de 92,4% e 84,4 % (Fig. 14, Tab. 09).

As curvas de calibração apresentaram bons resultados de exatidão (entre 94,5 e 105,9%), com coeficientes de correlação não inferiores a 0,98 durante os três dias de validação. A avaliação dos dados de precisão das mesmas, também evidenciam boa reprodutibilidade. Os coeficientes de variação foram inferiores a 20% para todas as concentrações analisadas (Tabela 10), variabilidade máxima admitida pelas normas do FDA para validação analítica em estudos farmacocinéticos de novas drogas mercadológicas (Shah *et al.*, 2000). No entanto, para as amostras de plasma dos animais tratados, os valores de CV foram superiores a 20% (Tabela 11), embora aceitáveis pois mostraram-se não superiores a 30%, permitindo a flexibilização do limite de aceitação para as amostras analisadas. Os possíveis fatores interferentes são detalhados no item 3.3.2 (Concentrações Plasmáticas de 4-NRC).

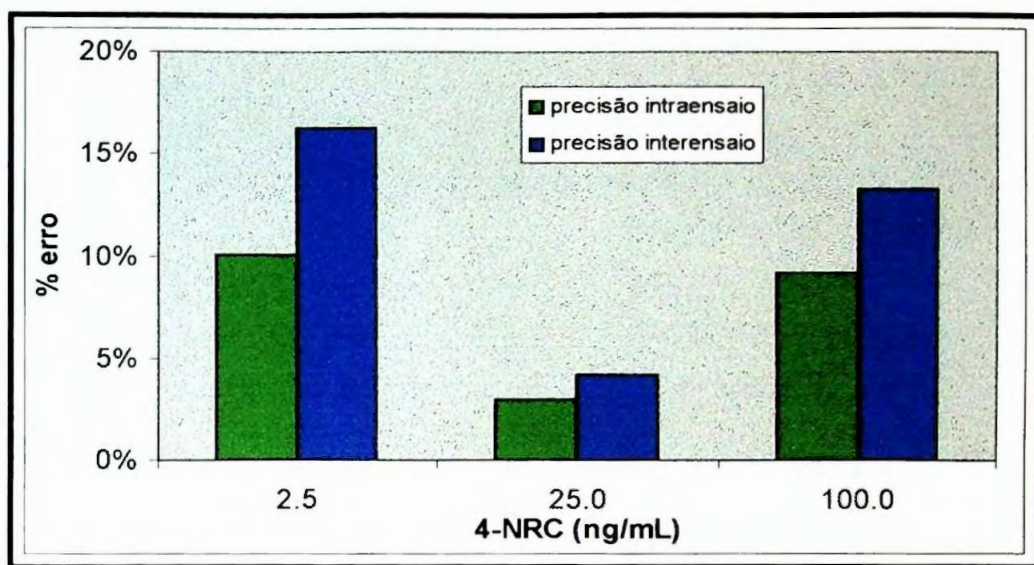


Figura 14: Precisão do método analítico em CLAE/MS/MS

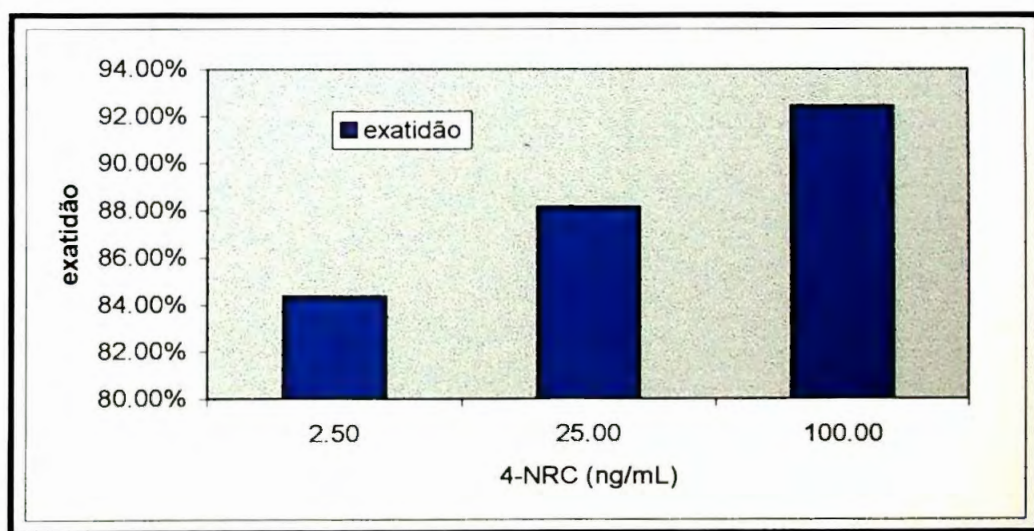


Figura 15: Exatidão do método analítico em CLAE/MS/MS

Tabela 09: Dados de triplicatas dos controles de qualidade durante validação do método em plasma (CLAE-EM/EM)

ANÁLISE DE VEROSIMILITUDO		Unidade: ng/ml	
DATA	2,50	25,00	100,00
Dia 1	2.12	23.63	80.95
	2.11	21.91	101.32
	2.81	21.98	111.67
Dia 2	2.05	22.73	94.06
	1.97	21.41	87.39
	1.79	22.75	108.51
Dia 3	2.08	21.93	84.99
	2.42	21.50	85.63
	1.63	20.45	77.21
Precisão interensaio (média)			
	2.11	22.03	92.41
Desvio padrão			
	0.34	0.92	12.25
Coef variação (%)			
	16,28%	4,17%	13,26%
Precisão intraensaio Dia 1 (média)			
	2.35 ± 0,4	22.51 ± 0,97	97.98 ± 15,63
Dia 2 (média)			
	1.94 ± 0,13	22.30 ± 0,77	96.65 ± 10,80
Dia 3 (média)			
	2.04 ± 0,4	21.29 ± 0,76	82.61 ± 4,69
Média (± DP)			
	2.11 ± 0.31	22.03±0.83	92.41±10,37
Coef. Variação (%)			
	14,69%	3,77%	11,22%
Exatidão			
	84,36%	88,13%	92,41%

Tabela 10: Dados de duplicatas de curvas de calibração durante validação do método em plasma (CLAE-EM/EM)

ANÁLITO: 4-NEROLIDILCATECOL		Unidade: ng/mL							
R ²	inclinação	intercepto	2.50	5.00	12.50	25.00	50.00	100.00	
Dia 1	0.982486	96.5306	-11.1339	2.54	4.68	13.86	26.12	48.75	98.13
Dia 2	0.992619	54.7592	36.0891	2.39	4.95	13.85	26.92	58.54	98.47
Dia 3	0.994050	105.508	6.62787	1.59	4.15	13.11	23.28	53.13	99.44
interensaio (média)	0.989718	85.59927	10.52769	2.36	4.98	11.94	21.00	56.00	103.52
Desvio padrão	0.006304	27.08285	23.85182	2.42	5.87	12.96	25.66	47.99	95.73
Coef. variação (%)	0.64%	31.64%	226.56%	2.36	5.29	13.24	24.60	50.52	101.06
Coef. variação (%)	18.07%	19.85%	5.64%	18.07%	19.85%	5.64%	9.86%	14.02%	5.46%
Precisão Intraensaio									
Dia 1 (média)	2.47	4.82	13.85	26.12	43.72	104.59			
Dia 2 (média)	2.23	5.63	13.42	25.10	55.84	98.95			
Dia 3 (média)	2.39	5.42	12.45	23.33	51.99	99.62			
Média	2.36	5.29	13.24	24.85	50.52	101.06			
Desvio padrão	0.12	0.42	0.72	1.41	6.19	3.08			
Coef. Variação (%)	4.96%	7.99%	5.44%	5.68%	12.26%	3.05%			
Exatidão	94,5%	105,8%	105,9%	100,6%	100,0%	100,01%			

3.3.2- Concentrações plasmáticas de 4-NRC

A quantificação das concentrações plasmáticas atingidas após administração de 4-NRC aos animais foi realizada utilizando-se duas curvas de calibração diárias. Uma realizada no início do período e outra ao fim do mesmo, intercaladas por amostras do analito. A cada doze amostras de analito, foram adicionadas três amostras de controle de qualidade, nas concentrações baixo (B), médio (M) e alto (A).

Nestas análises, a precisão estabelecida para aceitação das corridas analíticas foi baseada na precisão dos CQs, e fixada para limite não superior a 30 % em nenhum dos níveis analisados. Dentre os CQ inseridos nos dias das análises das concentrações plasmáticas, apenas uma amostra de cada um dos níveis (Alto, Médio ou Baixo) apresentou DP superior ao limite pré-fixado (Tabela 11), assegurando a quantificação das corridas analíticas.

Observa-se maior variabilidade quando da análise de amostras provenientes da administração oral (dia 2), sugerindo intereferentes relacionados ao metabolismo animal *in vivo*. A precisão obtida, embora inferior àquela obtida para os CQs durante a etapa de validação do método, não invalida os resultados das análises, apenas acomoda as ligeiras diferenças na composição do plasma dos animais tratados, relativamente àquelas amostras de plasma contaminadas *in vitro*.

Fatores biológicos provenientes do metabolismo *in vivo*, originados geralmente após administração oral (cujas amostras refletiram em maior variabilidade nos CQs, tabela 11) podem acarretar interferências analíticas não detectadas *in vitro*, como extensamente relatado na metabolização de compostos fenólicos (Couteau *et al.*, 2001; Davies & Lunte, 1996; De Santi *et al.*, 2000; De Santi *et al.*, 2000; Graefe *et al.*, 2001; Jacobson *et al.*, 1983; Scott & Lunte, 1993). Após análise de grande número de amostras, tais impurezas geradas *in vivo* seriam responsáveis pela diminuição da relação sinal/ruído, conseqüentemente elevando a variabilidade das medidas (Ermer, 1998; Nicolas & Scholz, 1998; Sheldon & Downar, 2000).

Os dados de referência para CCs e CQs em CLAE/EM durante quantificação das amostras de plasma dos animais tratados são apresentados (Tabela 11). Para as concentrações plasmáticas do 4-NRC dos animais tratados, há descrição em tabelas (Tabelas 12 a 14) e ilustração em gráficos (Figuras 16 a 18). Os perfis de

concentração *versus* tempo mostraram diferenças interindividuais claramente aceitáveis, com uma clara disposição farmacocinética nas curvas médias.

Após administração intravascular do 4-NRC, o perfil da curva média demonstra um rápido decaimento das concentrações plasmáticas, tendo mostrado níveis inferiores a 1 µg/mL (3,19 nM), logo após os 2,5 min de sua administração (Figura 16)

Após administração oral da substância isolada, observa-se baixos níveis plasmáticos de 4-nerolidilcatecol atingindo em média, picos plasmáticos máximos de 74,0 ng/mL (0,24 nM), em aproximadamente 20 min (Tabelas 12 e 13). Observa-se ainda uma tendência à reabsorção após 120 min da administração oral. Similar disposição das concentrações plasmáticas é observada após a administração oral do extrato bruto. Excepcionalmente, há a presença de segundo pico de absorção, nos primeiros 20 min após aplicação da dose do extrato vegetal (Figuras 17 e 18)

A presença do pico em 20 min foi inicialmente questionada a cerca da formulação farmacêutica empregada, a hidropil-β-ciclodextrina a 30%. No entanto, tal formulação apresenta-se como uma forma farmacêutica de liberação imediata, pois o complexo de inclusão (Ono *et al.*, 1999) formado entre a substância e a ciclodextrina, é deslocada pelo colesterol plasmático (Frijlink *et al.*, 1991; Frijlink *et al.*, 1991). Geralmente, tais complexos de inclusão apresentam características superiores na melhoria da absorção oral, quando comparada a outros veículos carreadores de drogas lipídicas como, por exemplo, a metilcelulose (Nomeir *et al.*, 2000).

Especula-se ainda, que o extrato vegetal possa apresentar outras substâncias com mesma massa molecular, ou mesmo tipo de fragmentação, que estariam interferindo na análise do 4-NRC em plasma, levando ao aparecimento deste segundo pico de absorção. Podemos citar como exemplo, o dímero do 4-NRC presente em *Pothomorphe peltata* (Gustafson *et al.*, 1992), mas ainda não isolado em *Pothomorphe umbellata*, provavelmente pela inexistência de estudos fitoquímicos com extratos mais polares desta espécie (Bastos, 1998; Kijjoa *et al.*, 1980). Faz-se necessário portanto, o detalhamento e a caracterização por CLAE/EM/EM do extrato hidroalcolico desta espécie, visando sua completa monitoração.

Estudos complementares incluiriam a incubação do próprio 4-NRC, na presença de enzimas da fase II, principalmente glicuroniltransferases e sulfotransferases, para obtenção e caracterização dos principais metabólitos formados *in vivo* (Beckmann-Knopp *et al.*, 2000; loku *et al.*, 1998; Piskula & Terao, 1998).

Tabela 11: Curvas de calibração (CCs) e controles de qualidade (CQs) utilizadas na avaliação das amostras de concentração desconhecidas, obtidas após dosagem dos animais.

ANÁLITO: 4-NEROLIDILCATECOL		Equipamento: CLAE/EM-APCI		Coluna: RP-018						
Fase móvel: metanol:H ₂ O 9:1		Fluxo: 1,0 mL/min		Unidades: ng/mL						
Data	Ratos #	R ²	inclinação	Intercepto	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	CC6
Dia 1	08:10:11; 24:33:34	0.966427	53.4035	-14.0301	2.5	5	12.5	25	50	100
Dia 2	6:9:17:21:22; 25:26:27	0.98073	64.2652	-16.8335	2.94	5.01	13.99	28.35	59.02	136.65
Exatidão dos controles de qualidade na análise das amostras dos animais tratados, em CLAE-EM/EM										
Data	RSQ	inclinação	Intercepto	CQ (B)	CQ (M)	CQ (A)	DP (B)	DP (M)	DP (A)	
Dia 1	0.966643	53.4035	-14.0301	2.50	25.00	100.00	2.50	25.00	100.00	
Dia 2	0.98073	64.2652	-16.8335	1.69	19.23	85.40	32.4%	23.1%	14.6%	
				2.32	6.65	88.29	7.2%	73.4%	11.7%	
				2.49	21.91	80.92	0.3%	12.3%	19.1%	
				2.22	24.50	86.08	11.3%	2.0%	13.9%	
				2.21	21.16	110.93	11.5%	15.4%	-10.9%	
				2.51	27.09	103.39	-0.3%	-8.3%	-3.4%	
				1.85	18.30	75.87	25.9%	26.8%	24.1%	
				2.17	18.87	78.11	13.0%	24.5%	21.9%	
				2.26	20.45	84.59	9.4%	18.2%	15.4%	
				2.15	19.22	71.89	14.2%	23.1%	28.1%	
				0.91	21.29	85.66	63.6%	14.8%	14.3%	
				2.00	16.97	42.28	19.9%	32.1%	57.7%	
				2.31	22.39	85.62	7.4%	10.4%	14.4%	

Tabela 12: Concentrações plasmáticas de 4-NRC após administração intravascular (10 mg/kg) a ratos Sprague-Dawley.*

tempo após adm. (min)	Cp (ng/mL)						MÉDIA
	rato# 8	rato # 10	rato# 22	rato# 24	rato# 32	rato # 33	
2.5	9.26E+03	3.57E+03	4.90E+03	5.54E+03	1.08E+04	2.71E+04	1.02E+04
5	5.20E+03	4.05E+03	2.46E+03	3.06E+03	1.09E+04	5.04E+03	5.12E+03
7.5	3.19E+03	1.05E+03	2.10E+03	2.26E+03	2.89E+03	8.19E+03	3.28E+03
10	1.72E+03	2.02E+03	1.50E+03	1.42E+03	5.81E+03	1.56E+03	2.34E+03
15	1.14E+03	1.15E+03	1.51E+03	1.34E+03	2.19E+03	2.85E+03	1.70E+03
20	1.52E+03	1.14E+03	1.05E+03	1.04E+03	1.76E+03	1.60E+03	1.35E+03
30	7.89E+02	1.06E+03	6.39E+02	7.89E+02	1.57E+03	1.80E+03	1.11E+03
45	5.36E+02	9.03E+02	4.91E+02	1.92E+03	1.40E+03	1.54E+03	1.13E+03
60	3.08E+02	6.56E+02	3.56E+02	4.75E+02	5.19E+02	2.49E+03	8.00E+02
120	7.21E+01	2.20E+02	5.24E+00	—	1.07E+03	1.90E+02	3.12E+02
180	—	—	—	—	4.14E+02	—	4.14E+02

*Os valores das concentrações plasmáticas são expressos em notação científica

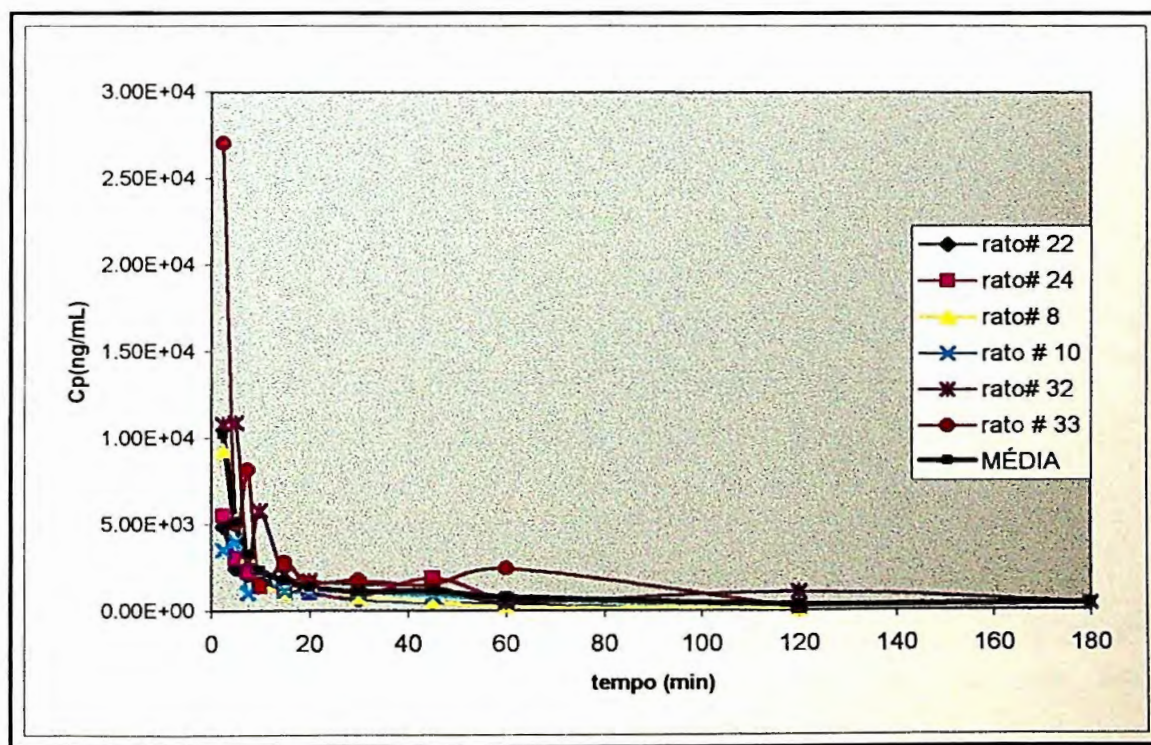


Figura 16: Concentrações plasmáticas de 4-NRC após administração intravascular (10 mg/kg)

Tabela 13: Concentrações plasmáticas de 4-NRC após administração oral (10mg/kg) a ratos Sprague-Dawley, em jejum por 15 h.

Tempo após adm. (min)	Cp (ng/mL)				
	rato # 06	rato # 09	rato # 21	rato # 25	MÉDIA
0	0	0	0	0	0
10	141.91	7.05	5.98	52.75	51.9
12.5	141.91	11.72	5.67	47.31	51.7
15	189.45	18.17	18.92	58.51	71.3
17.5	189.45	5.12	20.05	81.18	74.0
20	173.6	2.63	21.78	56.91	63.7
30	109.09	2.37	8.98	76.07	49.1
45	10.13	1.98	22.76	56.59	22.9
60	10.13	1.86	10.61	28.72	12.8
120	51.11	0.54	19.14	22.63	23.4
180	—	3.58	10.16	11.75	8.5

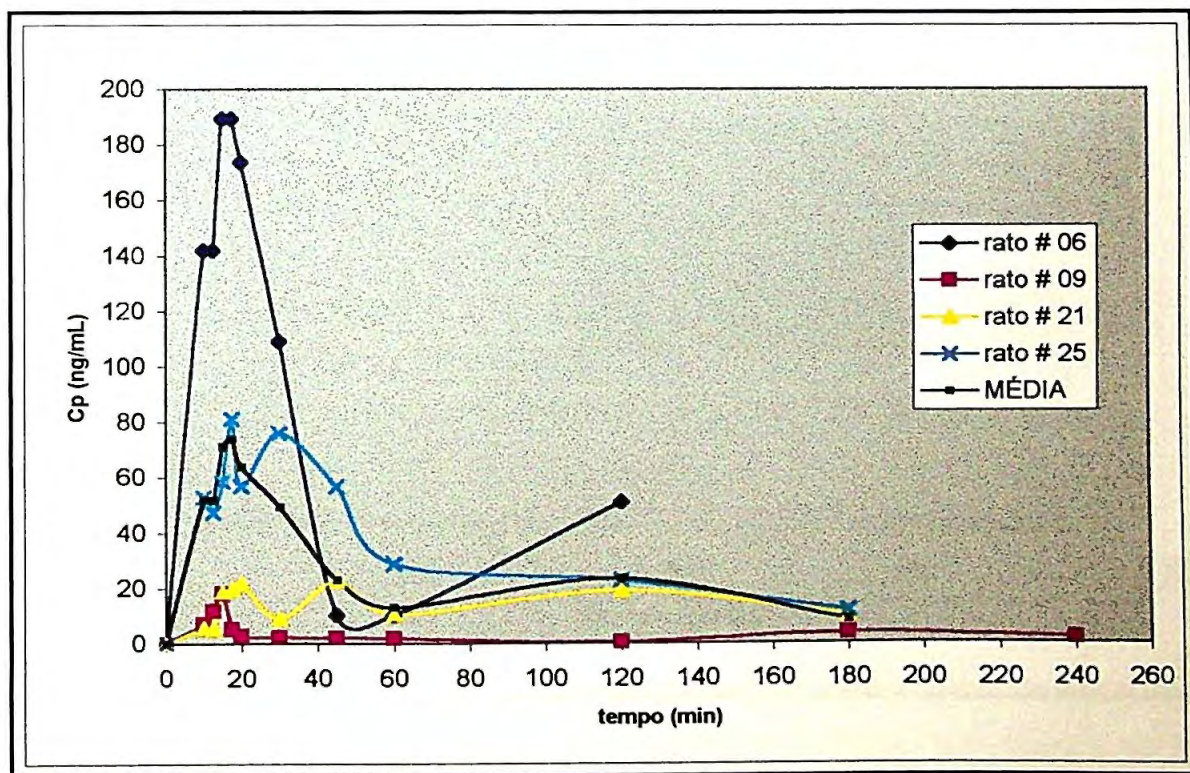


Figura 17: Concentrações plasmáticas de 4-NRC após administração oral (10 mg/kg).

Tabela 14: Concentrações plasmáticas de 4-NRC após administração oral do extrato hidroalcolólico de *Pothomorphe umbellata* (100 mg/kg) a ratos Sprague-Dawley.

tempo após adm. (min)	Cp (ng/mL)				
	rato # 11	rato # 17	rato # 26	rato # 27	MEDIANA
0	0	0	0	0	0
10	5.30	7.33	5.94	4.13	5.62
12.5	6.71	15.64	34.74	35.42	25.19
15	7.05	11.04	9.28	10.36	9.82
17.5	6.11	57.31	3.48	49.03	27.57
20	5.16	27.12	12.82	17.77	15.295
30	10.78	17.97	56.71	37.45	27.71
45	9.94	10.56	582.68	13.46	12.01
60	8.48	18.38	7.27	10.70	9.59
120	6.71	30.58	3.80	5.23	5.97
180	10.67	5.96	4.80	2.32	5.38

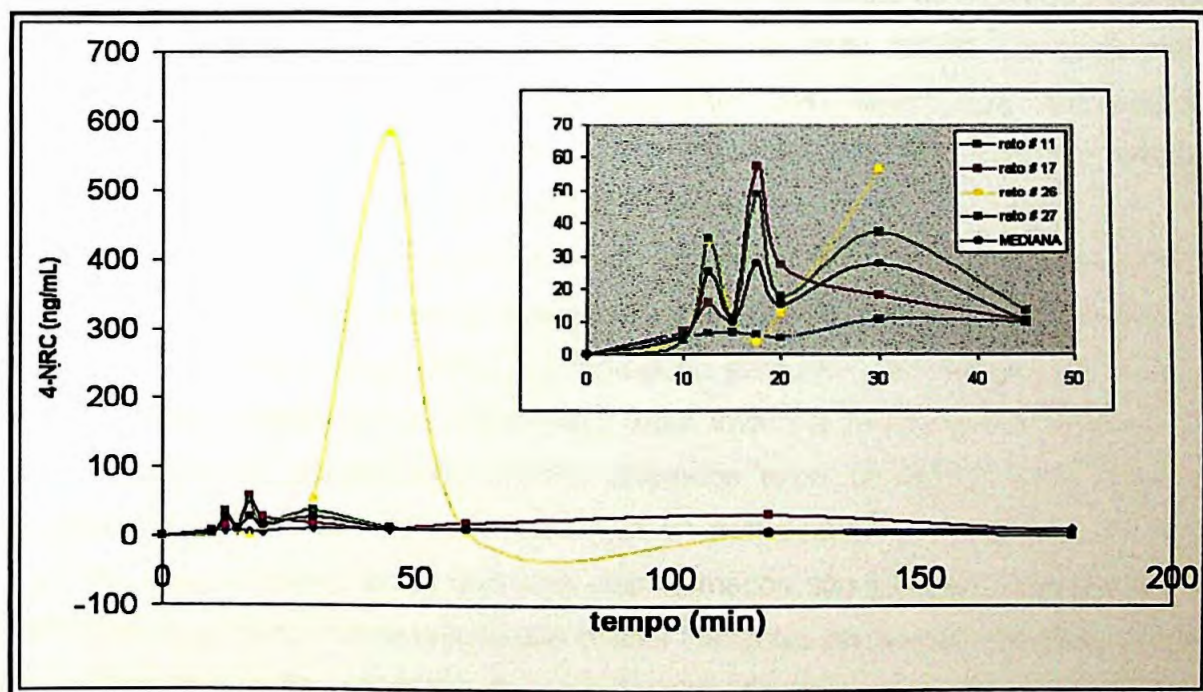


Figura 18: Concentrações plasmáticas de 4-NRC após administração oral do extrato hidroalcolólico de *Pothomorphe umbellata* e expansão da região entre 0 e 50 min.

3.3.3- Avaliação farmacocinética (Shargel & Yu, 1999), (Di Piro *et al.*, 1988)

A avaliação farmacocinética relaciona-se à investigação da cinética de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco em função do tempo, caracterizando-se tanto pela abordagem experimental, quanto teórica.

O aspecto experimental relaciona-se ao desenvolvimento de técnicas de amostragem biológica e desenvolvimento de métodos analíticos, enquanto que o teórico aborda o desenvolvimento de modelos farmacocinéticos que possam prever a disponibilidade do fármaco após sua absorção.

Considera-se a absorção uma extensão do processo de dissociação do fármaco a partir de sua forma farmacêutica, de sua dissolução nos fluidos biológicos e ainda da difusão através das barreiras de membranas biológicas até a corrente sangüínea. A extensão da absorção pode variar consideravelmente, uma vez que esta depende ainda da natureza intrínseca do fármaco (ex.: solubilidade, pKa), assim como de seu ambiente fisiológico (pH; motilidade intestinal e vascularização muscular).

Subsequente à absorção, inicia-se a distribuição do fármaco por vários processos de transporte, podendo conduzi-lo a áreas distantes do sítios de absorção. Este processo é dependente das características de cada tecido, os quais estão correlacionados à vascularização, aos diferentes pHs fisiológicos, aos estados fisiológicos alterados em diversas patologias; à solubilidade lipídica destes, além da extensão de suas ligações às proteínas plasmáticas.

Órgãos altamente perfundidos como coração, fígado e rins favorecem uma distribuição mais rápida, quando comparada com tecidos gordurosos e ósseos, ou mesmo tecidos musculares. Estados patológicos geradores de deficiência hepática, déficit cardíaco congestivo ou deficiência renal levam a alteração no desempenho e/ou perfusão de sangue nos tecidos alterados e/ou diminuição das proteínas circulantes, podendo acarretar no acúmulo ou na ineficácia medicamentosa.

As características físico-químicas dos fármacos são também importantes na distribuição e portanto, na definição das doses. Pacientes obesos por exemplo, podem ser acometidos pelo acúmulo de substâncias lipossolúveis. Em contrapartida, fármacos hidrossolúveis não se distribuem consideravelmente no tecido adiposo, podendo induzir erros de cálculos e, conseqüentemente, acarretar superdosagens.

A limitação da distribuição também ocorre no caso de drogas ionizáveis em pH 7,4. Estas moléculas são incapazes de atravessar as membranas plasmáticas e adentrar a célula. Nestes casos, a excreção do fármaco pode ocorrer, por exemplo, no leite materno onde o pH ácido funciona como uma armadilha para as substâncias alcalinas.

Outro fator importante na distribuição é a ligação do fármaco aos tecidos e às proteínas plasmáticas, como albumina, globulinas e alfa-1-glicoproteína ácida. A associação e dissociação das drogas para estados ligado e não-ligado, é um processo rápido e contínuo que assegura a distribuição das drogas na forma livre (não-ligada), difundindo-as pelo plasma e exercendo ação farmacológica.

Assim, a extensão da ligação proteica é dependente da presença de outros fármacos em ligação, e da concentração destes e das proteínas no plasma, para produção da resposta terapêutica. Portanto, o equilíbrio entre os processos de distribuição e eliminação, depende não apenas da concentração plasmática alcançada, mas também da concentração tecidual e da taxa de distribuição tecidual do fármaco.

Preferencialmente, as ligações às proteínas plasmáticas ocorrem com a albumina e a alfa-1-ácido glicoproteína, envolvidas em cerca de 95% dos casos. Substâncias aniônicas como a maioria dos antibióticos β -lactâmicos apresentam-se basicamente ligados à albumina, enquanto aquelas catiônicas (ex.: lidocaína) e as bases fracas ligam-se preferencialmente, a alfa-1-glicoproteína ácida.

No entanto, a ligação às proteínas plasmáticas é relevante para mudança da resposta terapêutica, somente para fármacos altamente ligados (cerca de 80-90%), como warfarin, salicilatos e fenitoína. Vale ressaltar que a elevada ligação a proteínas plasmáticas não prediz, necessariamente, pobre penetração tecidual ou baixa meia-vida do fármaco. Drogas lipofílicas, por exemplo, tendem a associar-se em maior extensão às proteínas plasmáticas, comparativamente às hidrofílicas. As primeiras distribuem-se em maior extensão através do corpo, acarretando em maior suscetibilidade à metabolização hepática.

Pelo processo de eliminação entende-se a remoção irreversível do fármaco do corpo, incluindo todas as rotas de eliminação. Este pode ser dividido em dois principais componentes: a excreção e a biotransformação.

A excreção de drogas inclui a remoção do fármaco intacto, principalmente através dos rins, embora inclua ainda a excreção através da bile, saliva, leite e outros fluidos orgânicos.

A biotransformação ou metabolismo de fármacos é o processo pelo qual o corpo converte quimicamente a substância em seu metabólito. Este processo geralmente ocorre por mecanismos enzimáticos, embora haja vias não-enzimáticas. A principal localização das enzimas biotransformadoras é o fígado, com menor ocorrência em outros tecidos como rins, pulmão, intestino delgado e pele.

Atualmente, a maioria dos trabalhos publicados na área de farmacocinética de produtos naturais são relativos a metabolização de flavonóides (Hollman & Katan, 1997), (Paganga & Rice-Evans, 1997). No entanto, existem estudos que discutem as concentrações plasmáticas e a excreção urinária de substâncias fenólicas de maneira geral (Jacobson *et al.*, 1983). Nestes, a presença de fenólicos no plasma parece ser apenas passageira, embora uma curta meia vida não exclua a possibilidade de exercer efeito farmacológico.

Os mecanismos de biotransformação de fenólicos ocorrem amplamente, sofrendo principalmente derivatizações, pois originalmente já apresentam grupos reativos. Observa-se rápida biotransformação através dos mecanismos enzimáticos da FASE II como a glicuronização, sulfatação e metilação presentes no intestino delgado, fígado ou mesmo outros órgãos. A glicuronização é catalisada pela UDP-glicuroniltransferase (UGT) localizada nas organelas microssomais. A sulfatação é catalisada pela sulfotransferases citosólicas (SULT) tendo 5'- fosfosulfato de 3'- fosfoadenosina (PAPS) como sulfato doador. Já a S-adenosilmetionina (SAM) é responsável pela provisão de grupamentos metila à enzima catecol-O-metiltransferase, a qual os transfere para substâncias polifenólicas.

A sequência e a extensão destas reações depende de vários fatores como a especificidade dos substratos enzimáticos e da disponibilidade dos cofatores para conjugação enzimática. Tais cofatores são variáveis com polimorfismo genético; com indução enzimática, dieta e estado metabólico. O metabolismo enzimático pode variar ainda, em função das doses dos polifenóis da dieta e dos substratos competidores.

O metabolismo FASE I, embora ocorra em menor extensão, é importante para alguns polifenóis, pois levam à redução de duplas ligações. As enzimas do complexo citocromo P450 podem ainda, oxidar e produzir grupos hidroxílicos adicionais no anel

aromático ou ainda, catalizar a O-desmetilação de polifenóis metilados. No entanto, polifenóis extensivamente hidroxilados são muito hidrofílicos como substratos para enzimas do complexo citocromo P450.

Polifenóis refratários a absorção no trato gastrointestinal superior e polifenóis conjugados oriundos do metabolismo biliar direcionam-se para o cólon, sendo submetidos à hidrolases da microflora bacteriana. Tais enzimas são responsáveis pela formação de metabólitos como, por exemplo, os derivados glicuronídicos e sulfatados da epigallocatequina encontrados em plasma e urina humana (Hollman *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001). A presença de flavonóis intactos em plasma humano geralmente não excede 1 μM , quando doses similares a ingestão diária são administradas (Scalbert & Williamson, 2000).

3.3.3.1- Parâmetros farmacocinéticos (Shargel & Yu, 1999; Welling, 1997)

A transformação do fármaco pelo organismo pode ser bastante complexa pois, muitos processos decorrem para modificação do mesmo nos tecidos e fluidos orgânicos. No entanto, simplificações de tais processos são necessários para prever seu comportamento no organismo. Tal abordagem é possibilitada através da aplicação de modelos matemáticos de predição dos processos de absorção, distribuição e eliminação do fármaco.

Os modelos compartimentais são os tipos mais comuns de abordagem, sendo categorizados como mono, bi ou multicompartimentais. A compartimentalização não representa um tecido ou fluido apenas, mas um *grupo* de fluidos ou tecidos similares. Por exemplo, para grande maioria das drogas a distribuição no tecido adiposo difere daquela no tecido renal, representando dois compartimentos. Diferentemente, o plasma e os órgãos altamente perfundidos como coração, fígado e rins são descritos como um único compartimento denominado por “central”, pois geralmente apresentam padrão de distribuição similar.

No modelo monocompartimental assume-se que após a administração do fármaco, há distribuição instantânea a todas as áreas do corpo, observando-se apenas o compartimento “central”.

No modelo bicompartimental, observam-se tecidos e/ou órgãos onde a distribuição ocorre mais lentamente em relação ao compartimento central, considerando um compartimento “periférico”.

Um importante indicador da extensão da distribuição do fármaco nos fluidos e tecidos é chamado de *volume de distribuição* (V_d). Este relaciona a quantidade de droga no organismo (X_0) à concentração inicial medida no plasma (C_0), quando em equilíbrio com tecidos. Se o volume de distribuição é elevado, evidencia-se extensa distribuição do fármaco no organismo, caso de drogas lipossolúveis.

O *clearance* é um outro importante parâmetro, pois descreve o volume de plasma do qual a droga é removida, ou depurada, por unidade de tempo. Este pode ser correlacionado ao volume de distribuição (V_d) e à constante de eliminação (K_{el}) através da seguinte equação: $CL_s = K_{el} \times V_d$. O clearance sistêmico (ou total) engloba os mecanismos de biotransformação (hepática), excreção renal e excreção biliar.

Na eliminação do fármaco, a fração de droga que deve ser eliminada por unidade de tempo (K), é dependente do tipo de cinética a ser seguida; *primeira ordem* ou *ordem zero*. No primeiro caso a fração é constante, mas a *quantidade* de droga eliminada decresce a medida que a concentração plasmática decresce. Se a eliminação é de *ordem zero*, a quantidade de droga eliminada permanece constante, mas a *fração* removida varia. Neste caso, a fração eliminada é maior quando a concentração plasmática é menor.

O *tempo de meia-vida* ($t_{1/2}$) do fármaco é o tempo necessário para que a concentração plasmática inicial do fármaco (C_0) diminua pela metade. Este pode ser relacionado à constante (K) através da equação $t_{1/2} = 0,693/K$, pois ambos os fatores indicam o quão rápido uma droga é removida do plasma. Já a meia vida de distribuição ($t_{1/2} \alpha$) e eliminação ($t_{1/2} \beta$) são obtidas pelas respectivas equações: $0,693/\alpha$ e $0,693/\beta$.

Os três últimos parâmetros aqui discutidos, ajudam no cálculo do regime de dosagem das drogas pois, relacionam-se ao tempo para o término do efeito do fármaco. O *clearance* é um parâmetro farmacocinético independente de modelo ($CL_s = \text{dose}/AUC$), e portanto a área sob a curva (AUC) está diretamente relacionada à dose administrada. Assim, o cálculo de biodisponibilidade de um fármaco, pode ser comparado à administração intravascular do mesmo.

3.3.3.2- Parâmetros farmacocinéticos do 4-NRC

Os valores de AUC, $t_{1/2}$, C_{max} , T_{max} , K_{el} , e assim como suas microconstantes k_{12} e k_{21} foram obtidos. Estas últimas representam a taxa de transferência da droga de um compartimento para o outro, caracterizando assim o modelo bicompartimental. A partir das microconstantes geraram-se as macroconstantes com inserção do método “microtomacro”. Para avaliação oral inferiu-se a existência de “Lag time”.

Após a administração intravascular do 4-NRC aos ratos Sprague Dawley, a curva plasmática média mostrou decréscimo exponencial (Figura 19). Os parâmetros farmacocinéticos foram obtidos individualmente, para cada animal. No entanto, a melhor correlação entre os dados teóricos e aqueles experimentais foi obtida com a curva de concentração plasmática média, utilizando-se o modelo bicompartimental (Tabela 15). Estes dados são apresentados e discutidos a seguir.

O 4-NRC apresenta-se amplamente distribuído ($V_d = 0,47$ L), comparativamente ao volume sangüíneo total de 18-30 mL. Considere que o volume sangüíneo total em ratos oscila entre 6-10% do peso animal (18-30 mL), dependendo da linhagem e idade dos indivíduos. Desta maneira pode-se inferir que o 4-NRC encontra-se localizado, majoritariamente, fora do compartimento central (sangüíneo). A área sob a curva (AUC), calculada 3 h após a administração *i.v.* do 4-NRC, foi de 187,06 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$. O *clearance* sistêmico ($CL_s = K_{el} \cdot V_d$) foi de 0,05 L/min, sendo que a cada minuto, cerca de 11% do fármaco foi eliminado ($K_{el} = 0,1139$).

O tempo de meia-vida do 4-NRC no compartimento central ($T_{1/2c} = 0,693/K_{el}$) mostrou-se curto (6,08 min). Os dados de meia-vida de distribuição ($T_{1/2\alpha} = 0,693/\alpha$) e eliminação ($T_{1/2\beta} = 0,693/\beta$), após administração *i.v.*, foram de 2,04 e 47,63 min, respectivamente. Estes dados refletem os valores de α (0,34) > β (0,015) e indicam a taxa de remoção do 4-NRC do plasma. Assim, a distribuição para os tecidos (α) ocorre a uma velocidade bastante superior à eliminação (β). Em outras palavras significa dizer que, a eliminação do fármaco presente no plasma ocorre cerca de 23 vezes mais rapidamente, que a eliminação proveniente dos tecidos.

Após administração oral do 4-NRC (10 mg/kg), o modelo farmacocinético aplicado foi bicompartimental (Figura 19). O perfil farmacocinético demonstrou rápida absorção seguida de eliminação lenta (Tabela 15). A concentração plasmática teórica máxima (C_{max}), calculada pelo programa KINETICA™ foi de 34,9 ng/mL, atingindo pico

máximo 22,8 min após a administração oral. O valor de $T_{1/2}$ central obtido foi de 40,1 min, com $T_{1/2\alpha}$ e $T_{1/2\beta}$ de 9,2 e 158,3; respectivamente. Assim, os valores preditos pelo KINETICA™ mostraram boa correlação com os valores experimentais obtidos.

A distribuição do 4-NRC após administração oral ($\alpha=0,075$) foi preponderante sobre eliminação ($\beta=0,044$), sendo a primeira 17,2 vezes superior. O *clearance* oral da substância pura foi de 2,0 L/min, depuração esta 40 vezes superior ao valor obtido após administração *i.v.*. O valor da AUC total (AUC) foi de 5,4 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$, sendo que a biodisponibilidade $[(AUC_{po}/dose_{po})/(AUC_{iv}/dose_{iv})\cdot 100]$ média foi de 2,7 % apenas.

Para o extrato de *Pothomorphe umbellata*, o modelo farmacocinético aplicado foi bicompartimental (Figura 19). Neste a concentração plasmática máxima (C_{max}) foi de 21,90 ng/mL, tendo ocorrido após 12,5 min da administração oral. O valor de $T_{1/2}$ central obtido foi de 1,14 min. $T_{1/2\alpha}$ e $T_{1/2\beta}$ foram 0,36 e 540,33 min, respectivamente. A distribuição preponderou sobre a eliminação com valores similares aos anteriores (16,4 vezes).

O *clearance* do 4-NRC presente no extrato bruto, foi de 4,91 mL/min. O valor da área sob a curva (AUC) foi de 4,37 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$, valor este similar àquele calculado para o composto isolado. No entanto, a dose de 4-NRC presente no extrato bruto foi de 21,5 mg/kg resultando em biodisponibilidade de 1,09 % apenas. Portanto, a biodisponibilidade oral do extrato bruto foi próxima à 1/3 do valor obtido para substância isolada.

A menor biodisponibilidade do extrato bruto, comparativamente à substância isolada deve estar correlacionada aos seguintes fatores: possibilidade de predomínio de farmacocinética não linear para diferentes doses (10 mg/kg X 21,5 mg/kg), ao grau de solubilidade do 4-NRC na preparação farmacêutica empregada, ou ainda, ao grau de sedação provocado pela anestesia, o qual diminuiria a motilidade no TGI.

A estequiometria do complexo de inclusão formado entre o 4-NRC presente no extrato bruto, e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (30%) pode ter sido alterada. A dose de 4-NRC administrada na forma de extrato bruto foi superior à dose oral de 4-NRC. Portanto, havia maior quantidade de 4-NRC a ser incluso na estrutura da molécula hospedeira (HP- β -CD 30%), incorrendo na insolubilidade de parte da dose administrada.

Alternativamente, questiona-se a possibilidade de competição pela inclusão na molécula hospedeira entre 4-NRC puro, e as demais substâncias presentes no extrato bruto.

Assim, futuros estudos espectrométricos para a caracterização da estequiometria do complexo, sua estrutura de coordenação e o tipo de complexo formado são fortemente recomendados (Hirayama & Uekama, 1987).

Tabela 15: Parâmetros farmacocinéticos do 4-nerolidilcatecol, calculados a partir da curva plasmática média (*i.v.*; $n=6$) ou mediana (*oral*, $n=4$).

Campo numérico	4-NRC (<i>i.v.</i>)	4-NRC (<i>oral</i>)	Extrato bruto
Dose (μg)	10000	10000	21500
K_a (min^{-1})	—	0.0655753	0.0162978
Lag (min)	—	5.09679	9.8492
Volume (L)	0.469341	114.756	8.08836
K_{el} (min^{-1})	0.1139	0.0173005	0.607412
K_{12} (min^{-1})	0.197321	0.0433834	1.30251
K_{21} (min^{-1})	0.0434501	0.0190805	0.00403867
AUC ($\text{ng/mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	187062	5036.91	4376.18
AUMC ($\text{ng/mL}/\text{min}^2$)	9.10E+06	1.03E+06	2.60E+06
MRT (min)	48.6507	184.129	522.756
Lz	0.0145506	0.00437887	0.00128256
C_{max} calc ($\mu\text{g/mL}$)	21,31	34.8995	21.8659
T_{max} calc (min)	0	22.7923	12.4586
A	19415.2	69.099	2654.31
Alpha (min^{-1})	0.340121	0.0753856	1.91268
B	1891.28	18.0422	3.83286
Beta (min^{-1})	0.0145506	0.00437887	0.00128256
CL (L/min)	0.05	1.99	4.91
$T_{1/2}$ alfa (min)	2.04	9.19	0.36
$T_{1/2}$ beta (min)	47.63	158.26	540.33
biodisponibilidade	100.00%	2.69%	1.09%

3.4- Conclusões

A avaliação dos dados de precisão e exatidão das curvas de calibração evidencia boa reprodutibilidade, através de coeficientes de correlação não inferiores a 0,98 durante os três dias de validação.

O método analítico desenvolvido em CLAE/EM forneceu simplicidade, seletividade e sensibilidade necessárias para descrever o completo perfil da concentração plasmática de 4-NRC. X tempo. Este foi ainda adequado na avaliação cinética do 4-NRC em plasma de rato, segundo os limites de confiança estabelecidos. A reprodutibilidade dos valores das corridas interensaio (reprodutibilidade) oscilou entre 4,2% e 16,3%. A variabilidade da precisão intraensaio (repetibilidade) das medidas permaneceu entre 3,8% e 14,7 %. Os dados de exatidão oscilaram entre 92,4 % e 84,4%, indicando boa concordância com os valores verdadeiros.

O perfil farmacocinético observado, após administração oral do 4-NRC e extrato bruto, reflete as características de uma substância com baixos níveis plasmáticos (C_{max} oral \approx 0,070 a 0,111 nM) resultantes de rápida distribuição, curta meia-vida plasmática e elevada depuração sistêmica (entre 0,05-4,9 litros/min). No entanto, maiores investigações acerca dos mecanismos de depuração, se preferencialmente hepáticos ou renais, são ainda necessários. Os dados farmacocinéticos obtidos devem ainda, direcionar futuros estudos complementares, primando pela avaliação do metabolismo hepático, realizando-se tanto experimentos *in vivo* quanto *in vitro* (Kawakami *et al.*, 1993). Exemplos incluem a incubação enzimática com posterior determinação estrutural dos metabólitos formados, assim como a canulação do ducto biliar para avaliação do efeito de primeira passagem (Ichikawa *et al.*, 1986).

Futuros estudos farmacológicos acerca da concentração plasmática eficaz e conseqüentemente, a dose e intervalos de administração necessários para exercer efeito terapêutico serão facilitados pelos parâmetros farmacocinéticos aqui obtidos ($Dose_{ataque} = C_{ss} \cdot V_d$). Necessário se faz ainda quantificar, através de microdiálise, a ligação às proteínas plasmáticas para obtenção da fração de droga livre no fígado (Scott & Lunte, 1993), uma vez que sua principal aplicação farmacológica refere-se à sua propriedade hepatoprotetora.

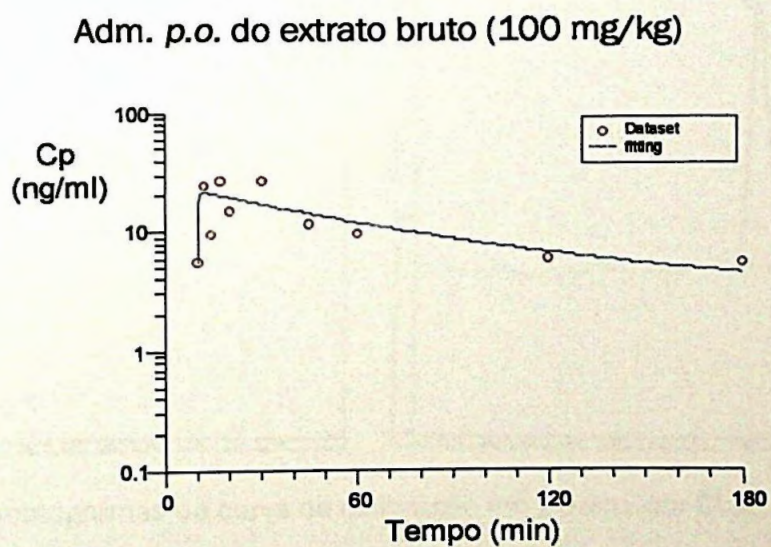
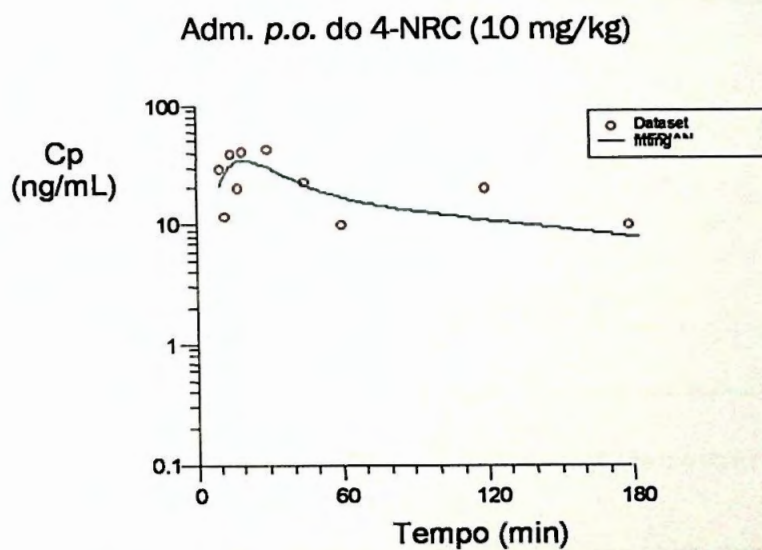
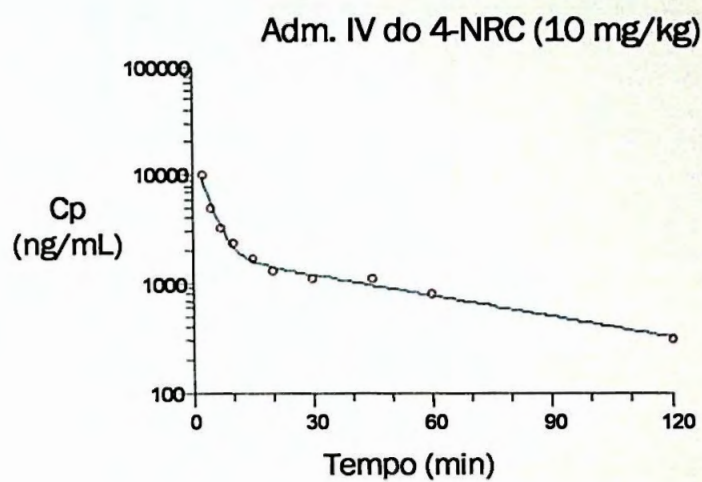


Figura 19: Modelagem computacional dos dados da curva Cp x t, após administração intravascular e oral do 4-NRC utilizando o programa Kinetica

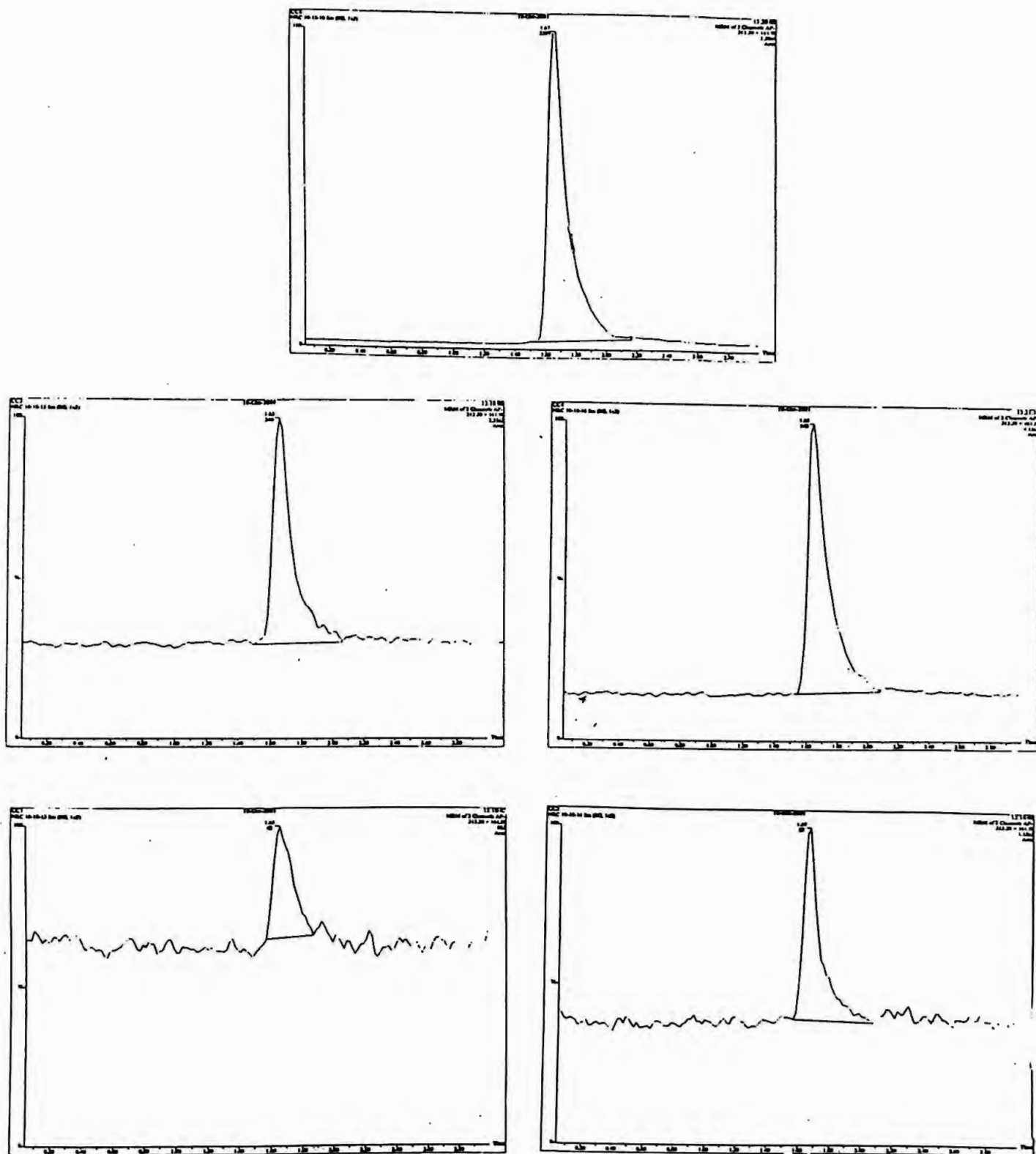


Figura 20 : Cromatogramas da curva de calibração em plasma, por CLAE-EM/EM.

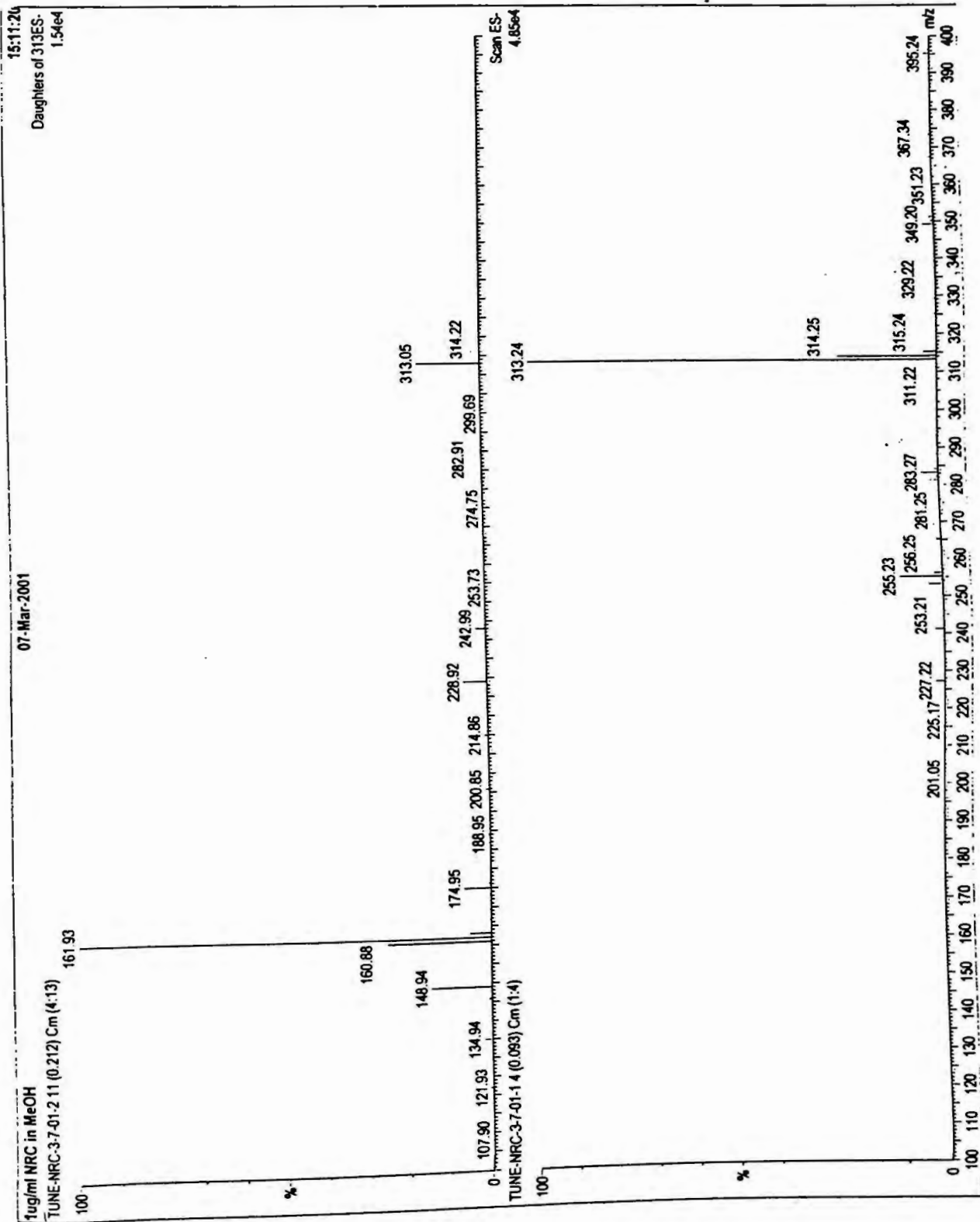


Figura 21 : Espectro de massas do 4-NRC em CLAE/EM/EM (m/z 313,2 e 161,9)

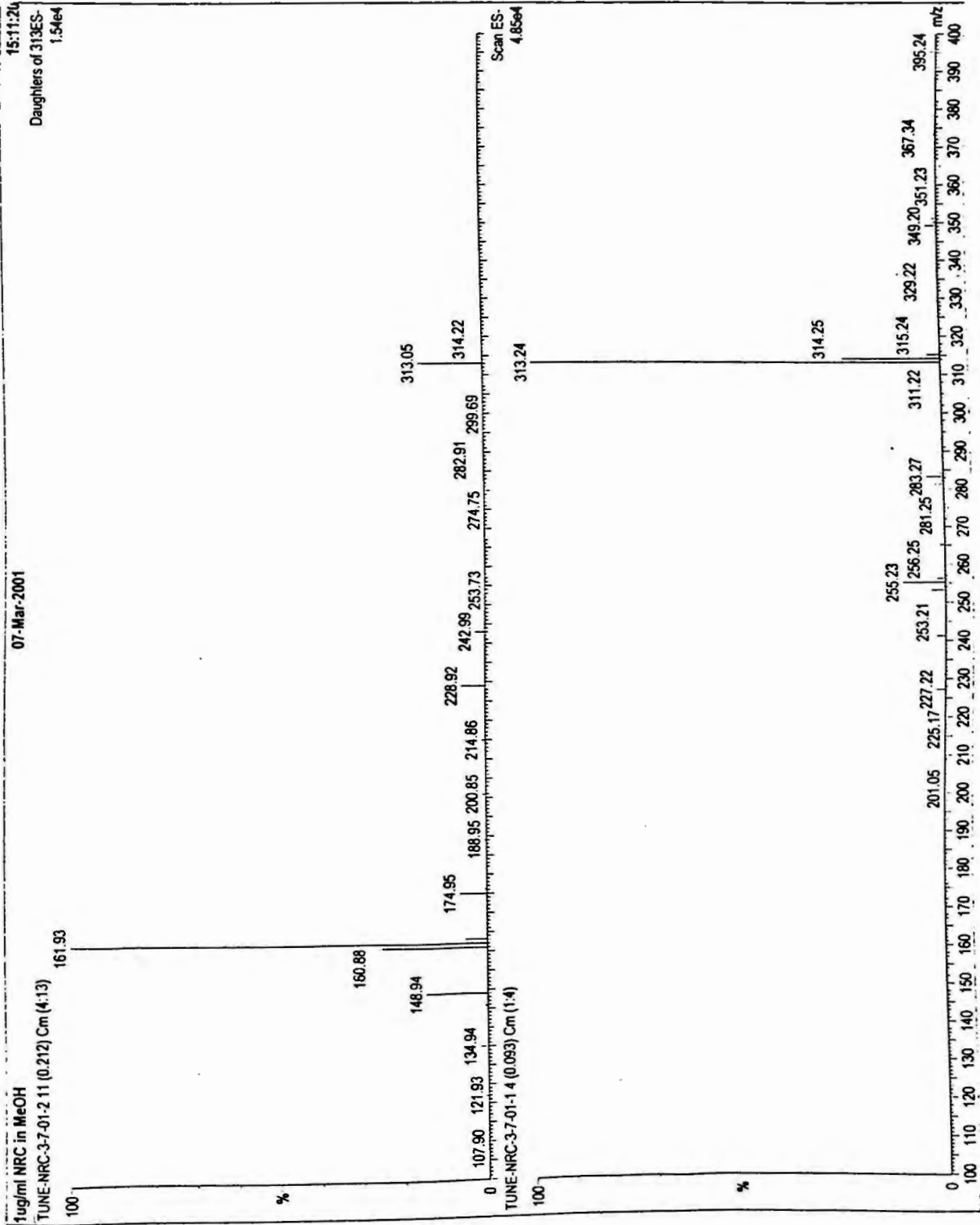


Figura 21 : Espectro de massas do 4-NRC em CLAE/EM/EM (m/z 313,2 e 161,9)

Quantify Calibration Report
FP IVAX repeat samples, 10-3-01

Page 1

Calibration: C:\MASSLYNX\Default.pro\CURVEDB\NRC 10-05-01
Last modified: Sat Oct 06 19:13:00 2001
Printed: Sat Oct 06 19:24:28 2001

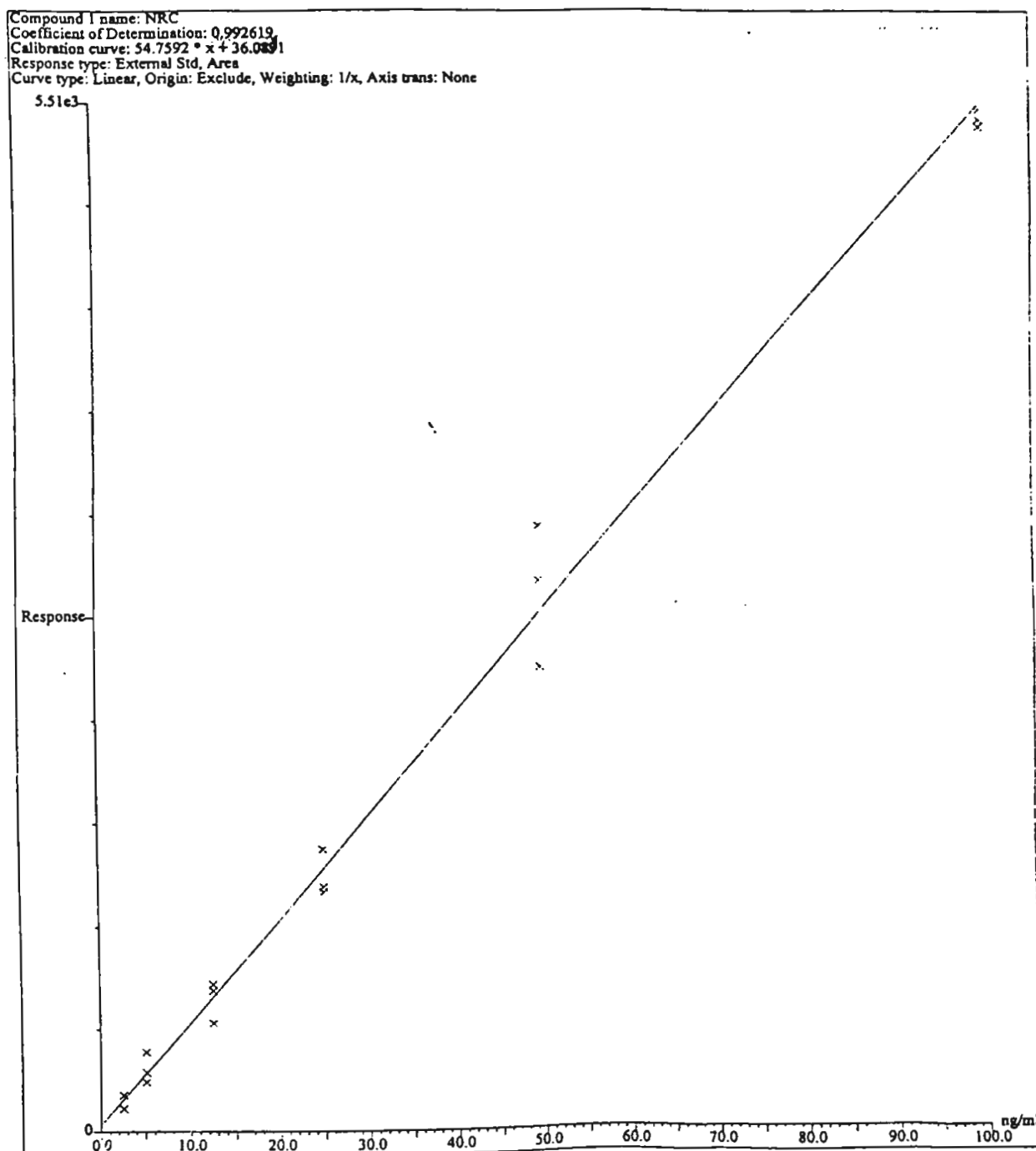


Figura 22: Curva de calibração do 4- NRC em plasma, por CLAE/EM/EM.

3.5- Referências

- Allen, M.C., Shah, T.S. & Day, W.W. (1998). Rapid determination of oral pharmacokinetics and plasma free fraction using cocktail approaches methods and application. *Pharmaceutical Research*, 15, 93-97.
- Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T. & Terao, J. (2000). Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res*, 33, 635-41.
- Bastos, W.L. (1998). Metabolismo secundário de *Pothomorphe umbellata*. In *Química Orgânica*. pp. 95. Araraquara: Universidade Estadual Paulista.
- Beckmann-Knopp, S., Rietbrock, S., Weyhenmeyer, R., Bocker, R.H., Beckurts, K.T., Lang, W., Hunz, M. & Fuhr, U. (2000). Inhibitory effects of silibinin on cytochrome P-450 enzymes in human liver microsomes. *Pharmacol Toxicol*, 86, 250-6.
- Couteau, D., McCartney, A.L., Gibson, G.R., Williamson, G. & Faulds, C.B. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol*, 90, 873-81.
- Davies, B. & Morris, T. (1993). Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res*, 10, 1093-5.
- Davies, M.I. & Lunte, C.E. (1996). Simultaneous microdialysis sampling from multiple sites in the liver for the study of phenol metabolism. *Life Sci*, 59, 1001-13.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Mosca, F. & Pacifici, G.M. (2000). Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica*, 30, 1047-54.
- De Santi, C., Pietrabissa, A., Spisni, R., Mosca, F. & Pacifici, G.M. (2000). Sulphation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica*, 30, 857-66.
- Di Piro, J.T., Blouin, R.A., Pruemer, J.M. & Spruill, W.J. (1988). *Concepts In Clinical Pharmacokinetics*. Bethesda, MD: American Society of Hospital Pharmacists.
- Ermer, J. (1998). The use of hyphenated LC-MS technique for characterisation of impurity profiles during drug development. *J Pharm Biomed Anal*, 18, 707-14.

- Frijlink, H.W., Eissens, A.C., Hefting, N.R., Poelstra, K., Lerk, C.F. & Meijer, D.K. (1991). The effect of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat. *Pharm Res*, **8**, 9-16.
- Frijlink, H.W., Franssen, E.J., Eissens, A.C., Oosting, R., Lerk, C.F. & Meijer, D.K. (1991). The effects of cyclodextrins on the disposition of intravenously injected drugs in the rat. *Pharm Res*, **8**, 380-4.
- Graefe, E.U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A.K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H. & Veit, M. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, **41**, 492-9.
- Gustafson, K.R., Cardelina II, J.H., Mcahon, J.B., Pannell, L.H., Cragg, G.M. & Boyd, M.R. (1992). The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. *Journal of Organic Chemistry*, **57**, 2809-2811.
- Hirayama, F. & Uekama, K. (1987). Methods of investigating and preparing inclusion complexes. In *Cyclodextrins and their industrial uses*. ed. Duchene, D. pp. 133-173. Paris.
- Hollman, P.C. & Katan, M.B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, **51**, 305-10.
- Hollman, P.C., Tijburg, L.B. & Yang, C.S. (1997). Bioavailability of flavonoids from tea. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **37**, 719-38.
- Ichikawa, T., Ishida, S., Sakiya, Y., Sawada, Y. & Hanano, M. (1986). Biliary excretion and enterohepatic cycling of glycyrrhizin in rats. *J Pharm Sci*, **75**, 672-5.
- Ioku, K., Pongpiriyadacha, Y., Konishi, Y., Takei, Y., Nakatani, N. & Terao, J. (1998). beta-Glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 1428-31.
- Jacobson, E.A., Newmark, H., Baptista, J. & Bruce, W.R. (1983). A preliminary investigation of metabolism of dietary phenolics in humans. *Nutr. Rep. Int.*, **1983**, 1409-1417.
- Kawakami, J., Yamamura, Y., Santa, T., Kotaki, H., Uchino, K., Sawada, Y. & Iga, T. (1993). Kinetic analysis of glycyrrhetic acid, an active metabolite of glycyrrhizin, in rats: role of enterohepatic circulation. *J Pharm Sci*, **82**, 301-5.
- Kijoa, A., AM, G., MK, A., OR, G. & HE, G. (1980). The chemistry of Brazilian Piperaceae. 2. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *PLANTA MEDICA*, **39**, 85-87.

- Korfmacher, W.A., Veals, J., Dunn-Meynell, K., Zhang, X., Tucker, G., Cox, K.A. & Lin, C.-C. (1999). Demonstration of the capabilities of a parallel high performance liquid chromatography tandem mass spectroscopy system for use in the analysis of drug discovery plasma samples. *Rapid Communications In Mass Spectroscopy*, 13, 1991-1998.
- Li, C., Lee, M.J., Sheng, S., Meng, X., Prabhu, S., Winnik, B., Huang, B., Chung, J.Y., Yan, S., Ho, C.T. & Yang, C.S. (2000). Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem Res Toxicol*, 13, 177-84.
- Li, C., Meng, X., Winnik, B., Lee, M.J., Lu, H., Sheng, S., Buckley, B. & Yang, C.S. (2001). Analysis of urinary metabolites of tea catechins by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*, 14, 702-7.
- Mauri, P. & Pietta, P. (2000). High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry of Hypericum perforatum extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 14, 95-9.
- Mauri, P., Simonetti, P., Gardana, C., Minoggio, M., Morazzoni, P., Bombardelli, E. & Pietta, P. (2001). Liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry of terpene lactones in plasma of volunteers dosed with Ginkgo biloba L. extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15, 929-34.
- Nicolas, E.C. & Scholz, T.H. (1998). Active drug substance impurity profiling part II. LC/MS/MS fingerprinting. *J Pharm Biomed Anal*, 16, 825-36.
- Nomeir, A.A., Kumari, P., Hilbert, M.J., Gupta, S., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Hare, R., Miller, G.H., Lin, C.C. & Cayen, M.N. (2000). Pharmacokinetics of SCH 56592, a new azole broad-spectrum antifungal agent, in mice, rats, rabbits, dogs, and cynomolgus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 727-31.
- Olah, T.V., McLoughlin, D.A. & Gilbert, J.D. (1997). The simultaneous determination of mixtures of Drug candidates by liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry as an *in vivo* drug screening procedure. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, 11, 17-23.
- Ono, N., Hirayama, F., Arima, H. & Uekama, K. (1999). Determination of stability constant of beta-cyclodextrin complexes using the membrane permeation

- technique and the permeation behavior of drug-competing agent-beta-cyclodextrin ternary systems. *Eur J Pharm Sci*, **8**, 133-9.
- Paganga, G. & Rice-Evans, C.A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett*, **401**, 78-82.
- Piskula, M.K. & Terao, J. (1998). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr*, **128**, 1172-8.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, **130**, 2073S-85S.
- Scott, D.O. & Lunte, C.E. (1993). In vivo microdialysis sampling in the bile, blood, and liver of rats to study the disposition of phenol. *Pharm Res*, **10**, 335-42.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., McDowall, R.D. & et al. (1991). Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, **16**, 249-55.
- Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powell, M.L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T. & Yacobi, A. (2000). Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *Pharm Res*, **17**, 1551-7.
- Shargel, L. & Yu, A. (1999). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. New York: McGraw-Hill.
- Shargel, L. & Yu, A.B.C. (1999). Introduction to Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. In *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. pp. 29-45: McGraw-Hill.
- Sheldon, E.M. & Downar, J.B. (2000). Development and validation of a single robust HPLC method for the characterization of a pharmaceutical starting material and impurities from three suppliers using three separate synthetic routes. *J Pharm Biomed Anal*, **23**, 561-72.
- Wang, X., Sakuma, T., Asafu-Adjaye, E. & Shiu, G.K. (1999). Determination of ginsenosides in plant extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by LC/MS/MS. *Anal Chem*, **71**, 1579-84.
- Wang, Y., Xu, X., van Lieshout, M., West, C.E., Lugtenburg, J., Verhoeven, M.A., Creemers, A.F., Muhilal & van Breemen, R.B. (2000). A liquid chromatography-
-

mass spectrometry method for the quantification of bioavailability and bioconversion of beta-carotene to retinol in humans. *Anal Chem*, 72, 4999-5003.

Welling, P.G. (1997). *Pharmacokinetics Processes, Mathematics and Applications*. Washington, DC: American Chemical Society.

Conclusões finais

3.6- Conclusões finais

1. O 4-nerolidilcatecol purificado a partir do extrato de folhas de *Pothomorphe umbellata* foi obtido com 96% de pureza.
 2. A metodologia analítica em CLAE-UV não demonstrou sensibilidade suficiente para medir as concentrações plasmáticas após administração de doses i.v e oral de 10 mg/Kg do 4-nerolidilcatecol, tampouco a 100 mg/kg do extrato hidroalcolico de raízes
 3. Observou-se elevada porcentagem de ligação do 4-NRC aos eritrócitos e instabilidade do mesmo frente ao sangue total rato. Em contrapartida, a estabilidade do analito foi demonstrada para armazenado em freezer a - 70°C.
 4. A metodologia em CLAE/EM/EM demonstrou sensibilidade bastante superior à CLAE-UV. Detectou-se níveis plasmáticos da ordem de ng/mL, em oposição à µg/mL, respectivamente, quando doses idênticas de 4-NRC foram administradas aos animais.
 5. A administração i.v. ou oral do 4-NRC resultou em níveis plasmáticos máximos da ordem de 10,0 µg/mL e 42,5 ng/mL, respectivamente. Houve ampla distribuição nos fluidos e tecidos orgânicos, com extensa metabolização da droga.
 6. A biodisponibilidade obtida para o 4-NRC após administração oral de 10 mg/kg foi de 2,7%, enquanto que para o extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (21,5 mg/kg de 4-NRC) esta foi de 1,1 %.
-