

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LUCIANA NASCIMENTO MOREIRA**

**VALIDAÇÃO DE L-(+)-BORNESITOL COMO MARCADOR ATIVO DE**  
***Hancornia speciosa*: ATIVIDADE HIPOTENSORA, ESTUDO**  
**FARMACOCINÉTICO E DE PERMEAÇÃO**

**BELO HORIZONTE – MG**

**2019**

**LUCIANA NASCIMENTO MOREIRA**

**VALIDAÇÃO DE L-(+)-BORNESITOL COMO MARCADOR ATIVO DE  
*Hancornia speciosa*: ATIVIDADE HIPOTENSORA, ESTUDO  
FARMACOCINÉTICO E DE PERMEAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fernão C. Braga

Coorientadores: Prof. Dr. Rodrigo M. Pádua

Prof. Dr. Steyner F. Côrtes, ICB/UFMG

**BELO HORIZONTE – MG**

**2019**

M838v      Moreira, Luciana Nascimento.  
Validação de L-(+)-bornesitol como marcador ativo *Hancornia speciosa*: atividade hipotensora, estudo farmacocinético e de permeação / Luciana Nascimento Moreira. – 2019.  
170 f. : il.

Orientador: Fernão Castro Braga.  
Coorientadores: Rodrigo Maia de Pádua.  
Steyner de França Côrtes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Marcadores biológicos – Teses. 2. Mangaba – Teses. 3. Produtos naturais – Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLUE) – Teses. 5. Espectrometria de massa – Teses. 6. Apocinaceas – Teses. 7. Validação de método – Teses. 8. Bornesitol. I. Braga, Fernão Castro. II. Pádua, Rodrigo Maia de. III. Côrtes, Steyner de França. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**VALIDAÇÃO DE L-(+)-BORNESITOL COMO MARCADOR ATIVO DE *Hancornia speciosa*: ATIVIDADE HIPOTENSORA, ESTUDO FARMACOCINÉTICO E DE PERMEAÇÃO**

### LUCIANA NASCIMENTO MOREIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 24 de outubro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Fernão Castro Braga - Orientador  
UFMG

Prof. Rodrigo Maia de Padua - Coorientador  
UFMG

Prof. Steyner de Franca Côrtes - Coorientador  
UFMG

Profa. Priscilla Rodrigues Valadares Campana  
UFMG

Prof. André Klein  
UFMG

Profa. Jacqueline de Souza  
UFOP

Prof. Whocely Victor de Castro  
UFSJ

Belo Horizonte, 24 de outubro de 2019.

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

## **AGRADECIMENTOS**

*Há quem diz que “a gratidão é a lembrança do coração”. Por isso essa parte da minha tese é tão especial... quero aqui expressar os meus agradecimentos as seguintes pessoas e instituições:*

*Ao Prof. Dr. Fernão Braga agradeço pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, pelos ensinamentos e aconselhamentos oportunos, pela amizade, paciência, orientação, zelo e atenção na minha formação profissional. Tenho um carinho muito grande pelo senhor e um respeito muito maior.*

*Ao Prof. Dr. Steyner Côrtes e ao Prof. Dr. Rodrigo Pádua agradeço pela coorientação, ensinamentos e conhecimentos compartilhados e pela amizade ao longo desses anos.*

*Ao Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves agradeço pela colaboração, apoio e ensinamentos.*

*A Prof. Dra. Cláudia Simões pela oportunidade de execução de parte do meu trabalho no laboratório de Virologia Aplicada da UFSC.*

*Um agradecimento especial a Dra. Grazielle Silva e Dra. Clarissa Feltrin pela parceria nos experimentos e ensinamentos.*

*Meu reconhecimento e meu muito obrigado aos colegas do laboratório de Fitoquímica, Farmacognosia e Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, meus companheiros de vida acadêmica. São inesquecíveis os momentos de discussão científica e de descontração.*

*Ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar este projeto e a Capes pelo suporte financeiro.*

*A minha cunhada Rutyela e meus sobrinhos por acompanharem de perto minha trajetória e pela amizade.*

*Ao meu irmão Luciano agradeço por ter sido o meu grande professor e grande amigo. Testemunho de minhas vitórias e derrotas.*

*Ao meu marido Felipe pelo exemplo de dedicação e paixão ao conhecimento, por estar ao meu lado compartilhando meus sonhos e experiências. Pelo apoio, incentivo e amor dedicados a mim. Amo você!*

*Aos meus pais Juracy e Edna por serem os meus grandes incentivadores nas horas mais difíceis, pela sabedoria em me educar, pelo amor, carinho, proteção e que sabiamente souberam me ensinar os limites da vida, por terem investido e*

*acreditado sempre na educação e me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento. Obrigado por me ensinar a não desistir dos meus sonhos, por acreditar em mim e por compartilhar de muitas das minhas angústias e conquistas.*

*E por fim, agradeço a Deus que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.*

*Muito obrigada!*

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas,  
mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito,  
que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta,  
onde não conhecem nem vitória, nem derrota”*

*(Theodore Roosevelt)*



## RESUMO

L-(+)-Bornesitol é o constituinte majoritário do extrato etanólico de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), planta medicinal com atividade anti-hipertensiva comprovada. O presente trabalho teve como objetivo validar L-(+)-bornesitol como marcador ativo de *H. speciosa*, empregando estudos de farmacodinâmica e farmacocinética em ratos, e de permeação *in vitro*. O bornesitol foi isolado de um extrato em metanol / acetato de etila (1:1) de folhas de *H. speciosa* e sua pureza e identidade foram aferidos por métodos espectrométricos usuais (RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e MS). Para a realização dos estudos farmacocinéticos desenvolvemos e validamos um método bioanalítico para quantificar o bornesitol em plasma de rato por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas sequencial com ionização por electrospray (UPLC-ESI-MS/MS). O efeito hipotensor do bornesitol foi investigado em ratos Wistar normotensos. Bornesitol (0,1; 1,0 e 3,0 mg/kg i.v.) promoveu a redução da pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial média (PAM) dos animais e seu mecanismo de ação foi caracterizado como resultante da inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina e aumento da concentração de óxido nítrico. O método bioanalítico de UPLC-ESI-MS/MS/MS desenvolvido e validado utilizou modo de aquisição por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) e ionização em modo negativo, e foi baseado em duas transições observadas para o analito, uma específica ( $m/z$  193,1  $\rightarrow$  161,0 Da) e outra confirmatória ( $m/z$  193,1  $\rightarrow$  125,0 Da). Pentaeritritol foi definido como padrão interno, sendo duas transições empregadas para sua análise, uma específica ( $m/z$  135,1  $\rightarrow$  87,3 Da) e outra confirmatória ( $m/z$  135,1  $\rightarrow$  69,3 Da). Para a realização do estudo farmacocinético, o plasma foi purificado por meio da precipitação de proteínas com acetonitrila. O método mostrou-se linear, exato, preciso, específico e sensível, sendo adequado para a determinação dos perfis plasmáticos do composto após diferentes doses e vias de administração. O bornesitol (3, 15 e 25 mg/Kg) administrado a ratos Wistar apresentou perfil farmacocinético não linear e com modelo bicompartimental. A permeabilidade do bornesitol foi avaliada *in vitro* em modelo transwell com células Caco-2. Quando avaliado isoladamente, o bornesitol apresentou baixa permeação, provavelmente devido à elevada hidrofília do composto, de maneira semelhante à relatada para outros ciclitóis. A permeabilidade do bornesitol foi aparentemente

aumentada quando este foi administrado associado com a rutina, ou como constituinte da matriz de uma fração padronizada de *H. speciosa*.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa*, bornesitol, UPLC-ESI-MS/MS, plasma de rato, estudo farmacocinético, estudo de permeabilidade, monocamada de células Caco-2.

## ABSTRACT

L-(+)-Bornesitol is the major constituent of an ethanol extract from *Hancornia speciosa* leaves, a medicinal plant with proven antihypertensive properties. The present work aimed to develop and validate a bioanalytical method to quantify bornesitol in rat plasma by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) for application in pharmacodynamics and pharmacokinetics studies, as well as *in vitro* permeation study. Bornesitol was isolated from a methanol / ethyl acetate (1:1) extract of *H. speciosa* leaves and its purity and identity were checked by usual spectrometric methods ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, MS). The hypotensive effect of bornesitol was investigated in normotensive Wistar rats. Bornesitol (0.1, 1.0 and 3.0 mg / kg i.v.) elicited a decrease in the systolic blood pressure (SBP) and mean blood pressure (MBP) of the animals and its mechanism of action was characterized as resulting from the inhibition of the angiotensin converting enzyme and increase in nitric oxide concentration. The developed UPLC-ESI-MS/MS method used MRM (Multiple Reaction Monitoring) and negative mode of ionization. It was based on two transitions observed for bornesitol, a specific one ( $m/z$  193.1  $\rightarrow$  161.0 Da) and a confirmatory one ( $m/z$  193.1  $\rightarrow$  125.0 Da). Pentaeritritol was defined as the internal standard for the method, for which two transitions were also employed, one specific ( $m/z$  135.1  $\rightarrow$  87.3 Da) and another confirmatory ( $m/z$  135.1  $\rightarrow$  69.3 Da). To perform the pharmacokinetics study, a bioanalytical method was developed based on plasma purification by precipitation of proteins with acetonitrile. The method presented high recovery rates of bornesitol, besides sensitivity, selectivity, high accuracy and precision, being suitable for the determination of the plasma profiles of the compound at different doses and routes of administration. The pharmacokinetic profile of bornesitol (3, 15 and 25 mg/Kg), given to Wistar rats, was characterized to be non-linear and with bicompartamental model. The permeability of bornesitol was investigated *in vitro*, using transwell model with Caco-2 cells. When tested separately, bornesitol showed low permeability, probably due to its high hydrophilicity, as similarly reported to other cyclitols. The permeability of bornesitol was apparently increased when it was administered combined with rutin, or as constituent from a standardized fraction of *H. speciosa* leaves.

Keywords: *Hancornia speciosa*, bornesitol, UPLC-ESI-MS/MS, rat plasma pharmacokinetic study, permeability study, Caco-2 cell monolayer

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** *Hancornia speciosa* e em destaque suas folhas e inflorescência (LORENZI, 2009). ..... 15
- Figura 2:** Origem das plantas utilizadas na produção de fitoterápicos com registro válido na ANVISA, até setembro de 2019. Dados compilados pela autora, a partir de informações disponíveis no site da ANVISA (<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>) e Flora do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=F6FECB425C758D0655B9D7A25D8463DE#CondicaoTaxonCP>). ..... 32
- Figura 3:** Fotografia de cultura de células Caco-2 com  $\pm$  80% de confluência, utilizada nos ensaios de citotoxicidade e permeabilidade. .... 58
- Figura 4:** Perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel para bornesitol substância de referência (A e E), fase orgânica (B) e fase aquosa (C) da purificação do extrato de *H. speciosa*, após a extração com carvão ativado, e (D) bornesitol isolado no presente trabalho. .... 68
- Figura 5:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do bornesitol (400 MHz e 100 MHz, respectivamente, DMSO- $d_6$ ). ..... 69
- Figura 6:** Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS/MS no modo negativo de ionização para o extrato em acetato de etila/metanol de folhas de *H. speciosa* (A), bornesitol isolado (B), espectro de MS (modo *scan*) extraído para bornesitol (TR = 2,96 min) (C) e metanol, utilizado como solvente (D). ..... 73
- Figura 7:** Efeito do bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 mg/Kg; i.v.) na pressão arterial sistólica (A-C), pressão arterial diastólica (D-F), pressão arterial média (G-I) e frequência cardíaca (J-L) de ratos Wistar normotensos. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM da diferença ( $\Delta$ ) entre a pressão arterial antes e após a administração do bornesitol em pelo menos cinco experimentos. \* P <0,05; \*\* P <0,01 e \*\*\* P <0,001 em relação à solução salina. .... 76
- Figura 8:** Efeito do bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 mg/kg, i.v.) na concentração plasmática de nitrito de ratos Wistar normotensos. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 8 experimentos. \*\*\* P <0,001 em relação à solução salina. .... 77
- Figura 9:** Efeito do bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 mg/Kg, i.v.) na atividade plasmática da ECA de ratos Wistar normotensos. Captopril (10,0 mg/Kg) foi utilizado como controle

positivo. Os resultados representam a média ± EPM de 8 experimentos. *** P <0,001 em relação à solução salina.....	79
<b>Figura 10:</b> Estruturas químicas do L-(+)-bornesitol (A), D-pinitol (B) e pentaeritritol (C).....	81
<b>Figura 11:</b> Propostas de fragmentação do bornesitol para as transições $m/z$ 193,1 → 161,0 Da (A) e $m/z$ 193,1 → 125,0 Da (B).....	83
<b>Figura 12:</b> Propostas de fragmentação para as transições $m/z$ 135,1 → 87,3 Da (A) e 135,1 → 69,3 Da (B). ....	83
<b>Figura 13:</b> Cromatogramas, obtidos com detecção no DAD ( $\lambda$ 190 – 500 nm), para o metanol (branco) (A) e solução metanólica de bornesitol com pentaeritritol (B), e cromatograma obtido com detecção no espectrômetro de massas em modo MRM (C) para bornesitol (TR 2,9 min) e pentaeritritol (TR= 1,4 min).....	85
<b>Figura 14:</b> Espectro de massas obtido <i>on line</i> no modo <i>Scan ESI<sup>-</sup></i> para bornesitol (A) e íon produto de $m/z$ 193 Da (B), destacando os íons identificados. ....	86
<b>Figura 15:</b> Espectro de massas obtido <i>on line</i> no modo <i>Scan ESI<sup>-</sup></i> para pentaeritritol (A) e íons produtos de $m/z$ 135 Da (B) para o pentaeritritol, destacando os íons identificados. ....	87
<b>Figura 16:</b> Cromatogramas obtidos para amostras branco (Bornesitol, <b>A</b> e Pentaeritritol, <b>B</b> ) e para amostra LIQ (Bornesitol, <b>C</b> e Pentaeritritol, <b>D</b> ).....	94
<b>Figura 17:</b> Cromatogramas, obtidos para amostras branco (Bornesitol, <b>A</b> e Pentaeritritol, <b>B</b> ) e para uma amostra LIQ (Bornesitol, <b>C</b> e Pentaeritritol, <b>D</b> ) após injeção de amostra CQD.....	95
<b>Figura 18:</b> Curvas de calibração obtidas para bornesitol em dias diferentes. ....	100
<b>Figura 19:</b> Distribuição dos resíduos obtida para cada nível de concentração de bornesitol sem fator de ponderação ( <b>A</b> ) e com fatores de ponderação $1/x$ ( <b>B</b> ) e $1/x^2$ ( <b>C</b> ). Vide comentários no texto. ....	102
<b>Figura 20:</b> Curva média de concentração plasmática em função do tempo, em escala linear, para a administração intravenosa de bornesitol (3 mg/Kg) em ratos. Os resultados representam a média ± EPM de 6 experimentos. ....	110
<b>Figura 21:</b> Curva média de concentração plasmática em função do tempo, em escala logarítmica, para a administração intravenosa de bornesitol (3 mg/Kg) em ratos. Os resultados representam a média ± EPM de 6 experimentos. ....	110

<b>Figura 22:</b> Curva média de concentração plasmática em função do tempo, em escala logarítmica, para a administração oral de bornesitol (3 mg/Kg, 15 mg/Kg e 25 mg/Kg) em ratos. Os resultados representam a média ± EPM de 4 experimentos na dose de 3 mg/Kg, 15 mg/Kg e 25 mg/Kg.....	111
<b>Figura 23:</b> Citotoxicidade do bornesitol (15,38 µM), da mistura bornesitol e rutina (15,38 µM e 1,84 µM) e da fração padronizada de <i>Hancornia speciosa</i> (0,0385 mg/mL, contendo o equivalente a 15,38 µM de bornesitol) em células Caco-2, após 24 h de tratamento.....	118
<b>Figura 24:</b> Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS/MS em modo MRM para amostra branco (A) e para amostra bornesitol (B).....	119
<b>Figura 25:</b> Curvas analíticas para quantificação do bornesitol obtidas por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM.....	120
<b>Figura 26:</b> Distribuição dos resíduos obtidos na curva analítica média do bornesitol.....	121
<b>Figura 27:</b> Avaliação da robustez do método para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM. Os resultados representam a média ± EPM de três experimentos. ** P < 0,01 e **** P < 0,0001 em relação à condição nominal. .	125
<b>Figura 28:</b> Monocamada de células Caco-2 diferenciadas após 21 dias de incubação. ....	126
<b>Figura 29:</b> Curva de calibração do <i>Lucifer Yellow</i> . Os resultados representam a média de três experimentos. ....	127
<b>Figura 30:</b> Imagens de microscopia de imunofluorescência de monocamadas de células Caco-2. <b>(A)</b> Junções oclusivas, em verde, marcadas com o anticorpo Anti-ZO-1 e <b>(B)</b> F-actina, em vermelho, corada com rodamina-faloidina. Os núcleos celulares, em azul, foram corados com Hoechst 32258. ....	127
<b>Figura 31:</b> Modulação da permeabilidade aparente ( $P_{app}$ em cm/s) do bornesitol pelos transportadores de efluxo e influxo no estudo de permeabilidade. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes e as barras os respectivos valores de EPM.....	129

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Série eluotrópica utilizada no fracionamento de $f_{aca}$ .....	41
<b>Tabela 2:</b> Condições espectrométricas utilizadas para quantificação de bornesitol e pentaeritritol.....	45
<b>Tabela 3:</b> Condições espectrométricas específicas para quantificação de bornesitol e pentaeritritol.....	46
<b>Tabela 4:</b> Condições espectrométricas utilizadas para identificação de bornesitol em extrato de <i>H. speciosa</i> .....	48
<b>Tabela 5:</b> Atribuição dos sinais do espectro de RMN de $^1H$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) e $^{13}C$ (100 MHz, DMSO- $d_6$ ) obtido para o bornesitol isolado.....	71
<b>Tabela 6:</b> Taxas de recuperação de pentaeritritol avaliado como padrão interno no método bioanalítico, após extração do plasma por precipitação de proteínas. Os resultados representam a média de 3 experimentos.....	90
<b>Tabela 7:</b> Avaliação do diluente dos analitos na solução estoque. Água (A), Água e metanol 1:1 (B) e Metanol (C). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 3 experimentos * $P < 0,05$ .....	91
<b>Tabela 8:</b> Influência da temperatura e tempo de secagem na recuperação do bornesitol. Os resultados representam 1 experimento.....	91
<b>Tabela 9:</b> Taxa de recuperação de diferentes concentrações de bornesitol em plasma, após procedimento de preparo de amostra estabelecido.....	93
<b>Tabela 10:</b> $FMN_{BOH/PENT}$ obtidos a partir dos resultados do ensaio de efeito matriz com as amostras CQB e CQA.....	97
<b>Tabela 11:</b> Dados obtidos para construção das curvas analíticas de bornesitol.....	99
<b>Tabela 12:</b> Valores das somas dos erros relativos das concentrações nominais <i>versus</i> as concentrações calculadas em três curvas de calibração, com fatores de ponderação $1/x$ e $1/x^2$ para bornesitol nas três validações.....	103
<b>Tabela 13:</b> Equações das retas e respectivos coeficientes de determinação obtidos para as três curvas de calibração.....	103
<b>Tabela 14:</b> Valores de CV (%) intracorrída e intercorrídas obtidos no ensaio de precisão.....	104
<b>Tabela 15:</b> Valores de EPR (%) intracorrída e intercorrídas obtidos no ensaio de exatidão.....	105



<b>Tabela 16:</b> Valores obtidos na avaliação da estabilidade do bornesitol em matriz biológica.....	106
<b>Tabela 17:</b> Valores obtidos na avaliação da estabilidade de solução de bornesitol e pentaeritritol na temperatura de transporte e à temperatura ambiente. Os resultados representam a média de 3 experimentos. ....	108
<b>Tabela 18:</b> Valores obtidos na avaliação da estabilidade da solução de bornesitol e pentaeritritol na temperatura de armazenamento ( $4 \pm 2$ °C). Os resultados representam a média de 3 experimentos. ....	108
<b>Tabela 19:</b> Parâmetros farmacocinéticos determinados para o bornesitol para administração intravenosa e oral em ratos Wistar. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 experimentos na dose de 3 mg/Kg por via intravenosa e de 4 experimentos na dose de 3 mg/Kg, 15 mg/Kg e 25 mg/Kg por via oral. ....	112
<b>Tabela 20:</b> Dados obtidos para construção da curva de linearidade.....	120
<b>Tabela 21:</b> Dados da precisão intradia do método para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM. ....	122
<b>Tabela 22:</b> Dados da precisão interdias do método para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM. ....	122
<b>Tabela 23:</b> Dados da exatidão do método para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM. ....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP Binding Cassete</i> – transportadores ABC
ACN	Acetonitrila
Ang II	Angiotensina II
AP-BL	Apical-basolateral
aRA	Antagonistas dos receptores da angiotensina
ARP	Amostra recém-preparada
ASC <sub>0-t</sub>	Área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta quantificado
ASC <sub>0-∞</sub>	Área sob a curva do tempo zero ao infinito
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i> – proteína de resistência do câncer de mama
BL-AP	Basolateral-apical
BOH	Bornesitol
BPC	Boas Práticas Clínicas
Caco-2	Células de adenocarcinoma de cólon humano
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEBIO	Centro de bioterismo
C-ECA terminal	Carboxila-terminal ECA
CEUA	Comitê de experimentação e uso animal
Cl	<i>Clearance</i> – Depuração total
C <sub>máx</sub>	Concentração plasmática máxima
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo

CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coeficiente de variação
$\delta$	Deslocamento químico
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DAD	Detector arranjo de diodos
DCV	Doenças cardiovasculares
DEPT-135	Intensificação sem distorção por transferência de polarização 135
DMSO- $d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
DPR	Desvio padrão relativo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECC	Estabilidade de congelamento e descongelamento
ECD	Estabilidade de curta duração
EFS	Extração em fase sólida
ELD	Estabilidade de longa duração
ELL	Extração líquido-líquido
EPM	Erro padrão médio
EPP	Estabilidade pós-processamento
EPPr	Extração por precipitação de proteínas
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Ionização por electrospray
ETA	Estabilidade de temperatura de trabalho
ETT	Estabilidade de temperatura de armazenamento

EtOAc	Acetato de etila
F	Biodisponibilidade absoluta
$f_{aca}$	Fração aquosa do fracionamento com carvão ativado
FC	Frequência cardíaca
FHS	Fração padronizada das folhas de <i>H. speciosa</i>
FMN	Fator de matriz normalizado
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massa
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HILIC	<i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> – cromatografia líquida de interação hidrofílica
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Hz	Hertz
iECA	Inibidores da ECA
$J$	Constante de acoplamento escalar
$K_a$	Constante da velocidade de absorção
$K_{el}$	Constante de eliminação
$K_i$	Constante de inibição
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LIQ	Limite inferior de quantificação
ln	Logaritmo natural
Log P	Coeficiente de partição
m	Multiplete

MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
MMP-9	Metaloproteinase-9
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
<i>N</i> -ECA terminal	Amino-terminal ECA
NF-κB	Fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
OATP	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide</i> – polipeptídeo transportador de ânions orgânicos
OCT	<i>Organic Cation Transporters</i> – transportadores de cátions orgânicos)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
PENT	Pentaeritritol
P-gp	<i>P-glycoprotein</i> – glicoproteína P
PI	Padrão interno
pKa	Logaritmo da constante de acidez

PNPICS	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
Ppt	Precipitado
q	Quarteto
$r^2$	Coeficiente de determinação
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS – Sistema Único de Saúde
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
SLC	<i>Solute Carrier</i> – transportadores carreadores de solutos
SPH	Sociedade portuguesa de hipertensão
SRA	Sistema renina-angiotensina
SUS	Sistema Único de Saúde
$t_{1/2}$	Meia-vida de eliminação
TAC	Terapia Alternativa Complementar
td	Tripleto duplo
TEER	Resistência elétrica transepitelial
TGI	Trato gastrointestinal
TIC	<i>Total ions count</i> – contagem de íons totais
$T_{\text{máx}}$	Tempo em que atinge a $C_{\text{máx}}$
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de retenção
UPLC-ESI-	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a

MS/MS	espectrômetro de massa sequencial com fonte de ionização por electrospray
V <sub>d</sub>	Volume de distribuição
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

- (1) Ácido gálico
- (2) Ácido siríngico
- (3) 5-O-Cafeoilquínico
- (4) 3-O-Cafeoilquínico
- (5) *cis*-Clorogenato de metila
- (6) *trans*-Clorogenato de metila
- (7) 2,7-Diidroxixantona
- (8) 2,7- Dimetoxixantona
- (9) Eugenol
- (10) Lupeol
- (11) Rutina
- (12) L-(+)-Bornesitol
- (13) *trans*-4-Hidroxicinâmico
- (14)  $\alpha$ -Amirina
- (15) 3 $\beta$ -O-Éster de ácido graxo
- (16) 3-O- $\beta$ -(3'-*R*-Hidroxi)-hexadecanoil-lupeol
- (17) Berberina
- (18) Quercetina
- (19) Ácido 3,4-di-hidroxifenilático
- (20) Ácido ferúlico
- (21) Hexanicotinato de inositol
- (22) Ácido fítico
- (23) Atenolol



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
3.1 Hipertensão arterial.....	14
3.2 Atividades biológicas e constituintes químicos de <i>Hancornia speciosa</i> .....	15
3.3 Estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos com produtos naturais .....	20
3.3.1 Identificação de marcadores .....	21
3.3.2 Parâmetros farmacocinéticos .....	23
3.3.3 Métodos bioanalíticos.....	26
3.3.3.1 Cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC) .....	29
3.3.4 Estudos de farmacocinética com plantas brasileiras .....	30
3.4 Estudos de permeabilidade <i>in vitro</i> .....	32
3.4.1 Transportadores SLC ( <i>Solute Carrier</i> ).....	33
3.4.2 Transportadores ABC ( <i>ATP-binding cassette</i> ).....	34
<b>4 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
4.1 Equipamentos, insumos e vidrarias.....	35
4.2 Reagentes e soluções.....	37
4.3 Animais .....	39
4.4 Material vegetal e obtenção da fração padronizada .....	39
4.5 Isolamento e caracterização do bornesitol .....	40
4.6 Ensaio farmacológico .....	42
4.6.1 Aferição direta da pressão arterial sistólica e coleta de sangue .....	42
4.6.2 Determinação sérica de nitrito .....	43
4.6.3 Atividade da ECA no plasma.....	43
4.6.4 Análise estatística .....	44

4.7 Ensaio farmacocinéticos.....	44
4.7.1 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação do bornesitol em plasma de rato por UPLC-ESI-MS/MS .....	44
4.7.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos .....	44
4.7.1.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos .....	46
4.7.1.3 Determinação dos parâmetros de preparo da amostra.....	46
4.7.2 Análise de bornesitol em extrato de <i>H. speciosa</i> por UPLC-ESI-MS/MS.....	47
4.7.3 Validação de método bioanalítico para quantificação do bornesitol em plasma de rato por UPLC-ESI-MS/MS .....	48
4.7.3.1 Seletividade.....	49
4.7.3.2 Efeito residual ou <i>carry-over</i> .....	49
4.7.3.3 Efeito matriz .....	49
4.7.3.4 Linearidade .....	50
4.7.3.5 Precisão .....	51
4.7.3.6 Exatidão .....	51
4.7.3.7 Estabilidade do analito em matriz biológica .....	51
4.7.3.8 Estabilidade do analito e PI em solução .....	52
4.7.4 Estudo farmacocinético com administração intravenosa e oral de bornesitol a ratos Wistar.....	53
4.7.5 Determinação de parâmetros farmacocinéticos.....	54
4.7.6 Análise estatística .....	56
4.8 Ensaio de citotoxicidade em células Caco-2.....	57
4.8.1 Preparação das amostras para os testes de citotoxicidade .....	57
4.8.2 Cultura de células Caco-2 .....	57
4.8.3 Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2.....	58
4.8.4 Análise Estatística.....	59
4.9 Ensaio de permeabilidade em células Caco-2.....	59
4.9.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS nos ensaios de permeabilidade.....	59
4.9.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos e cromatográficos .....	59
4.9.1.2 Determinação dos parâmetros de preparo de amostra.....	60

4.9.2 Validação de método analítico .....	60
4.9.2.1 Seletividade.....	61
4.9.2.2 Linearidade .....	61
4.9.2.3 Limite de quantificação.....	61
4.9.2.4 Limite de detecção .....	61
4.9.2.5 Precisão .....	62
4.9.2.6 Exatidão .....	62
4.9.2.7 Robustez.....	62
4.9.3 Preparação dos insertos .....	63
4.9.4 Avaliação da qualidade das células Caco-2 .....	63
4.9.4.1 Medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) .....	63
4.9.4.2 Permeabilidade do marcador <i>Lucifer Yellow</i> .....	64
4.9.4.3 Marcação dos filamentos de F-actina com o corante rodamina-faloidina e análise da formação das junções oclusivas por imunofluorescência .....	65
4.9.5 Preparação das amostras para os ensaios de permeabilidade .....	66
4.9.6 Ensaios de permeabilidade utilizando células Caco-2 em modelo <i>Transwell</i> ..	66
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
5.1 Obtenção, caracterização e pureza do bornesitol isolado .....	67
5.2 Avaliação da atividade hipotensora do bornesitol.....	74
5.2.1 Efeito na pressão arterial sistólica e frequência cardíaca .....	74
5.2.2 Efeito na concentração plasmática de nitrito .....	77
5.2.3 Efeito na atividade da ECA.....	78
5.3 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação do bornesitol .....	81
5.3.1 Otimização das condições cromatográficas do método bioanalítico para estudo farmacocinético.....	87
5.3.2 Preparo da amostra para o método bioanalítico .....	88
5.4 Validação do método bioanalítico para quantificação do bornesitol em plasma de rato .....	93
5.4.1 Seletividade .....	94
5.4.2 Efeito residual ou <i>carry-over</i> .....	95
5.4.3 Efeito matriz .....	96

5.4.4 Linearidade .....	97
5.4.5 Precisão .....	103
5.4.6 Exatidão .....	104
5.4.7 Estabilidade do analito em matriz biológica .....	105
5.4.8 Estabilidade do analito e PI em solução .....	107
5.5 Estudo farmacocinético do bornesitol com administração intravenosa e oral em ratos Wistar.....	108
5.6 Avaliação da citotoxicidade .....	117
5.7 Validação de método analítico para quantificação do bornesitol nos experimentos de permeabilidade .....	118
5.7.1 Seletividade .....	118
5.7.2 Linearidade .....	119
5.7.3 Limite de quantificação e detecção .....	121
5.7.4 Precisão .....	121
5.7.5 Exatidão .....	123
5.7.6 Robustez.....	123
5.8 Avaliação da qualidade das células Caco-2 .....	125
5.8.1 Medidas da TEER e permeabilidade do <i>Lucifer Yellow</i> .....	125
5.8.2 Ensaio de imunofluorescência para atestar a diferenciação das células Caco-2 .....	127
5.9 Modulação da permeabilidade do bornesitol pelos transportadores de efluxo e influxo utilizando células Caco-2 em modelo <i>Transwell</i> .....	128
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>134</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>170</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares (DCV) causam mais de 17 milhões de mortes anualmente; deste total, mais de 50% das mortes estão associadas à hipertensão arterial sistêmica (HAS), considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de DCV. O número de adultos com aumento da pressão arterial aumentou de 594 milhões em 1975 para 1,13 bilhões em 2015. Em 2016, estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram de DCV, representando 31% dos óbitos globais, sendo que 75% das mortes ocorreram em países de baixa e média renda (WHO, 2013, 2017; EGAN *et al.*, 2019). De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão, a HAS atinge 32,5% da população, ou seja, 36 milhões de indivíduos adultos diagnosticados até 2018.

As DCV ocupam a primeira posição em número de óbitos no Brasil. Esta observação é comprovada pelos dados do último censo que indicam que 29,8% das mortes ocorridas em 2013 no país tiveram como principal causa doenças cardiovasculares (MALACHIAS *et al.*, 2016). Dessa forma, a HAS pode ser considerada um problema de saúde pública, visto que apresenta alta taxa de mortalidade e seu tratamento envolve custos elevados em países de baixa e média renda, contribuindo para a pobreza.

A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial sistólica (PAS  $\geq$  140 mmHg) e/ou pressão arterial diastólica (PAD  $\geq$  90 mmHg). Frequentemente está associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (MALACHIAS *et al.*, 2016; Sociedade Portuguesa de Hipertensão - SPH, 2014).

No Brasil, a prevalência de HAS não segue uma tendência linear, mantendo-se elevada nos últimos cinco anos com predomínio em idosos (MENDES *et al.*, 2014). O estilo de vida, a falta de informação e a estrutura precária das unidades básicas de saúde também contribuem para a severidade das comorbidades associadas a esta condição (PEREIRA, 2015). Casos de hipertensos refratários ainda são bastante comuns (CALHOUN *et al.*, 2014), bem como daqueles que possuem dificuldades em aderir ao tratamento convencional (farmacológico e não farmacológico) (ABREU *et al.*, 2006).

Uma alternativa utilizada pela população para controle da hipertensão arterial baseia-se no uso de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Plantas medicinais são usadas desde os primórdios da civilização e muitos fármacos são originários ou derivados de produtos naturais. Alguns deles revolucionaram a farmacoterapia, como é o caso do ácido salicílico, morfina, digoxina, quinina e reserpina, entre diversos outros (MASHOUR *et al.*, 1998; HALBERSTEIN, 2005). Produtos naturais podem ser utilizados como fitofármacos ou como protótipos para a síntese de derivados ou, ainda, podem ser utilizados como misturas padronizadas, constituindo os fitoterápicos. Desta forma, justifica-se a constante busca científica por novos produtos naturais, bem como o refinamento desses estudos visando à elucidação dos seus mecanismos de ação farmacológica e a obtenção de doses terapêuticas seguras. Esses estudos podem fomentar e estimular o desenvolvimento de futuros fitofármacos e ou fitoterápicos (MASHOUR *et al.*, 1998; CRAGG & NEWMAN, 2013).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa demonstrou que uma fração padronizada de *Hancornia speciosa* apresenta potente atividade anti-hipertensiva em experimentos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, sendo L-(+)-bornesitol identificado como um dos principais constituintes bioativos (FERREIRA *et al.*, 2007a, b; SILVA *et al.*, 2011, 2016; ENDRINGER *et al.*, 2014). Desta forma, justifica-se empreender estudos de farmacocinética com o marcador químico bornesitol, que pode futuramente nortear o desenvolvimento de um fitoterápico a partir dessa espécie vegetal, objeto do presente trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Validar L-(+)-bornesitol como marcador ativo de *Hancornia speciosa* empregando estudos de farmacodinâmica, farmacocinética e de permeação.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar, purificar e caracterizar o bornesitol a partir de extrato de folhas de *H. speciosa*;
- b) Avaliar o efeito hipotensor do bornesitol em ratos Wistar normotensos;
- c) Desenvolver e validar um método de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massa com fonte de ionização por electrospray (UPLC-ESI-MS/MS) para quantificar bornesitol em plasma de ratos;
- d) Avaliar a biodisponibilidade e determinar parâmetros farmacocinéticos para o bornesitol isolado e como constituinte de fração padronizada de folhas de *H. speciosa*, após administração intravenosa e oral em ratos Wistar normotensos.
- e) Determinar a citotoxicidade do bornesitol frente a células Caco-2;
- f) Desenvolver e validar um método analítico por UPLC-ESI-MS/MS para quantificar bornesitol em células Caco-2;
- g) Investigar a permeação do bornesitol isoladamente e em mistura com outros constituintes de *H. speciosa* em células Caco-2, bem como avaliar o efeito de transportadores de efluxo e influxo na permeação.

### 3 REVISÃO BIBLOGRÁFICA

#### 3.1 Hipertensão arterial

Anualmente são observadas mais de 17 milhões de mortes relacionadas a problemas cardiovasculares, das quais aproximadamente 9,4 milhões estão associadas à hipertensão arterial. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 1,13 bilhões de adultos foram acometidos por essa condição em 2015 e existe uma tendência do aumento exponencial no número de casos. A alta prevalência acrescida de uma baixa taxa de controle posiciona a hipertensão arterial como um grave problema de saúde pública mundial, fato que é acentuado devido sua forte associação com doenças cardiovasculares e com altas taxas de mortalidade (VERSARI *et al.*, 2008; HO *et al.*, 2010; MALACHIAS *et al.*, 2016; WHO, 2017; EGAN *et al.*, 2019).

É considerado hipertenso o indivíduo que apresenta, sistematicamente, pressão arterial sistólica (PAS)  $\geq 140$  mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD)  $\geq 90$  mmHg (Sociedade Portuguesa de Hipertensão - SPH, 2014; MALACHIAS *et al.*, 2016). A patologia pode ser assintomática por anos e/ou estar associada a alterações estruturais e funcionais de órgãos-alvo como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, além de alterações metabólicas (FREEMAN, 2008; MALACHIAS *et al.*, 2016), alterações na rigidez arterial, resistência periférica e débito cardíaco (LOIZZO *et al.*, 2008; AGYEMANG & BHOPAL, 2013).

A morbidade e mortalidade associadas a alterações do sistema cardiovascular têm uma redução significativa nos casos em que há o controle da hipertensão arterial (MANCIA *et al.*, 2007). A terapêutica atual abrange alterações de hábitos de vida e a introdução de uma terapia medicamentosa combinada, que inclui diferentes classes de fármacos: diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), bloqueadores dos canais para cálcio, e antagonistas dos receptores de angiotensina e receptores beta-adrenérgicos (MANCIA *et al.*, 2007; WHO, 2007). A escolha da terapêutica deve ser feita considerando-se os fatores de risco associados ao paciente e os efeitos sobre o sistema cardiovascular (MANCIA *et al.*, 2007).

Apesar de se ter disponível atualmente um vasto arsenal terapêutico, grande parte dos tratamentos anti-hipertensivos apresenta problemas/limitações, principalmente devido às dificuldades na definição dos fármacos e/ou doses



adequadas, à ocorrência de efeitos adversos, e a presença de hipertensão refratária, na qual a pressão alta do paciente não responde à terapia atualmente disponível (BRONSERT *et al.*, 2013; DUDENBOSTEL *et al.*, 2015). Nesse contexto, a busca por novos agentes anti-hipertensivos se faz necessária, objetivando tratamentos com uma relação custo-benefício mais vantajosa.

### 3.2 Atividades biológicas e constituintes químicos de *Hancornia speciosa*

*Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), popularmente conhecida como mangabeira ou mangaba, é uma árvore frutífera ocorrente desde os tabuleiros costeiros e baixadas litorâneas do Nordeste, até os cerrados das regiões centro-oeste, norte e sudeste do Brasil (ALMEIDA, 1993) (Figura 1). Estudos etnobotânicos descrevem o uso da mangabeira para o tratamento de tuberculose, úlceras, herpes, dermatoses, doenças hepáticas, além de apresentar propriedades anti-inflamatória, adstringente e anti-hipertensiva (MOREIRA, 1984; ALMEIDA 1993; SOUZA & FELFILI, 2006).

**Figura 1:** *Hancornia speciosa* e em destaque suas folhas e inflorescência (LORENZI, 2009).



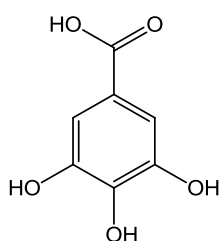
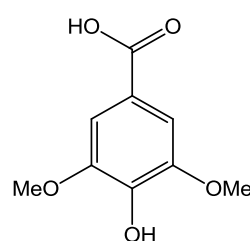
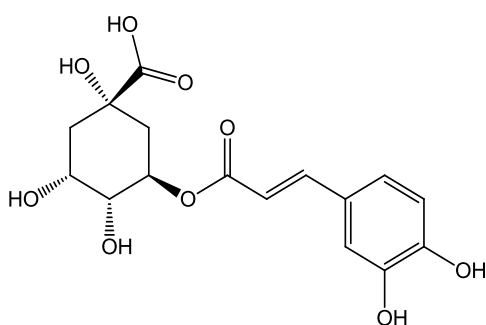
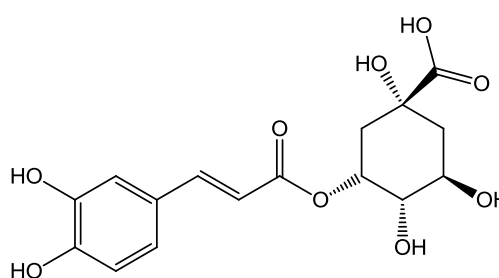
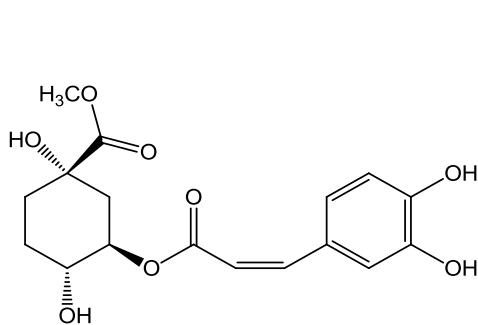
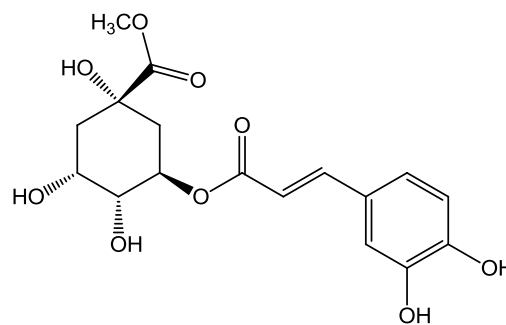
Há alguns trabalhos descritos na literatura sobre as atividades biológicas de *H. speciosa*, dentre eles a atividade antibacteriana e antifúngica (COSTA *et al.*, 2008). O extrato etanólico das cascas apresenta efeito gastroprotetor e ação anti-helicobacter (MORAES *et al.*, 2008). Endringer e colaboradores (2009) demonstraram o potencial anti-inflamatório por meio da inibição do fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pelo extrato etanólico das folhas. Marinho e colaboradores (2011) demonstraram, em modelo de inflamação de pata induzida por carragenina e formalina, que o látex de *H. speciosa* apresenta propriedades anti-inflamatórias. Pereira e colaboradores (2015) relataram o efeito antidiabético do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*, tendo se observado redução da glicose plasmática resultante da inibição da  $\alpha$ -glicosidase intestinal e estimulação da absorção de glicose por adipócitos.

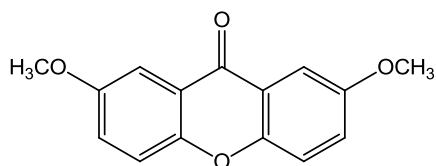
Nos últimos 15 anos, nosso grupo de pesquisa tem investigado o potencial anti-hipertensivo desta planta. Inicialmente, Serra e colaboradores (2005) demonstraram *in vitro* o efeito inibitório da ECA pelo extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*. Posteriormente, Ferreira e colaboradores (2007a, 2007b) demonstraram que o extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* induz efeito vasodilatador dependente do endotélio e da produção de óxido nítrico (NO) em anéis de aorta (com ativação da via PI<sub>3</sub>K) e em artéria mesentérica de rato (com ativação dos canais para potássio). Silva e colaboradores (2011) demonstraram que a administração oral em camundongos Swiss normotensos de uma fração padronizada de folhas de *H. speciosa*, contendo bornesitol, rutina e ácido quínico, reduzia a pressão arterial sistólica por meio da inibição da ECA, resultando em redução dos níveis de angiotensina II (Ang II) em  $56,6 \pm 2,7\%$  quando comparado ao grupo controle, além de aumento da concentração plasmática de óxido nítrico. Nos anos seguintes, Silva e colaboradores (2016) demonstraram o efeito anti-hipertensivo dessa fração padronizada em camundongos Swiss hipertensos. Segundo os autores, o mecanismo do efeito hipotensor é decorrente da produção de NO e seu efeito vasodilatador em artérias de resistência, e está relacionado à liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF's), como NO e peróxido de hidrogênio.

A composição química de *H. speciosa* foi anteriormente investigada. Das cascas da espécie foram isolados os ácidos gálico (**1**), siríngico (**2**), e derivados de ácido *O*-cafeoilquínico como 5-*O*-cafeoilquínico (**3**) e 3-*O*-cafeoilquínico (**4**), além de

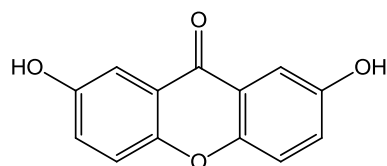
*cis*-clorogenato de metila (**5**), *trans*-clorogenato de metila (**6**), 2,7-diidroxixantona (**7**) e 2,7- dimetoxixantona (**8**) (RODRIGUES *et al.*, 2006). Derivados C-glicosilados e proantocianidinas do tipo B foram detectados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplados a espectrometria de massas (HPLC-MS) (RODRIGUES *et al.*, 2007). Alguns compostos voláteis foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) e cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (GC-FID), destacando-se o eugenol (**9**) (SAMPAIO & NOGUEIRA, 2006; SANTOS *et al.*, 2006).

Barros e colaboradores (2008) identificaram compostos apolares como álcoois de cadeia longa e lupeol (**10**) a partir do fracionamento do extrato hexânico de folhas de *H. speciosa*. Já rutina (**11**) e ácido clorogênico (**4**) foram identificados pelos autores no extrato no etanólico de folhas de *H. speciosa*.

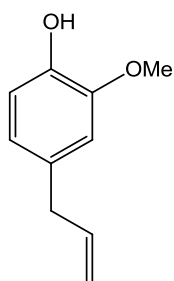
**(1)****(2)****(3)****(4)****(5)****(6)**



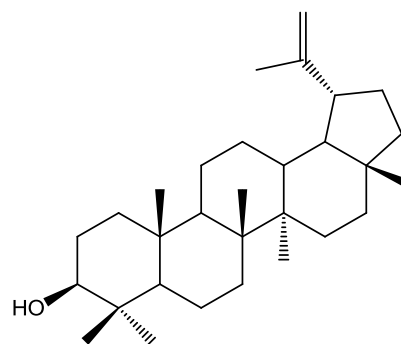
(7)



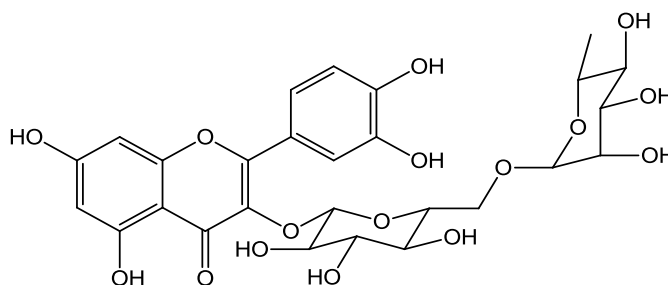
(8)



(9)



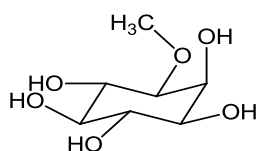
(10)



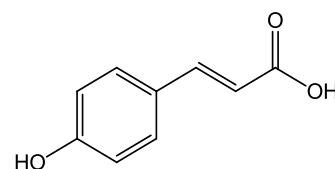
(11)

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* realizado por nosso grupo de pesquisa (ENDRINGER, 2007) resultou no isolamento de L-(+)-bornesitol (**12**) e rutina (**11**), definidos como marcadores químicos da espécie. L-(+)-bornesitol foi identificado como constituinte majoritário, com um teor de  $7,75 \pm 0,78\%$  (m/m) na fração padronizada das folhas (PEREIRA *et al.*, 2012).

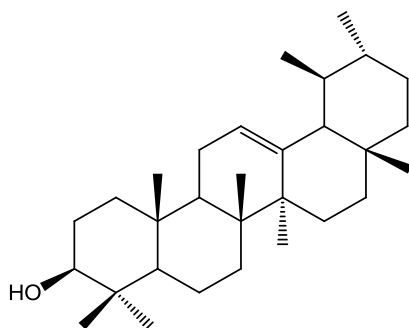
Outros constituintes químicos determinados por nosso grupo foram: ácido 5-O-cafeoil-quínico (**3**), ácido *trans*-4-hidroxicinâmico (**13**),  $\alpha$ -amirina (**14**), ácido clorogênico (ácido-3-O-cafeoil-quínico) (**4**), lupeol (**10**) e seu  $3\beta$ -O-éster de ácido graxo (**15**) (ENDRINGER, 2007) e 3-O- $\beta$ -(3'-*R*-hidroxi)-hexadecanoil-lupeol (**16**) (PEREIRA, 2016).



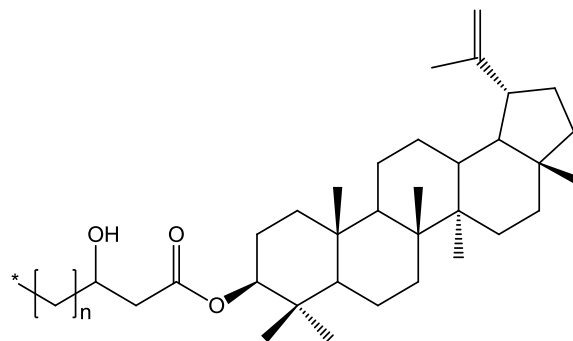
(12)



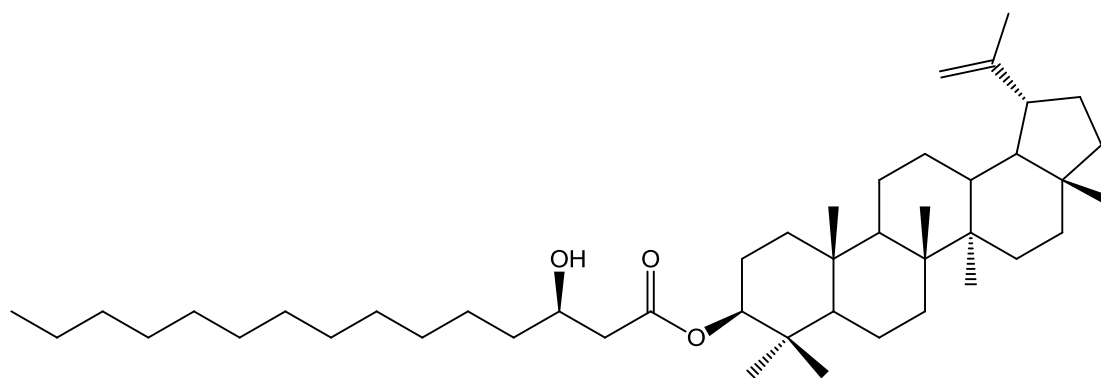
(13)



(14)



(15)



(16)

A presença do bornesitol no reino vegetal está descrita amplamente na literatura; no entanto, apenas poucos estudos foram desenvolvidos para investigar suas atividades biológicas. Endringer e colaboradores (2014) demonstraram que o bornesitol é um potente inibidor da ECA em ensaios *in vitro*, com  $CI_{50}$  de  $41,4 \pm 9,6$   $\mu\text{M}$ . Utilizando experimentos *in silico*, por meio da técnica ancoragem molecular com ECA humana, os autores relataram a constante de inibição ( $K_i$ ) de  $25,3$   $\mu\text{M}$  para o bornesitol, e sugeriu que este ciclitol se ligue a uma nova região da enzima, distinta dos sítios de ligação dos inibidores clássicos da ECA, como captopril, que é o átomo de zinco divalente. Em suma, nosso grupo demonstrou para o extrato e fração padronizada da *H. speciosa*, a atividade anti-hipertensiva em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

O procedimento para a produção da fração padronizada de folhas de *H. speciosa* foi escalonado, sendo obtido um lote piloto em 2010, produzido pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, o qual teve sua segurança pré-clínica atestada por estudos toxicológicos agudos, sub-crônico e crônico em roedores. Visando o desenvolvimento futuro de um fitoterápico, o bornesitol, marcador químico da fração padronizada, teve sua estabilidade avaliada em diversas condições de estresse, mostrando-se estável frente à maioria das condições avaliadas (GOMES *et al.*, 2018). É de interesse do nosso grupo de pesquisa investigar o bornesitol como um marcador ativo da fração padronizada de *H. speciosa*, visando seu monitoramento em estudos clínicos futuros com o fitoterápico em desenvolvimento. Para tanto, é necessário realizar estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e de permeação com o bornesitol, objetos do presente trabalho.

### **3.3 Estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos com produtos naturais**

Estudos farmacológicos pré-clínicos têm por objetivo determinar o efeito farmacológico, o mecanismo de ação e parâmetros farmacocinéticos de um candidato a fármaco, visando posterior transposição para humanos. Dados de farmacocinética em animais são fundamentais para nortear o estabelecimento da posologia ideal em estudos clínicos de fase I e em estudos de eficácia/toxicidade na interação medicamentosa, patológica e alimentícia. É uma etapa importante que deve ser considerada, pois muitos candidatos a fármacos falham nessa fase (CONSIGLIERI & STORPIRTIS, 2000; ZHOU *et al.*, 2013; DIALLO *et al.*, 2014; ROBERTS *et al.*, 2015; BRAGA *et al.*, 2017).

Em países da União Europeia (EU, 2004), África (KASILO & TRAPSIDA, 2003), Austrália (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2018) e América do Sul (BRASIL, 2014b), a avaliação farmacocinética de princípios ativos presentes em fitoterápicos de uso tradicional não é uma exigência necessária, seja em níveis pré-clínicos ou clínicos. Essa visão tem mudado gradualmente, visto que ultimamente pesquisadores têm ressaltado a importância de realizar estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos de ativos e extratos vegetais (MOREÉ *et al.*, 2017). Países como a Rússia (RÚSSIA, 2010) e China (CHINA, 2007) exigem avaliações pré-clínicas e clínicas dos ativos provenientes de plantas medicinais, mesmo tendo informações do uso tradicional da planta.

### 3.3.1 Identificação de marcadores

Durante o desenvolvimento de um fitoterápico deve-se avaliar se o derivado de droga vegetal utilizada apresenta um ou mais ativos responsáveis pelo efeito terapêutico. Constituintes isolados podem ter sua ação potencializada ao serem administrados em associação com outros compostos. Este sinergismo pode se dar de diferentes maneiras, incluindo a proteção da substância ativa contra degradação enzimática, bem como facilitar o transporte por meio de barreiras, ou até mesmo ativar a fosforilação ou ativação de proteínas (GILBERT & ALVES, 2003). Frequentemente a substância é menos ativa quando avaliada isoladamente do que quando na presença de outros componentes da matriz vegetal. Por exemplo, a artemisinina, constituinte ativo isolado de folhas de *Artemisia annua*, quando administrada a humanos na dose de 3000 mg por via oral, durante 4 dias, apresenta o mesmo efeito antimalárico do chá das folhas, que contém 50 mg de artemisinina, administrado no mesmo período de tempo (MUELLER *et al.*, 2000).

Há dois tipos de sinergismos com base na natureza da interação: farmacodinâmica e farmacocinética. A sinergia farmacodinâmica resulta de dois compostos direcionados para um alvo ou receptor; já a sinergia farmacocinética resulta em alterações nos processos de absorção, distribuição, biotransformação ou eliminação do fármaco (SPINELLA, 2002). Por exemplo, os efeitos do extrato de kava-kava no receptor do GABA e nos canais iônicos de voltagem criam sinergia farmacodinâmica. Kava-kava também mostra evidências de sinergia farmacocinética, uma vez que a administração de lactonas combinadas de kava aumenta a biodisponibilidade cerebral, em comparação com a administração individual (TAKASHI *et al.*, 1999; SPINELLA, 2002). Dessa forma, medicamentos à base de plantas podem produzir uma resposta mais favorável quando um extrato/fração é administrado ao invés de um único constituinte isolado. Porém é necessário considerar caso a caso (SPINELLA, 2002; YANG *et al.*, 2014).

Fitoterápicos constituem misturas complexas de diferentes substâncias, nos quais um constituinte ou até mesmo uma série de compostos, estruturalmente relacionados ou não, podem apresentar efeito terapêutico sinérgico. Desta forma, uma etapa primordial no desenvolvimento desses medicamentos consiste na definição de marcadores analíticos e/ou ativos. O marcador é utilizado como parâmetro no controle de qualidade. Pode ser um constituinte ou uma classe de substâncias que têm relação com o efeito terapêutico (marcador ativo), ou pode ser

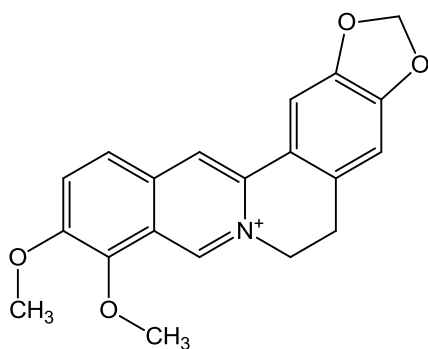
classificado como marcador analítico, quando ainda não foi demonstrada a relação da substância ou grupo(s) de substâncias com a atividade terapêutica do fitoterápico (BRASIL, 2018).

Idealmente, o composto selecionado como marcador ativo deve apresentar uma correlação positiva entre sua concentração no fitoterápico e o efeito terapêutico. A partir dessa premissa, a qualidade dos fitoterápicos pode ser certificada pela concentração do marcador no medicamento. Adicionalmente, a definição do marcador analítico e/ou ativo possibilita a realização de estudos do perfil farmacocinético do fitoterápico, nos quais se avaliam parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do marcador, a fim de justificar e validar o uso do fitoterápico específico. A partir desses estudos é validado o uso terapêutico do fitoterápico, sua posologia, seu regime terapêutico e, em parte, sua segurança (SPINELLA, 2002; YANG *et al.*, 2014; MEHTA *et al.*, 2015).

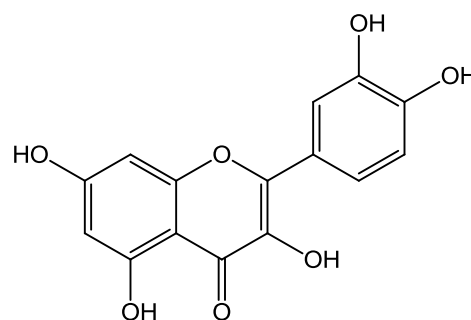
Estudos de farmacocinética são essenciais para determinar a ação farmacológica de um fitocomplexo. Esses estudos ainda não foram conduzidos para diversos fitocomplexos devido ao elevado número de componentes presentes nos mesmos, o que resulta em uma absorção variável e biotransformação complexa (ULRICH-MERZENICHA *et al.*, 2010). Dessa forma, é necessário utilizar métodos analíticos de alta eficiência que possibilitem determinar o perfil químico da planta e o modo de ação, avaliando a existência de sinergismo farmacológico ou não (SPINELLA, 2002; YANG *et al.*, 2014).

Moré e colaboradores (2017) revisaram a literatura científica publicada no período de 2004 a 2015, relativa a estudos de farmacocinética com extratos e ativos vegetais. Segundo os autores, foram identificados 197 compostos como marcadores de diferentes classes químicas, incluindo ácidos fenólicos, alcaloides, flavonas, flavonóis, glicosilflavonóis, isoflavonoides, cumarinas, furanocumarinas, furanos, glicosídeos, saponinas, witanolídeos, antracenos e xantonas. Os marcadores farmacocinéticos mais difundidos na literatura foram, segundo a revisão, berberina (17), quercetina (18), e os ácidos 3,4-di-hidroxifenilático (19) e ferúlico (20).

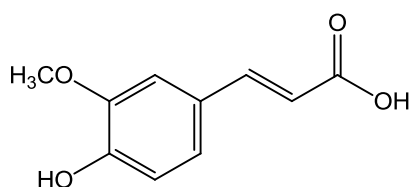




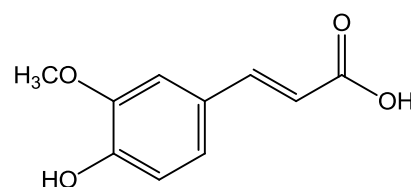
(17)



(18)



(19)



(20)

### 3.3.2 Parâmetros farmacocinéticos

A farmacocinética é o ramo da farmacologia que estuda as concentrações de fármacos e seus metabólitos no indivíduo em função do tempo. São avaliados os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (HASHEK & ROUSSEAU, 2013), além de estudos de modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) (ZHOU *et al.*, 2013; DIALLO *et al.*, 2014; BRAGA *et al.*, 2017).

A absorção consiste na passagem do fármaco do local de administração para a circulação. O processo depende da concentração, da solubilidade do fármaco, do fluxo sanguíneo no local, da superfície de absorção, do pH da superfície de absorção, da forma farmacêutica, da interação com alimentos e das propriedades físico-químicas do princípio ativo ( $pK_a$ , tamanho de partícula e polimorfismo). As principais vias de administração de fármacos são: via oral, via intravenosa ou endovenosa, via intramuscular, via subcutânea, via intraperitoneal e via retal. A absorção deve ser considerada para todas as vias de administração, exceto a intravenosa, que é considerada completa, ou seja, 100% do fármaco ficam disponíveis na corrente sanguínea (TOZER & ROLAND, 2009; STORPIRTIS *et al.*, 2011). A curva da concentração do fármaco em função do tempo é determinada e os parâmetros farmacocinéticos são avaliados: constante de velocidade de absorção ( $K_a$ ), concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ), tempo para atingir a concentração

plasmática máxima ( $t_{m\acute{a}x}$ ), e área sob a curva de concentração plasmática pelo tempo (ASC) (BOROUJERDI, 2002). O cálculo de ASC expressará a quantidade de fármaco que atinge a circulação sistêmica (KWON, 2002). Também é utilizado para determinar a biodisponibilidade absoluta (F), correlacionando-se a ASC da administração do fármaco pela via endovenosa e a ASC da administração do mesmo fármaco por uma via diferente. Portanto, F é a fração (%) da dose administrada que atinge a circulação sistêmica, estando disponível para ser prontamente distribuída. É um parâmetro dependente dos processos de absorção e metabolismo hepático (STORPIRTIS *et al.*, 2011; FAN & DE LANNOY, 2014).

Distribuição constitui a transferência do fármaco da circulação para o meio extravascular (tecido) de forma reversível e depende principalmente do grau de partição plasma/tecido e da quantidade de fármaco livre (POULIN, 2015). Depois de absorvido pela corrente sanguínea o fármaco circula rapidamente em tecidos ricos em vasos sanguíneos, como coração, fígado, rim, pulmão e cérebro, e lentamente em tecidos pobres em vasos sanguíneos, como gordura, pele, osso, ligamentos, dentes e pelos. Circula de forma intermediária em tecidos como o músculo, o qual possui irrigação intermediária de vasos sanguíneos. A quantidade de fármaco é proporcional ao fluxo de sangue de cada tecido e a perfusão tecidual. Os principais fatores que influenciam a distribuição são: idade, sexo, peso, solubilidade, ligação do fármaco às proteínas, diferenças de pH nos diferentes tecidos, lipossolubilidade e patologias que comprometam o funcionamento do coração, rim e fígado.

O parâmetro farmacocinético de volume aparente de distribuição ( $V_d$ ) é definido como a relação entre a dose total administrada e a concentração plasmática inicial da substância logo após sua distribuição, ou seja, está relacionado com o volume no qual o fármaco está diluído no organismo. Este volume mede a extensão da distribuição do fármaco e sua unidade de medida de é *mL* ou *L* (TOZER & ROLAND, 2009; STORPIRTIS *et al.*, 2011). O  $V_d$  auxilia no número de compartimentos para o perfil farmacocinético das substâncias, determinando a cinética do fármaco em três modelos, mono, bi e tricompartmental. O modelo monocompartmental é caracterizado apenas pela fase de eliminação; o bicompartimental apresenta uma fase de distribuição rápida e em seguida a fase de eliminação. Já o modelo tricompartmental apresenta uma fase de distribuição rápida, seguida de uma fase lenta de distribuição e, por fim, uma fase de eliminação. Na prática clínica, uma das principais aplicações da determinação do volume de

distribuição aparente é o cálculo da dose de ataque, em que é administrada no início do tratamento com um determinado fármaco, com o objetivo de alcançar o estado de equilíbrio rapidamente (SCHOENWALD, 2002; TOZER & ROWLAND, 2009).

Metabolização ou biotransformação é a fase em que o fármaco sofre reações enzimáticas originando metabólitos inativos, geralmente por reações de conjugação, que são mais complexas, ou metabólitos parcialmente ativos ou tóxicos, através de reações catalisadas por enzimas em processos de oxidação, redução e hidrólise, ou até mesmo metabólitos ativos, no caso de pró-fármacos. Embora o fígado seja considerado o principal local de metabolização de fármacos, a maioria dos tecidos é capaz de metabolizar fármacos específicos através de enzimas presentes nestes locais (TOZER & ROLAND, 2009; STORPIRTIS *et al.*, 2011).

A metabolização objetiva tornar os compostos mais fáceis de serem eliminados através de reações bioquímicas gerando produtos mais hidrossolúveis (FAN & DE LANNOY, 2014). O estudo do metabolismo é de suma importância na farmacocinética visto que a ativação metabólica em alguns casos pode levar à formação de metabólitos tóxicos e até mesmo mutagênicos e carcinogênicos. A pesquisa de metabolização com plantas medicinais é mais complexa devido à complexidade da matriz, o desconhecimento sobre a concentração de alguns componentes e a falta de padrões para caracterização (YANG *et al.*, 2012).

A excreção é irreversível e consiste na etapa final do perfil farmacocinético, sendo rins e fígado os principais órgãos responsáveis por essa fase. Também pode se dar por outras vias, como intestino e pulmão, além de suor, saliva, secreção nasal, lágrima e leite materno (TOZER & ROWLAND, 2009; STORPIRTIS *et al.*, 2011). Constante de eliminação ( $K_{el}$ ) e depuração ou *clearance* (Cl) são os parâmetros farmacocinéticos relacionados com esse processo (FAN & DE LANNOY, 2014). A  $K_{el}$  representa a fração de fármaco eliminada do corpo por unidade de tempo. É um parâmetro que permite medir, de maneira direta, a eficácia da eliminação. O Cl é a capacidade de remoção completa de uma substância pelo organismo em um volume específico de sangue por unidade de tempo, e é expressa em mL/min ou L/h. É o parâmetro que relaciona a velocidade de eliminação do fármaco com a concentração plasmática. Na prática clínica, a determinação do *clearance* possibilita determinar a dose de manutenção de um fármaco para atingir a concentração terapêutica o estado de equilíbrio (SCHOENWALD, 2002; TOUTAIN *et al.*, 2010). Outro parâmetro farmacocinético de fundamental importância no

estabelecimento da posologia é a meia vida ( $t_{1/2}$ ), que consiste no tempo em que a concentração do fármaco no sangue é reduzida à metade, sendo calculada por meio da razão entre  $V_d$  e  $Cl$ . É um parâmetro importante visto que determina o tempo para que o estado de equilíbrio seja alcançado e a frequência para a administração de doses em um determinado esquema terapêutico (STORPIRTIS *et al.*, 2011; FAN DE LANNOY, 2014).

Para a realização dos ensaios farmacocinéticos em animais são utilizados usualmente plasma ou urina (BRAGA *et al.*, 2017) e a quantificação do fármaco e de seus metabólitos se dá a partir do desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos (MOEINA *et al.*, 2017; LONDHE & RAJADHYAKSHA, 2019).

### 3.3.3 Métodos bioanalíticos

Os métodos bioanalíticos podem ser classificados como uma subdivisão especial dos métodos analíticos, os quais apresentam como peculiaridade a determinação de analitos em matrizes complexas, ricas em diversos macro e micro constituintes, que podem interferir nas análises quantitativas e qualitativas, a saber: soro, plasma, sangue, urina e saliva, entre outros. Os métodos são caracterizados pela combinação de técnicas analíticas de separação e detecção, juntamente com procedimentos de preparo de amostra (VISWANATHAN *et al.*, 2007; SAVOIE, *et al.*, 2009; DEVANSHU *et al.*, 2010).

Devido às suas peculiaridades, os métodos bioanalíticos ainda não estão disponíveis em compêndios oficiais. Dessa forma, para garantir a rastreabilidade e confiabilidade nos resultados, devem-se avaliar parâmetros de recuperação, seletividade, efeito matriz, precisão, exatidão e linearidade da faixa de trabalho, e posteriormente validá-los.

Em métodos bioanalíticos, o uso de padrão interno (PI) é requerido a fim de minimizar o erro. O PI é uma substância com características físico-químicas semelhantes ao analito, não encontrado originalmente na matriz. O PI é adicionado à preparação em uma concentração fixa e é utilizado para quantificar o analito por meio da razão da resposta analito/PI. Dessa forma, eventuais variações no processo analítico são corrigidas (BRONSEMA *et al.*, 2012).

Para a realização de estudos farmacocinéticos de derivados de drogas vegetais as principais premissas que precisam ser observadas são a separação cromatográfica e a detecção em baixíssimas concentrações do marcador químico.

Nesse contexto, as técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta e ultra eficiência acopladas à espectrometria de massas apresentam grande destaque. Outro fator de extrema importância é o tratamento prévio da amostra devido sua alta complexidade. Basicamente, o processo extrativo visa eliminar macro e micromoléculas que possam interferir nas análises, a saber: proteínas, sais, lipídeos, anticoagulantes e outras substâncias endógenas e exógenas responsáveis pela redução da estabilidade do fármaco, ou que aumentem a necessidade de manutenção do equipamento utilizado nas análises. Desta forma, a etapa de preparo da amostra pode ser considerada crítica em um método bioanalítico e, por isso, é requerido um processo extrativo do analito que forneça uma solução homogênea, reproduzível e com o menor número possível de constituintes na matriz (BRASIL, 2003b; CHANG *et al.*, 2007; VIEIRA & CAMPOS, 2011; MOEINA *et al.*, 2017; LONDHE & RAJADHYAKSHA, 2019).

As técnicas de preparo de amostra tradicionais utilizadas para extração de fármacos em matrizes complexas são: extração líquido-líquido (ELL), extração por precipitação de proteínas (EPP), e extração em fase sólida (EFS). A escolha da técnica de extração a ser utilizada dependerá das características físico-químicas do analito e deve ser simples, rápida, ter baixo custo, alta precisão e exatidão, apresentar elevada taxa de recuperação para o analito, e utilizar soluções/solventes que interfiram minimamente no processo (CHANG *et al.*, 2007).

No setor bioanalítico, o acoplamento de sistema de cromatografia gasosa a espectrômetro de massas (GC/MS) é um método potencialmente útil para análise do perfil metabólico em amostras biológicas, principalmente para compostos voláteis e termicamente estáveis (PASIKANTI *et al.*, 2008). Por sua vez, a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas (UPLC-MS) é uma técnica eficaz que harmoniza as vantagens da cromatografia com as vantagens da espectrometria de massas, resultando na obtenção de métodos precisos, exatos, rápidos, resolutivos, seletivos e sensíveis. Além da sua aplicação em análises de matrizes biológicas, sua utilização é bastante ampla para análise e determinação de substâncias bioativas, pesticidas, toxinas e resíduos industriais, possibilitando identificar e quantificar substâncias com diferentes massas e concentrações, e até mesmo a elucidação estrutural de compostos desconhecidos (ZHANG *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2012; MILMAN, 2015). Apesar de ser menos sensível que a espectrometria de massa, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear

(RMN) é uma técnica poderosa para identificação de marcadores e metabólitos, empregada na elucidação estrutural desses compostos, principalmente para identificação estereo-específica e diferenciação de isômeros (KRISHNAN *et al.*, 2005; YANG, 2006).

O acoplamento de espectrometria de massas sequencial ao HPLC e GC gradualmente se tornou a escolha preferida para a rápida identificação de metabólitos devido à resolução aprimorada e maior sensibilidade e especificidade (MA *et al.*, 2009; TOLONEN *et al.*, 2009). O fundamento desta técnica consiste na produção de íons a partir dos analitos, que são detectados em função de sua razão massa/carga ( $m/z$ ). Utilizando-se a aquisição dos íons no modo de monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring* - MRM) podem-se selecionar, a partir do espectro de massas do analito, dois ou três íons específicos formados, o que aumenta grandemente a qualidade e a seletividade da análise, propiciando, inclusive, a possibilidade de detecção de vários analitos com tempos de retenção semelhantes ou idênticos (DEVANSHU *et al.*, 2010; BANERJEE & MAZUMDAR, 2012; MOEINA *et al.*, 2017; LONDHE & RAJADHYAKSHA, 2019).

Um espectrômetro de massas é constituído por um *inlet*, responsável pela introdução da amostra na câmara de ionização; uma fonte de ionização, responsável pela geração dos íons das moléculas do analito; um analisador de massas, responsável pela separação e seleção dos íons provenientes da fonte de acordo com suas razões  $m/z$ ; e um sistema de detecção, responsável pela identificação e amplificação do sinal da corrente de íons provenientes do analisador e pela transferência do sinal para o sistema de processamento de dados.

Os equipamentos atuais utilizam a técnica de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) e por isso são concebidos com dois ou mais analisadores de massas em série, que têm como objetivo aumentar a seletividade durante as análises. Dessa forma, os íons de interesse são obtidos e selecionados em um primeiro analisador de massas e transferidos para a câmara de colisão, onde ocorrem colisões contínuas com um gás inerte, normalmente argônio, de elevada energia, que aumenta a energia potencial do íon e resulta em fragmentações adicionais. Os íons secundários formados na câmara de colisão passam por um segundo analisador de massas que permite a seleção de um ou mais fragmentos (BANERJEE & MAZUMDAR, 2012; DI STEFANO *et al.*, 2012).

Essas técnicas proporcionam a obtenção da relação  $m/z$  de cada íon precursor e do seu perfil de fragmentação (IUPAC, 1991; MEIJA *et al.*, 2016). Assim, dados sobre a estrutura química dos analitos podem ser obtidos a partir da relação  $m/z$  dos íons produtos, dos grupamentos perdidos, e das ligações clivadas. O estudo detalhado dos espectros de massas pode resultar na elucidação estrutural e/ou na diferenciação entre moléculas orgânicas isômeras (DEMARQUE *et al.*, 2016).

A primeira etapa do desenvolvimento de um método bioanalítico consiste na infusão direta da solução do analito no espectrômetro de massas, visando definir o modo de ionização a ser utilizado, os íons monitorados e os parâmetros do espectrômetro de massas que serão empregados, a saber: voltagem do capilar, voltagem do cone, temperatura da fonte e temperatura do gás de dessolvatação, entre outros. Posteriormente, determina-se as condições cromatográficas e, por último, realiza-se a otimização do preparo de amostra, onde se pretende minimizar o efeito matriz, que é caracterizado pela supressão ou indução do sinal do analito na presença de interferentes da matriz coeluídos com o analito. Resumidamente, os íons selecionados durante o monitoramento são, idealmente, aqueles que apresentam alta sensibilidade e seletividade, além de sofrerem baixa influência do efeito matriz (DEVANSHU *et al.*, 2010; BANERJEE & MAZUMDAR, 2012; MOEINA *et al.*, 2017; LONDHE & RAJADHYAKSHA, 2019).

### 3.3.3.1 Cromatografia líquida com interação hidrofílica (HILIC)

Uma etapa fundamental no desenvolvimento de métodos bioanalíticos é a escolha da coluna a ser utilizada no processo cromatográfico. Esta escolha se baseia principalmente nas características físico-químicas do analito. A cromatografia líquida com interação hidrofílica – HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) é empregada para análise de compostos polares, os quais provavelmente seriam eluídos no tempo morto em uma coluna de fase reversa, como ODS (WANG & HE, 2011; ALPERT, 1990).

Na HILIC, a fase estacionária é constituída por sílica pura (tipo A, B ou C). Essa é uma vantagem em relação às colunas de fase ligada, susceptíveis a quebra da ligação do ligante com o grupo silanol utilizado como suporte, em análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Desta forma, reduz-se o aparecimento de sinais provenientes da degradação de fases

quimicamente ligadas, tais como grupos ciano, diol e amina (PERSON *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2006; LANÇAS, 2010).

Os grupos silanois têm a propriedade intrínseca de reter uma baixa quantidade de água, entre 0,5% a 1,0% v/v, formando uma fina camada na superfície do leito cromatográfico, principalmente quando se utiliza proporções inferiores a 30% de água na fase móvel (QIAO *et al.*, 2016) e 70 a 90% do modificador orgânico (acetonitrila, mais comumente utilizada) (JANDERA & JANÁS, 2017; WANG & HE, 2011; ARRUA *et al.*, 2012). Essa camada torna-se parte da fase estacionária e quanto mais hidrofílico for o analito, maior será sua retenção. Assim, o mecanismo de separação em colunas HILIC alterna entre adsorção e partição, dependendo da proporção de água na fase móvel (WANG & HE, 2011). O mecanismo de separação depende da fase estacionária e da composição da fase móvel os quais irão afetar as interações polares, hidrofóbicas ou de troca iônica e conseqüentemente à retenção dos compostos. Em casos de fase móvel rica em acetonitrila, a retenção é controlada por meio de interações polares, enquanto que em fase móvel altamente aquosa, a coluna pode apresentar um comportamento de fase reversa com o papel principal de interações hidrofóbicas. Essas colunas são bastante utilizadas na área de desenvolvimento farmacêutico, principalmente no estudo de fitoterápicos (KOH *et al.*, 2005; JANDERA & JANÁS, 2017; MCCALLEY, 2017).

### **3.3.4 Estudos de farmacocinética com plantas brasileiras**

Pouco se conhece sobre a farmacocinética de plantas medicinais brasileiras. Cerca de 40% das espécies vegetais da RENISUS, que possuem dados farmacocinéticos conhecidos, podem interferir no funcionamento das enzimas de fase 1 e 2 do metabolismo, alterando a absorção de medicamentos (HU *et al.*, 2005; MAZZARI & PRIETO, 2014a, 2014b).

A maioria dos fitoterápicos comercializados no Brasil é produzida a partir de plantas exóticas. Um exemplo de fitoterápico de espécie brasileira é o Acheflan. Esse fitoterápico tem como princípio ativo o óleo essencial de *Cordia verbenacea*, comumente conhecida como erva baleeira ou Maria-milagrosa, um arbusto presente no território brasileiro, principalmente na Mata Atlântica. O desenvolvimento de um fitoterápico a partir do óleo essencial das folhas dessa espécie foi realizado a partir



de parcerias entre a indústria e a academia, resultando em um fitoterápico tópico eficaz e inovador, com ação analgésica e anti-inflamatória.

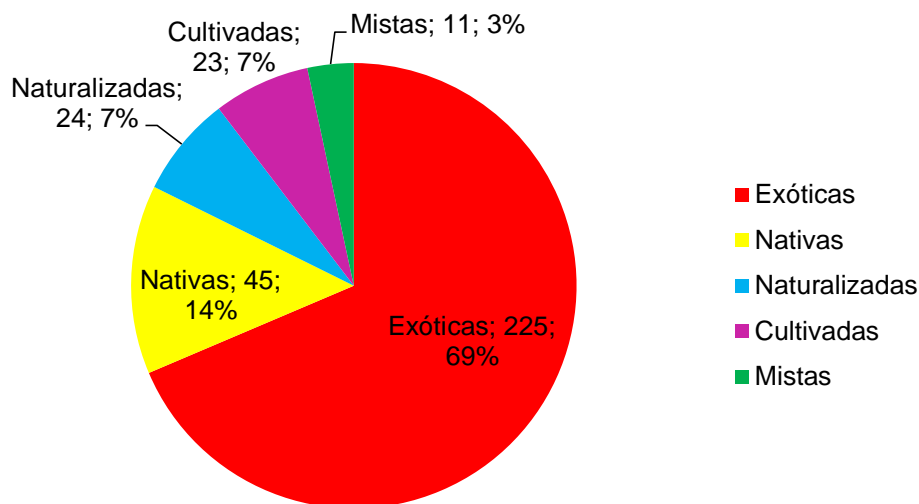
O  $\alpha$ -humuleno e o *trans*-cariofileno são compostos sesquiterpênicos ativos de *C. verbenacea*, identificados como os responsáveis pela redução da formação de edema, migração leucocitária e produção de citocinas, bem como a ativação das MAPkinases e NF- $\kappa$ B (MEDEIROS *et al.*, 2007). A avaliação farmacocinética do  $\alpha$ -humuleno indicou uma absorção rápida e satisfatória, tanto na administração oral quanto tópica (CHAVES *et al.*, 2008).

A procura por tratamento à base de fitoterápicos tem aumentado no país e o Sistema Único de Saúde (SUS) vem ampliando continuamente seus investimentos nessa área. Segundo o Ministério da Saúde, entre 2013 e 2015 ocorreu um aumento de 161% na utilização de fitoterápicos no país, sendo que em 2015 aproximadamente 16 mil pessoas procuraram por plantas medicinais nas farmácias de atenção básica.

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) tem como objetivo “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”. No âmbito desta política, desde 2012, a Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde vêm investindo em projetos de plantas medicinais e fitoterápicos no âmbito do SUS, com a realização de cursos de fitoterapia para médicos e com a comercialização de diversos medicamentos fitoterápicos, simples e associados nas farmácias [http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus].

O gráfico da Figura 2 apresentada a origem das plantas utilizadas na produção de fitoterápicos registrados na ANVISA, até setembro de 2019. Dos 328 fitoterápicos com registro válido, 225 correspondem a fitoterápicos de plantas exóticas, 45 a fitoterápicos de plantas nativas, 24 a fitoterápicos de plantas medicinais naturalizadas brasileiras, 23 a fitoterápicos de plantas cultivadas no Brasil, e 11 a fitoterápicos mistos, compostos por plantas nativas, naturalizadas, cultivadas e exóticas. É importante ressaltar que, nesse estudo, dos 45 fitoterápicos de plantas nativas, esses são oriundos de apenas 9 espécies de plantas. Para os fitoterápicos produzidos com plantas naturalizadas e cultivadas são empregadas 6 e 4 espécies, respectivamente.

**Figura 2:** Origem das plantas utilizadas na produção de fitoterápicos com registro válido na ANVISA, até setembro de 2019. Dados compilados pela autora, a partir de informações disponíveis no site da ANVISA (<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>) e Flora do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=F6FECEB425C758D0655B9D7A25D8463DE#CondicaoTaxonCP>).



O Brasil é detentor da maior biodiversidade vegetal do planeta, mas conforme pode ser constatado na Figura 2 o número de produtos fitoterápicos obtidos a partir de espécies nacionais é ainda bastante limitado. O desenvolvimento de um fitoterápico é uma tarefa complexa e de natureza multidisciplinar. Dentre as competências requeridas, destacam-se os estudos pré-clínicos de farmacocinética, indispensáveis para a realização de estudos clínicos posteriores. Portanto, é imprescindível empreender estudos de farmacocinética com algumas plantas brasileiras, de forma a viabilizar o desenvolvimento de fitoterápicos no país.

### 3.4 Estudos de permeabilidade *in vitro*

Na administração oral, um fármaco deve ser dissolvido e solubilizado no trato gastrointestinal para ser absorvido e seguir para a circulação sanguínea. A permeabilidade de um composto através da membrana celular intestinal deve ser avaliada para possíveis candidatos a fármacos, visando sua administração oral (EGAN & LAURI, 2002; LARREGIEU & BENET, 2013). Para ocorrer à passagem, a substância pode atravessar a parede intestinal por meio dos seguintes mecanismos: difusão passiva, que ocorre entre as junções celulares por meio do transporte

paracelular, ou através do citoplasma, por meio do transporte transcelular. Adicionalmente, tem-se o transporte ativo que requer o uso de energia e, também, de transportadores. Diversos modelos *in vitro* estão disponíveis para avaliar a permeabilidade de candidatos a fármacos e o que mais se aproxima das características da permeabilidade intestinal é o modelo que utiliza células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) (LARREGIEU & BENET, 2013).

O modelo com Caco-2 é utilizado em estudos de permeação para verificar a classe de permeabilidade de um composto/fármaco. Além disso, a determinação do coeficiente de permeabilidade aparente *in vitro* possibilita prever se há absorção *in vivo* (FERREC *et al*, 2001; CASTILLO *et al.*, 2006). Este sistema mimetiza o epitélio gastrointestinal por meio da formação de uma monocamada de células que, quando cultivadas em membranas porosas por 21 a 25 dias, se diferenciam espontaneamente em células com características morfológicas e funcionais de enterócitos maduros. É um excelente modelo de absorção, pois apresenta uma boa correlação com a fração absorvida em humanos. Esse modelo expressa transportadores de membrana e enzimas do citocromo P450, o que permite fazer a avaliação e comparação do mecanismo de absorção/transporte e metabolismo pré-sistêmico (YAMASHITA *et al.*, 2000; FERREC *et al*, 2001).

A avaliação de transportadores em estudos de permeabilidade é de suma importância, visto que estão diretamente ligados à biodisponibilidade dos compostos, bem como à interação com fármacos, alimentos, suplementos e plantas medicinais. Entre os transportadores mais estudados destacam-se os da superfamília dos SLC (*Solute Carrier*), composta pelos *Organic Anion Transporting Polypeptide* (OATP – polipeptídeo transportador de ânions orgânicos), *Organic Cation Transporters* (OCT – transportadores de cátions orgânicos) e os transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*), grupo ao qual pertencem as proteínas P-gp (*P-glycoprotein* – glicoproteína P) e BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein* – proteína de resistência do câncer de mama) (ITC *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2017; LAI *et al.*, 2018).

### 3.4.1 Transportadores SLC (*Solute Carrier*)

Os transportadores SLC são proteínas integrais de membrana, relevantes no transporte passivo de substâncias, principalmente xenobióticos, pelos transportadores OCT1 e OATP2B1 (DROZDZIK *et al.*, 2014; ESTUDANTE *et al.*,

2016). Dentre o grupo de transportadores SLC destacam-se os transportadores de cátions orgânicos (OCT) e os transportadores polipeptídeos de ânions orgânicos (OATP).

Os transportadores de cátions orgânicos mais conhecidos são OCT1, OCT2, OCT3, OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, URAT1, e aqueles pertencentes ao grupo SLC22 (LAI *et al.*, 2018), que são responsáveis pelo influxo de compostos (LOZANO *et al.*, 2018), funcionando como importadores eletrogênicos de cátions ou como trocadores de cátions, formando um potencial negativo no interior da membrana (KOEPESELL, 2015; CHIEN *et al.*, 2016). O transportador OCT1 é expresso, principalmente, no fígado e intestino delgado, sendo encontrado na região apical dos enterócitos, e considerado um dos mais relevantes nas interações medicamentosas (MÜLLER *et al.*, 2017). A inibição dos OCT é induzida por fármacos de diversas classes, como anti-inflamatórios, antibióticos, antiarrítmicos, antiparkinsonianos e antidepressivos (KOEPESELL, 2015; LU *et al.*, 2018).

Os OATP fazem parte da família SLCO (ROTH *et al.*, 2012), estão envolvidos no influxo de substâncias em diversos tecidos e participam da absorção intestinal de compostos, independentes do gasto de energia (ROTH *et al.*, 2012; HAGENBUCH & STIEGER, 2013). Entre os OATPs conhecidos, os expressos no intestino delgado são OATP1A2, OATP2B1, OATP3A1 e OATP4A1. O principal transportador deste grupo é OATP2B1, o qual possui distribuição homogênea ao longo do intestino (MEIER *et al.*, 2007; SHITARA *et al.*, 2013). Fármacos inibidores desses transportadores incluem a quinidina, rifampicina, budenosida, ciclosporina e glibenclamida (ESTUDANTE *et al.*, 2016).

#### **3.4.2 Transportadores ABC (ATP-binding cassette)**

Os transportadores ABC são os mais estudados, pois a maioria das interações que envolvem transportadores é atribuída a eles. Sua classificação engloba subfamílias de A à G (ZAKERI-MILANI & VALIZADEH, 2014). A glicoproteína P (P-gp/*ABCB1*) e a proteína de resistência do câncer de mama (BCRP/*ABCG2*) são os carreadores de efluxo que mais se destacam, sendo responsáveis pela redução do acúmulo de xenobióticos intracelulares e a proteção do organismo contra substâncias nocivas (FROMM & KIM, 2011; STAUD & PAVEK, 2005).

A P-gp é uma proteína transmembrana de efluxo presente no fígado, barreira hematoencefálica, linfócitos, testículos, placenta e células tumorais, além de ocorrer nos intestinos delgado e grosso (KUMAR *et al.*, 2010). Está presente na região apical dessas células, sendo controlada por mecanismos de fosforilação e desfosforilação proteica (WOLKING *et al.*, 2015). A P-gp pode ser inibida por inibidores competitivos, como o verapamil e a ciclosporina, ou por inibidores alostéricos, como o *cis*-(Z)-flupentixol (MAKI *et al.*, 2003). Como as interações são prejudiciais à eficácia terapêutica, é desejável identificar compostos que inibem a P-gp para associá-los à terapia e reduzir a resistência aos tratamentos acessíveis (KHAN *et al.*, 2015).

A BCRP é um transportador ABC de efluxo identificado em uma linhagem celular de câncer de mama (DOYLE *et al.*, 1998). Estão presentes no fígado, cérebro, rins, intestino delgado e tumores (MAO & UNADKAT, 2005). No intestino delgado, concentra-se nas porções do jejuno e do íleo (DROZDZIK *et al.*, 2014). Esse transportador reconhece tanto moléculas com cargas negativas quanto positivas, ânions orgânicos e moléculas conjugadas com sulfato (STAUD & PAVEK, 2005). Inibidores dessa proteína como os flavonoides, canabinoides, terpenoides e produtos marinhos, podem auxiliar na terapia antineoplásica (PENA-SOLORZANO *et al.*, 2016).

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipamentos, insumos e vidrarias

- Agulha descartável 13 mm x 0,45 mm 26 G.
- Agulha descartável 25 mm x 0,8 mm 21G.
- Agulha para sutura, Procare.
- Balança analítica Mettler, modelo AB 204.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Balões volumétricos de 1, 5, 10 e 25 mL, Satelit, Normax, Blaubrand.
- Banho de ultrassom Thornton, modelo T 50.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Barras magnéticas.
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Borrifador de vidro.

- Centrífuga Hermle Z323K.
- Chapas de aquecimento Fisatom, modelo 752 A e Corning, modelo V-092.
- Coluna para UPLC Waters ACQUITY UPLC BEH amide (100 x 2,1 mm – 1,7 µm).
- Coluna para UPLC Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm – 1,7 µm).
- Concentrador SpeedVac, Thermo.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 x 10 cm e 10 x 10 cm.
- Cromatofolhas de alumínio recobertas por sílica gel 60, 20 x 20 cm, Merck.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Erlenmeyers de 25, 50, 100 e 250 mL.
- Espátulas diversas.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX – 400 MHz (Departamento de Química, ICEX, UFMG).
- Espectrofotômetro no UV-Vis, SoftMax<sup>®</sup> Pro - Molecular Devices.
- Evaporador rotatório Buchi, modelo B-480.
- Filtro de 0,22 µm, Millex HV.
- Fio de Nylon para sutura, Procure.
- Frascos de penicilina com tampa de borracha.
- Funil sinterizado n°4.
- Insert, Fisherbrand.
- Kitasato de 250 e 500 mL.
- Leitor de microplacas BioTek Instruments Inc., modelo Epoch.
- Membrana de filtração de acetato de celulose 0,22 µm, Whatman.
- Micropipetas HTL, volume ajustável de 10 – 100 µL e 100 – 1000 µL.
- Microscópio de fluorescência, Olympus IX71.
- Microtubo plástico de 1,5 e 2,0 mL do tipo *safe-lock*, Axygen Scientific Inc.
- Papel de filtro qualitativo.
- Papel indicador de pH Universal, pH 0-14, Merck.
- Placa de microtitulação 96 poços para cultivo celular, Corning.
- Ponteiras universais, 2-200 µL e 100-1000 µL, Axygen Scientific Inc.
- Ponto de fusão MQAPF-30, Microquímica.
- Pré-coluna Waters ACQUITY UPLC BEH amide (5 x 2,1 mm – 1,7 µm).
- Pré-coluna Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (5 x 2,1 mm – 1,7 µm).

- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Seringas descartáveis sem agulha, de 1 mL, Descarpack e de 10 mL, Injex.
- Sílica gel 60, 230 – 400 mesh, Merck.
- Sistema de concentração a vácuo Centrivap, Labconco, modelo A50.
- Sistema de medição direta de pressão com transdutor, Biopac, modelo MP100.
- Sistema de UPLC-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LC™, Waters, Milford, Massachusetts, EUA, composto por bomba binária, amostrador automático, degasser em linha e detector de arranjos de diodo (DAD) modelo PDA 2996 e espectrômetro de massas ACQUITY TQ (Waters), equipado com fonte de ionização por electrospray - Z-spray (IES) e software Mass Lynx™ (versão 4.1, Waters).
- Termômetro 10-360 °C.
- Tri-Way.
- Tubo de polietileno nº 50 e nº 10, CPL Medical's Produtos Médicos LTDA.
- Tubo de silástico (Micro-Renathane) 0,037 d.e. x 0,023 d.i., Braintree Scientific, Inc.
- Tubo plástico do tipo falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP.
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de HPLC e UPLC-MS, Tedia.
- Voltímetro Millicell® ERS, Millipore.
- Vórtex Mixer, Vixar.

#### **4.2 Reagentes e soluções**

- Acetato de amônio, Sigma-Aldrich.
- Ácido acético a 1% (LAFAN Química Fina).
- Ácido fórmico grau P.A., Merck.
- Ácido fosfórico grau P. A, Synth.
- Ácido sulfúrico, Synth.
- Ácido tricloroacético a 10%, TCA, LAFAN Química Fina.
- Aminoácidos não essenciais, Cultilab.
- Bicarbonato de sódio, Sigma-Aldrich.
- Captopril, Sigma-Aldrich.
- Carvão ativado, Synth.
- Cimetidina, Sigma-Aldrich.
- Curcumina, Sigma-Aldrich.

- Cloreto de sódio, Merck.
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich.
- Heparina, Blau Farmacêutica.
- HEPES [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil] etanosulfonato, Sigma-Aldrich.
- Hidróxido de amônio, Synth.
- Hidróxido de sódio P. A. em pérolas, Fmaia.
- Hipuril-glicil-glicina, Sigma-Aldrich.
- Ketamina, Ceva Santhé Animale.
- L-glutamina, Sigma-Aldrich.
- Lucifer Yellow, Sigma-Aldrich.
- Meio de cultura DMEM 4,5g/L de glicose (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose*), Gibco.
- MES [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico], Sigma-Aldrich.
- N-(1-naftil)-etilenodiamina, Sigma-Aldrich.
- Nitrito de sódio, Sigma-Aldrich.
- Paraformaldeído, Sigma-Aldrich.
- PBS (*Phosphate-buffered saline*), Sigma-Aldrich.
- Pentaeritritol, Sigma-Aldrich.
- Permanganato de potássio, Merck.
- Piridina, Sigma-Aldrich.
- Propranolol 99%, INCQ (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Brasil).
- Rifampicina, Sigma-Aldrich.
- Solução de antibióticos (10.000 U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina), Cultilab.
- Solução injetável endovenosa de cloreto de sódio 0,9%, Equiplex.
- Solventes grau CLAE acetonitrila e metanol, Tedia.
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): álcool isopropílico, álcool *n*-butílico, acetona, acetato de etila, metanol.
- Soro fetal bovino (SFB), Gibco.
- Sulfanilamida, Sigma-Aldrich.
- Sulfato de sódio anidro, Synth.
- Sulforrodamina B, Sigma-Aldrich.
- Tampão HBSS (*Hank's balanced salt solution*), Sigma-Aldrich.



- TNBS, sigma-Aldrich.
- Tripsina, Sigma-Aldrich.
- Tris base 10 mm pH 10,5, Sigma-Aldrich.
- Triton X-100, Sigma-Aldrich.
- Tungstato de sódio, Sigma-Aldrich.
- Verapamil, Sigma-Aldrich.
- Xilasina, Ceva Santhé Animale.

### **4.3 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 14 e 16 semanas (250 e 300 g), proveniente do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia em ciclos de claro-escuro (12/12 horas) com livre acesso à água e ração. Os ratos foram mantidos em gaiolas contendo no máximo 3 animais. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes e normas de pesquisa previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG), protocolo 332/2016.

### **4.4 Material vegetal e obtenção da fração padronizada**

As folhas de *H. speciosa* foram adquiridas da Indústria Farmacêutica Cathedral Ltda., Belo Horizonte, Brasil, em julho de 2010. O material vegetal foi autenticado por botânicos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e depositado no Herbário BHCB (número de registro: 165.298). O material vegetal foi seco, por 72 h, em estufa ventilada a 40 °C e posteriormente pulverizado em moinho de facas.

Foi realizada a percolação exaustiva de duas porções de 100 g da droga vegetal seca e pulverizada com metanol / acetato de etila (1:1). O percolado foi concentrado até resíduo a 55 °C, sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Posteriormente, os resíduos foram transferidos para frascos pesados previamente e mantidos em dessecador para eliminação de solvente residual. Os rendimentos obtidos da fração padronizada nas duas extrações realizadas foram de 40,3% (m/m) e 38,4% (m/m).

#### 4.5 Isolamento e caracterização do bornesitol

O isolamento do bornesitol foi realizado conforme procedimento relatado por Gomes (2016). Solubilizaram-se 5,0 g da fração padronizada de *H. speciosa* em 50 mL de metanol (MeOH) em banho de ultrassom por 20 minutos. Adicionaram-se 400,0 mL de acetato de etila (EtOAc), observando a formação de precipitado amarelado. A solução foi resfriada à 4 °C por 24 h. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 822 g por 20 minutos. O precipitado obtido (Ppt I, 3,0 g) foi transferido para frasco tarado e armazenado em dessecador, sob pressão reduzida, para eliminação de solvente residual. O sobrenadante foi seco em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e solubilizado em MeOH (2,0 g / 30,0 mL). Adicionaram-se 400,0 mL de EtOAc à solução e repetiu-se o procedimento anterior, obtendo-se um novo precipitado (Ppt II, 0,4 g), que foi transferido para frasco tarado e armazenado em dessecador sob pressão reduzida para eliminação do solvente residual. O processo foi repetido para a obtenção do terceiro precipitado (Ppt III, 0,1 g), utilizando 25,0 mL de MeOH e 480,0 mL de EtOAc. Os precipitados obtidos foram então reunidos (PptTOTAL, 3,5 g). Durante o processo, a presença de bornesitol nos precipitados foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel, utilizando-se como eluente água / acetato de etila / propan-2-ol (6:11:83) e como revelador 0,5% de  $\text{KMnO}_4$  em hidróxido de sódio 1M (BAUMGARTNER *et al.*, 1986). Utilizou-se como substância química de referência o bornesitol isolado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (PEREIRA *et al.*, 2012).

O precipitado obtido (PptTOTAL) foi submetido à purificação em carvão ativado. Para tanto, 3,5 g do material seco foram solubilizados em 35,0 mL de solução aquosa de ácido fosfórico a 0,1% resfriada a 4 °C. A solução resultante foi transferida para tubo Falcon de 50,0 mL contendo 350,0 mg de carvão ativado. Agitou em vórtex por 5 minutos e centrifugou-se a 822 g à 4 °C durante 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante (35,0 mL) foi particionado com mistura (2 x 100 mL) de acetato de etila / *n*-butanol / propan-2-ol (7:1:2). As fases aquosas foram reunidas, secas em evaporador rotatório à temperatura máxima de 60 °C, e o resíduo obtido foi armazenado em dessecador sob pressão reduzida até completa eliminação do solvente residual, originando a fração aquosa do fracionamento com carvão ativado ( $f_{aca} = 1,07$  g).

Uma porção de 1,0 g da fração  $f_{aca}$  obtida foi incorporada em 5,0 g de sílica gel (0,04 – 0,063 mm) e depositada em funil sinterizado n° 4, preenchido com 45,0 g

de sílica gel (0,04 – 0,063 mm). Procedeu-se à eluição com pressão negativa fornecida por trompa de vácuo, utilizando a série eluotrópica descrita na Tabela 1. As frações foram reunidas de acordo com semelhança no perfil por CCD de sílica gel, utilizando-se como eluente o sistema água / acetato de etila / propan-2-ol (6:11:83) e revelação com solução de  $\text{KMnO}_4$  0,5% (m/v) em NaOH 1 M.

**Tabela 1:** Série eluotrópica utilizada no fracionamento de  $f_{aca}$ .

Eluente (%)	Volume de frações (mL)	Frações reunidas
EtOAc (100)	3 x 100	1,2,3
EtOAc : MeOH (95:5)	14 x 50	4 – 17
EtOAc : MeOH (90:10)	14 x 50	18 – 31
EtOAc : MeOH (85:15)	14 x 50	32 – 45
EtOAc : MeOH (80:20)	14 x 50	46 – 59
EtOAc : MeOH (75:25)	14 x 50	60 – 73
EtOAc : MeOH (70:30)	14 x 50	74 – 87
EtOAc : MeOH (65:35)	8 x 50	88 – 94
MeOH (100)	1 x 100	95

As frações enriquecidas em bornesitol (32-59) foram reunidas e secas em evaporador rotatório e depois mantidas em dessecador, sob pressão reduzida, para garantir a completa eliminação do solvente. O sólido amarelado obtido foi submetido à recristalização em MeOH. A solução metanólica foi aquecida à temperatura máxima de  $60 \pm 5$  °C, seguindo-se as etapas de resfriamento à temperatura ambiente (20 min) e em *freezer* à -20 °C (24 h). A água mãe de todas as recristalizações foi reunida em um único frasco previamente tarado, sendo submetida a sucessivas etapas de recristalização em solução metanólica (GOMES *et al.*, 2018).

Os ensaios de caracterização tiveram como objetivo avaliar a pureza do bornesitol isolado. Para tanto, foram realizadas análises por CCD de sílica gel, além da determinação do ponto de fusão, obtenção de espectros de RMN e análises por UPLC-ESI-MS/MS.

As placas de CCD de sílica gel foram eluídas com água / acetato de etila / propano-2-ol (6:11:83), empregando como revelador solução alcalina de

permanganato de potássio. As faixas de fusão foram determinadas em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301 Microquímica. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX – 400 MHz, à 25 °C, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna para ambos os núcleos. O solvente empregado para as análises foi dimetilsulfóxido deuterado (*d*6-DMSO). As condições de análise por UPLC-ESI-MS/MS estão descritas no item 4.7.1.

## **4.6 Ensaios farmacológicos**

### **4.6.1 Aferição direta da pressão arterial sistólica e coleta de sangue**

Foram utilizados ratos Wistar (320-350 g) anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (50 mg/kg) por via intraperitoneal. Um cateter de polietileno foi inserido na artéria femoral por dissecação, para monitoramento da pressão sanguínea. Outro cateter foi colocado na veia femoral para infusão de solução salina estéril (0,9%) e/ou administração em bolus de bornesitol (0,1 - 3 mg/kg) e coleta de amostras (antes da infusão e 30 min após a infusão da substância). Os cateteres foram transpassados no dorso do animal e vinte e quatro horas após o procedimento de implantação de cânulas foi realizado o registro da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial média (PAM), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) nos animais acordados (5 animais por grupo). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada por um sinal enviado a um transdutor conectado à cânula inserida na aorta abdominal pela artéria femoral por meio do sistema de aquisição de dados (Biopac System, modelo MP100). As oscilações de pressão captadas foram amplificadas e convertidas, por meio de placa de conversão analógico/digital, em sinais que alimentam a placa de aquisição de dados. Por meio do software de leitura da placa Acqknowledge v.3.5.7 (Biopac System), a PAP foi registrada continuamente com uma frequência de amostragem de 2000-4000 Hz. Os valores de pressão e frequência cardíaca foram calculados a partir de pulsos de PA e registrados pelo sistema. Assim, os parâmetros foram registrados durante todo o período de experimentação, sendo que o primeiro registro foi para obter a etapa basal (controle), sendo realizado 30 min após a infusão de salina. O segundo registro foi obtido 30 min após a infusão de bornesitol. A coleta de sangue venoso (300  $\mu\text{L}$ ) ocorreu em dois tempos: 30 min após a infusão de salina e 30 min após a

administração de bornesitol. O sangue foi centrifugado a 9184 g por 10 minutos a 4 °C para separação do plasma e armazenado em freezer a -80 °C para posterior determinação da concentração de nitrito e atividade da ECA (itens 4.6.2 e 4.6.3, respectivamente).

#### **4.6.2 Determinação sérica de nitrito**

A dosagem de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foi realizada utilizando a reação de Griess com modificações (GREEN *et al.*, 1982). Uma alíquota de plasma (100  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada a uma placa de microtitulação de 96 poços, acrescida de igual volume do reagente de Griess (0,1% m/v de naftilenoetilenodiamina e 1,0 % m/v de sulfanilamida em 2,5 % (v/v) de ácido fosfórico) por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os experimentos foram realizados em triplicata com a leitura da absorbância em leitor de microplacas (BioTek Instruments Inc., modelo Epoch) no comprimento de onda de 545 nm. Como branco, utilizou-se solução salina.

#### **4.6.3 Atividade da ECA no plasma**

A atividade inibitória da ECA foi determinada empregando o método descrito por Lucas-Filho e colaboradores (2010) com modificações. Alíquotas de plasma (40  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas a uma placa de microtitulação de 96 poços e a reação enzimática foi iniciada por adição de 50  $\mu\text{L}$  de tampão HEPES pH 8,15 (composição em mM: 50 HEPES, 300 NaCl, 400  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 8,15) e 30  $\mu\text{L}$  de solução de substrato hipuril- glicil-glicina (100 mM) (Sigma, EUA). Após homogeneização, a mistura foi incubada durante 45 min, a 37°C. Posteriormente foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  0,3 M e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,32 M. A solução foi homogeneizada e mantida em repouso por 10 minutos. Ao sistema, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de tampão HEPES pH 8,15 e 3  $\mu\text{L}$  de solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) 6,92 mM (Sigma, EUA). Após 20 min protegidos da luz, a absorbância da placa foi lida em leitor de microplacas (BioTek Instruments Inc., modelo Epoch) em 415 nm contra uma solução branco preparada de forma semelhante, exceto pela adição das soluções de tungstato de sódio e ácido sulfúrico antes da solução enzimática. Como controle positivo do ensaio, foi utilizado solução de captopril 6,4  $\mu\text{M}$ .

#### 4.6.4 Análise estatística

A análise estatística dos ensaios farmacológicos foi realizada com o programa Graph Pad Prism 6.0.1. Two-way ANOVA seguida do pós-teste de Fisher's LSD foi utilizada para analisar os resultados da medição direta da pressão arterial. One-way ANOVA foi utilizado para a análise estatística da dosagem de nitrito e da atividade plasmática da ECA. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPR) e foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

### 4.7 Ensaios farmacocinéticos

#### 4.7.1 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação do bornesitol em plasma de rato por UPLC-ESI-MS/MS

O desenvolvimento do método bioanalítico foi realizado no equipamento UPLC-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LC<sup>TM</sup>, Waters, composto por bomba binária, amostrador automático, degasser em linha e detector de arranjos de diodo (DAD) e espectrômetro de massas ACQUITY TQ, Waters, Milford, Massachusetts, EUA, equipado com fonte de ionização por electrospray - Z-spray (ESI) e analisador triplo quadrupolo. Os cromatogramas e espectros foram obtidos e processados online pelo software Mass Lynx<sup>TM</sup> (versão 4.1, Waters).

##### 4.7.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos

A condição analítica definida para a quantificação do bornesitol foi otimizada a partir da otimização de método de MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), com injeção de solução de bornesitol 0,1 mg/mL em MeOH. Para a quantificação do analito, o método foi otimizado nas transições  $m/z$  193,1  $\rightarrow$  161,0 Da (para íon específico) e 193,1  $\rightarrow$  125,0 Da (para o íon confirmatório).

O pentaeritritol foi utilizado como padrão interno, e a otimização foi realizada por meio de uma solução de pentaeritritol 0,1 mg/mL em metanol utilizada para se estabelecer o método de MRM baseado nas transições  $m/z$  135,1  $\rightarrow$  87,3 Da (para íon específico) e 193,1  $\rightarrow$  69,3 Da (para o íon confirmatório). O bornesitol e pentaeritritol apresentaram melhor ionização no modo negativo ESI<sup>-</sup>. Os parâmetros definidos para o método de MRM estão descritos nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2:** Condições espectrométricas utilizadas para quantificação de bornesitol e pentaeritritol.

Parâmetro da fonte ESI <sup>+</sup>	
Parâmetro	Valores
Voltagem do capilar	5 kV
Voltagem do extrator	3 V
RF Lens	0,1 V
Temperatura da fonte	120 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C
Fluxo do gás de dessolvatação	840 L/h
Fluxo do gás do cone	90 L/h
Parâmetros do analisador de massas	
Parâmetro	Valores
Resolução de massas LM 1	10
Resolução de massas HM 1	14,3
Ion energy 1	0,5
Modo MS/MS entrada	2
Modo MS/MS saída	2
Modo MS entrada	50
Modo MS saída	50
Resolução de massas LM 2	12
Resolução de massas HM 2	14,7
Ion energy 2	1,0

**Tabela 3:** Condições espectrométricas específicas para quantificação de bornesitol e pentaeritritol.

Substância	Íon precursor ( <i>m/z</i> )	Íon produto ( <i>m/z</i> )	Dwell time (s)	Cone (V)	Energia de colisão (eV)
Bornesitol	193,1	161,0	0,065	33	10
Bornesitol	193,1	125,0	0,065	33	16
Pentaeritritol	135,1	87,3	0,065	24	11
Pentaeritritol	135,1	69,3	0,065	24	14

#### 4.7.1.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos

O desenvolvimento do método cromatográfico bioanalítico baseou-se nas condições descritas por Kindt e colaboradores (2004). Foi utilizada uma coluna Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH amida (2,1 x 100 mm d.i., partículas de 1,7 µm, Waters, Milford, Massachusetts, EUA) e uma pré-coluna VanGuard UPLC<sup>®</sup> BEH amida (2,1 x 5 mm d.i., partículas de 1.7 µm, Waters, Milford, Massachusetts, EUA). Empregou-se como fase móvel acetato de amônio 5 mM e acetonitrila, avaliando-se diversas proporções desses solventes em eluição isocrática. Para a otimização do sistema cromatográfico foi preparada inicialmente uma solução metanólica contendo mistura de bornesitol e do padrão interno pentaeritritol (10 µg/mL cada). Esta solução foi posteriormente submetida ao procedimento de extração descrito no item 4.7.1.3. Os parâmetros definidos para o método cromatográfico foram: eluição isocrática de acetato de amônio 5 mM pH 6,78 e acetonitrila (25:75), fluxo de 0,3 mL/min, volume de injeção de 2 µL, temperatura da coluna 30 °C, temperatura das amostras 21 °C. O tempo de análise foi de 5 minutos sendo o tempo de retenção do pentaeritritol de 1,4 minutos e do bornesitol de 2,9 minutos.

#### 4.7.1.3 Determinação dos parâmetros de preparo da amostra

A estratégia utilizada para extração do bornesitol e pentaeritritol no plasma consistiu inicialmente na precipitação de proteínas utilizando acetonitrila como agente precipitante (LEUNG *et al.*, 2011; ROMERO-CASTRO *et al.*, 2016). Foi adicionada, a cada volume de plasma, uma quantidade aproximada de dois volumes e meio de acetonitrila (POLSON *et al.*, 2003). Em detalhes, o procedimento consistiu



na adição de 20 µL de uma solução de bornesitol (200 µg/mL) e 20 µL de uma solução de pentaeritritol (200 µg/mL), ambas em metanol, em microtubo plástico tipo *safe-lock* (2 mL de capacidade). A solução metanólica foi seca em evaporador centrífugo Centrivap à 30 °C, por 1 hora, sendo então adicionados 160 µL de plasma, seguida de homogeneização em vórtex por 1 minuto. Na sequência, foram adicionados 400 µL de ACN e a solução foi novamente homogeneizada em vórtex por 1 minuto e centrifugada a 9184 g por 10 minutos. O sobrenadante, equivalente a 410 µL, foi recolhido em microtubo plástico tipo *safe-lock*. Ao precipitado foram adicionados novamente 100 µL de água e a solução foi sonicada por 10 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 200 µL de ACN e o microtubo plástico tipo *safe-lock* foi submetido à homogeneização em vórtex por 30 segundos, sonicado por 10 minutos e centrifugado a 9184 g por 10 minutos. Na sequência o sobrenadante foi recolhido (310 µL) e reunido com o sobrenadante inicial, perfazendo um volume total de 720 µL, o qual foi seco em evaporador centrífugo a 30 °C durante 4h. O resíduo obtido foi então reconstituído com 400 µL de MeOH, homogeneizado em vórtex por 1 minuto, sonicado por 10 minutos, e submetido a centrifugação a 9184 g por 10 minutos. Ao final, a solução metanólica obtida foi filtrada em filtro de 0,22 µm diretamente para os *inserts* de 250 µL.

#### **4.7.2 Análise de bornesitol em extrato de *H. speciosa* por UPLC-ESI-MS/MS**

As análises foram realizadas no sistema de UPLC-MS descrito anteriormente (item 4.7.1). Os cromatogramas e espectros foram obtidos e processados online pelo software Mass Lynx™ (versão 4.1, Waters). As análises foram realizadas em uma coluna de amida (Acquity UPLC BEH, Waters, Irlanda; 100 × 2,1 mm id, 1,7 µm) em combinação com uma coluna de guarda (pré-coluna Acquity UPLC BEH VanGuard, Waters; 2,1 × 5 mm id, 1,7 µm), utilizando eluição isocrática de solução aquosa de acetato de amônio (25% m/v) e acetonitrila (75%), a um fluxo de 0,3 mL/min e temperatura de 30 °C. Foram preparadas soluções metanólicas de bornesitol (2 mg/mL) e do extrato de *H. speciosa* (10 mg/mL), procedendo-se à solubilização com auxílio de banho de ultrassom durante 10 min. A solução obtida foi filtrada em membrana de PVDF de 0,22 µm e foram injetadas alíquotas de 3 µL no equipamento. O modo SCAN de análise ESI negativo foi empregado, com as condições espectrométricas descritas na tabela 4.

**Tabela 4:** Condições espectrométricas utilizadas para identificação de bornesitol em extrato de *H. speciosa*.

Parâmetro da fonte ESI <sup>+</sup>	
Parâmetro	Valores
Voltagem do capilar	5,0 kV
Voltagem do cone	33 V
Faixa de detecção de massa ( <i>m/z</i> )	60 - 500
Temperatura da fonte	120 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C
Fluxo do gás de dessolvatação	840 L/h
Fluxo do gás do cone	90 L/h

#### 4.7.3 Validação de método bioanalítico para quantificação do bornesitol em plasma de rato por UPLC-ESI-MS/MS

O método bioanalítico desenvolvido para quantificação de bornesitol em plasma de rato por UPLC-ESI-MS/MS foi validado de acordo com as diretrizes do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA – *Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation*, 2013 e do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da *European Medicines Agency (EMA) – Guideline on Bioanalytical Method Validation*, 2011. Foram realizados os ensaios de validação de seletividade, efeito residual, efeito matriz, linearidade da faixa de trabalho, precisão, exatidão e estabilidade dos analitos em plasma e em solução, conforme as especificações de cada ensaio. Os ensaios de validação foram realizados a partir da adição de soluções de bornesitol e pentaeritritol a amostras de plasma branco em microtubo plástico do tipo *safe-lock*. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.7.1.3 com volumes suficientes para as concentrações da curva de calibração e amostras controle de qualidade (CQ's). As amostras contendo bornesitol foram as seguintes: amostra limite inferior de quantificação (LIQ) na concentração de 30 ng/mL, amostra controle de qualidade baixo (CQB) com a concentração de 100 ng/mL, amostra controle de qualidade média (CQM) com a concentração de 2000 ng/mL, amostra de controle de qualidade alta (CQA) com a concentração de 4000 ng/mL e amostra de controle de qualidade de diluição (CQD) com a concentração de

5000 ng/mL. A essas amostras foram adicionadas o padrão interno na concentração fixa de 5500 ng/mL.

#### **4.7.3.1 Seletividade**

A seletividade foi analisada com seis amostras de plasma branco de ratos distintos e uma de plasma hemolisado. O plasma hemolisado é um plasma que contém hemoglobina proveniente de hemácias lisadas. As áreas dessas amostras foram comparadas com a área da amostra do limite inferior de quantificação (LIQ= 30 ng/mL de bornesitol e 5500 ng/mL de pentaeritritol). A presença de picos interferentes no tempo de retenção do bornesitol e do pentaeritritol só foi aceita quando a área dos picos eram inferiores a 20% da área do analito e a 5% da área do padrão interno no LIQ.

#### **4.7.3.2 Efeito residual ou *carry-over***

O efeito residual foi analisado por meio de injeções da mesma amostra de plasma branco sendo uma antes e duas sequências após a injeção de uma amostra extraída do controle de qualidade de diluição (CQD= 5000 ng/mL de bornesitol e 5500 ng/mL de pentaeritritol). Em seguida, uma amostra LIQ foi injetada para comparação. A presença de picos interferentes nos tempos de retenção do bornesitol e do pentaeritritol só foi aceita quando as áreas eram inferiores a 20% da área do analito e a 5% da área do padrão interno no LIQ.

#### **4.7.3.3 Efeito matriz**

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação de seis amostras de plasma branco extraídas e adicionadas de bornesitol e pentaeritritol nas concentrações das amostras controle de qualidade baixo (CQB= 100 ng/mL de bornesitol e 5500 ng/mL de pentaeritritol) e controle de qualidade alto (CQA= 4000 ng/mL de bornesitol e 5500 ng/mL de pentaeritritol) na última etapa da extração. Para cada amostra foi obtido o fator de matriz normalizado por PI (FMN), conforme a equação (1). O critério de aceitação utilizado foi de que o coeficiente de variação (CV%) dos FMN's relativos a todas as amostras deverá ser inferior a 15%.

$$FMN = \frac{\frac{\text{Área sob o pico do analito em matriz}}{\text{Área sob o pico do PI em matriz}}}{\frac{\text{Área sob o pico do analito em solução}}{\text{Área sob o pico do PI em solução}}} \quad (1)$$

#### 4.7.3.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio de três curvas de calibração obtidas em três dias diferentes. As curvas foram construídas com amostras de cada um dos níveis de concentração do bornesitol (LIQ= 30 ng/mL, CQB= 100 ng/mL, CQM= 2000 ng/mL, CQA= 4000 ng/mL e CQD= 5000 ng/mL), além de soluções de bornesitol a 500 ng/mL e 1000 ng/mL, injetados em triplicata. Foi injetada uma amostra branco (amostra de plasma branco sem adição de bornesitol e pentaeritritol) e uma amostra zero (amostra de plasma branco com adição de PI no início da extração) preparadas simultaneamente às curvas, para garantir a ausência de interferentes.

As soluções de bornesitol e PI foram adicionadas na primeira etapa da extração em todas as amostras da curva de calibração. Foi realizada a regressão linear e calculada a equação com o uso de fator de ponderação. A escolha do fator de ponderação foi a partir do gráfico de resíduos selecionando o fator de ponderação que forneceu menor valor de soma, maior homogeneidade e menor amplitude de distribuição. A concentração de cada ponto da curva foi calculada considerando a razão entre a área do analito e a área do PI. Como critérios de aprovação da faixa de trabalho proposta foram considerados os desvios das concentrações calculadas para cada ponto em relação à razão entre a área do analito e a área do PI.

O desvio máximo permitido foi de 20% para o LIQ e de 15% para os demais níveis de concentração. Pontos com desvio acima do valor preconizado foram excluídos, não sendo utilizados para o cálculo da equação da reta. Cada curva de calibração só foi considerada aprovada quando teve 75% dos pontos com desvios inferiores aos descritos. Foi analisado o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) da curva o qual deve ser superior a 0,98 e o gráfico de dispersão dos resíduos para avaliar a uniformidade das variâncias.

#### 4.7.3.5 Precisão

A precisão intracorridas e intercorridas foi analisada simultaneamente à determinação da linearidade da faixa de trabalho, como descrito no item 4.7.3.5. As amostras foram analisadas em sextuplicata nas concentrações LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. O desvio padrão relativo (DPR) ou CV% foi utilizado para expressar a precisão do método, sendo calculado com base em todos os valores obtidos, conforme a equação (2). Não foram admitidos valores superiores a 20% para o LIQ e a 15% para as outras concentrações.

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio padrão} * 100}{\text{Concentração média experimental}} \quad (2)$$

#### 4.7.3.6 Exatidão

A exatidão intracorridas e intercorridas foi realizada simultaneamente à determinação da linearidade da faixa de trabalho, como descrito no item 4.7.3.4. As amostras foram analisadas em sextuplicata nas concentrações LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. O erro padrão relativo (EPR %) foi utilizado para expressar a exatidão do método, sendo calculado com base em todos os valores obtidos, conforme a equação (3). Não foram admitidos valores superiores à faixa de  $\pm 20\%$  do valor nominal para o LIQ e a  $\pm 15\%$  do valor nominal para as outras concentrações.

$$EPR(\%) = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) * 100}{\text{Valor nominal}} \quad (3)$$

#### 4.7.3.7 Estabilidade do analito em matriz biológica

A estabilidade do bornesitol em plasma de rato foi avaliada em quatro condições: estabilidade de curta duração (ECD); estabilidade após 2 ciclos de congelamento e descongelamento (ECC); estabilidade pós-processamento (EPP) e estabilidade de longa duração (ELD). Em todos os ensaios de estabilidade, foram extraídas simultaneamente a uma curva de calibração, amostras em quadruplicata

de CQB e CQA. O bornesitol e o pentaeritritol foram adicionados na primeira etapa da extração.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos a partir da análise de amostras recém-preparadas. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas em relação ao valor nominal, ou seja,  $EPR = \pm 15\%$ .

Para se avaliar a ECD do analito em plasma, este deverá permanecer à temperatura ambiente por um tempo superior ao que as amostras em estudo serão mantidas nas mesmas condições. Dessa forma, o tempo estipulado foi de 6 h, tendo em vista o tempo gasto desde o preparo à filtração das amostras para os vials.

O ensaio de ECC avaliou a estabilidade do bornesitol em plasma após 2 ciclos de congelamento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e descongelamento completo à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). A cada ciclo, as amostras foram mantidas congeladas por 24 horas. Após o último descongelamento, as amostras foram extraídas e analisadas.

A EPP consiste em analisar as amostras após a extração nas mesmas condições de análise das amostras em estudo. A EPP deve abranger o intervalo compreendido entre o término da extração e a análise da última amostra da corrida analítica mais longa do estudo. Dessa forma, a EPP do analito na solução final da extração mantida no amostrador automático a  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi reinjetado após um intervalo de, no mínimo, 18h.

Para avaliação da ELD dos analitos, as amostras deverão permanecer congeladas por um tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última. Desse modo, as amostras contendo bornesitol foram congeladas por um mês. Após o descongelamento, as amostras foram extraídas e analisadas.

#### **4.7.3.8 Estabilidade do analito e PI em solução**

Durante a validação do método fez-se o uso de soluções contendo bornesitol e pentaeritritol para adição nas amostras de plasma para posterior extração. Desse modo, procedeu-se à avaliação da estabilidade das soluções de analito e do padrão interno na temperatura de trabalho (ETT) e a estabilidade na temperatura de armazenamento (ETA) foi avaliada por um período superior ao que as soluções foram expostas a essas condições.

Para avaliação da estabilidade, as soluções de trabalho em duas concentrações, LIQ e CQD, foram obtidas em triplicata, por diluições a partir das

soluções primárias recém-preparadas. Todas as soluções foram preparadas utilizando metanol como diluente. A ETT foi avaliada após 6 horas de manutenção da solução à temperatura ambiente, enquanto para avaliar ETA as amostras foram analisadas após 15 dias armazenadas em geladeira ( $4 \pm 2$  °C).

Os resultados foram analisados pela comparação entre a média das áreas dos picos obtidos a partir de soluções recém-preparadas com as obtidas para as soluções submetidas às condições dos ensaios, conforme a equação (4). As soluções foram consideradas estáveis quando não se observou variações superiores a 10%.

$$\text{Variação (\%)} = \frac{(\text{Área média experimental} - \text{Área média referência}) * 100}{\text{Área média referência}} \quad (4)$$

#### **4.7.4 Estudo farmacocinético com administração intravenosa e oral de bornesitol a ratos Wistar**

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 14 e 16 semanas (280 g e 310 g), proveniente do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia em ciclos de claro-escuro (12/12) com livre acesso a água e ração. Os ratos foram mantidos em gaiolas contendo no máximo três animais. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes e normas de pesquisa previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG), protocolo 332/2016. Todos os experimentos foram realizados usando pelo menos cinco animais por grupo.

Os animais foram anestesiados com 100 µL de uma solução ketamina/xilasina (3:2) para cada 100 g de massa do animal. Um cateter de silástico foi inserido na veia jugular para a coleta das amostras (por via intravenosa e oral). Os animais foram mantidos em gaiolas, contendo um animal por gaiola. Vinte e quatro horas após a implantação do cateter, os animais estavam aptos para realizar o procedimento, tendo em vista a eliminação completa dos anestésicos (xiliasina  $t_{1/2} = 1,5\text{h}$ ; cetamina  $t_{1/2} = 2\text{h}$ ).

Ao grupo de ratos denominado G1 foi administrada, pela veia caudal, alíquota de uma solução de bornesitol em solução salina estéril correspondente a 3 mg/Kg

corrigida de acordo com a massa do animal. Após a administração, procedeu-se a coleta de 300 µL de sangue pelo acesso venoso da veia jugular nos tempos 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 minutos. Logo após a coleta de sangue em cada tempo, foi repostado a mesma quantidade de solução salina estéril.

Para a administração por via oral, os animais foram alocados em três grupos identificados como G2, G3 e G4 para os quais foram administrados, empregando sonda gástrica, volumes de uma solução de bornesitol em solução salina estéril correspondente as doses de 3 mg/Kg, 15 mg/Kg e 25 mg/Kg corrigida de acordo com a massa do animal. Foram coletados 300 µL de sangue nos tempos de 0, 5, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 e 480 minutos. As amostras de sangue coletadas foram dispensadas em microtubos plásticos contendo heparina e centrifugadas a 9182 g por 10 minutos para a separação de plasma e congeladas à -80 °C para posterior extração e quantificação do ativo por UPLC-ESI-MS/MS.

#### 4.7.5 Determinação de parâmetros farmacocinéticos

Para determinação dos parâmetros farmacocinéticos, cada animal foi avaliado individualmente e os dados de concentração plasmática obtidos *versus* tempo foram plotados em gráficos em escala linear e em escala logarítmica. A partir dos gráficos obtidos os demais parâmetros farmacocinéticos foram determinados empregando as equações modelo (5 a 13) independentes a seguir:

- a) Constante de eliminação ( $K_{el}$ )

$$K_{el} = \frac{|\ln C_1 - \ln C_2|}{|t_1 - t_2|} \quad (5)$$

Em que:

Ln  $C_1$ : logaritmo natural da concentração 1; Ln  $C_2$ : logaritmo natural da concentração 2;  $t_1$ : tempo da concentração 1;  $t_2$ : tempo da concentração 2

- b) Meia vida de eliminação ( $t_{1/2}$ )

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_{el}} \quad (6)$$



Em que:

$K_{el}$ : constante de eliminação

c) Área sob a curva ( $ASC_{0-t}$ )

$$ASC_{0-t} = \sum \text{Trapézios} \quad (7)$$

$$ASC = \left( \frac{C_1 + C_2}{2} \right) \times (t_2 - t_1) \quad (8)$$

Em que:

$C_1$ : concentração 1;  $C_2$ : concentração 2;  $t_1$ : tempo da concentração 1;  $t_2$ : tempo da concentração 2

d) Área sob a curva ( $ASC_{t-\infty}$ )

$$ASC_{t-\infty} = \frac{C_{final}}{K_{el\text{média}}} \quad (9)$$

Em que:

$C_{final}$ : concentração final;  $K_{el}$ : constante de eliminação

e) Área sob a curva ( $ASC_{0-\infty}$ )

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

Em que:

$ASC_{0-t}$ : área sob a curva do tempo zero a t;  $ASC_{t-\infty}$ : área sob a curva do tempo t ao infinito

f) Volume de distribuição ( $V_d$ )

$$V_d = \frac{Dose}{ASC_{0-\infty} \times K_{el\text{média}}} \quad (11)$$

Em que:

Dose: Dose administrada no experimento oral ou intravenoso;  $ASC_{0-\infty}$ : área sob a curva do tempo zero ao infinito;  $K_{el}$ : constante de eliminação.

g) Clearance (Cl)

$$Cl = \frac{Dose}{ASC_{0-\infty}} \quad (12)$$

Em que:

Dose: Dose administrada no experimento oral ou intravenoso;  $ASC_{0-\infty}$ : área sob a curva do tempo zero ao infinito.

h) Biodisponibilidade (F)

$$F = \frac{ASC_{0-\infty\text{oral}}}{ASC_{0-\infty\text{i.v}}} \times \frac{Dose_{i.v}}{Dose_{\text{oral}}} \times 100 \quad (13)$$

Em que:

$ASC_{0-\infty\text{oral}}$ : área sob a curva do tempo zero ao infinito na administração oral;  $ASC_{0-\infty\text{i.v}}$ : área sob a curva do tempo zero ao infinito na administração venosa;  $Dose_{i.v}$ : Dose da administração intravenosa;  $Dose_{\text{oral}}$ : Dose da administração oral.

#### 4.7.6 Análise estatística

Todos os cálculos foram feitos com auxílio dos softwares Masslynx 4.1 e Microsoft Excel 2010. As análises estatísticas foram feitas nos programas Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2003) e GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software, 2007). One-way ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos

parâmetros farmacocinéticos Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPR) e considerados significativos para  $p < 0,05$ .

#### **4.8 Ensaios de citotoxicidade em células Caco-2**

Os ensaios de citotoxicidade e permeabilidade com células Caco-2 foram realizados no Laboratório de Virologia Aplicada, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, sob supervisão da Profa. Cláudia Maria Oliveira Simões, e executados em colaboração com a Dra. Clarissa Feltrin.

##### **4.8.1 Preparação das amostras para os testes de citotoxicidade**

Foram preparadas, por solubilização em DMSO, as seguintes soluções-estoque: bornesitol (7,69 mM), bornesitol com rutina (7,69 mM e 0,46 mM respectivamente), fração padronizada de *H. speciosa* (119,27 mg/mL, contendo 7,69 mM de bornesitol). A concentração final de DMSO aplicada nas células durante os experimentos foi menor que 1% v/v.

##### **4.8.2 Cultura de células Caco-2**

As células Caco-2, células de adenocarcinoma de cólon humano (ATCC, HTB37), foram mantidas em meio DMEM contendo 4,5 g/L de glicose (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 1% de L-glutamina (Cultilab) e 1% de aminoácidos não essenciais (Cultilab). As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> nomeada como “condições padrão de cultivo”. O meio DMEM suplementado foi trocado em dias alternados até as células atingirem a confluência de, no máximo, 80-90% (Figura 3), sendo consideradas adequadas para os ensaios de citotoxicidade e permeabilidade. A qualidade da linhagem celular foi constantemente avaliada, procedendo-se testes da presença de bactérias, fungos, leveduras e micoplasmas, os quais foram todos negativos.

**Figura 3:** Fotografia de cultura de células Caco-2 com  $\pm$  80% de confluência, utilizada nos ensaios de citotoxicidade e permeabilidade.



#### 4.8.3 Avaliação da citotoxicidade em células Caco-2

A citotoxicidade das amostras foi determinada pelo método colorimétrico utilizando sulforrodamina B, conforme descrito por Vichai e Kirtikara (2006), com modificações. O método consiste na ligação do corante ao conteúdo proteico celular permitindo, de forma indireta, a determinação da viabilidade celular pela quantificação de proteínas totais.

As células Caco-2 foram semeadas em placas de 96 cavidades, na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/cavidade, 48 h antes do tratamento com as amostras. As células foram tratadas com soluções diluídas em meio DMEM contendo 4,5 g/L de glicose nas seguintes concentrações: bornesitol (15,38  $\mu$ M), bornesitol com rutina (15,38  $\mu$ M e 1,84  $\mu$ M respectivamente), fração padronizada de *H. speciosa* (0,0385 mg/mL, contendo o equivalente à 15,38  $\mu$ M de bornesitol). Foram realizadas diluições seriadas (1:2 v/v) até a obtenção da concentração de 0,481  $\mu$ M de bornesitol e 0,0575  $\mu$ M de rutina tanto na solução de associação quanto na solução da fração padronizada de *H. speciosa* e, em seguida, as placas foram incubadas nas condições padrão de cultivo por 24 h. No controle celular foi adicionado apenas DMEM contendo 4,5 g/L de glicose e no branco foi adicionado somente 1 % DMSO.

Finalizada a incubação, as células foram fixadas por 1 h a 4° C com 66 µL de ácido tricloroacético a 15 % (TCA, LAFAN Química Fina) e, na sequência, lavadas três vezes com 100 µL de água destilada a 4° C, secas e coradas com 100 µL da solução de sulforrodamina B a 0,057 % (Sigma-Aldrich) em ácido acético a 1 % (LAFAN Química Fina), por 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com 100 µL de ácido acético a 1 % para remoção do corante não ligado. As placas foram deixadas em repouso por 48 h para garantir que estavam totalmente secas. Posteriormente, o corante foi solubilizado com 100 µL da solução de Tris Base 10 mM (pH 10,5, Sigma-Aldrich). A leitura das absorbâncias foi efetuada em espectrofotômetro UV-Vis SoftMax<sup>®</sup> Pro - Molecular Devices, em 510 nm. Os valores de absorbâncias encontrados foram divididos pela média dos valores de absorbâncias do controle celular e os resultados expressos em porcentagem. Os resultados obtidos foram plotados em gráfico de barras de concentração (µM) em função da viabilidade celular (%).

#### **4.8.4 Análise Estatística**

Os resultados foram analisados com os programas Microsoft Excel<sup>®</sup> 2013 e GraphPad Prism 6.0.1. A análise de variância foi realizada pelo teste de ANOVA duas vias, seguida do pós-teste de Sidak, com intervalo de confiança de 95 %.

### **4.9 Ensaio de permeabilidade em células Caco-2**

#### **4.9.1 Desenvolvimento de método analítico para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS nos ensaios de permeabilidade**

O desenvolvimento do método analítico foi realizado no equipamento UPLC-ESI-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LC<sup>™</sup>, Waters, composto por detector de arranjos de diodo (DAD) e espectrômetro de massas ACQUITY TQ, Waters, equipado com fonte de ionização por electrospray - Z-spray (ESI) e analisador triplo quadrupolo. Os cromatogramas e os espectros foram obtidos e processados *online* pelo programa Mass Lynx<sup>™</sup> (versão 4.1, Waters).

##### **4.9.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos e cromatográficos**

As condições analíticas definidas para a quantificação do bornesitol nos ensaios de permeabilidade foram as mesmas desenvolvidas e validadas para a

quantificação do bornesitol nos ensaios de farmacocinética (item 4.7.1.1 e 4.7.1.2), exceto o volume de injeção, que foi padronizado para 7  $\mu\text{L}$ , e a não utilização de padrão interno nas amostras.

#### **4.9.1.2 Determinação dos parâmetros de preparo de amostra**

Após o experimento de permeabilidade, realizado conforme descrito no item 4.9.5, as amostras secas foram reconstituídas e extraídas para injeção no cromatógrafo. Durante o desenvolvimento, foram testados como solventes extratores: acetonitrila, metanol e piridina, sendo que a piridina foi selecionada para o método. Dessa forma, foram adicionadas às amostras secas 200  $\mu\text{L}$  de piridina e as soluções foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 30 seg, sonicadas por 10 min e centrifugadas a 9.184 g por 5 min. Os sobrenadantes foram filtrados em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  diretamente para insertos de 250  $\mu\text{L}$ .

Para realizar a validação do método analítico, foi preparada uma solução-estoque de bornesitol 10.000  $\mu\text{M}$  em DMSO. Posteriormente, as soluções de trabalho foram obtidas a partir da diluição da solução-estoque em HBSS pH 6,5 de forma a mimetizar a solução utilizada nos experimentos de permeabilidade. Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  foi seca em evaporador centrífugo Centrivap a 30  $^{\circ}\text{C}$ , por 3 h. Na sequência, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de piridina e a solução foi homogeneizada em agitador tipo vórtex por 30 seg, sonicada por 10 min e centrifugada a 9.184 g por 5 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  diretamente para insertos de 250  $\mu\text{L}$ .

#### **4.9.2 Validação de método analítico**

O método analítico desenvolvido para quantificação do bornesitol no experimento de permeabilidade por UPLC-ESI-MS/MS foi validado de acordo com as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH, 1994; ICH, 1996) e da RDC 166 da ANVISA (BRASIL, 2017). Os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.9.1.2.

#### 4.9.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da injeção do branco. Para tanto, 200 µL de HBSS pH 6,5 foram concentrados em evaporador centrífugo Centrivap a 30 °C, por 3 h, e o resíduo obtido foi reconstituído com 200 µL de piridina. Os ensaios foram realizados com seis replicatas.

#### 4.9.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela construção de curvas de calibração contendo cinco pontos injetados em triplicatas. As concentrações nominais da faixa de calibração foram: 0,3 µM; 0,6 µM; 1,0 µM; 3,0 µM e 6,0 µM. Os dados obtidos foram analisados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) correspondentes foram calculados. As curvas obtidas em dois dias distintos foram avaliadas estatisticamente por análise de variância, sendo consideradas equivalentes para  $P < 0,05$ .

#### 4.9.2.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) foi determinado a partir da equação recomendada pela Comissão Internacional de Harmonização (ICH, 1996):

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad (14)$$

Em que:

$\sigma$ : desvio-padrão do intercepto da curva analítica;

S: inclinação da curva analítica.

#### 4.9.2.4 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi determinado a partir da equação recomendada pela Comissão Internacional de Harmonização (ICH, 1996):

$$LD = \frac{3 \times \sigma}{S} \quad (15)$$

Em que:

$\sigma$ : desvio-padrão do intercepto da curva analítica,

S: inclinação da curva analítica.

#### 4.9.2.5 Precisão

A precisão foi avaliada utilizando seis determinações no ponto médio de concentração do bornesitol na curva analítica (3,0  $\mu\text{M}$ ), com três repetições para cada nível. A precisão intradia foi analisada no mesmo dia e a precisão interdias foi determinada de maneira semelhante, em dois dias consecutivos, por analistas diferentes ( $n=12$ ). Os valores de DPR (Desvio-Padrão Relativo, %) foram calculados com base nas áreas obtidas para a precisão intradia ( $n=6$ ) e para a precisão interdias ( $n=12$ ). As médias dos teores entre os dias de determinação foram comparadas pelo teste  $t$  de Student ( $P < 0,05$ ).

#### 4.9.2.6 Exatidão

A exatidão foi investigada a partir de estudos de recuperação de soluções brancas fortificadas com bornesitol utilizando três concentrações do intervalo linear (0,3  $\mu\text{M}$ ; 3,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$ ), em triplicata. As concentrações foram determinadas com base na curva de calibração e comparadas com o valor teórico. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores de DPR (%).

#### 4.9.2.7 Robustez

A robustez foi determinada por meio de pequenas variações dos parâmetros analíticos e espectrométricos, em relação à condição nominal. Cada parâmetro foi analisado em três determinações no ponto médio de concentração do bornesitol na curva analítica (3,0  $\mu\text{M}$ ), com três repetições para cada nível. Os parâmetros foram: temperatura do forno (27 e 33  $^{\circ}\text{C}$ ), fluxo da fase móvel (0,27 e 0,33 mL/min), proporção de fase móvel acetonitrila/solução acetato de amônio 5 mM pH 6,78 (73:27 e 77:23), pH da solução de acetato de amônio 5 mM (pH 6,28 e 7,28), temperatura do gás de dessolvatação (440 e 460 $^{\circ}\text{C}$ ) e fluxo do gás de dessolvatação (790 e 890 L/h).

As modificações inseridas foram avaliadas individualmente e comparadas com os resultados aferidos nas condições analíticas. A avaliação estatística das áreas obtidas foi feita por análise de variância (ANOVA).



### 4.9.3 Preparação dos insertos

As células Caco-2 foram cultivadas em insertos contendo uma membrana semipermeável de policarbonato (área de superfície: 1,12 cm<sup>2</sup>; tamanho dos poros: 0,4 µM, Transwell® Permeable Support, Corning) dispostos em placas de 12 cavidades. Os insertos foram incubados com meio DMEM contendo 4,5 g/L de glicose sem suplementação por 30 min nas condições padrão de cultivo, anteriormente à semeadura das células. As células foram dissociadas dos frascos de cultivo utilizando 1 a 2 mL da solução de tripsina-EDTA (0,25 %), ressuspensas em DMEM contendo 4,5 g/L de glicose suplementado, e semeadas na densidade de  $1,87 \times 10^5$  células/inserto. As células foram incubadas de 21 a 25 dias para que ocorresse a diferenciação e pudessem ser então utilizadas nos experimentos. O meio de cultura foi substituído a cada dois dias durante o período de cultivo das células nos frascos e de manutenção das mesmas nos insertos. Nos insertos foram aplicados 500 µL de meio suplementado no compartimento apical e 1.500 µL no compartimento basolateral para a manutenção das células.

### 4.9.4 Avaliação da qualidade das células Caco-2

A qualidade das células foi verificada quanto à integridade e diferenciação celular. A integridade foi avaliada por meio da medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) e pela permeabilidade do marcador *Lucifer Yellow*. A diferenciação celular foi investigada por meio da marcação dos filamentos de F-actina com o corante rodamina-faloidina e das junções oclusivas com anticorpos específicos. Esses parâmetros costumam ser avaliados como forma de controlar a qualidade das células Caco-2 a serem usadas em ensaios de permeabilidade (SRINIVASAN *et al.*, 2015).

#### 4.9.4.1 Medida da resistência elétrica transepitelial (TEER)

Para medir a TEER, o meio de cultivo foi removido e as células dos insertos foram lavadas com HBSS pH 7,4. Em seguida, os insertos foram incubados por 15 min nas condições padrão de cultivo com HBSS pH 7,4. Posteriormente, o tampão foi substituído por tampão previamente aquecido a 37° C para efetuar as medidas usando o voltímetro Millicell® ERS (Millipore), seguindo as recomendações do fabricante do equipamento.

Os valores de TEER das células de todos os insertos foram obtidos antes e após os procedimentos de avaliação da permeabilidade. Tais medidas baseiam-se na aplicação de uma corrente alternada na solução dos compartimentos resultando em um valor de resistência elétrica, medida em ohms ( $\Omega$ ), gerada pela monocamada celular (SRINIVASAN *et al.*, 2015). O valor de TEER final foi calculado pela equação 16 e, como controle, foi utilizado um inserto sem células.

$$TEER = (R - R_B) \times A \quad (16)$$

Em que:

R = Resistência mensurada em  $\Omega$ ;

R<sub>b</sub> = Resistência do branco em  $\Omega$ ;

A = Área do filtro em  $\text{cm}^2$ .

#### 4.9.4.2 Permeabilidade do marcador *Lucifer Yellow*

Para confirmar a integridade da monocamada celular, ao final do experimento foi adicionado um marcador de baixa permeabilidade transcelular, o composto fluorescente *Lucifer Yellow*. O composto foi diluído em HBSS pH 7,4 na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e aplicado no compartimento apical (400  $\mu\text{L}$ ) dos insertos, enquanto ao compartimento basolateral foi adicionado apenas HBSS pH 7,4 (1.200  $\mu\text{L}$ ). Os insertos foram incubados protegidos da luz a 37 °C, em agitador orbital (100 rpm) por 1 h. A porção do marcador que permeou a monocamada celular teve a fluorescência quantificada utilizando-se o espectrofluorímetro SoftMax<sup>®</sup> Pro-Molecular Devices, nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/530 nm. As concentrações foram determinadas com base na equação da curva de calibração ( $y = 0,0056x - 0,0005$ ,  $r^2 = 0,9992$ ), obtida por diluição seriada da solução do marcador na concentração de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0,39  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão HBSS pH 7,4, relacionando a concentração nominal com a fluorescência obtida. A curva de calibração foi realizada no final de cada experimento utilizando uma placa de 12 cavidades sem insertos. A permeabilidade aparente (cm/s) do *Lucifer Yellow* foi calculada utilizando a equação (17).

$$P_{app} = \left( \frac{\Delta Q}{\Delta t} \right) \times \frac{1}{A \times C_0}$$

Em que:

$(\Delta Q)/(\Delta t)$  = Variação da concentração inicial no tempo em mol/s;

A = Área do filtro em  $\text{cm}^2$ ;

$C_0$  = Concentração inicial no compartimento doador em mol/mL.

#### **4.9.4.3 Marcação dos filamentos de F-actina com o corante rodamina-faloidina e análise da formação das junções oclusivas por imunofluorescência**

As células Caco-2 foram cultivadas em insertos por 21 a 25 dias nas condições de cultivo já descritas. As membranas semipermeáveis dos insertos contendo as células foram removidas e transferidas para lâminas de vidro até completa secagem. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma) em PBS por 15 min e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% (Sigma) em PBS por 10 min, sob agitação (60 rpm).

A formação da F-actina foi avaliada por marcação das células Caco-2 com o corante fluorescente rodamina-faloidina (1:200 v/v, Invitrogen), por 30 min, sob agitação (60 rpm). Finalizada a incubação, as células foram lavadas com PBS e analisadas em microscópio de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 510-550/590 nm.

A formação das junções oclusivas foi verificada após fixação e permeabilização das células, seguida de marcação com o anticorpo Mouse anti-ZO-1 (1:1.000 v/v, Santa Cruz Biotechnology), por 30 min, sob agitação (60 rpm). Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Goat anti-mouse Alexa Fluor 448 (1:1.000 v/v, Invitrogen), por 30 min, sob agitação (60 rpm). As monocamadas celulares foram analisadas em microscópio de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 460-490/520 nm.

O material nuclear foi marcado com o corante Hoechst 32258 (1  $\mu\text{g/mL}$ ) por 30 min, e analisado por microscopia de fluorescência nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 330 - 380/440 nm.

As imagens obtidas após as marcações foram adquiridas utilizando o microscópio de fluorescência Olympus IX71 e processadas com o programa Cell<sup>^</sup>P Olympus Images.

#### 4.9.5 Preparação das amostras para os ensaios de permeabilidade

Foram preparadas por solubilização em DMSO as seguintes soluções-estoque: bornesitol (7,69 mM), mistura de bornesitol e rutina (7,69 mM e 0,46 mM, respectivamente), fração padronizada de *H. speciosa* (19,27 mg/mL, contendo o equivalente a 7,69 mM de bornesitol), verapamil (100 mM), curcumina (100 mM), cimetidina (100 mM), rifampicina (5 mM) e propranolol (100 mM). A concentração final de DMSO aplicada nas células durante os experimentos foi menor que 1%. As soluções de trabalho foram diluídas em tampão HBSS 6,5 para as amostras aplicadas no compartimento apical e em tampão HBSS 7,4 para as amostras aplicadas no compartimento basolateral. Os compostos avaliados foram bornesitol (4,61  $\mu$ M), bornesitol com rutina (4,61  $\mu$ M e 2,76  $\mu$ M) e fração padronizada de *H. speciosa* (0,012 mg/mL, equivalente a 4,61  $\mu$ M de bornesitol). Para avaliação dos transportadores foram utilizados verapamil (30  $\mu$ M) como inibidor de P-gp (MAKI *et al.*, 2003), curcumina (100  $\mu$ M) como inibidor dos transportadores BCRP (PEÑA-SOLÓRZANO *et al.*, 2017), cimetidina (400  $\mu$ M) como inibidor dos transportadores OCT (KOEPESELL, 2015), e rifampicina (100  $\mu$ M) como inibidor dos transportadores OATP (ESTUDANTE *et al.*, 2016). Propranolol (25  $\mu$ M) foi usado controle experimental.

#### 4.9.6 Ensaios de permeabilidade utilizando células Caco-2 em modelo *Transwell*

Células Caco-2, entre as passagens #119 e #123, foram cultivadas por 21 a 25 dias nos insertos. Após a confirmação da adequada formação da monocamada celular, foram efetuados os ensaios de permeabilidade utilizando o modelo *Transwell*.

Antes de iniciar o experimento, as células foram pré-incubadas com o tampão HBSS pH 7,4 (controle), ou com a solução dos inibidores, aplicados em ambos os compartimentos do sistema por 30 min nas condições padrão de cultivo. Para a avaliação da permeabilidade, 400  $\mu$ L das amostras diluídas em tampão HBSS pH 6,5 foram aplicados no compartimento apical, enquanto que no compartimento basolateral foram adicionados 1.200  $\mu$ L do tampão HBSS pH 7,4. Para a avaliação do efluxo, 1.200  $\mu$ L das amostras diluídas em tampão HBSS pH 7,4 foram aplicados no compartimento basolateral e no compartimento apical foram adicionados 400  $\mu$ L do tampão HBSS pH 6,5.

As placas foram incubadas em agitador orbital a 37° C, sob agitação (150 rpm). Foram coletadas alíquotas de 200 µL do compartimento apical (para as análises de efluxo) e de 600 µL do compartimento basolateral (para as análises de permeabilidade) a cada 30 min, durante 2 h. Após a coleta de cada alíquota, o volume removido foi substituído pelo volume equivalente do tampão HBSS pré-aquecido, com pH correspondente, em cada compartimento.

As alíquotas coletadas foram secas usando o concentrador SpeedVac (Thermo) e os resíduos secos foram armazenados até a execução dos procedimentos de extração e quantificação por UPLC-ESI-MS/MS. Os valores de permeabilidade aparente ( $P_{app}$ ) foram calculados conforme a equação 17, previamente descrita. A relação entre permeabilidade e efluxo foi determinada conforme a equação 18.

$$Relação = \frac{P_{app}BL - AP}{P_{app}AP - BL} \quad (18)$$

Em que:

$P_{app}$  BL-AP = Permeabilidade aparente no sentido basolateral-apical (cm/s),

$P_{app}$  AP-BL = Permeabilidade aparente no sentido apical-basolateral (cm/s).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

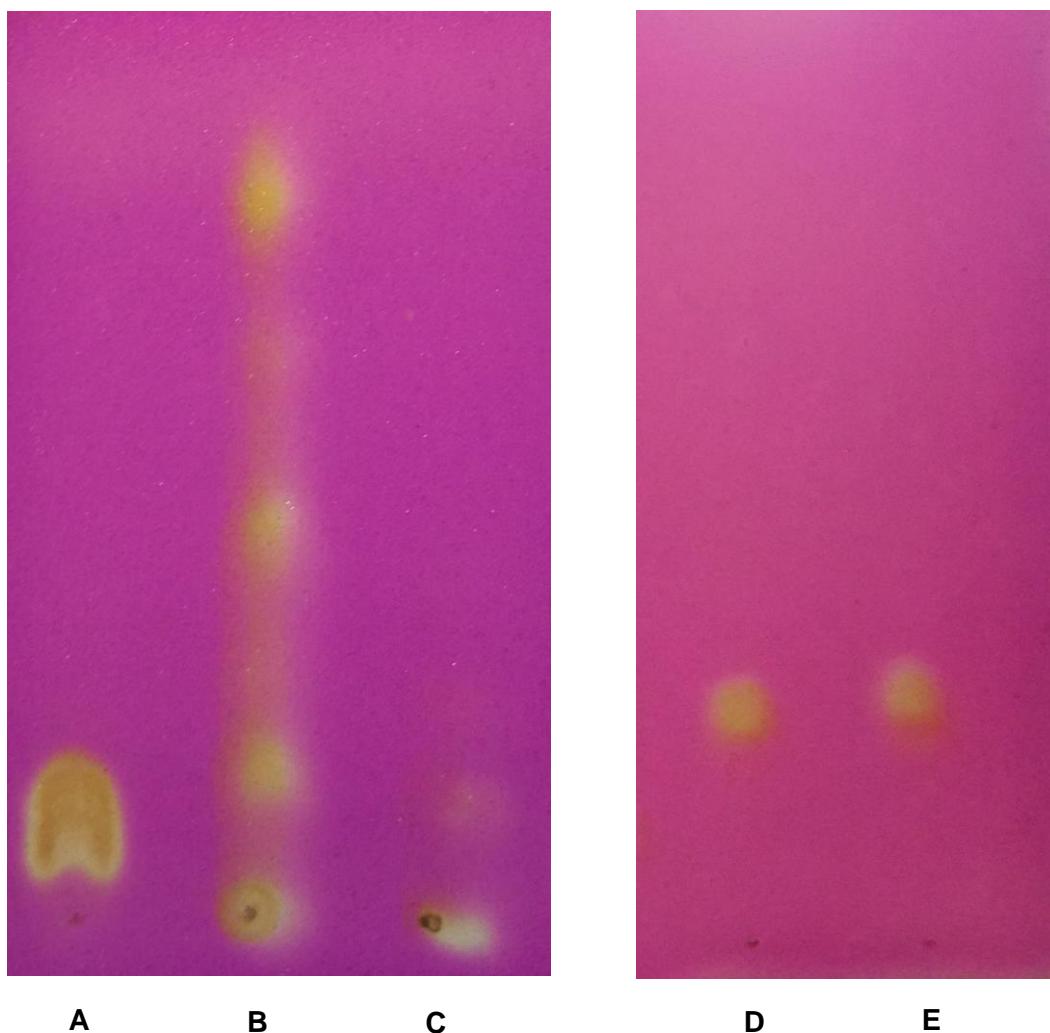
### 5.1 Obtenção, caracterização e pureza do bornesitol isolado

Conforme descrito nos itens 4.4 e 4.5, o bornesitol foi isolado a partir de folhas secas de *H. speciosa*. Partindo-se de 100 g da droga vegetal pulverizada foi obtido o resíduo da percolação com metanol / acetato de etila (1:1) com rendimento médio de 39,4 % (m/m). A partir de 5,0 g deste resíduo, foi realizada uma precipitação exaustiva com acetato de etila. Os precipitados reunidos foram solubilizados com metanol e purificados com a adição de carvão ativado, seguindo-se um particionamento líqui-líquido. A fase aquosa recolhida foi seca e o material obtido foi fracionado em sílica gel, com uma série eluotrópica com acetato de etila e metanol. As frações enriquecidas em bornesitol foram reunidas para purificação do composto por recristalização em quantidade mínima de metanol. A quantidade média de bornesitol isolado foi 45,2 mg. CCD em sílica gel foi inicialmente utilizada

para monitorar o procedimento de isolamento do bornesitol devido sua rapidez e facilidade de análise. As placas foram reveladas com solução alcalina de permanganato de potássio (Figura 4). Para monitorar o processo de isolamento, o bornesitol previamente isolado pelo nosso grupo de pesquisa foi utilizado como substância de referência.

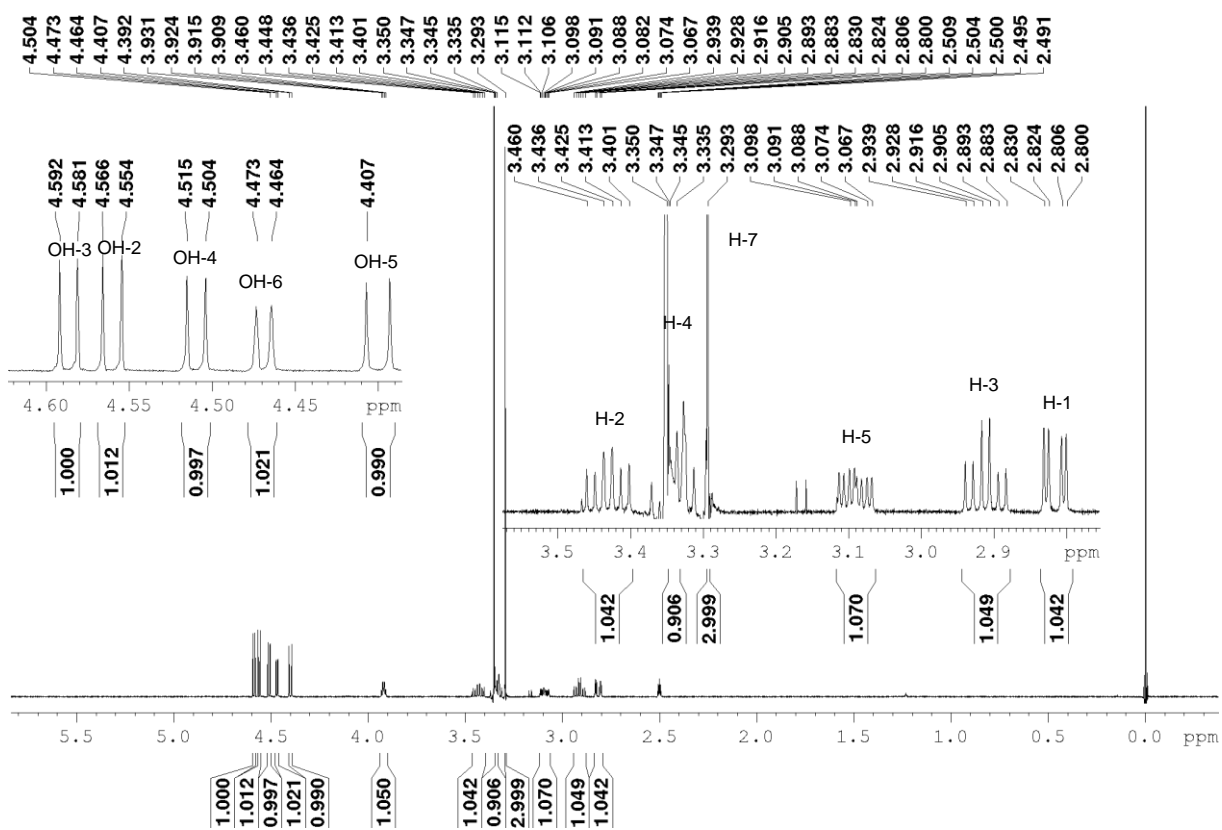
O ponto de fusão do bornesitol isolado foi determinado e o valor obtido (198,7 a 200,3 °C) indicou uma pequena faixa de variação, característica de um composto com alta pureza, além de apresentar concordância com a faixa relatada por Pereira e colaboradores (2012) e Endringer (2007), de 199,9 a 200,5 °C.

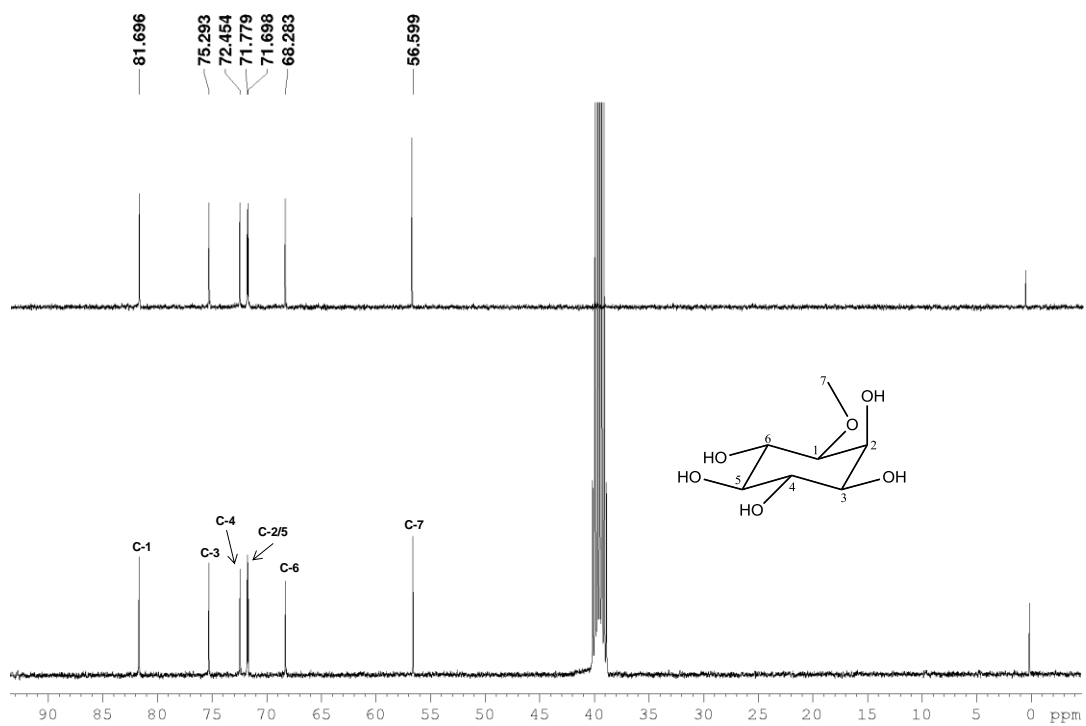
**Figura 4:** Perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel para bornesitol substância de referência (A e E), fase orgânica (B) e fase aquosa (C) da purificação do extrato de *H. speciosa*, após a extração com carvão ativado, e (D) bornesitol isolado no presente trabalho.



A fim de verificar a autenticidade do bornesitol obtido no presente trabalho, foi realizada sua caracterização por métodos espectrométricos. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  obtidos (figura 5) apresentaram multiplicidade de sinais e valores de deslocamentos químicos (Tabela 5) similares àqueles previamente relatados pelo nosso grupo de pesquisa para o bornesitol (GOMES, 2016).

**Figura 5:** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do bornesitol (400 MHz e 100 MHz, respectivamente,  $\text{DMSO-}d_6$ ).







**Tabela 5:** Atribuição dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) obtido para o bornesitol isolado.

Posição	L-(+)-bornesitol		GOMES <i>et al.</i> , 2018	
	$\delta_{\text{H}}$ , M e J	$\delta_{\text{C}}$ e DEPT-135	$\delta_{\text{H}}$ e M	$\delta_{\text{C}}$ e DEPT-135
1	2,85 dd (H1-H6; 2,52 Hz) e (H1-H2; 9,60 Hz)	81,69 CH	2,80 d	81,69 CH
2	3,34-3,33 m	71,78 CH	3,43 m	71,78 CH
3	2,91 t,d (H3-H4; 9,08 Hz), (H3-H2; 9,08 Hz) e (H3-OH3; 4,32Hz)	75,29 CH	2,91 m	75,29 CH
4	3,46-3,40 m	72,45 CH	3,35	72,46 CH
5	3,11-3,06 m	71,69 CH	3,1 m	71,70 CH
6	3,91 q	68,29 CH	3,92 s	68,29 CH
7	3,29 s	56,50 $\text{CH}_3$	3,33 s	56,61 $\text{CH}_3$
1'	4,56 d (OH2-H2; 4,60 Hz)		4,53 d (OH2-H2; 4,4 Hz)	
2'	4,59 d (OH3-H3; 4,28 Hz)		4,55 d (OH3-H3; 4,0 Hz)	
3'	4,51 d (OH4-H4; 4,48 Hz)		4,48 d (OH4-H4; 4,4 Hz)	
4'	4,39 d (OH5-H5; 5,68 Hz)		4,37 d (OH5-H5; 5,2 Hz)	
5'	4,47 d (OH6-H6; 3,64 Hz)		4,44 d (OH6-H6; 3,2 Hz)	

Em que:

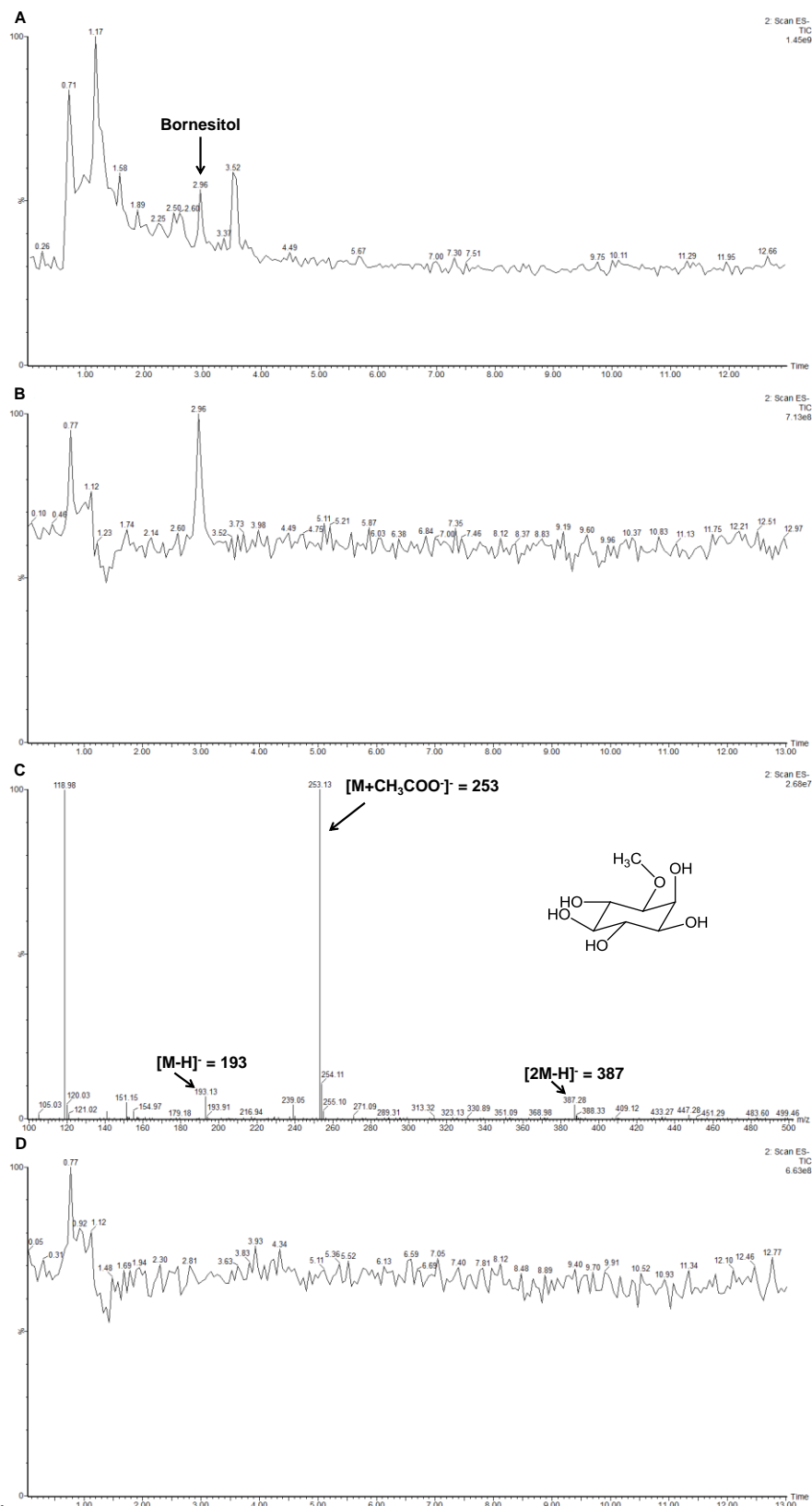
$\delta$ : Deslocamento químico (ppm); M: multiplicidade; s: simpleto, d: duplete, dd: duplete duplo, J: constante de acoplamento (Hz); m: multiplete; t,d: tripleto duplo; q: quarteto

A identidade do bornesitol isolado também foi atestada por espectrometria de massas. A análise por UPLC-ESI-MS/MS no modo negativo de ionização (Figura 6)

demonstrou a presença do íon desprotonado em  $m/z$  193 Da  $[M - H]^-$ , bem como os sinais dos adutos em  $m/z$  253 Da  $[M + CH_3COO]^-$  e  $m/z$  387 Da  $[2M - H]^-$ , compatíveis com a estrutura do bornesitol ( $C_7H_{14}O_6$ ).

Os dados obtidos confirmaram a autenticidade e a pureza do bornesitol, viabilizando seu uso como substância química de referência para os ensaios farmacológicos e a avaliação farmacocinética em ratos no presente trabalho.

**Figura 6:** Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS/MS no modo negativo de ionização para o extrato em acetato de etila/metanol de folhas de *H. speciosa* (A), bornesitol isolado (B), espectro de MS (modo *scan*) extraído para bornesitol (TR = 2,96 min) (C) e metanol, utilizado como solvente (D).



## 5.2 Avaliação da atividade hipotensora do bornesitol

A presença de bornesitol em diversas espécies vegetais encontra-se descrita na literatura, mas poucos estudos biológicos foram desenvolvidos com este ciclitol. Apesar do grande volume de trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa para investigar o potencial hipotensor de extrato e fração padronizada de *H. speciosa*, utilizando modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* com animais normotensos e hipertensos, o bornesitol só havia sido avaliado *in vitro* (inibição da ECA) e *in silico*. Dessa forma, para validar seu uso como marcador ativo da espécie, foi necessário avaliá-lo *in vivo*.

### 5.2.1 Efeito na pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

Bornesitol foi administrado a ratos Wistar nas doses de 0,1, 1,0 e 3,0 mg/kg por via intravenosa (i.v.) e a pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) dos animais foram avaliadas. Conforme observado na figura 7, todas as doses ensaiadas reduziram de forma significativa a PAS e a pressão arterial média (PAM). Quanto à PAD e à frequência cardíaca (FC) não foram observados efeitos significativos. O pico da hipotensão ocorreu entre 5-10 min após a infusão de bornesitol. Com exceção da dose de 1,0 mg/kg, o efeito hipotensor do bornesitol durou até o final do intervalo de tempo avaliado (30 minutos).

Buscou-se, no presente trabalho, avaliar se o bornesitol contribui para o efeito hipotensor previamente observado com uma fração padronizada das folhas de *H. speciosa* (FHS). Neste estudo prévio, a FHS administrada por via oral apresentou efeito hipotensivo, dose-dependente, em camundongos normotensos. O efeito hipotensivo de FHS teve início rápido (15 minutos após a administração) e longa duração (aproximadamente 5 h), sugerindo que os constituintes ativos desta fração apresentam boa disponibilidade oral. Além disso, o efeito hipotensor de FHS (1 mg/kg) foi mais potente e durador que o captopril (SILVA *et al.*, 2011). O efeito hipotensor de FHS foi relacionado à presença de rutina, L-(+)-bornesitol e ácido quínico (ENDRINGER *et al.*, 2009). O fato da FHS induzir um efeito hipotensivo mais potente e durador do que observado com o bornesitol no presente trabalho, sugere o provável sinergismo entre o bornesitol e os demais constituintes majoritários da FHS (rutina e ácido quínico). Uma evidência a este favor é a observação do efeito hipotensor de FHS administrado pela via oral, na dose de 1 mg/kg, ser superior ao observado com o bornesitol administrado pela via intravenosa, na dose de 3 mg/kg

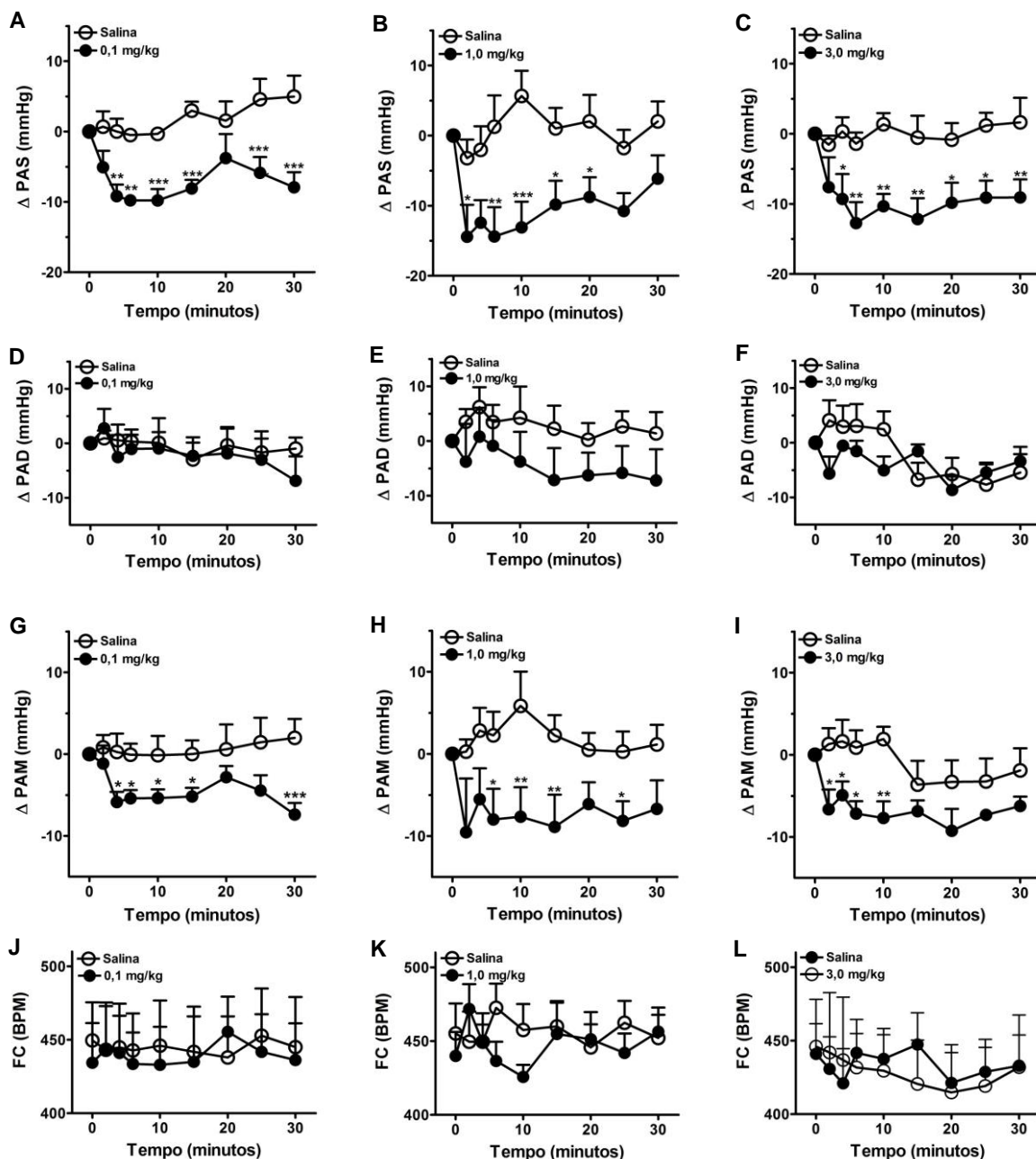
(SILVA *et al.*, 2011). Cabe ressaltar que o bornesitol é o principal composto majoritário da FHS, com um teor de  $7,75 \pm 0,78$  % (m/m).

O sinergismo entre os constituintes de FHS pode ser farmacocinético, farmacodinâmico ou ambos. Com relação ao sinergismo farmacodinâmico, existem relatos para a atividade anti-hipertensiva de alguns dos constituintes da fração padronizada de *H. speciosa*. Duarte e colaboradores (2001) demonstraram o efeito anti-hipertensivo da rutina em ratos Wistar normotensos e hipertensos após a administração de 10 mg/Kg, enquanto que Suzuki e colaboradores (2002) relataram a atividade anti-hipertensiva do ácido quínico administrado na dose de 5  $\mu$ mol/kg a ratos Wistar hipertensos. Além disso, a rutina e sua aglicona (quercetina) também apresentam atividades vasodilatadora e inibidora da ECA (FUSI *et al.* 2003; OH *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2007a). Estas observações apoiam a hipótese de um sinergismo farmacodinâmico com o bornesitol. O sinergismo farmacocinético é apoiado por relatos que demonstram que a rutina e ácido quínico são capazes de inibir a p-glicoproteína (BANSAL *et al.*, 2009; JIN *et al.*, 2015), um transportador de efluxo presente no lúmen do trato gastrintestinal, e podem, conseqüentemente, aumentar a taxa de absorção do bornesitol.

O bornesitol reduz a PAS e a PAM sem alterar significativamente a FC. Este resultado é semelhante ao observado com a FHS nas doses de 1 e 10 mg/kg (SILVA *et al.*, 2011). Além disso, efeitos semelhantes foram descritos por Gasparotto Junior e colaboradores (2011). Neste trabalho, a administração por via intravenosa em ratos normotensos do extrato hidroetanólico de *Tropaeolum majus* L, em doses de 10 a 300 mg/Kg, e do seu composto majoritário, o flavonoide isoquercitrina, em doses de 0,5 a 4 mg/kg, reduziram a PAS sem alteração significativa da FC. Os mecanismos responsáveis pela ausência de alteração na FC em resposta ao bornesitol não foram investigados. No entanto, não podemos descartar a hipótese de um efeito direto deste ciclitol no músculo cardíaco ou uma modulação dos mecanismos de baroreflexo.

Portanto, os presentes resultados demonstram que o bornesitol apresenta um efeito hipotensor semelhante ao observado com a FSH, tornando-o, além de um marcador químico, um marcador bioativo para o extrato das folhas de *Hancornia speciosa*.

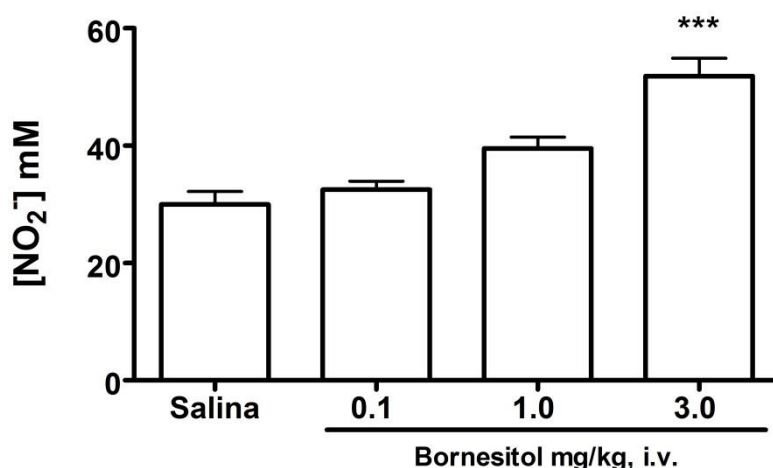
**Figura 7:** Efeito do bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 mg/Kg; i.v.) na pressão arterial sistólica (A-C), pressão arterial diastólica (D-F), pressão arterial média (G-I) e frequência cardíaca (J-L) de ratos Wistar normotensos. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM da diferença ( $\Delta$ ) entre a pressão arterial antes e após a administração do bornesitol em pelo menos cinco experimentos. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$  em relação à solução salina.



### 5.2.2 Efeito na concentração plasmática de nitrito

O efeito do bornesitol na produção de nitrito foi avaliado indiretamente pelo método de Griess. Observou-se um aumento significativo na concentração de nitrito apenas para os ratos tratados com a dose de 3,0 mg/kg (Figura 8).

**Figura 8:** Efeito do bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 mg/kg, i.v.) na concentração plasmática de nitrito de ratos Wistar normotensos. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 8 experimentos. \*\*\* P <0,001 em relação à solução salina.



O óxido nítrico (NO) desempenha um papel fundamental no sistema cardiovascular. NO modula o tônus vascular, diminui a adesão e a agregação de plaquetas, além de inibir o crescimento das células musculares lisas vasculares (MONCADA *et al.*, 1991; SCOTT-BURDEN & VANHOUTTE, 1994, MATTIAS *et al.*, 2015). Na hipertensão arterial, a redução na produção de NO é uma característica associada à disfunção endotelial (LINDER *et al.*, 1990; SENA *et al.*, 2013). O aumento na produção de NO induzido por produtos naturais resulta em melhoria da função hemodinâmica, reduzindo a formação de trombos e a disfunção endotelial (WOLLNY *et al.*, 1999; SENA *et al.*, 2013). Além disso, o aumento na produção ou biodisponibilidade do NO reduz a produção de dimetilarginina assimétrica, um inibidor do óxido nítrico sintase (NOS), e a disfunção endotelial associada à hipercolesterolemia (VLADIMIROVA-KITOVA *et al.*, 2008; STAPLETON *et al.*, 2010). Portanto, fica evidente a importância do NO na proteção do sistema cardiovascular e na prevenção de comorbidades associadas à hipertensão.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato de folhas de *H. speciosa* induz um efeito vasodilatador dependente da produção de NO em aorta de rato (FERREIRA *et al.*, 2007b). *In vivo*, o extrato etanólico de folhas de *H. speciosa* apresentou atividade hipotensora, com aumento da concentração de nitrito plasmático em camundongos normotensos (SILVA *et al.*, 2011). Além disso, uma fração padronizada de folhas de *H. speciosa*, rica em bornesitol e rutina, apresentou efeito anti-hipertensivo em camundongos hipertensos, cujo mecanismo de ação resulta da redução na resistência vascular periférica, por meio da produção de NO em artérias mesentéricas (SILVA *et al.*, 2016). Já em um estudo *ex-vivo* com artérias mesentéricas de ratos Wistar, o mecanismo envolvido na ativação da produção de NO induzido pelo bornesitol foi caracterizado como dependente da ativação do complexo cálcio-calmodulina (CÂMARA, 2015). Estes resultados demonstram a importância do NO no mecanismo da ação anti-hipertensiva do extrato de folhas de *H. speciosa*. Portanto, sendo o bornesitol o constituinte majoritário deste extrato, os resultados do presente trabalho demonstram que este composto possui uma atividade biológica compatível com o efeito hipotensor observado com o extrato de *H. speciosa*. Desta forma, chegamos à conclusão que o bornesitol pode ser considerado um marcador ativo importante para a atividade anti-hipertensiva do extrato etanólico de folhas de *H. speciosa*.

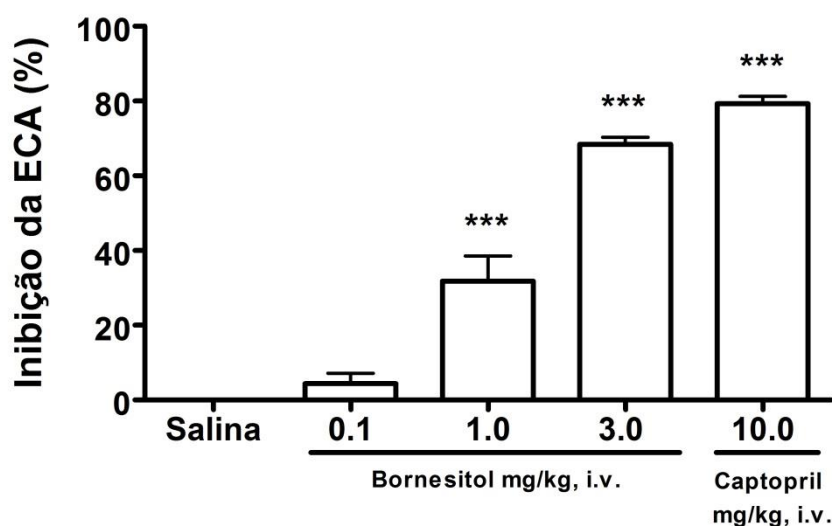
### 5.2.3 Efeito na atividade da ECA

O papel do sistema renina-angiotensina (SRA) na fisiopatologia e desenvolvimento de muitas doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, está bem estabelecido (VARK *et al.*, 2012, BRUGTS *et al.*, 2015). O uso de antagonistas dos receptores da angiotensina (aRA) e de inibidores da ECA (iECA) constitui uma estratégia terapêutica eficaz no controle da hipertensão (FERRARI & ROSANO, 2013 e MERCIER *et al.*, 2014). A utilização de iECA preserva a bradicinina, um peptídeo vasodilatador, contribuindo para proteção de lesões vasculares e isquêmicas. Esta proteção não é observada com os antagonistas de receptores de angiotensina (aRA), que contribuem para o aumento da concentração de angiotensina II (Ang II) circulante, resultando em apoptose de células endoteliais e inflamação, além do aumento da resistência vascular periférica associado ao potente efeito vasoconstritor da Ang II (MATCHAR *et al.*, 2008; VARK *et al.*, 2012).



Tendo em vista a relação entre o SRA e a hipertensão, avaliamos o efeito da administração de bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 mg/Kg) sobre a atividade da ECA em ratos Wistar normotensos. Observamos uma inibição dose-dependente da atividade plasmática da ECA, conforme representado na figura 9. A dose mais elevada (3,0 mg/Kg) promoveu uma inibição semelhante ao captopril, avaliado na dose de 10,0 mg/Kg.

**Figura 9:** Efeito do bornesitol (0,1, 1,0 e 3,0 mg/Kg, i.v.) na atividade plasmática da ECA de ratos Wistar normotensos. Captopril (10,0 mg/Kg) foi utilizado como controle positivo. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 8 experimentos. \*\*\* P <0,001 em relação à solução salina.



Anteriormente, demonstramos que o extrato etanólico de *H. speciosa* possui atividade inibitória da ECA (SERRA *et al.*, 2005) e que a administração oral desse extrato (3,0 mg/kg) a camundongos Swiss reduziu o nível plasmático de Ang II em  $56,6 \pm 2,7\%$ , em comparação com o grupo controle (SILVA *et al.*, 2011).

Endringer e colaboradores (2014) relataram o efeito inibidor da ECA *in vitro* induzido pelo bornesitol, com  $CI_{50}$  de  $41,4 \pm 9,6 \mu M$ . Os autores realizaram ensaios *in silico* pela técnica de ancoragem molecular com ciclitóis e carboidratos para averiguar como os compostos ativos interagem com a ECA humana, visando identificar regiões de ligação dos compostos ativos na enzima. O bornesitol apresentou uma constante de inibição ( $K_i$ ) de  $25,3 \mu M$  e os autores sugerem que ele se ligue a uma região distinta da enzima do sítio de ligação dos inibidores clássicos. Geralmente os inibidores de ECA se unem a sítios catalíticos homólogos, *N*-ECA

terminal (amino-terminal ECA) e C-ECA terminal (carboxila-terminal ECA), contendo regiões específicas para ligação do  $Zn^{2+}$ , o que facilita o ataque nucleofílico pela molécula de água à carbonila do substrato no sítio C-ECA terminal (HOOPER & TURNER, 2003; TZAKOS *et al.*, 2003).

A partir do efeito inibitório da ECA induzido por outros ciclitóis e açúcares, Endringer e colaboradores (2014) preconizaram que a atividade inibitória do bornesitol estaria relacionada ao número de hidroxilas e à presença de hidroxila em posição axial vicinal a carbono com substituinte metoxila. Portanto, os resultados *in vitro* anteriores e os dados *in vivo* aqui relatados apontam para o bornesitol como um composto promissor, pois é o primeiro trabalho *in vivo* sobre os efeitos cardiovasculares do bornesitol. Vale lembrar que o bornesitol é um ciclitol e os ciclitóis estão presentes em diferentes tipos de plantas medicinais, exercendo efeitos fisiológicos, farmacológicos e regulando processos celulares como o metabolismo lipídico (BENJAMIN *et al.*, 2014). Os dados clínicos obtidos para a terapia combinada de mio-inositol mais D-chiro-inositol revelaram uma melhora no perfil metabólico de mulheres com a síndrome do ovário policístico, com redução significativa de riscos cardiovasculares (MINOZZI *et al.*, 2013). Portanto, ciclitóis com estruturas químicas semelhantes ao bornesitol provocam um efeito indireto no sistema cardiovascular, regulando o metabolismo lipídico. Moreira e colaboradores (2018) relataram que o pinitol, um diastereoisômero do bornesitol, apresenta um efeito vasodilatador dependente do endotélio e do NO por um mecanismo de ação envolvendo a cálcio-calmodulina por ativação complexa da eNOS o que pode ser responsável por seu efeito hipotensivo visto em camundongos C57BL/6. O efeito direto do bornesitol no sistema cardiovascular é uma observação relevante para o entendimento da ação de plantas medicinais com efeitos cardiovasculares benéficos, bem como para o desenvolvimento de novos fitoterápicos e complementos alimentares visando à prevenção de comorbidades associadas a doenças cardiovasculares. Estes resultados acrescentam novo valor ao conteúdo de bornesitol em plantas medicinais e alimentos funcionais com efeitos benéficos no sistema cardiovascular. Esses resultados também demonstram que o bornesitol é um marcador ativo para a atividade biológica de *H. speciosa* no sistema cardiovascular, podendo ser considerada uma nova classe de inibidores da ECA.

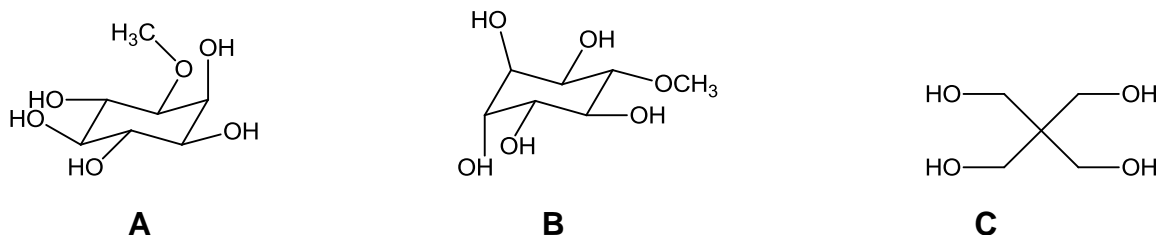
### 5.3 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação do bornesitol

A fim de desenvolver um método bioanalítico para quantificar o bornesitol, a ser empregado no estudo farmacocinético, inicialmente avaliaram-se as características físico-químicas deste ciclitol e de substâncias a serem utilizadas como padrão interno.

O bornesitol (figura 8) é uma substância de alta polaridade, que apresenta massa molar de 194,183 g/mol,  $\log P_{\text{octanol/água}}$  de -3,2 e pKa de 12,36 (PUBCHEM, 2019). A escolha do padrão interno tem importância fundamental para o êxito das análises. Algumas características devem ser consideradas na seleção do padrão interno: apresentar propriedades físico-químicas semelhantes ao analito, estar disponível comercialmente, apresentar alta estabilidade química durante o processo extrativo e as análises, exibir condições de ionização semelhantes ao analito, não interferir no processo de doseamento do analito e não estar originalmente presente na amostra a ser analisada (BRONSEMA *et al.*, 2012).

Inicialmente foi escolhido o pinitol como padrão interno, um diastereoisômero do bornesitol e que apresenta propriedades físico-químicas idênticas ao bornesitol. No entanto, o uso do pinitol foi descartado devido à presença desse analito no plasma dos animais, proveniente da ração usada na alimentação, conforme relatado por Bates e colaboradores (2000). Desta forma, o padrão interno escolhido foi o pentaeritritol (figura 8), que fora anteriormente utilizado por nosso grupo de pesquisa, para quantificação do bornesitol por HPLC-DAD após derivatização com cloreto de *p*-toluenosulfonila (PEREIRA *et al.*, 2012). Essa substância possui massa molar de 136,147 g/mol, pKa de 14,30 e  $\log P_{\text{octanol/água}}$  de -2,74 (Figura 10) (PUBCHEM, 2019).

**Figura 10:** Estruturas químicas do L-(+)-bornesitol (A), D-pinitol (B) e pentaeritritol (C).



O modo de aquisição no espectrômetro de massas escolhido para quantificar o bornesitol foi o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), no qual os quadropolos filtram apenas o íon precursor e os fragmentos gerados na câmara de colisão (IGLESIAS, 2012; AWADA *et al.*, 2015). A padronização do método MRM foi feita por meio da injeção direta no espectrômetro de massas da solução padrão de bornesitol e do padrão interno (descritos no item 4.7.1.1 e 4.7.1.2). O modo de ionização negativo (ESI<sup>-</sup>) foi definido por apresentar maior sensibilidade e estabilidade dos íons formados.

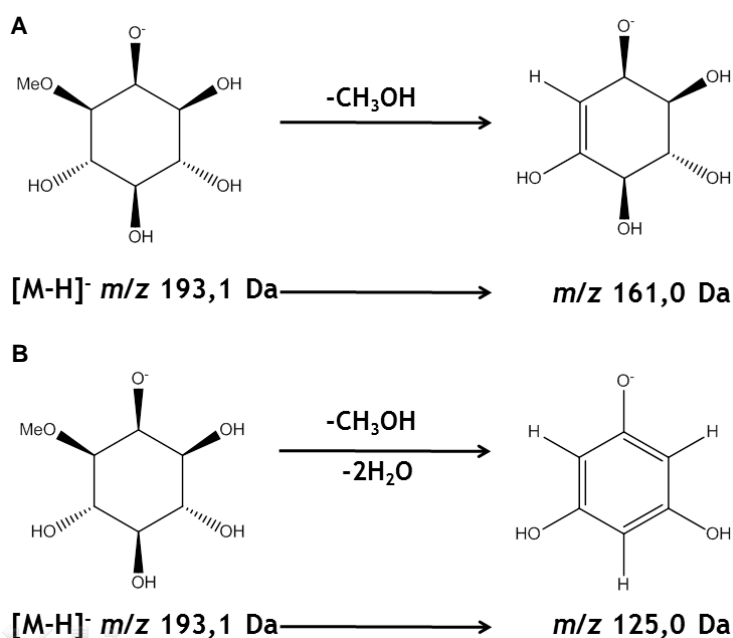
O processo de padronização é dinâmico e foi otimizado em tempo real no espectrômetro de massas pela variação dos diferentes parâmetros de ionização, dispostos na tabela 2 (item 4.7.1.1). A escolha do modo ESI negativo é sustentada pela literatura, visto que um método semelhante foi aplicado na quantificação de inositóis como o mio-inositol em amostra de tecido cerebral de rato (KINDT *et al.*, 2004), bem como de mio-ionositol e *D*-quiro-inositol em amostras de urina humana (KIM *et al.*, 2012). A otimização no modo positivo também foi testada; no entanto, com a fase móvel empregada, foi observada uma menor sensibilidade na análise, apesar de relatos da utilização deste modo de ionização para quantificação de mio-inositol em amostras de cérebro de camundongo (BATHENA *et al.*, 2012) e em soluções com fase móvel de pH elevado (RAINVILLE *et al.*, 2012).

Adicionalmente, durante a otimização do método de MRM, os parâmetros voltagem do capilar, voltagem do cone, temperatura da fonte, temperatura do gás de dessolvatação, entre outros, foram otimizados a fim de melhorar a eficiência de ionização da dessolvatação, visando uma maior transferência de íons gerados para dentro do sistema de vácuo. Todas as condições foram ajustadas visando garantir uma potencialização da resposta. Com os espectrômetros de massas atuais, o método MRM é utilizado normalmente para monitorar simultaneamente dois fragmentos do analito (STOLKER *et al.*, 2000), o que aumenta a sensibilidade, a seletividade e a eficiência do método bioanalítico.

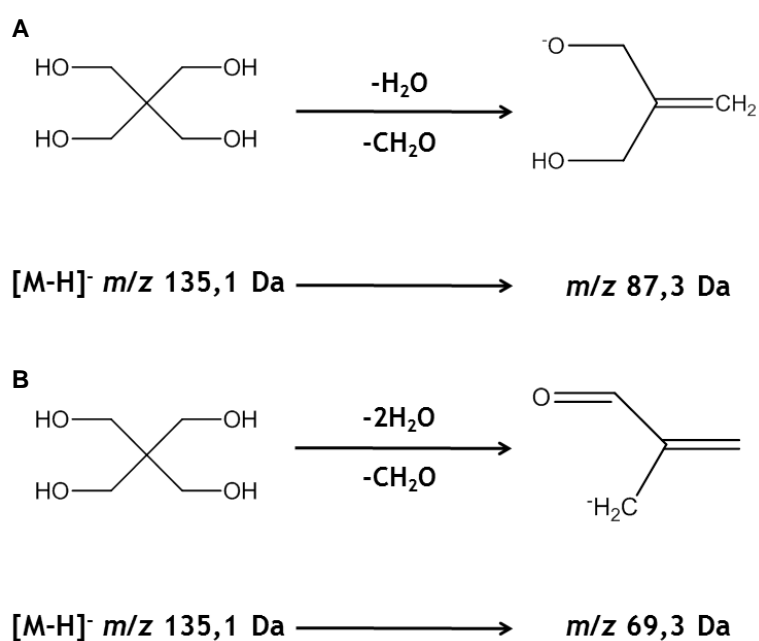
No caso da quantificação do bornesitol, foram padronizadas duas transições, uma específica, que corresponde à perda de CH<sub>3</sub>-OH ( $m/z$  193,1→161,0 Da) – Transição 1, e outra inespecífica, atribuída à perda CH<sub>3</sub>-OH e 2H<sub>2</sub>O ( $m/z$  193,1→125,0 Da) – Transição 2 (Figura 11). Já, no caso do pentaeritritol a transição específica utilizada correspondente à perda de H<sub>2</sub>O e CH<sub>2</sub>O ( $m/z$  135,1→87,3 Da) – Transição 1, enquanto à de confirmação ( $m/z$  135,1→69,3 Da) – Transição 2,

correspondente a perda de  $2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_2\text{O}$  (Figura 12). Nos métodos analíticos quantitativos, a primeira transição é utilizada para a quantificação, e a segunda para confirmação (IGLESIAS, 2012; AWADA *et al.*, 2015).

**Figura 11:** Propostas de fragmentação do bornesitol para as transições  $m/z$  193,1  $\rightarrow$  161,0 Da (A) e  $m/z$  193,1  $\rightarrow$  125,0 Da (B).



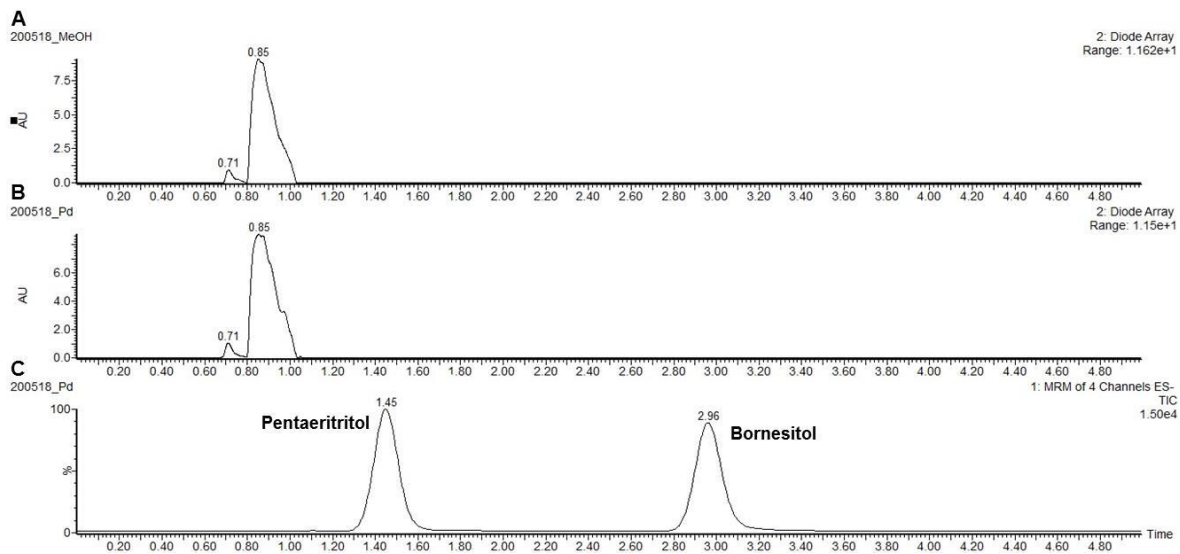
**Figura 12:** Propostas de fragmentação para as transições  $m/z$  135,1  $\rightarrow$  87,3 Da (A) e 135,1  $\rightarrow$  69,3 Da (B).



O cromatograma obtido com detecção no DAD na região de 190-500 nm para a solução padrão de bornesitol e pentaeritritol (Figura 13) apresenta apenas picos presentes no metanol (solvente utilizado para solubilizar o bornesitol), uma vez que os analitos não apresentam grupos cromóforos que possibilitem sua detecção no UV (PEREIRA *et al.*, 2012). Já o cromatograma obtido pelo método MRM apresenta um pico referente ao bornesitol, com tempo de retenção (TR) de 2,9 min, e outro do pico do pentaeritritol, com TR de 1,5 min. Adicionalmente, foram realizadas análises no modo *Scan*, que apresenta a contagem total dos íons (*Total Ions Count - TIC*), sendo observado um pico com o mesmo tempo de retenção obtido no modo MRM. O espectro de massas obtido no tempo de retenção referente ao bornesitol mostra as duas transições selecionadas no modo MRM. A análise no modo *Scan* com ionização negativa apresentou o íon desprotonado em  $m/z$  193 Da  $[M - H]^-$ , bem como um fragmento em  $m/z$  161 Da  $[M - H - CH_3OH]^-$  (Figura 14 A). Já na figura 14 B, pode-se observar a transição iônica compatível com a quantificação, ou seja, o espectro de fragmentação com a formação do íon produto supracitado em  $m/z$  161 Da. O *Scan* no modo positivo não produziu íons suficientemente estáveis para a quantificação.

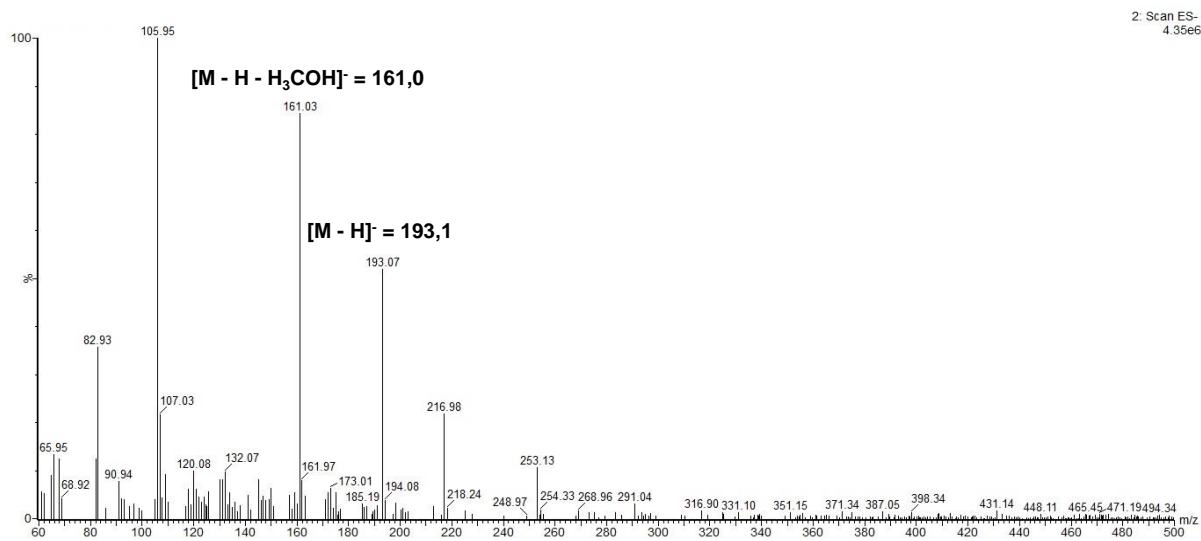
De forma semelhante foram realizadas análises no modo *Scan* para o pentaeritritol, utilizado como padrão interno no método bioanalítico (Figura 15). Observa-se no *Scan*, no modo negativo de ionização, o sinal do íon desprotonado em  $m/z$  135 Da  $[M - H]^-$ , (Figura 15 A). Por sua vez, na figura 15 B observa-se a transição iônica compatível com a quantificação, ou seja, o espectro de fragmentação com o íon produto de  $m/z$  87 Da e 69 Da. Da mesma forma que o bornesitol, o *Scan* no modo positivo para o pentaeritritol, não produziu íons suficientemente estáveis para a quantificação.

**Figura 13:** Cromatogramas, obtidos com detecção no DAD ( $\lambda$  190 – 500 nm), para o metanol (branco) (A) e solução metanólica de bornesitol com pentaeritritol (B), e cromatograma obtido com detecção no espectrômetro de massas em modo MRM (C) para bornesitol (TR 2,9 min) e pentaeritritol (TR= 1,4 min).

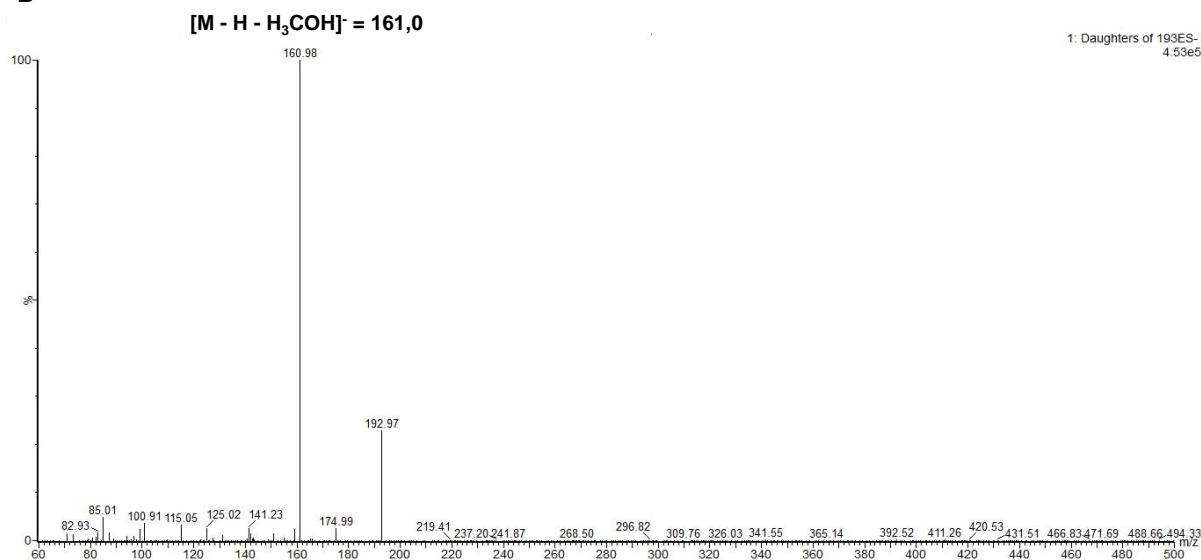


**Figura 14:** Espectro de massas obtido *on line* no modo Scan ESI<sup>-</sup> para bornesitol (A) e íon produto de  $m/z$  193 Da (B), destacando os íons identificados.

**A**

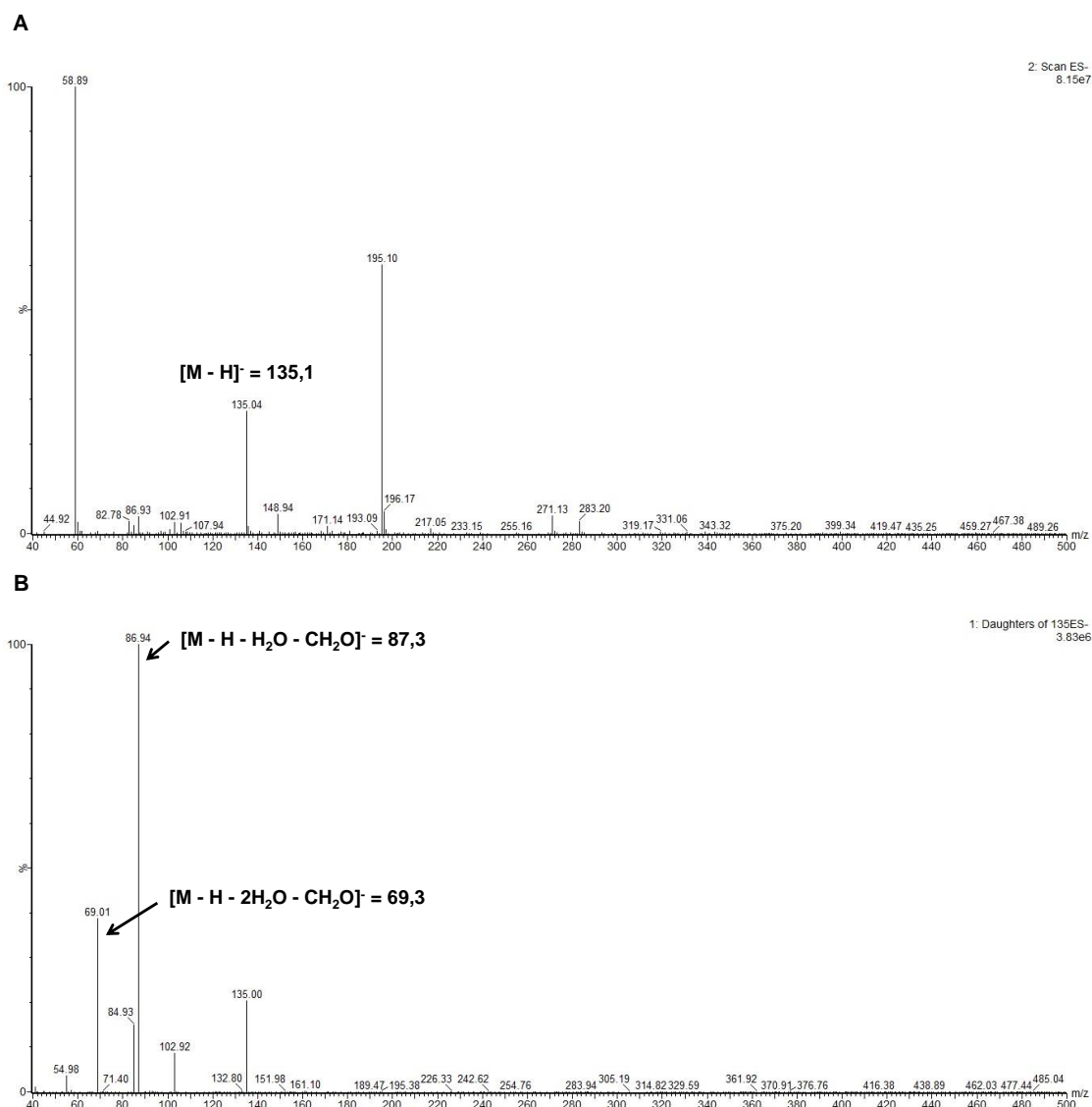


**B**





**Figura 15:** Espectro de massas obtido *on line* no modo *Scan ESI<sup>-</sup>* para pentaeritritol (A) e íons produtos de  $m/z$  135 Da (B) para o pentaeritritol, destacando os íons identificados.



### 5.3.1 Otimização das condições cromatográficas do método bioanalítico para estudo farmacocinético

As condições cromatográficas descritas anteriormente no item 4.7.1.2 foram otimizadas. A relação entre o tampão e o modificador orgânico foi otimizada objetivando obter análises de alta sensibilidade, rápidas, reprodutíveis e com menor efeito matriz possível (NIESSEN, 2006). A literatura relata que colunas de sílica quimicamente modificadas com grupos amida são estáveis, resistentes a uma ampla faixa de pH, eficientes e com boa reprodutibilidade, o que sustenta a escolha desta coluna no presente trabalho (LIU *et al.*, 2005; GHFAR *et al.*, 2015).

A otimização das condições cromatográficas teve início pela injeção de uma solução contendo uma mistura de bornesitol e pentaeritritol com concentrações de 10 µg/mL cada. O preparo desta solução de injeção consistiu na adição de 20 µL da solução estoque de bornesitol (200 µg/mL em MeOH) e 20 µL de solução estoque de pentaeritritol (200 µg/mL em MeOH) a 160 µL de plasma.

No processo de otimização das condições cromatográficas do método bioanalítico foram testados, como fase móvel, a mistura de uma solução de acetato de amônio 5 mM pH 6,78 com dois modificadores orgânicos distintos, ACN e MeOH. O uso de ACN forneceu uma melhor resolução entre os picos do bornesitol e do pentaeritritol, utilizado como padrão interno. Foram testadas diferentes proporções do modificador orgânico MeOH; no entanto, não foi obtida uma resolução satisfatória, diferente do relatado na literatura por Flores e colaboradores (2011) para quantificação de mio-inositol em leite.

A próxima etapa da otimização consistiu em variar a proporção de ACN e da solução de acetato de amônio visando obter um tempo de corrida curto, com boa resolução, e maior seletividade e intensidade dos picos. Foram testadas as seguintes proporções de acetato de amônio/ACN: 20:80, 25:75 e 35:65 v/v. O eluente com 80% ou 75% de modificador orgânico (ACN) apresentou melhor seletividade e intensidade dos picos. Desta forma, optou-se por utilizar a proporção de acetato de amônio/ACN (25:75 v/v) visando um menor consumo de ACN. O cromatograma da solução padrão de bornesitol contendo o padrão interno pentaeritritol, obtido nesta condição, está representado na Figura 9C.

### **5.3.2 Preparo da amostra para o método bioanalítico**

A etapa de preparação de amostra em métodos bioanalíticos tem grande importância nos fatores sensibilidade e seletividade. Desta forma, a eficiência do método extrativo de amostras complexas é avaliada a partir da seletividade obtida, taxa de recuperação elevada e baixo efeito matriz (STAHNKE *et al.*, 2012).

Dentre as técnicas clássicas existentes de preparo de amostra foram testadas, no presente trabalho, a extração líquido-líquido (ELL) e a extração por precipitação de proteínas (EPPr). O uso da extração em fase sólida (EFS) não foi inicialmente considerado devido seu maior custo em relação aos demais métodos. Como na literatura não existe nenhum método bioanalítico que tenha utilizado

bornesitol como analito, optou-se por testar algumas metodologias propostas para outros inositóis.

ELL foi testada inicialmente conforme proposto por Yamashita e colaboradores (2013) para a extração de mio-inositol, D-qui-ro-inositol e scillo-inositol em amostras de plasma de camundongos ICR com uma mistura de água / clorofórmio / MeOH (2:2:5). Ao realizar a extração do bornesitol com essa mistura, obtivemos uma solução turva após a reconstituição com MeOH, com a presença de um resíduo insolúvel e baixa recuperação do analito (21%).

Na sequência, foi testado a EPPr, tendo como base o método proposto por Leung e colaboradores (2011), que consiste na precipitação de proteínas com ACN e posterior reconstituição da amostra seca em MeOH. Essa metodologia apresentou-se bastante eficiente e após alguns ajustes foram obtidas taxas de recuperação do bornesitol superiores a 90%. A ACN é um dos principais agentes precipitantes de proteínas citados na literatura, juntamente com o sulfato de zinco e o ácido tricloroacético (POLSON *et al.*, 2003). Para a purificação de amostras biológicas complexas emprega-se um desses agentes precipitantes, principalmente a ACN, na proporção de 2:1 (2 partes de ACN e 1 parte de plasma), os quais promovem a precipitação de proteínas plasmáticas com taxas superiores a 90%, além de apresentar uma reprodutibilidade excelente. A escolha do agente precipitante depende das características físico-químicas do analito a ser quantificado (POLSON *et al.*, 2003).

Os resultados de ensaios de recuperação do padrão interno avaliado no presente trabalho (pentaeritritol), a partir de extração do plasma por EPPr são apresentados na tabela 6. Nota-se uma baixa taxa de recuperação do pentaeritriol. A recuperação refere-se à eficiência de extração de um método bioanalítico e não há limites para aprovação. Portanto, não é necessário que a recuperação seja 100%, mas é desejável que as taxas de recuperação dos analitos e dos PIs sejam precisas, consistentes, reprodutíveis e compatíveis com os experimentos realizados. O padrão interno selecionado foi o pentaeritritol conforme discutido no item 5.3. (BRASIL, 2003b; FDA, 2013).

**Tabela 6:** Taxas de recuperação de pentaeritritol avaliado como padrão interno no método bioanalítico, após extração do plasma por precipitação de proteínas. Os resultados representam a média de 3 experimentos.

Pentaeritritol 10 µg/mL	Recuperação %	Média	DP	DPR (%)
1	33,4	33,2	0,4	1,1
	32,9			
2	30,3	31,0	1,0	3,1
	31,6			
3	31,7	31,3	0,6	1,9
	30,9			

Outra variável padronizada no método bioanalítico foi à definição do solvente para solubilização das amostras para análise no sistema de LC-MS. Foram testados água, metanol e a misturas destes diluentes na proporção de 1:1, procedendo-se à avaliação da estabilidade das soluções 24 h após a primeira injeção e os resultados obtidos estão dispostos na tabela 7. Na padronização de métodos bioanalíticos é necessário avaliar a estabilidade das soluções do analito e do padrão interno durante um período determinado (BRASIL, 2003b).

As áreas dos picos de bornesitol obtidas para soluções analisadas no momento do preparo e 24 horas depois foram avaliadas pelo *Teste t*, sendo observada diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) para a amostra diluída em água/metanol (1:1). Dessa forma, o uso desse diluente foi excluído. Bornesitol apresentou boa estabilidade quando diluído em água ou metanol, visto que não se observaram diferenças estatísticas nas médias das áreas avaliadas entre dias consecutivos e o DPR, nas condições testadas, está dentro do permitido pelo guia brasileiro, europeu e americano (BRASIL, 2003b; EMA, 2011; FDA, 2013). A partir desses resultados, metanol foi selecionado como solvente para solubilização das amostras.

**Tabela 7:** Avaliação do diluente dos analitos na solução estoque. Água (A), Água e metanol 1:1 (B) e Metanol (C). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 3 experimentos \*  $P < 0,05$ .

Analito	Diluyente	1º dia			2º dia			Análise estatística	
		Área média	DP	DPR (%)	Área média	DP	DPR (%)	<i>Test t</i>	
Bornesitol 10 µg/mL	Água	588,3	27,01	4,59	552,3	10,07	1,82	P = 0,0965	=
Bornesitol 10 µg/mL	Água/MeOH	631,0	10,82	1,71	595,3	18,01	3,03	P = 0,0424	=
Bornesitol 10 µg/mL	MeOH	594,7	6,81	1,14	613,3	11,02	1,80	P = 0,0670	=

Outro parâmetro analisado foi o tempo e a temperatura de secagem da amostra na centrífuga a vácuo. Os dados da tabela 8 indicam que o aumento da temperatura de secagem ocasionou uma diminuição na taxa de recuperação dos analitos com menor concentração. Esse resultado indica que nessas condições possa haver degradação dos analitos, principalmente no caso de temperaturas mais elevadas.

**Tabela 8:** Influência da temperatura e tempo de secagem na recuperação do bornesitol. Os resultados representam 1 experimento.

Bornesitol (µg/mL)	Temperatura da centrífuga a vácuo / recuperação do bornesitol (%)				
	30°C	40°C	45°C	50°C	55°C
5	92,4	81,7	79,8	78,0	50,3
10	96,0	94,7	106,7	93,1	88,4
20	101,3	94,7	103,3	94,7	88,9
Tempo-secagem (h)	3,5	3,2	2,9	2,5	2,2

Com base nos resultados dos ensaios anteriores, o procedimento definido para o preparo da amostra de solução padrão de bornesitol (10 µg/mL) e do padrão interno pentaeritritol (10 µg/mL) compreende as seguintes etapas:

- a) Adição de 20 µL de solução de bornesitol (20 µg/mL, MeOH) em microtubo plástico de 2,0 mL do tipo *safe-lock*;
- b) Adição de 20 µL de solução de pentaeritritol (20 µg/mL, MeOH) no microtubo anterior;
- c) Secagem em centrífuga à vácuo à 30°C /1h;
- d) Adição de 160 µL de plasma no microtubo e agitação em vórtex por 1 minuto;
- e) Adição de 400 µL de ACN, agitação em vórtex por 1 minuto, seguida de centrifugação a 9184 g por 5 minutos;
- f) Reserva de 410 µL do sobrenadante em outro microtubo plástico de 2,0 mL do tipo *safe-lock* (tubo 1);
- g) Adição de 100 µL de água ao precipitado resultante e sonicação por 5 minutos;
- h) Adição de 200 µL de ACN, agitação em vórtex por 30 segundos, sonicação por 5 minutos e centrifugação a 9184 g por 5 minutos;
- i) Recolhimento de 300 µL do sobrenadante e adição no tubo 1;
- j) Secagem em centrífuga a vácuo a 30°C por 4 h;
- k) Reconstituição com 400 µL de MeOH, agitação em vórtex por 1 minuto, sonicação por 5 minutos, centrifugação a 9184 g por 5 minutos, e filtração em filtro de 0,22 µm.

A partir da padronização do método extrativo com recuperação superior a 80% (Tabela 9) e otimização das condições cromatográficas e espectrométricas, procedeu-se à validação bioanalítica, tendo como objetivo final aplicar o método na avaliação farmacocinética do bornesitol, após administração intravenosa e oral em ratos Wistar.

**Tabela 9:** Taxa de recuperação de diferentes concentrações de bornesitol em plasma, após procedimento de preparo de amostra estabelecido.

Concentração nominal (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DP	DPR (%)
5	4,59	91,8	84,2	0,2	5,1
	4,21	84,3			
	4,10	82,0			
	4,00	79,9			
	4,06	81,1			
	4,29	85,8			
	8,29	82,9			
10	8,97	89,7	87,4	0,3	3,6
	8,62	86,2			
	8,56	85,6			
	8,81	88,1			
	9,18	91,8			
	19,06	95,3			
	19,52	97,6			
20	18,05	90,2	92,3	1,1	5,9
	16,47	82,4			
	19,06	95,3			
	18,58	92,9			

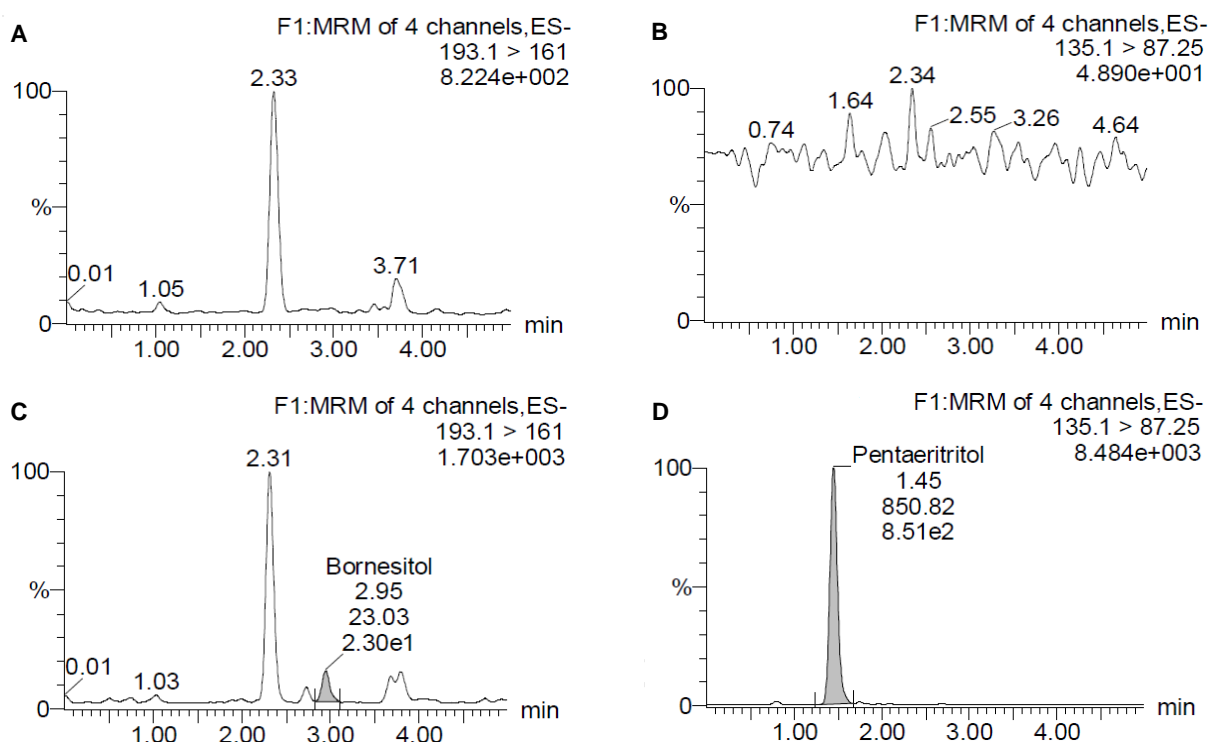
#### 5.4 Validação do método bioanalítico para quantificação do bornesitol em plasma de rato

Após o desenvolvimento do método foi realizada a validação, descrita nos itens 5.4.1 a 5.4.8 a seguir. As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque de bornesitol na concentração de 100.000 ng/mL em MeOH e solução estoque de pentaeritritol na concentração 5.500 ng/mL em MeOH. Foi realizada a validação bioanalítica segundo protocolo descrito no item 4.7.3.

### 5.4.1 Seletividade

A utilização de um método bioanalítico não seletivo pode acarretar em um resultado com uma concentração maior do que o valor real. A seletividade do método foi avaliada a partir da comparação com o plasma branco e pela presença de eventuais interferentes com a mesma relação massa/carga dos íons monitorados para o bornesitol ( $m/z$  193,1 $\rightarrow$ 161,0 Da) e o pentaeritritol ( $m/z$  135,1 $\rightarrow$ 87,3 Da). Os resultados obtidos atestam a seletividade do método, devido à ausência de picos de interferentes nos cromatogramas das soluções branco, com mesma relação massa / carga do bornesitol ou do pentaeritritol (figura 16A e 16B). No cromatograma do branco (figura 16A) se observam dois picos com a transição  $m/z$  193,1 $\rightarrow$ 161,0 Da, porém com TRs diferentes do bornesitol. Um método é considerado seletivo quando a resposta dos interferentes é inferior a 20% e 5% da amostra limite inferior de quantificação (LIQ) do analito e PI respectivamente (Figura 16C e 16D) (BRASIL, 2003b; EMA, 2011). Dessa forma, o método desenvolvido pode ser considerado seletivo.

**Figura 16:** Cromatogramas obtidos para amostras branco (Bornesitol, **A** e Pentaeritritol, **B**) e para amostra LIQ (Bornesitol, **C** e Pentaeritritol, **D**).



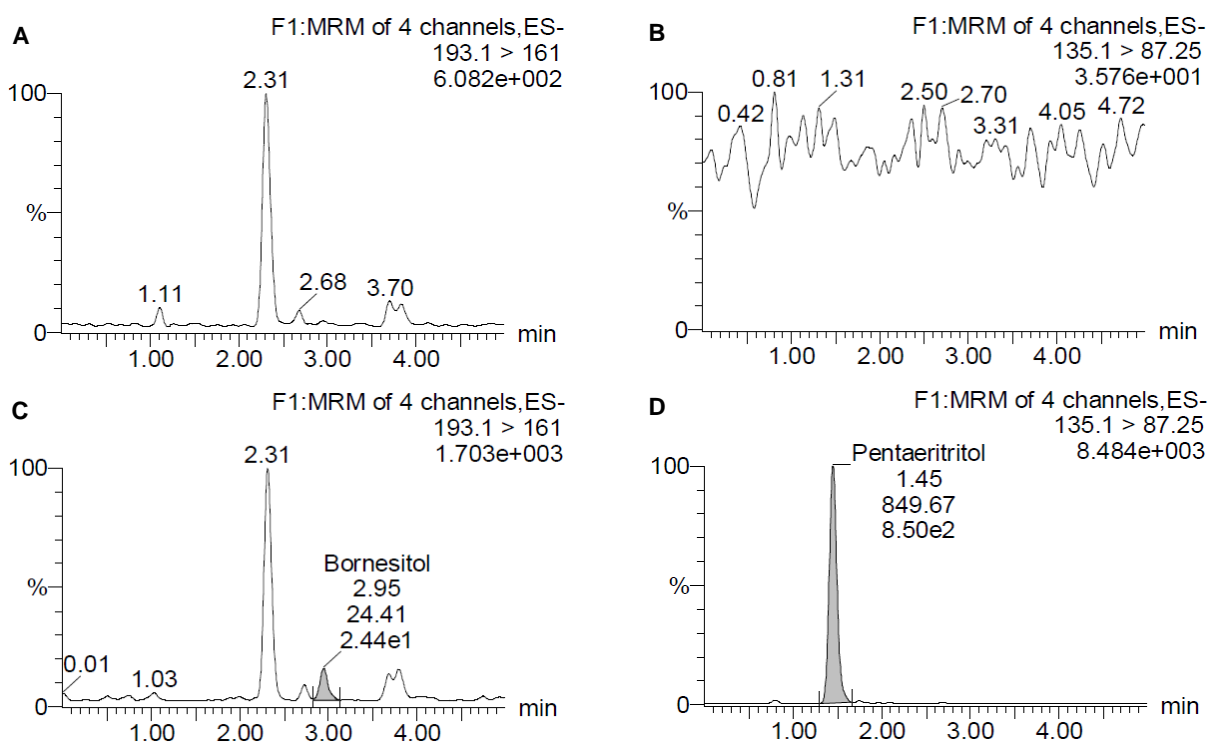


### 5.4.2 Efeito residual ou *carry-over*

O teste de efeito residual ou *carry-over* foi realizado seguindo a ordem de injeção das amostras no equipamento. Conforme indicado nas figuras 17A e 17B não se observaram picos de bornesitol e pentaeritritol na amostra branco injetada após a amostra controle de qualidade (CQD). A amostra LIQ (figura 17C e 17D) foi utilizada como padrão para a quantificação caso algum pico viesse a aparecer com a mesma transição  $m/z$  do bornesitol e pentaeritritol na amostra branco (Figura 17C e 17D). Um método é considerado sem *carry over* quando a resposta dos interferentes é inferior a 20% e 5% do LIQ do analito e PI respectivamente (BRASIL, 2003b; EMA, 2011).

Para evitar a ocorrência de efeito residual, após a injeção de cada amostra, a agulha do injetor foi lavada internamente com dois ciclos de 1000  $\mu\text{L}$  de uma solução *Weak Wash* (água / metanol 80:20) e externamente com um ciclo de 1000  $\mu\text{L}$  de solução *Strong Wash* (acetonitrila / metanol / isopropanol / água 50:20:15:15). A ausência de efeito residual no método foi confirmada durante a validação bioanalítica.

**Figura 17:** Cromatogramas, obtidos para amostras branco (Bornesitol, **A** e Pentaeritritol, **B**) e para uma amostra LIQ (Bornesitol, **C** e Pentaeritritol, **D**) após injeção de amostra CQD.



### 5.4.3 Efeito matriz

O efeito matriz acontece quando substâncias inerentes a matriz coeluem juntamente com o analito de interesse, comprometendo a eficiência da ionização (TAYLOR, 2005). O efeito matriz foi avaliado pelo coeficiente de variação do fator de matriz normalizado (FMN) nas amostras controle de qualidade alta (CQA) e amostra controle de qualidade baixa (CQB) com o FMN das amostras em solução. O FMN corresponde à divisão da resposta do analito em matriz pela resposta do padrão interno (PI) em matriz, divididos pela resposta do analito em solução pela resposta do PI em solução, conforme descrito na Parte Experimental item 4.7.3.3. O coeficiente de variação dos FMNs relativos de todas as amostras foi muito inferior ao valor de 15% estabelecido pela legislação (BRASIL, 2003b; EMA, 2011) (Tabela 10).

**Tabela 10:** FMN<sub>BOH/PENT</sub> obtidos a partir dos resultados do ensaio de efeito matriz com as amostras CQB e CQA.

	CQB			CQA		
	Matriz (FMN)	Solução (FMN)	CV (%)	Matriz (FMN)	Solução (FMN)	CV (%)
	0,052	0,029	2,321	1,493	1,021	1,627
	0,074	0,026	3,304	1,557	0,892	1,696
	0,090	0,018	4,018	1,634	0,974	1,780
	0,066	0,020	2,946	1,542	0,907	1,680
	0,072	0,019	3,214	1,578	0,795	1,719
	0,045		2,009	1,669		1,818
	0,066		2,946	1,811		1,973
	0,064		2,857	1,500		1,634
	0,070		3,125	1,634		1,780
	0,058		2,589	1,627		1,773
	0,047		2,098	1,657		1,805
	0,066		2,946	1,526		1,663
Média	0,064	0,022		1,602	0,918	
CV <sub>médio</sub> (%)			2,865			1,746

Em que:

FMN: Fator de matriz normalizado; CQB: Amostra controle de qualidade baixa (100 ng/mL); CQA: Amostra controle de qualidade alta (4000 ng/mL)

#### 5.4.4 Linearidade

A curva de calibração é um modelo matemático que estabelece a relação entre a resposta do detector e a concentração do analito (EMA, 2011). Segundo a ANVISA (RDC 27/2012) e o guia europeu de validação de métodos bioanalíticos (2011), o modelo deve ser construído com no mínimo 5 concentrações. No presente trabalho, a curva foi constituída com as seguintes concentrações de bornesitol: amostra limite inferior de quantificação - LIQ (30 ng/mL), amostra controle de

qualidade baixa - CQB (100 ng/mL), amostra controle de qualidade média - CQM (2.000 ng/mL), amostra controle de qualidade alta - CQA (4.000 ng/mL) e amostra controle de diluição - CQD (5.000 ng/mL) além dos pontos de 500 ng/mL e 1000 ng/mL (Tabela 11 e Figura18).

A mais usual e recomendada para métodos bioanalíticos é a padronização pelo método do padrão interno, que consiste na adição de uma substância (“padrão interno”) de concentração fixa às soluções padrão de diferentes concentrações do analito. Esse procedimento permite avaliar a variação da resposta em função do preparo da amostra como a extração do analito na matriz e até mesmo a faixa de concentração extensa característica desses casos (CUADROS-RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Como mencionado anteriormente, pentaeritritol foi utilizado como padrão interno, sendo adicionado na concentração de 5.500 ng/mL a cada ponto da curva de calibração. A escolha da padronização para a construção da curva de calibração é definida de acordo com o tipo de amostra analisada.

O limite inferior de quantificação (LIQ) estabelecido para o método foi de 30 ng/mL cujo DPR foi inferior a 20%. Este valor é bem inferior àqueles relatados para outros métodos de quantificação de ciclois como, por exemplo, mio-inositol, que apresentou valor de 1,8 nmol/mL (324,3 ng/mL) em plasma de ratos Sprague–Dawley (FRIELER *et al.*, 2009) e 2,5  $\mu$ M (450.400 ng/mL rever o valor) em plasma e urina (LEUNG *et al.*, 2011). De acordo com os guias de validação bioanalítica, o LIQ é estabelecido quando o valor quantificado é preciso e exato, além da área do pico ser 5 vezes aquela do sinal da amostra branco e a resposta obtida não ser superior a 5% da  $C_{m\acute{a}x}$  (BRASIL, 2003b; EMA, 2011).

A linearidade das faixas de trabalho de 30 a 5.000 ng/mL para o bornesitol foi confirmada nas três curvas de calibração, após a verificação de, no mínimo, 75% dos pontos com desvios inferiores a 20% para o LIQ e a 15% para os demais níveis de concentração, para as três curvas de calibração. Não foram verificados quaisquer picos de interferentes nos TRs das substâncias com áreas superiores a 20% das áreas dos analitos no LIQ e a 5% das áreas dos PIs, nas amostras branco (Tabela 11 e Figura 18).

**Tabela 11:** Dados obtidos para construção das curvas analíticas de bornesitol.

Concentração nominal (ng/mL)	Razão das	Razão das	Razão das	Média	CV (%)
	áreas	áreas	áreas	Razão das	
	BOH/PENT	BOH/PENT	BOH/PENT	áreas	
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	BOH/PENT	
30	0,021	0,020	0,035	0,025	6,77
	0,021	0,019	0,310	0,117	9,88
100	0,049	0,047	0,070	0,055	8,53
	0,049	0,045	0,068	0,054	5,47
500	0,254	0,231	0,244	0,243	9,60
	0,239	0,241	0,282	0,254	1,78
1000	0,435	0,420	0,486	0,447	0,76
	0,436	0,470	0,455	0,454	9,09
2000	0,791	0,752	0,999	0,847	7,30
	0,825	0,764	1,022	0,870	8,36
4000	1,748	1,633	1,930	1,770	2,75
	1,708	1,741	1,816	1,755	4,10
5000	2,156	2,134	2,385	2,225	0,55
	2,230	2,221	2,444	2,298	1,29

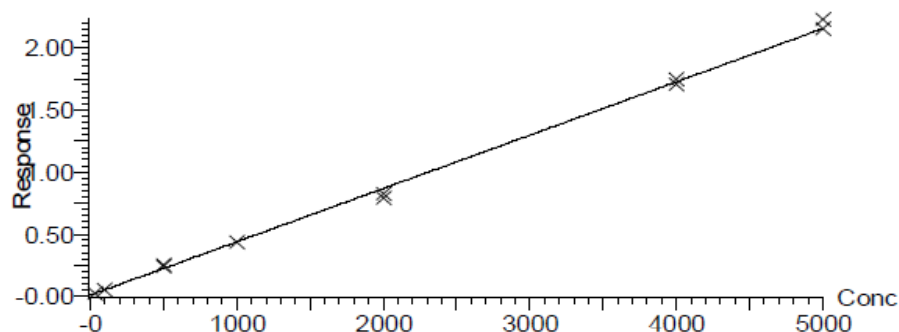
**Figura 18:** Curvas de calibração obtidas para bornesitol em dias diferentes.**A**

Compound name: Bornesitol

Correlation coefficient:  $r = 0.999111$ ,  $r^2 = 0.998222$ Calibration curve:  $0.000429462 * x + 0.00806536$ 

Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

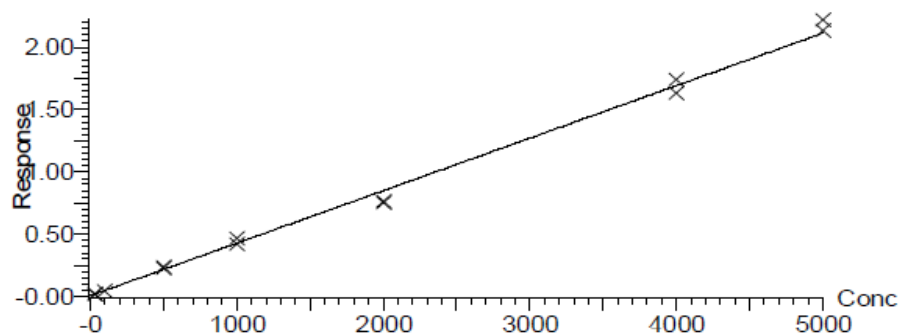
**B**

Compound name: Bornesitol

Correlation coefficient:  $r = 0.998090$ ,  $r^2 = 0.996184$ Calibration curve:  $0.000421425 * x + 0.00666278$ 

Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

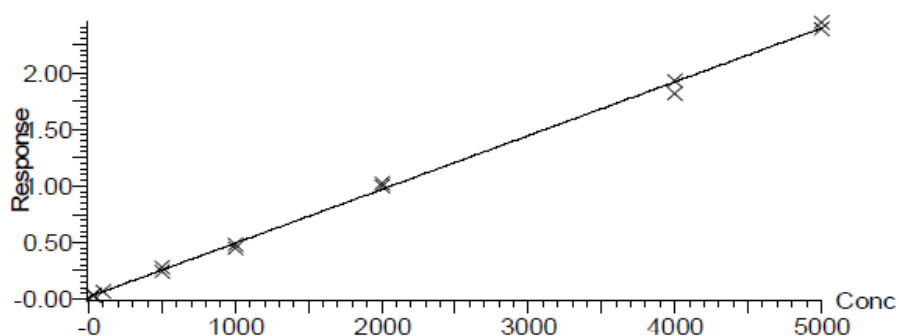
**C**

Compound name: Bornesitol

Correlation coefficient:  $r = 0.999175$ ,  $r^2 = 0.998350$ Calibration curve:  $0.000474764 * x + 0.0195827$ 

Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

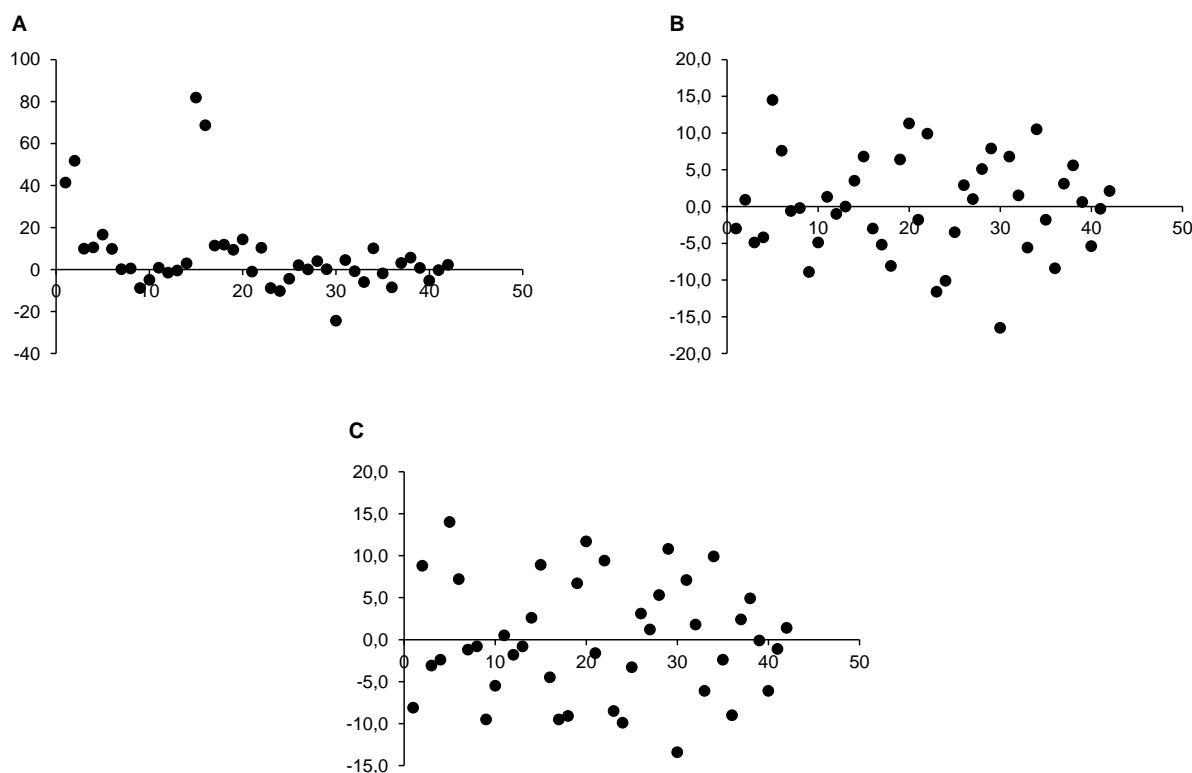


Em geral, os métodos bioanalíticos apresentam diversas etapas de tratamento da amostra. Para a quantificação do bornesitol no plasma em uma condição que não afetasse o bom funcionamento do equipamento, foi necessário utilizar procedimentos de extração, diluição, centrifugação, concentração e filtração. Caso não optasse pelo uso do padrão interno para a elaboração da curva de calibração, provavelmente o trabalho estaria comprometido.

Outra estratégia adotada para obtenção dos resultados foi à utilização de regressão linear com o uso de fator de ponderação. Para que o método bioanalítico seja adequadamente validado com resultados confiáveis, a curva de calibração deve ser muito bem elaborada. É necessária a aplicação de uma regressão não linear ou linear, definida a partir da dispersão das medidas (valores de  $y$ ). Essas medidas devem seguir uma distribuição independente da concentração, característica conhecida como homocedasticidade. A figura 19 demonstra que as curvas de calibração apresentadas possuem essa característica, sendo a figura 19 B o gráfico obtido a partir dos resíduos que forneceu menor valor de soma, maior homogeneidade e menor amplitude de distribuição.

A maioria dos métodos bioanalíticos possui o intervalo de concentração muito amplo e às vezes a heterocedasticidade predomina onde maiores desvios são encontrados nas concentrações mais altas, o que podem influenciar na regressão linear mais intensamente do que os pequenos desvios das concentrações mais baixas (SINGTOROJ *et al.*, 2006; CASSIANO *et al.*, 2009).

**Figura 19:** Distribuição dos resíduos obtida para cada nível de concentração de bornesitol sem fator de ponderação (A) e com fatores de ponderação  $1/x$  (B) e  $1/x^2$  (C). Vide comentários no texto.



Quando o modelo linear apresenta essa falta de ajuste, algumas correções podem ser consideradas, como utilizar intervalo de trabalho diferente do que está sendo testado; verificar se não são problemas relacionados à solubilidade do analito ou supressão de íons; transformar os dados de  $x$  e/ou  $y$  antes de realizar a regressão linear ou usar um fator peso (SINGTOROJ *et al.*, 2006). Um método pra contornar a heterocedasticidade é aplicar um modelo de regressão ponderado, cujo princípio é dar maior importância para dados com baixa variância e menor importância para dados com alta variância. Os pesos comumente usados são os valores empíricos  $1/x$ ,  $1/x^2$ ,  $1/x^{1/2}$  e  $1/y^{1/2}$ , de tal forma que se calcula, para cada valor de peso, novos valores para os coeficientes da regressão ( $a$  e  $b$ ) e, posteriormente, avalia-se qual dos pesos forneceu um modelo linear com melhor ajuste, calculando-se a percentagem de erro relativo individual e escolhendo o peso correspondente ao menor valor (ALMEIDA *et al.*, 2002).

No teste de linearidade foi avaliada a soma dos desvios referentes às calibrações realizadas com fator de ponderação e sem este fator. De acordo com os dados da tabela 12, o modelo de regressão linear com fator de ponderação  $1/x$  foi



selecionado por apresentar a menor soma dos desvios, quando comparado com a regressão linear sem o uso de fator de ponderação e com a regressão linear com fator de ponderação  $1/x^2$ .

**Tabela 12:** Valores das somas dos erros relativos das concentrações nominais *versus* as concentrações calculadas em três curvas de calibração, com fatores de ponderação  $1/x$  e  $1/x^2$  para bornesitol nas três validações.

Fator de ponderação	Soma dos desvios
Nenhum	472,00
$1/x$	218,30
$1/x^2$	235,50

A tabela 13 apresenta as equações das retas obtidas nas 3 curvas de calibração e os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) correspondentes, cujos valores foram superiores a 0,98. Um coeficiente de determinação inferior a 0,95 indica que a regressão linear não é eficiente e quanto mais próximo de 1 menor será a variação de  $y$  em torno da média, ou seja, menos resíduos apresentará o modelo (CASSIANO *et al.*, 2009; EMA, 2011).

**Tabela 13:** Equações das retas e respectivos coeficientes de determinação obtidos para as três curvas de calibração.

Curva de calibração	Equação da reta	$r^2$
1	$y = 4,29 \times 10^{-4}x + 8,06 \times 10^{-3}$	0,99822
2	$y = 4,21 \times 10^{-4}x + 6,66 \times 10^{-3}$	0,99618
3	$y = 4,75 \times 10^{-4}x + 19,58 \times 10^{-3}$	0,99835

#### 5.4.5 Precisão

A precisão do método bioanalítico avalia a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas da matriz. No desenvolvimento do método bioanalítico, a precisão intracorrída e intercorrída foi avaliada a partir da resposta de amostras LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD extraídas e analisadas em sextuplicatas no sistema de LC-MS, em três dias diferentes. A avaliação da resposta é analisada na mesma corrida e em corridas diferentes, sendo que o método é

considerado preciso quando o DPR ou o CV entre as injeções são inferiores a 20% para o LIQ, ou 15% para as outras concentrações (BRASIL, 2003b; EMA, 2011).

Os resultados obtidos, dispostos na tabela 14, indicam que o método bioanalítico desenvolvido é preciso para quantificação de bornesitol em plasma de ratos Wistar, uma vez que todos os valores de CV são inferiores a 15%.

**Tabela 14:** Valores de CV (%) intracorrída e intercorrídas obtidos no ensaio de precisão.

Corridas	CV (%) intracorrída				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	7,12	4,95	3,89	0,81	2,36
2	11,08	6,06	6,99	1,55	6,61
3	10,62	3,48	1,56	2,91	3,23
CV (%) intercorrída	10,58	6,02	5,71	3,68	5,95

#### 5.4.6 Exatidão

A exatidão do método avalia a concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência. No desenvolvimento do método bioanalítico, a exatidão intracorrída e intercorrídas foi avaliada a partir da resposta de amostras LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD extraídas e analisadas em sextuplicata no sistema de LC-MS, em três dias diferentes. O método é considerado exato quando o erro padrão relativo estiver dentro de  $\pm 15\%$  dos valores nominais para as amostras, com exceção da amostra LIQ, que deve estar dentro de  $\pm 20\%$  do valor nominal (BRASIL, 2003b; EMA, 2011).

Os resultados obtidos (Tabela 15) indicam que o método bioanalítico desenvolvido apresenta exatidão adequada para quantificar bornesitol em plasma de ratos Wistar, uma vez que todos os valores de EPR estão dentro da faixa de  $\pm 15\%$  do valor nominal.

**Tabela 15:** Valores de EPR (%) intracorrída e intercorrídas obtidos no ensaio de exatidão.

Corridas	EPR (%) intracorrída				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
1	-6,58	-7,58	-2,43	2,67	4,42
2	2,42	-1,92	-5,89	-4,47	-5,76
3	6,25	1,63	3,14	1,20	-2,47
EPR (%) intercorrída	0,69	-2,63	-1,72	-0,20	-1,27

#### 5.4.7 Estabilidade do analito em matriz biológica

O estudo de estabilidade realizado durante a validação do método bioanalítico visa assegurar que a estabilidade do analito na matriz seja mantida no decorrer do preparo, análise e estocagem das soluções (BANSAL & DE STEFANO, 2007; EMA, 2011). Dessa forma, durante a validação é essencial avaliar a estabilidade de soluções submetidas a diferentes condições de estocagem (estabilidade de curta duração (ECD), estabilidade de congelamento e descongelamento (ECC), estabilidade pós-processamento (EPP) e estabilidade de longa duração (ELD), a fim de investigar a confiabilidade dos resultados).

No presente trabalho, os ensaios de estabilidade foram realizados com amostras extraídas e analisadas nas concentrações CQB e CQA, procedendo-se à análise com uma curva de calibração, e comparação dos resultados obtidos com aqueles de amostras recém-preparadas (ERP). A tabela 16 demonstra os resultados obtidos com cada condição.

Para o estudo de estabilidade de curta duração (ECD) foi estipulado o tempo de 6 horas à temperatura ambiente. Esse tempo foi definido com base no intervalo de tempo gasto desde o descongelamento das amostras de plasma e adição do bornesitol e pentaeritritol até a última etapa de filtração da amostra extraída, reconstituição com metanol e filtração para vial. Após dois ciclos de congelamento a -80 °C e descongelamento à temperatura ambiente (ECC), não se observou degradação do bornesitol após a extração e reconstituição da amostra com metanol. A estabilidade pós-processamento (EPP) consiste no intervalo compreendido entre o término da extração e a análise da última amostra da corrida analítica mais longa do

estudo. A EPP foi avaliada a partir da leitura de amostra recém-preparada, mantida por 18h no amostrador automático à 21°C. A estabilidade de longa duração (ELD) foi avaliada a partir da análise de uma amostra de plasma contendo o analito mantida no freezer durante 1 mês, seguido de descongelamento e extração do analito na matriz biológica. Todos os resultados obtidos forneceram valores dentro da faixa recomendada pela legislação (BRASIL, 2003b; EMA, 2011), que são de EPR e CV inferiores a 15%.

**Tabela 16:** Valores obtidos na avaliação da estabilidade do bornesitol em matriz biológica.

Estabilidade	Parâmetro	CQB	CQA
ARP	Conc. Média (ng/mL)	99,2	3802,8
	CV (%)	6,2	2,3
	EPR (%)	-0,8	-4,9
ECD	Conc. Média (ng/mL)	89,8	3603,8
	CV (%)	9,0	2,4
	EPR (%)	-10,2	-9,9
ECC	Conc. Média (ng/mL)	97,1	3589,5
	CV (%)	8,6	2,9
	EPR (%)	-2,9	-10,3
EPP	Conc. Média (ng/mL)	90,2	3678,8
	CV (%)	9,9	4,8
	EPR (%)	-9,8	-8,0
ELD	Conc. Média (ng/mL)	98,6	3567,2
	CV (%)	5,9	2,7
	EPR (%)	-1,4	-10,8

Em que:

ARP: Amostra recém-preparada; ECD: Estabilidade de curta duração; ECC: Estabilidade de congelamento e descongelamento; EPP: Estabilidade pós-processamento; ELD: Estabilidade de longa duração.

#### **5.4.8 Estabilidade do analito e PI em solução**

A estabilidade do bornesitol e do pentaeritritol foi avaliada em solução metanólica com as concentrações de 30 ng/mL e 5.000 ng/mL, respectivamente. Esse experimento tem por finalidade verificar a estabilidade dessas soluções a serem utilizadas tanto na validação quanto na aplicação do método analítico. Caso seja confirmada a estabilidade, as soluções de trabalho podem ser preparadas a partir da mesma solução estoque (BRODIE & HILL, 2002), sem a necessidade de se preparar novas soluções dentro do prazo e das condições definidas.

A estabilidade da solução na temperatura de transporte (ETT) foi avaliada para uma solução padrão mantida por 6 horas em temperatura ambiente (Tabela 17). Já a estabilidade da solução na temperatura de armazenamento (ETA) foi avaliada para uma solução padrão após 15 dias armazenamento a  $4 \pm 2$  °C (Tabela 18). Os dados representados nas tabelas demonstram que as variações foram inferiores a 10%, além de CV inferiores a 15%, dentro da faixa preconizada pela legislação (BRASIL, 2003b; EMA, 2011).

Para a aplicação em estudos farmacocinéticos de bornesitol em ratos, o método mostrou-se linear, exato, preciso, específico sensível e estável, sendo adequado para a determinação dos perfis plasmáticos do composto após diferentes doses e vias de administração. Na literatura, esse foi o primeiro método validado descrito para o bornesitol com a utilização de UPLC-ESI-MS/MS para um estudo farmacocinético.

**Tabela 17:** Valores obtidos na avaliação da estabilidade de solução de bornesitol e pentaeritritol na temperatura de transporte e à temperatura ambiente. Os resultados representam a média de 3 experimentos.

Parâmetros	Bornesitol				Pentaeritritol	
	LIQ recente	LIQ teste	CQD recente	CQD teste	recente	teste
Área média	11404,5	10989,0	2055319,8	2135434,8	2012159,5	1935136,8
CV (%)	13,7	8,4	2,0	2,8	3,8	1,8
Variação (%)		-3,6		3,9		-3,8

Em que:

LIQ: Amostra limite inferior de quantificação; CQD: Controle de qualidade de diluição

**Tabela 18:** Valores obtidos na avaliação da estabilidade da solução de bornesitol e pentaeritritol na temperatura de armazenamento ( $4 \pm 2$  °C). Os resultados representam a média de 3 experimentos.

Parâmetros	Bornesitol				Pentaeritritol	
	LIQ recente	LIQ teste	CQD recente	CQD teste	recente	teste
Área média	11404,5	11551,8	2055319,8	1953031,2	2012159,5	2032771,2
CV (%)	13,7	11,9	2,0	1,6	3,8	5,2
Variação (%)		1,3		-5,0		1,0

Em que:

LIQ: Amostra limite inferior de quantificação; CQD: Controle de qualidade de diluição

### 5.5 Estudo farmacocinético do bornesitol com administração intravenosa e oral em ratos Wistar

A fim de validar o bornesitol como um marcador ativo de *H. speciosa*, diretamente relacionado com a atividade hipotensora de derivados da droga vegetal *H. speciosa*, anteriormente demonstrada por nosso grupo de pesquisa, procedeu-se

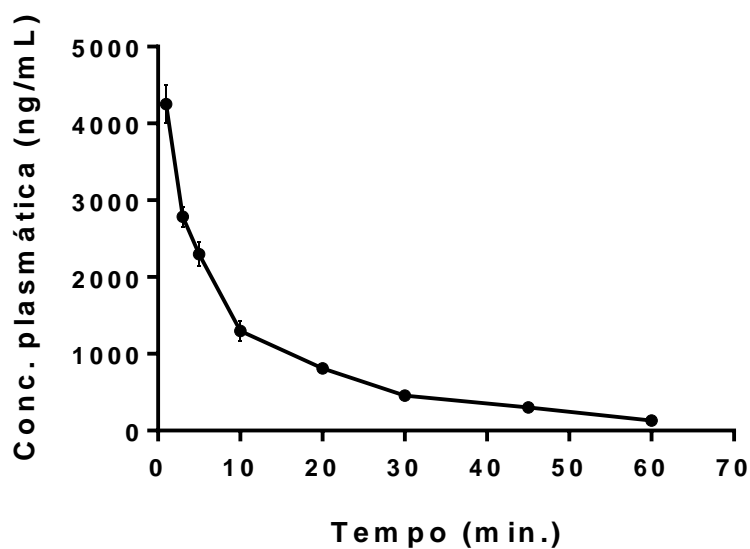
ao estudo farmacocinético. Para tanto, foram realizados ensaios com a administração do bornesitol por via intravenosa e por via oral em ratos Wistar.

Os experimentos com administração por via intravenosa e por via oral foram realizados ao todo com 30 animais, no entanto foram descartados para cálculo os animais que apresentaram as seguintes situações: perda sanguínea durante o processo cirúrgico, atraso na coleta do sangue, coagulação na cânula, rompimento da veia caudal e regurgitação da solução de bornesitol durante a gavagem. Para determinação dos parâmetros farmacocinéticos, cada animal foi avaliado individualmente.

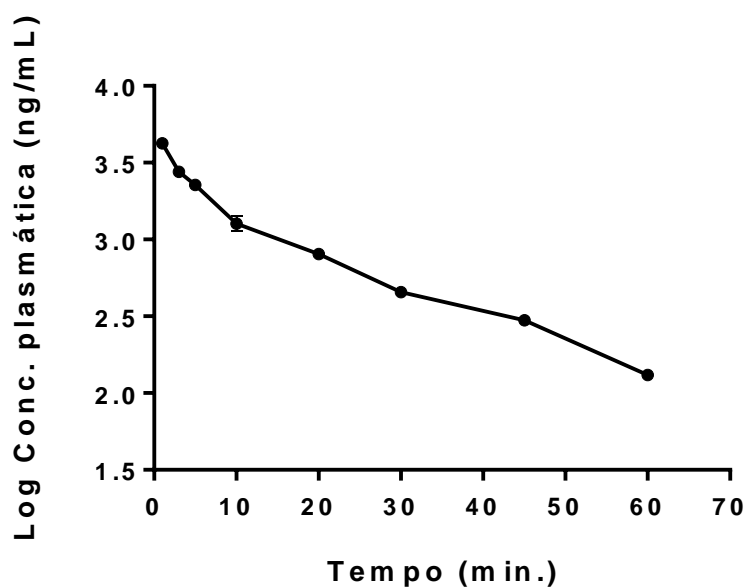
Ao grupo G1 contendo 6 animais foram administradas doses de 100  $\mu$ L pela veia caudal de uma solução de bornesitol 3 mg/Kg em solução salina estéril. A dose de 3 mg/Kg foi selecionada mediante a atividade hipotensora do bornesitol, avaliada na PAS, FC (figura 7) e concentração plasmática de nitrito (figura 8). As amostras de plasma foram coletadas nos tempos definidos e os dados plotados para obter os gráficos de concentração (em escala linear, Figura 20, e escala logarítmica, Figura (21) *versus* tempo. A partir do gráfico em escala logarítmica (em anexo) pode-se inferir que a disposição cinética do bornesitol atende ao modelo bicompartimental. De acordo com esse modelo, é possível diferenciar graficamente o processo de distribuição e eliminação do bornesitol. Tal comportamento é possivelmente esperado quando se trata de compostos com características hidrofílicas, como o bornesitol. Watson e colaboradores (2017) também relatam o modelo bicompartimental como o modelo que melhor atende ao composto hidrossolúvel fosfato de clindamicina no estudo da investigação farmacocinética após infusão intravenosa em cangurus.

O perfil médio da concentração plasmática (escala linear) em função do tempo para o G1 ( $n = 6$ ) está representada na figura 20. A concentração plasmática máxima na via intravenosa é a concentração sanguínea inicial ( $C_0$ ), imediatamente após a administração. Para os dados apresentados, obteve-se uma  $C_0$  de 5.550,0 ng/mL. O segundo (G2, 4 animais), terceiro (G3, 4 animais) e quarto (G4, 4 animais) grupos de animais receberam doses orais de, respectivamente, 3 mg/Kg, 15 mg/Kg e 25 mg/Kg. As curvas médias das concentrações plasmáticas de bornesitol em função do tempo obtidas após a administração oral das doses supracitadas estão representadas na figura 22. A  $C_{m\acute{a}x}$  observada para G2, G3 e G4 foi de  $204,3 \pm 46,0$  ng/mL,  $752,2 \pm 142,6$  ng/mL e  $1.099,2 \pm 194,7$  ng/mL, respectivamente.

**Figura 20:** Curva média de concentração plasmática em função do tempo, em escala linear, para a administração intravenosa de bornesitol (3 mg/Kg) em ratos. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 experimentos.

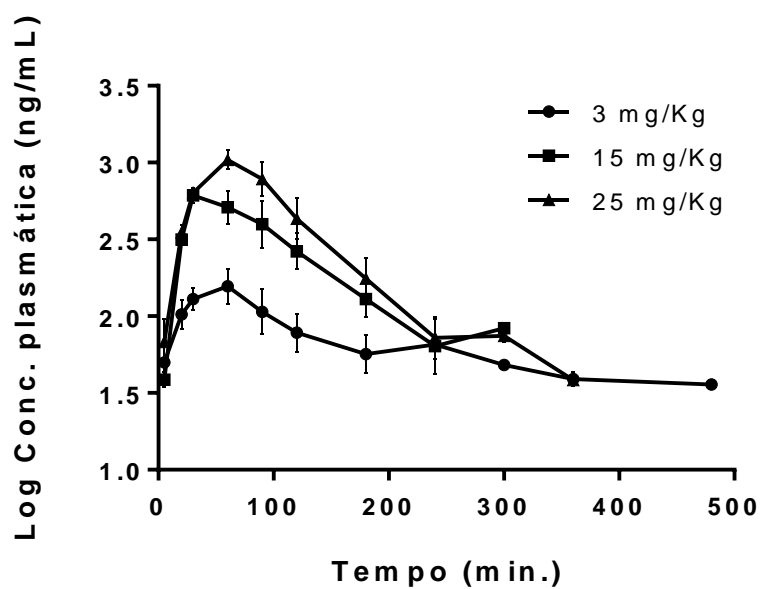


**Figura 21:** Curva média de concentração plasmática em função do tempo, em escala logarítmica, para a administração intravenosa de bornesitol (3 mg/Kg) em ratos. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 experimentos.





**Figura 22:** Curva média de concentração plasmática em função do tempo, em escala logarítmica, para a administração oral de bornesitol (3 mg/Kg, 15 mg/Kg e 25 mg/Kg) em ratos. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 4 experimentos na dose de 3 mg/Kg, 15 mg/Kg e 25 mg/Kg.



Os parâmetros farmacocinéticos obtidos para os 4 grupos de animais estão dispostos na tabela 19.

**Tabela 19:** Parâmetros farmacocinéticos determinados para o bornesitol para administração intravenosa e oral em ratos Wistar. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de 6 experimentos na dose de 3 mg/Kg por via intravenosa e de 4 experimentos na dose de 3 mg/Kg, 15 mg/Kg e 25 mg/Kg por via oral.

Parâmetros	i.v.(n=6) (3 mg/Kg)	v.o.(n=4) (3 mg/Kg)	v.o.(n=4) (15 mg/Kg)	v.o.(n=4) (25 mg/Kg)
$K_{el}$ média ( $\text{min}^{-1}$ )	0,0467 $\pm$ 0,002	0,0052 $\pm$ 0,002	0,0098 $\pm$ 0,002	0,0114 $\pm$ 0,002
$t_{1/2}$ (min)	15,5 $\pm$ 0,7	214,8 $\pm$ 79,3	78,8 $\pm$ 16,3	66,7 $\pm$ 12,4
$ASC_{0-t}$ (ng $\times$ min/mL)	49933,4 $\pm$ 2121,4	25858,4 $\pm$ 8023,9	73218,4 $\pm$ 17537,2	100232,4 $\pm$ 23665,9
$ASC_{t-\infty}$ (ng $\times$ min/mL)	2898,0 $\pm$ 239,1	11288,1 $\pm$ 4437,8	8513,4 $\pm$ 2778,8	3692,5 $\pm$ 1033,4
$ASC_{0-\infty}$ (ng $\times$ min/mL)	52831,4 $\pm$ 2243,2	37146,5 $\pm$ 8239,1	81731,8 $\pm$ 18715,3	103924,8 $\pm$ 23544,4
F (%)	NA	63,9	29,4	22,8
$V_d$ (L)	0,36 $\pm$ 0,02	8,33 $\pm$ 2,95	7,10 $\pm$ 1,58	7,88 $\pm$ 1,89
Cl (mL/min)	16,6 $\pm$ 0,7	33,0 $\pm$ 10,7	63,2 $\pm$ 12,4	83,4 $\pm$ 16,8
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	*5550,0 $\pm$ 0,7	204,3 $\pm$ 46,0	752,2 $\pm$ 142,6	1099,2 $\pm$ 194,7
$T_{m\acute{a}x}$ (min)	NA	38,8 $\pm$ 13,3	45,0 $\pm$ 15,0	67,5 $\pm$ 7,5

\*O valor corresponde ao  $C_0$  na administração intravenosa.

Em que:

$K_{el}$  média (constante de eliminação média);  $t_{1/2}$  (meia-vida de eliminação); ASC (área sob a curva); F (biodisponibilidade);  $V_d$  (volume de distribuição); Cl (*clearance*);  $C_{m\acute{a}x}$  (concentração máxima),  $T_{m\acute{a}x}$  (tempo máximo).

A utilização do plasma no presente estudo se justifica pela falta de informação em relação a possível ligação do bornesitol às proteínas plasmáticas. Dessa forma, tendo o plasma como matriz biológica, a quantificação do bornesitol foi efetuada independente a porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas. Até o presente momento, na literatura há poucos trabalhos com inosítois que abordam a farmacocinética avaliada em plasma de ratos e não se tem conhecimento sobre estudos de farmacocinética previamente realizados com o bornesitol, sendo este um estudo inovador e pioneiro. Dessa forma, aos dados apresentados são resultados preliminares e sugestivos de que o estudo cinético do bornesitol atende ao modelo bicompartimental e apresenta uma farmacocinética não linear para as doses administradas nesse estudo nos grupos de animais utilizados.

Os dados apresentados na tabela 19 indicam que a dose de 3 mg/Kg por via oral apresentou uma biodisponibilidade absoluta (F%) de 63,9% para o bornesitol, entretanto, para as doses de 15 e 25 mg/kg foram obtidas biodisponibilidades absolutas de 29,4 e 22,8% do ciclitol, respectivamente. Esses dados sugerem uma falta de proporcionalidade entre as doses administradas e suas biodisponibilidades, o que é característico de fármacos com farmacocinética não linear. A não linearidade farmacocinética de alguns compostos pode ser justificada por fatores que influenciam os processos farmacocinéticos. Dentre os principais fatores que podem afetar a correlação entre a quantidade do composto administrado e a velocidade da absorção, pode se destacar o transporte através de membranas intermediadas por transportadores que possam ser saturados, a insolubilidade do composto no trato gastrintestinal (TGI), a degradação por enzimas da microbiota, a interação com alimentos e conteúdos do TGI e a degradação ácida (GONÇALVES *et al.*, 2009; STORPIRTIS *et al.*, 2011).

Dados da literatura, obtidos para isômeros de inosítois, como o mio-inositol, indicam um transporte pelas células intestinais de forma ativa contra um gradiente de concentração, e dependente de Na<sup>+</sup> (CASPARY & CRANE, 1970). No trabalho de Carlomagno e colaboradores (2012), realizado em 20 humanos, foram administrados 0,6 e 1,2 g de mio-inositol em duas formas farmacêuticas distintas, uma na forma de cápsula gelatinosa mole e outra na forma de pó. Os autores descrevem uma melhora da biodisponibilidade na formulação cápsula mole em relação ao pó. Entretanto, ao analisarmos a administração da dose de 0,6 g e 1,2 g na mesma forma farmacêutica de cápsula mole, verifica-se a não correlação entre a ASC e a

dose administrada, o que poderia estar relacionado à saturação do processo de absorção. Para outro inositol, o scillo-inositol, é relatado no trabalho de Liang e colaboradores (2013), a administração oral de 2000 mg duas vezes ao dia em humanos. O scillo-inositol apresentou uma boa absorção, atingindo a concentração máxima de 17,2 µg/mL em um tempo máximo de 3,8 horas após a dose. O *clearance* foi lento e a meia-vida foi longa, com um valor médio de 7,4 L/h e 62,6 horas, respectivamente.

No presente estudo, a falta de linearidade farmacocinética observada para as três doses ensaiadas sugere que o bornesitol seja absorvido por transportadores ativos e que em doses maiores ocorra à saturação desses transportadores, dificultando a absorção. A fim de investigar esta hipótese, avaliamos *in vitro* a permeabilidade do bornesitol em células Caco-2 frente a transportadores de efluxo e influxo e os resultados estão descritos no item 5.9.

Outro fator que poderia explicar a farmacocinética não linear do bornesitol é sua possível instabilidade no TGI. Gomes e colaboradores (2018) avaliaram a estabilidade do bornesitol em experimentos de degradação forçada, empregando diferentes concentrações e tempo de exposição à solução ácida. Os resultados obtidos permitiram classificar o bornesitol como lábil ou de classe III frente a soluções ácidas conforme a classificação de substâncias propostas por Singh & Bakshi (2000).

Em relação ao  $C_{m\acute{a}x}$  foram obtidos os valores de 204,3 ng/mL para a dose de 3 mg/Kg, 752,2 ng/mL para a dose de 15 mg/Kg e 1.099,2 ng/mL para a dose de 25 mg/Kg. Apesar de se observar um aumento no valor de  $C_{m\acute{a}x}$  em função do aumento da dose administrada, não se observou uma relação linear entre as duas variáveis.

Apesar de o bornesitol ser um composto hidrofílico, seu alto valor de distribuição é característico de substâncias de baixa massa molecular, o que pode favorecer a distribuição para outros tecidos. Neste sentido, Frieler e colaboradores (2009) demonstraram a ampla distribuição do mio-inositol em ratos Sprague-Dawley, sendo realizada a quantificação desse ciclitol em plasma, cérebro, músculo, fígado, rim, coração e testículo.

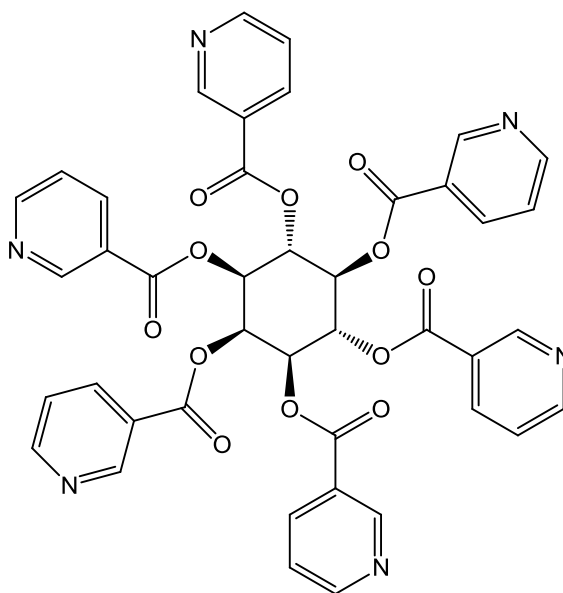
Um volume de distribuição alto de  $3,5\pm 1,5$  L/Kg foi relatado por Lennernäs e colaboradores (1997) após a administração de uma dose em bolus intravenosa de  $\alpha$ -trinositol (18,2 µmol/kg), imediatamente seguida por uma infusão intravenosa de curto prazo (48,8 µmol/kg/h) por 1,5 h em ratos Sprague-Dawley.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ju e colaboradores (2010) para a gastrodina, uma substância hidrofílica e com baixa massa molecular (Log P - 0,8; MM 286,28 mol/L), com características físico-químicas semelhantes ao bornesitol. A administração de 200 mg de gastrodina por via oral para humanos resultou um volume de distribuição alto ( $V_1/F$ , volume central aparente de distribuição de  $180,35 \pm 89,44$  L) e com distribuição na bÍlis e no cérebro. De acordo com Smith e colaboradores (2015), para a maioria das moléculas pequenas, o *clearance* e o volume de distribuição têm implicações significativas para a duração da ação, através de sua relação com a meia-vida. Além disso, transportadores ativos podem influenciar o volume de distribuição de diferentes fármacos. Por exemplo, em animais, os valores de volume de distribuição foram de 0,27, 0,82 e 14 L/kg para pravastatina, atorvastatina e simvastatina, respectivamente (HIGGINS *et al.*, 2014).

Nesse estudo, o aumento na dose de bornesitol administrada resultou num aumento não proporcional do *clearance*. Em relação à meia-vida de eliminação, os valores encontrados foram 214,8 min, 78,8 min e 66,7 min respectivamente para as doses orais de 3, 15 e 25 mg/Kg. Já para a administração intravenosa na dose 3 mg/kg, a meia vida de eliminação foi de 15,5 min. Uma farmacocinética não linear nos resultados de *clearance* e meia-vida de eliminação também é demonstrada para o bornesitol. Outros inositois apresentaram resultados não lineares, como por exemplo, pode-se citar o trabalho de Phelps e colaboradores (2013). Nesse estudo foi avaliado a farmacocinética em 74 bebês prematuros nascidos com 23 a 29 semanas de gestação por meio da administração intravenosa de 60 ou 120 mg/Kg de myo-inositol. Durante 96 horas de monitoramento, concluiu-se que o modelo que melhor atendia aos dados obtidos foi o modelo monocompartimental com resultados não lineares. Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados obtendo um volume de distribuição de 0,5115 L, *clearance* de 0,0679 L/h e meia vida de 5,22h.

Nesse trabalho a meia-vida de eliminação na administração intravenosa de bornesitol foi de 15,5 minutos. Na literatura, a meia-vida de eliminação de compostos estruturalmente relacionados apresentam valores próximos. Milton e colaboradores (2013) avaliaram a administração intravenosa de 100 ou 50 mg/Kg de hexanicotinato de inositol (**21**) em 6 ratos Sprague-Dawley e relataram uma meia-vida de eliminação curta, de 9,12 min. Já Lennernäs e colaboradores (1997) relataram uma

meia-vida de eliminação de 5 a 10 minutos para o  $\alpha$ -trinositol (D-mio-inositol 1,2,6-trisfosfato) em estudo farmacocinético realizado em 4 ratos Sprague-Dawley.



(21)

Cabe destacar que os resultados aqui relatados foram obtidos para o bornesitol isoladamente. Conforme descrito na Revisão da Literatura (item 3.2), o bornesitol é o principal constituinte de uma fração padronizada de folhas de *H. speciosa*, que também contém flavonoides, especialmente rutina. Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento de um fitoterápico a partir dessa fração padronizada, visando seu emprego como anti-hipertensivo. É provável que a farmacocinética do bornesitol administrado na fração padronizada apresente parâmetros mais favoráveis do que os observados para o composto administrado isoladamente. Essa hipótese é subsidiada por dados da literatura que relatam uma melhor biodisponibilidade para um composto associado a outros componentes da matriz do que sua administração de forma isolada.

Assim, Cheng e colaboradores (2014) relataram que a administração oral em seis ratos Sprague-Dawley de 200 mg/Kg de geniposídeos, 4,69 g/Kg de extrato dos frutos *Gardenia* (*Gardenia jasminoides* Ellis) e 10,82 g/Kg de formulação a base do extrato *Gardenia*, ambos correspondentes a 200 mg/Kg de geniposídeos, apresentaram uma biodisponibilidade de 32,2% para o extrato e 27,17% para a formulação. Estes resultados foram superiores do que a biodisponibilidade dos geniposídeos isolados (4,23%). Um comportamento semelhante foi observado ao se comparar a biodisponibilidade do flavonoide orientin-2''-O- $\beta$ -L-galactopiranosil,

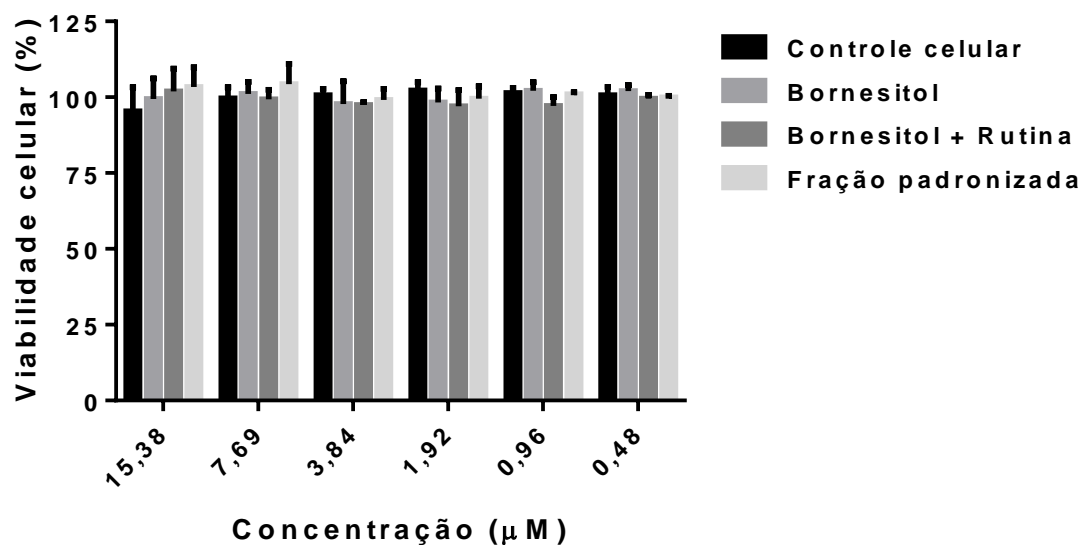
administrado de forma isolada, com sua administração como constituinte do extrato de *Trollius ledebourii* por via intravenosa em 6 ratos Sprague-Dawley, sendo que a última forneceu maior biodisponibilidade (Li *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos nesse trabalho possibilita a comparação do efeito hipotensor do marcador ativo bornesitol com o efeito hipotensor obtido pela fração padronizada de *H. speciosa* contendo rutina, ácido quínico e bornesitol ( $7,75 \pm 0,78\%$ ) nos trabalhos anteriores do grupo. Sendo que a dose utilizada da fração para obtenção dos resultados é muito menor quando se comparado com a administração do bornesitol isolado. Silva e colaboradores (2011, 2016) demonstraram o efeito anti-hipertensivo da fração padronizada com a administração oral de 1 mg/Kg em camundongos normotensos e 0,1 mg/Kg em camundongos hipertensos. Nesse trabalho a dose intravenosa de bornesitol que apresentou atividade foi de 3 mg/Kg. Isso comprova que o efeito é mais potente quando o biomarcador é administrado com os outros constituintes do extrato.

## **5.6 Avaliação da citotoxicidade**

A citotoxicidade do bornesitol, da associação bornesitol com rutina, e da fração padronizada de *H. speciosa* foi avaliada nas células Caco-2, após 24h de incubação, previamente aos ensaios de permeabilidade. Conforme é verificado na figura 23, não foram constatadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os controles celulares e as células tratadas com as amostras. Sendo assim, pode-se concluir que concentrações testadas podem ser utilizadas nos ensaios de permeabilidade com células Caco-2 durante 24 h, sem comprometimento da viabilidade celular.

**Figura 23:** Citotoxicidade do bornesitol (15,38  $\mu\text{M}$ ), da mistura bornesitol e rutina (15,38  $\mu\text{M}$  e 1,84  $\mu\text{M}$ ) e da fração padronizada de *Hancornia speciosa* (0,0385 mg/mL, contendo o equivalente a 15,38  $\mu\text{M}$  de bornesitol) em células Caco-2, após 24 h de tratamento.



## 5.7 Validação de método analítico para quantificação do bornesitol nos experimentos de permeabilidade

Os resultados da validação são apresentados nos itens 5.7.1 a 5.7.6. As amostras utilizadas nos ensaios de validação foram preparadas a partir de uma solução-estoque de bornesitol na concentração de 10.000  $\mu\text{M}$  em DMSO, conforme protocolo descrito anteriormente (item 4.9.5). A validação de um método analítico é imprescindível para análises quantitativas, visto que tem como propósito controlar fatores que interfiram na precisão e exatidão dos dados obtidos (LANÇAS, 2009).

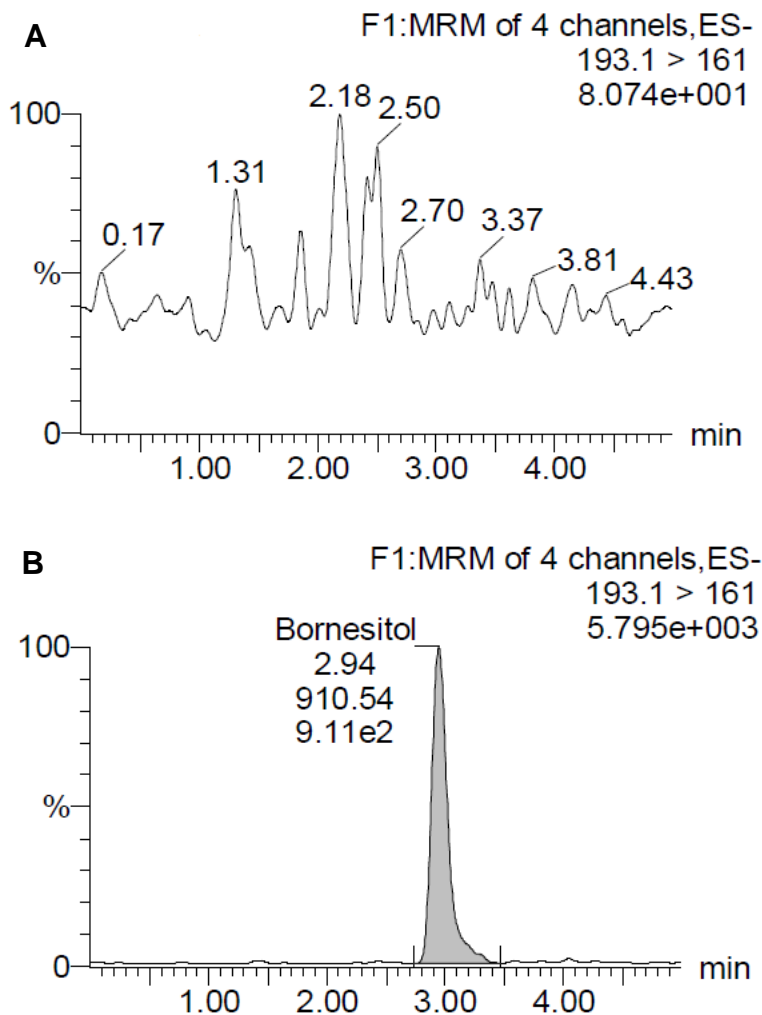
### 5.7.1 Seletividade

A seletividade de um método analítico é evidenciada por sua capacidade em identificar e quantificar o analito na presença de outros componentes que estejam na amostra (BRASIL, 2017). Dessa forma, a seletividade avalia a extensão da interferência de uma substância da matriz na quantificação de um analito (IUPAC 2010). No método desenvolvido, a seletividade foi avaliada a partir da comparação do branco e da amostra contendo o analito. Foram avaliados eventuais interferentes com a mesma relação massa/carga dos íons monitorados para o bornesitol ( $m/z$  193,1 $\rightarrow$ 161,0 Da), no método de MRM empregado para a quantificação. Os



resultados obtidos atestam a seletividade do método, devido à ausência de picos de interferentes que produzam íons com a mesma relação massa/carga dos íons monitorados para o bornesitol (figura 24).

**Figura 24:** Cromatogramas obtidos por UPLC-ESI-MS/MS em modo MRM para amostra branco (A) e para amostra bornesitol (B).



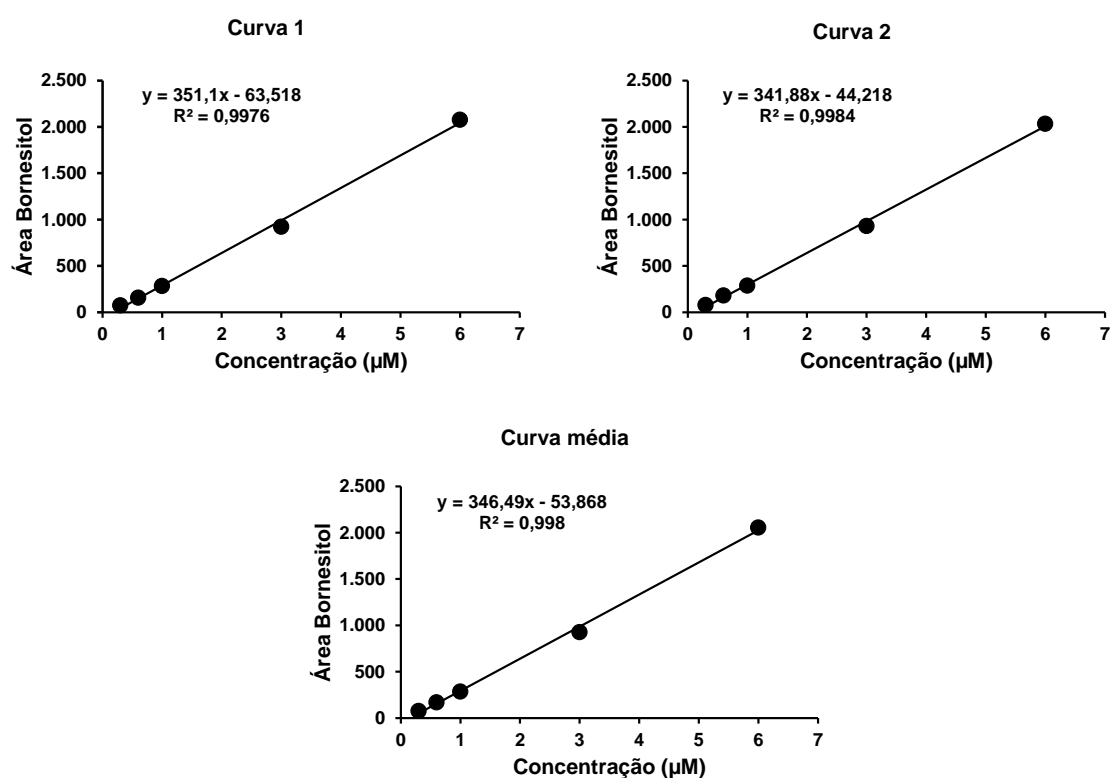
### 5.7.2 Linearidade

A linearidade é o parâmetro que demonstra se um método desenvolvido é capaz de obter respostas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. A confirmação da resposta linear foi definida pela construção de duas curvas analíticas em dois dias consecutivos, construídas no intervalo de concentrações de 0,3  $\mu\text{M}$  a 6  $\mu\text{M}$ . Os valores de área média e DPR obtidos estão representados na tabela 20.

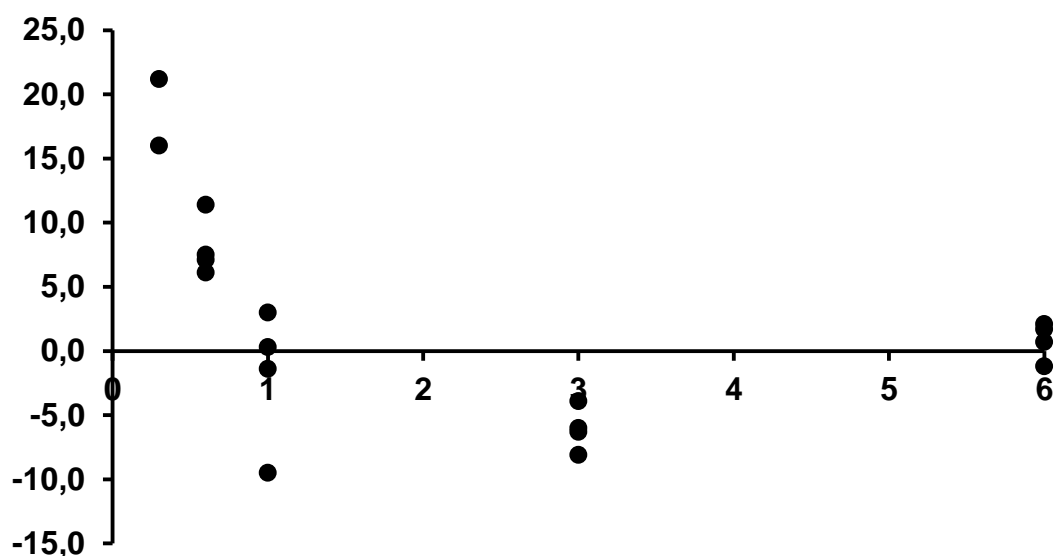
**Tabela 20:** Dados obtidos para construção da curva de linearidade.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Curva 1		Curva 2	
	Área média	DPR	Área média	DPR
0,3	73,205	2,62	77,435	3,48
0,6	156,261	0,73	180,249	2,24
1,0	282,669	1,04	286,491	1,45
3,0	921,936	1,24	928,984	1,31
6,0	2075,373	1,69	2032,280	0,49

A curva analítica comprova a relação linear entre a concentração de bornesitol injetada ( $\mu\text{M}$ ) versus a área do pico correspondente para a transição principal ( $m/z$  193  $\rightarrow$  161) do bornesitol. Os coeficientes de determinação ( $r^2$ ) obtidos atendem o estabelecido pela literatura (ICH, 1996; BRASIL, 2017), com valores superiores a 0,99. Os dados da análise de regressão linear bem como a curva analítica estão representados na figura 25. Na figura 26 está demonstrada a dispersão dos resíduos demonstrando a homocedasticidade dos dados.

**Figura 25:** Curvas analíticas para quantificação do bornesitol obtidas por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM.

**Figura 26:** Distribuição dos resíduos obtidos na curva analítica média do bornesitol.



As curvas obtidas em dois dias consecutivos de análise não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) e, portanto, os dados foram reunidos para a construção da curva média (Figura 25). A resposta do método dentro da faixa de concentração avaliada para o analito apresentou-se linear.

### 5.7.3 Limite de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção de bornesitol foram calculados empregando-se os parâmetros da curva analítica sendo obtidos os valores de  $0,411 \mu\text{M}$  e  $0,135 \mu\text{M}$ , respectivamente. O limite de quantificação experimental foi obtido por meio de injeções de soluções com diluições sequenciais em sextuplicata. O LQ experimental obtido foi de  $0,2 \mu\text{M}$ , definido como a menor concentração quantificada com DPR inferior a 3 %. O limite de detecção experimental foi estabelecido a partir da relação sinal/ruído com valor igual a 3; portanto, o LD experimental foi  $0,054 \mu\text{M}$ . (SNYDER *et al.*, 1997).

### 5.7.4 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos no método analítico desenvolvido. Os dados obtidos no presente trabalho indicam valores de DPR inferiores a 5%, podendo-se considerar a precisão intradia adequada (Tabela 21). A precisão interdias (Tabela 22) também apresentou DPR inferior a 5%. Os resultados obtidos confirmam a precisão do método desenvolvido.

**Tabela 21:** Dados da precisão intradia do método para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM.

Amostras (3 $\mu$ M)	Concentração ( $\mu$ M)
1	2,7
2	2,8
3	2,8
4	2,9
5	2,9
6	2,7
Área média	2,8
DPR (%)	3,0

**Tabela 22:** Dados da precisão interdias do método para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM.

Amostras (3 $\mu$ M)	Concentração ( $\mu$ M)
1	2,7
2	2,8
3	2,8
4	2,9
5	2,9
6	2,7
7	2,9
8	2,9
9	3,1
10	3,0
11	3,0
12	3,0
Área média	2,9
DPR (%)	4,3

### 5.7.5 Exatidão

Um método é considerado exato quando há um grau de concordância entre os resultados obtidos no método com o valor considerado aceito como verdadeiro. A exatidão foi avaliada em ensaio de recuperação realizado com três concentrações distintas (0,3  $\mu\text{M}$ ; 3,0  $\mu\text{M}$  e 6,0  $\mu\text{M}$ ), em triplicata para cada nível. Conforme a tabela 23, os resultados obtidos com a concentração de 3  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  apresentaram um valor próximo a 100% e DPR inferiores ao recomendado pela literatura, de 5 % (ICH, 1996). Por outro lado, a concentração de 0,3  $\mu\text{M}$  apresentou valor de recuperação superior a 100% e DPR acima de 5%.

**Tabela 23:** Dados da exatidão do método para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM.

Concentração ( $\mu\text{M}$ )	Concentração obtida ( $\mu\text{M}$ )	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
0,3	0,4	133,3		
0,3	0,5	166,7	144,4	13,3
0,3	0,4	133,3		
3,0	3,1	103,3		
3,0	2,9	96,7	100,0	3,3
3,0	3,0	100,0		
6,0	6,0	100,0		
6,0	6,1	101,7	100,6	1,0
6,0	6,0	100,0		

### 5.7.6 Robustez

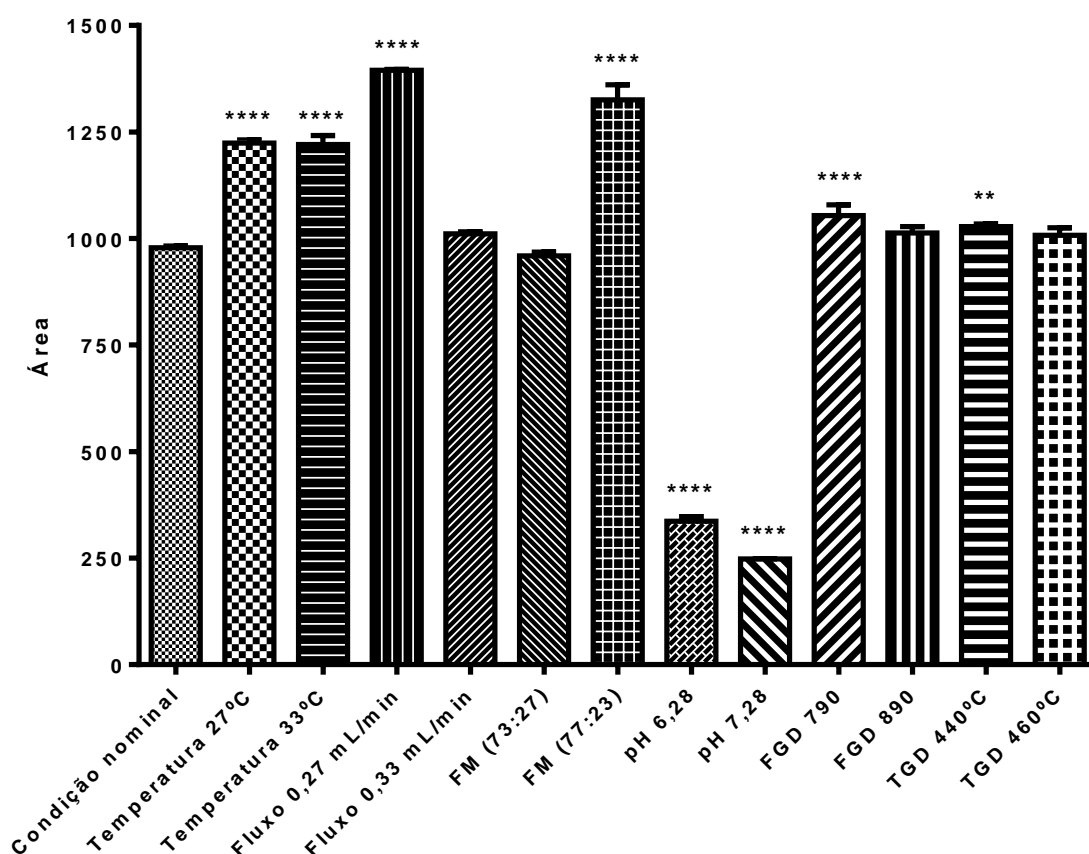
A robustez do método indica sua capacidade em resistir a pequenas variações nas condições analíticas (ICH, 1996; BRASIL, 2017) e evidencia os fatores que podem influenciar a resposta do método de forma significativa (VAN DER HEYDEN *et al.*, 1999).

Para a avaliação da robustez procedeu-se à quantificação do bornesitol na condição nominal e sob alterações deliberadas de alguns parâmetros, a saber, temperatura do forno (27 e 33  $^{\circ}\text{C}$ ), fluxo da fase móvel (0,27 e 0,33 mL/min),

proporção da fase móvel (73 e/ou 77 % de acetonitrila com 27 e/ou 23 % de solução de acetato de amônio 5 mM pH 6,78), pH da solução de acetato de amônio 5 mM (6,28 e 7,28), fluxo do gás de dessolvatação (790 e 890 L/h) e temperatura do gás de dessolvatação (440 e 460 °C). Os resultados obtidos no estudo de robustez para o método de quantificação do bornesitol estão apresentados graficamente na figura 27.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), que indicou diferenças estatisticamente significativas entre as áreas médias obtidas para o bornesitol na condição nominal e aquelas resultantes de variações deliberadas na condição cromatográfica definida ( $P < 0,05$ ). Com exceção das alterações de fluxo da fase móvel de 0,33 mL/min, proporção de fase móvel de 73% de acetonitrila com 27% de solução de acetato de amônio 5 mM pH 6,78, fluxo do gás de dessolvatação de 890 L/h e temperatura do gás de dessolvatação de 460 °C ( $P > 0,05$ ), todas as demais variações resultaram em diferenças significativas em relação à condição nominal.

**Figura 27:** Avaliação da robustez do método para quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS no modo MRM. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos. \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*\*  $P < 0,0001$  em relação à condição nominal.



Os resultados obtidos da validação do método de UPLC-ESI-MS/MS para quantificação do bornesitol no modo MRM foram satisfatórios e indicam que o método pode ser aplicado nos estudos de permeação, descritos na sequência.

## 5.8 Avaliação da qualidade das células Caco-2

### 5.8.1 Medidas da TEER e permeabilidade do *Lucifer Yellow*

A medida da resistência elétrica transepitelial (TEER) é um ensaio rápido, convencional, não invasivo e quantitativo, que é usado para avaliar a integridade das junções oclusivas durante o processo de diferenciação das células Caco-2 (SRINIVASAN *et al.*, 2015; HENRY *et al.*, 2017). A TEER das monocamadas celulares dos insertos dispostos nas diferentes posições da placa de cultivo de 12 cavidades foi avaliada entre 21 a 25 dias de incubação, tanto no início quanto no fim

do experimento (Figura 28). Apenas os insertos com valores acima de  $200 \Omega\text{cm}^2$  foram utilizados nos ensaios de permeabilidade e considerados para os cálculos da permeabilidade aparente ( $P_{\text{app}}$ ). Ao final do experimento, foi avaliada a permeabilidade do *Lucifer Yellow* na monocamada celular. Os dados de fluorescência obtidos foram utilizados para o cálculo da concentração do composto acumulado no compartimento basolateral.

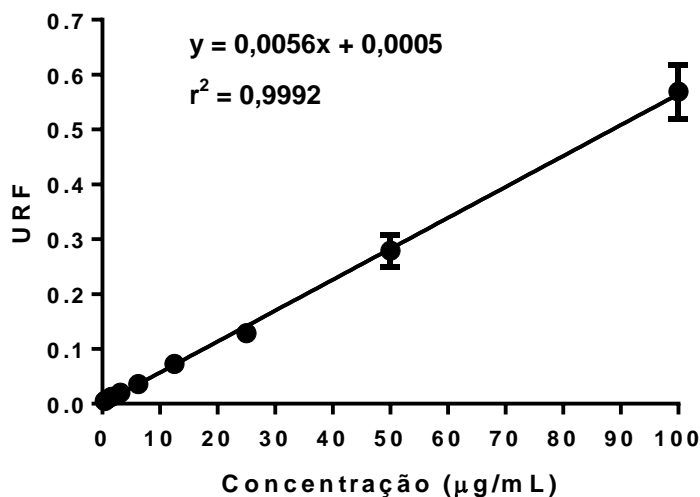
As concentrações foram determinadas com base na equação da curva de calibração ( $y = 0,0056x - 0,0005$ ,  $r^2 = 0,9992$ ), obtida por diluição seriada da solução do marcador na concentração de  $100 \mu\text{g/mL}$  a  $0,39 \mu\text{g/mL}$ , relacionando a concentração nominal com a fluorescência obtida (Figura 29). Os dados resultantes foram empregados no cálculo da  $P_{\text{app}}$ . Foram considerados validados os insertos que apresentaram  $P_{\text{app}} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ , o que garante a integridade da monocamada celular (CYPROTEX, 2018). A integridade foi também atestada com o uso do propranolol como marcador de alta permeabilidade transcelular, que demonstrou uma permeação adequada na monocamada de células Caco-2 diferenciadas (dados não mostrados).

**Figura 28:** Monocamada de células Caco-2 diferenciadas após 21 dias de incubação.





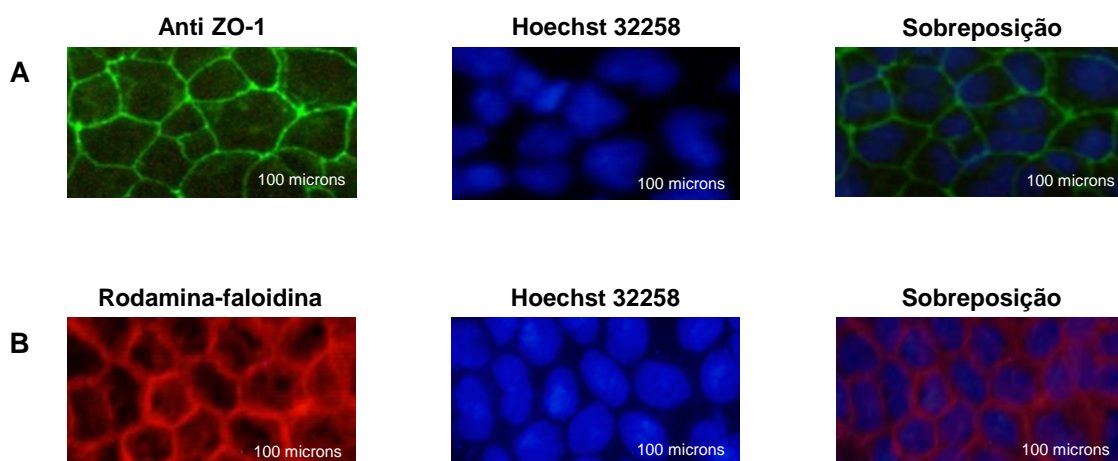
**Figura 29:** Curva de calibração do *Lucifer Yellow*. Os resultados representam a média de três experimentos.



### 5.8.2 Ensaio de imunofluorescência para atestar a diferenciação das células Caco-2

Como podem ser observado na Figura 30, as células Caco-2 se diferenciaram adequadamente com a formação de junções oclusivas e distribuição de F-actina, estando aptas para utilização no estudo de permeabilidade.

**Figura 30:** Imagens de microscopia de imunofluorescência de monocamadas de células Caco-2. **(A)** Junções oclusivas, em verde, marcadas com o anticorpo Anti-ZO-1 e **(B)** F-actina, em vermelho, corada com rodamina-faloidina. Os núcleos celulares, em azul, foram corados com Hoechst 32258.



### 5.9 Modulação da permeabilidade do bornesitol pelos transportadores de efluxo e influxo utilizando células Caco-2 em modelo *Transwell*

Como mencionado na Revisão da Literatura (item 3.4.1 e 3.4.2), o modelo *Transwell* com células Caco-2 é utilizado para avaliar o transporte transcelular (transporte passivo pelo citoplasma das células), transporte paracelular (transporte passivo entre as junções celulares), e transporte intermediado por um transportador (transporte ativo) (CAO *et al.*, 2012). De acordo com dados da literatura, compostos pouco absorvidos (0-20%) possuem coeficiente de permeabilidade de  $1 \times 10^{-6}$  cm/s, compostos moderadamente absorvidos (20-70%) apresentam coeficientes de permeabilidade entre 1 e  $10 \times 10^{-6}$  cm/s, e para os compostos com alta absorção (70-100%), os valores de coeficiente de permeabilidade são superiores a  $10 \times 10^{-6}$  cm/s (CASTILLO-GARIT *et al.*, 2008).

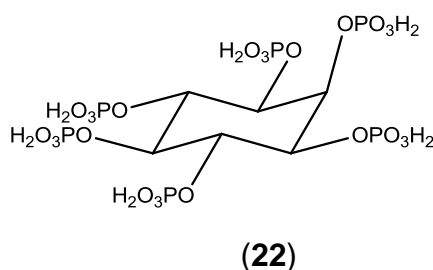
A figura 31 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de permeação do bornesitol, da associação bornesitol com rutina, e da fração padronizada de *H. speciosa*, na ausência e na presença de inibidores de transportadores de efluxo e influxo. O gráfico da figura 31A demonstra que somente foi possível quantificar o bornesitol permeado no sentido apical-basolateral (AP-BL) quando este ciclitol estava associado à rutina ou como constituinte da fração padronizada de *H. speciosa*, obtendo-se valores de  $P_{app}$  de  $14,4 \times 10^{-6} \pm 7,2 \times 10^{-6}$  cm/s e  $20,2 \times 10^{-6} \pm 12,0 \times 10^{-6}$  cm/s, respectivamente. Em presença de rifampicina e cimetidina (respectivamente, inibidores de transportadores de influxo OATP e OCT), observa-se eliminação do influxo do bornesitol. Na presença dos inibidores de efluxo (verapamil e curcumina) foram obtidos valores de bornesitol abaixo do limite de quantificação do método.

O gráfico da figura 31B representa a permeabilidade do bornesitol no sentido basolateral-apical (BL-AP). Em associação com a rutina, o bornesitol é efluxado pela proteína P-gp. Na presença do verapamil, um inibidor de P-gp, observa-se a diminuição do efluxo do bornesitol, cuja permeabilidade aparente passa de  $4,1 \times 10^{-6} \pm 2,7 \times 10^{-6}$  cm/s para  $1,4 \times 10^{-6} \pm 1,4 \times 10^{-6}$  cm/s com a associação do bornesitol com rutina. Essa redução do efluxo é sugerida, pois não se observou diferenças estatísticas entre os valores de  $P_{app}$  ( $P > 0,05$ ).

O gráfico da figura 31C representa a relação BL-AP/AP-BL menor que 2, ou seja, a taxa de efluxo é menor que a de influxo, tanto para a associação do

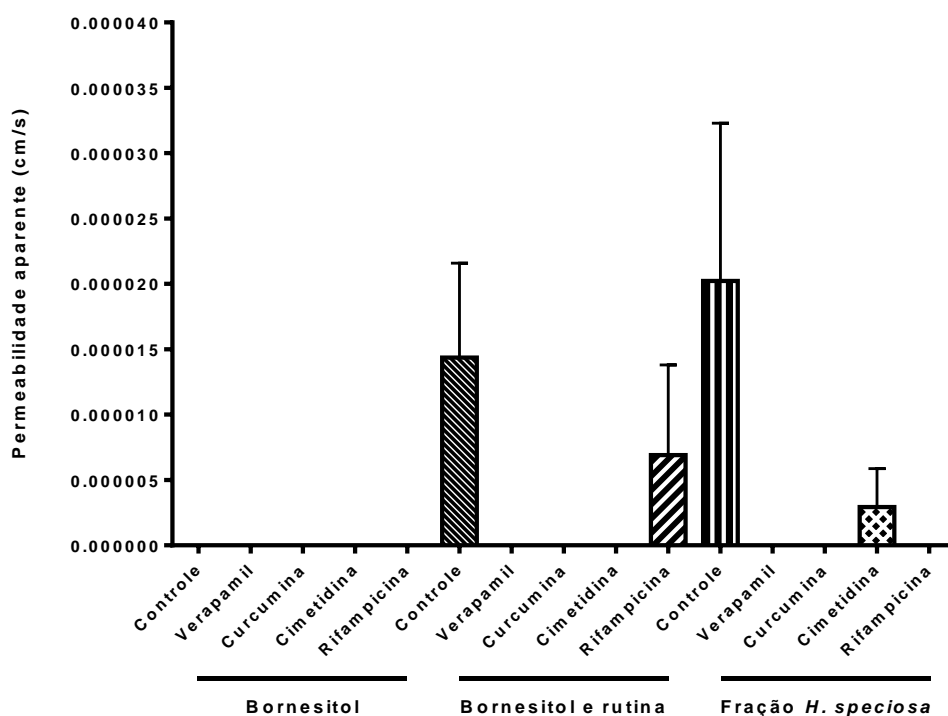
bornesitol com rutina quanto para a fração padronizada de *H. speciosa* com cimetidina (inibidor do transportador OCT).

Na literatura há descrição de inositóis, como o ácido fítico (**22**), considerado substrato da P-gp. Segundo Li e colaboradores (2018), o ácido fítico inibe a P-gp de forma não competitiva (inibidor alostérico), diminuindo a atividade da ATPase e alterando sua conformação molecular por meio de alterações dos sítios ativos. Dessa forma, o ácido fítico funciona como um agente capaz de aumentar os efeitos farmacológicos dos fármacos substratos da P-gp.

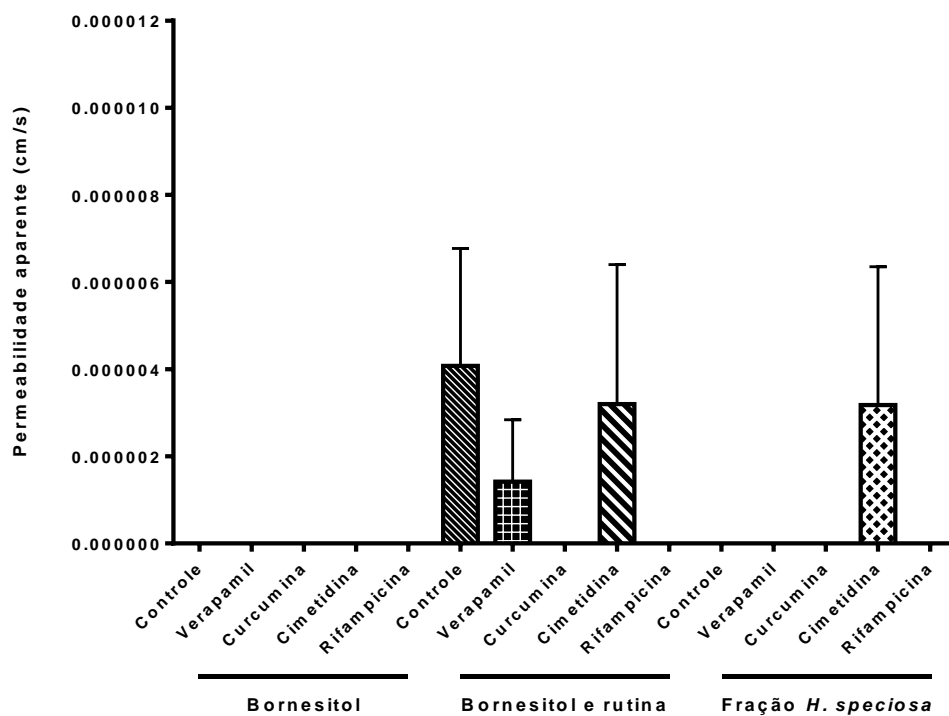


**Figura 31:** Modulação da permeabilidade aparente ( $P_{app}$  em cm/s) do bornesitol pelos transportadores de efluxo e influxo no estudo de permeabilidade. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes e as barras os respectivos valores de EPM.

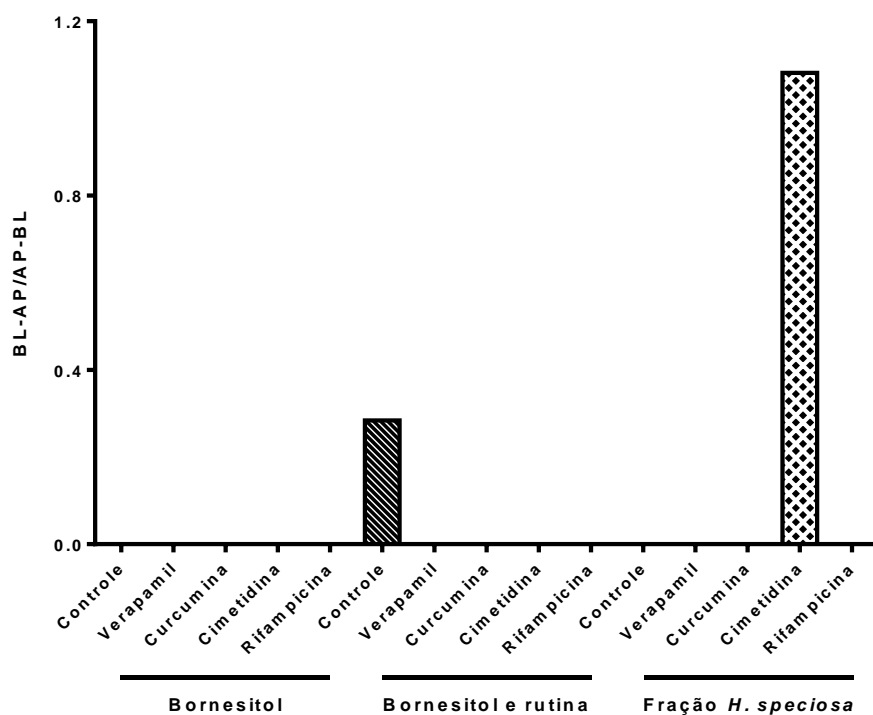
#### A) Permeação AP-BL (sentido apical – basolateral)



## B) Permeação BL-AP (sentido basolateral – apical)

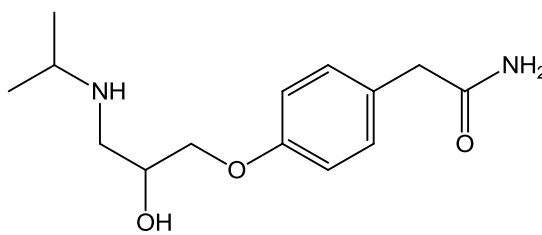


## C) Relação BL-AP/AP-BL



Ao se investigar o bornesitol isoladamente, observou-se que ele não permeou através da membrana, tanto no sentido AP-BL quanto no sentido BL-AP. Sabe-se que compostos hidrofílicos apresentam maior dificuldade para permeação. É

possível supor que o bornesitol tenha ficado retido na membrana do inserto ou no interior das células Caco-2 diferenciadas. Nossa hipótese é corroborada por dados da literatura, que indicam baixa permeação de substâncias hidrofílicas como o atenolol (**23**;  $\log P = 0,2$ ), em células Caco-2, em comparação com os resultados obtidos em experimento *in vivo* com ratos (Artursson, 1990).



(23)

Segundo Rubas e colaboradores (1993), compostos hidrofílicos atravessam a membrana por transporte paracelular, devido ao pequeno valor do coeficiente de partição ( $\log p < 0$ ). Briviba e colaboradores (2018) relataram que ao adicionarem 500  $\mu\text{mol}$  de ácido fítico ( $\log P = -10,3$ ) no compartimento apical do modelo *Transwell* com células Caco-2 apenas 5% desse ciclitol permeou para o compartimento basolateral. Os autores relataram, ainda, que o restante não foi absorvido pelas células, mas permaneceu retido na membrana. A hidrofiliidade também foi o fator primordial para explicar a não absorção de compostos hidrofílicos em trabalho de D'Antuono e colaboradores (2015). Os autores relataram que os ácidos 1-O-cafeoilquínico ( $\log P = -0,4$ ), 3-O-cafeoilquínico ( $\log P = -0,4$ ), 4,5-O-dicafeoilquínico ( $\log P = 1,5$ ) e 3,4-O-dicafeoilquínico ( $\log P = 1,5$ ), compostos constituintes da alcachofra, permaneceram acumulados na célula, mas não permeando pelas células Caco-2 para o compartimento basolateral. Um efeito semelhante também foi relatado para os flavonoides puerarina ( $\log P = -0,03$ ), rutina ( $\log P = -1,3$ ), hesperidina ( $\log P = -1,1$ ), quercetina ( $\log P = 1,5$ ), genisteína ( $\log P = 2,7$ ), canferol ( $\log P = 1,9$ ), apigenina ( $\log P = 1,7$ ) e isoliquiritigenina ( $\log P = 3,2$ ) (YANG *et al.*, 2014). Os autores relataram que os principais fatores determinantes para o transporte transmembrana foram o coeficiente de partição óleo-água e a posição de ligação dos resíduos de açúcar e dos grupos hidroxila nos flavonoides. Segundo eles, quanto maior o número de hidroxilas e de unidades de açúcar, menores eram os valores de permeabilidade aparente em células Caco-2.

A lipofilia de uma substância, estimada a partir de seu coeficiente de partição óleo/água ( $\log P$ ), é uma variável útil para prever a absorção *in vitro*. Substâncias

com baixos valores de log P, ou seja, com elevada hidrofília, como são os casos do bornesitol, mio-inositol e ácido fítico (log P: -3,2; -3,7 e -10,3, respectivamente), apresentam dificuldade para permear através da membrana celular. Esses dados explicariam a baixa permeação do mio-inositol e do ácido fítico anteriormente relatada na literatura (Briviba *et al.*, 2018), bem como os resultados aqui apresentados para o bornesitol.

No presente trabalho, observou-se que a permeabilidade do bornesitol foi significativamente alterada quando esse foi avaliado em associação com rutina ou na fração padronizada de *H. speciosa*, que contém 1,46% de rutina e 4,59% de flavonoides totais (PEREIRA, 2016). A permeação de diversos flavonoides já foi avaliada no modelo *Transwell* com células Caco-2. A permeabilidade *in vitro* de flavonoides é acentuada com o uso de inibidores de P-gp, como o verapamil, e alterações na estrutura dos flavonoides, tal como a ausência dos grupos 3'-OH, 3-OH e 4'-OH, melhoram sua permeabilidade (FANG *et al.*, 2017). Zhang e colaboradores (2013) relataram que a rutina não permeia em células Caco-2, ficando retida no interior da célula independentemente do sentido de aplicação do composto (AP-BL ou BL-AP). A acumulação intracelular é dependente da P-gp, visto que a incubação com verapamil (inibidor de P-gp) favorece o acúmulo da rutina no interior das células Caco-2. No entanto, Taur & Rodriguez-Proteau (2008) demonstraram que flavonoides, como quercetina, genisteína, naringenina e xantohumol, serviram de substrato para a P-gp, com consequente inibição do efluxo da cimetidina, substância avaliada pelos pesquisadores. Isso corrobora os resultados encontrados no presente trabalho, onde o bornesitol apresenta um aumento da permeabilidade quando associado à rutina ou como constituinte da fração padronizada de *H. speciosa*.

Segundo Choi & Kim (2014), diferentes extratos vegetais modulam e alteram a biodisponibilidade de fármacos que são efluxados pela P-gp como, por exemplo, os extratos de *Strobilanthes cusia* e *Rheum palmatum*, que inibem a P-gp. Uma estratégia para aumentar a permeabilidade de compostos hidrofílicos foi descrita por Thanou e colaboradores (2000), que se baseia na adição do cloreto de N-trimetilquitosana juntamente com o composto de interesse, resultando, segundo os autores, na abertura das junções oclusivas e promovendo uma melhora na permeabilidade de compostos hidrofílicos, bem como de peptídeos e proteínas.

A permeabilidade de uma substância pode ser alterada quando esta for administrada simultaneamente com outros compostos, que é o caso de uma matriz complexa, como um extrato vegetal. Verjee e colaboradores (2019) avaliaram a permeabilidade em células Caco-2 da hipericina isoladamente e como constituinte do extrato de *Hypericum perforatum*, bem como na presença de misturas de flavonoides constituintes da matriz (quercetina, quercitrina, isoquercitrina, hiperosídeo e rutina). A administração da hipericina (5  $\mu$ M) no compartimento apical resultou em uma permeação abaixo do limite de quantificação no compartimento basolateral, indicando baixa permeabilidade. Por outro lado, a administração da hipericina associada aos flavonoides incrementou a permeação, sendo que o melhor resultado foi obtido na presença da quercetina. De maneira semelhante, a permeação da hipericina foi significativamente melhorada ao se administrar o extrato de *H. perforatum* que, além de flavonoides, possui ácidos fenólicos e proantocianidinas. Os constituintes da matriz melhoraram de forma significativa a permeabilidade da hipericina para o compartimento basolateral.

Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho. A administração do bornesitol associado à rutina ou como constituinte da matriz do extrato padronizado de *H. speciosa* aumentou a permeabilidade deste ciclitol em células Caco-2. Esse efeito está relacionado à inibição de transportadores de efluxo, conforme discutido anteriormente, e possivelmente a alterações no coeficiente de partição do bornesitol, induzido por outros constituintes da matriz. Sabe-se que o coeficiente de partição óleo-água de uma substância determinado isoladamente difere do valor obtido para a mesma substância na presença de outros constituintes, conforme demonstrado anteriormente por Braga e colaboradores (1998) para cardenólídeos digitálicos, isoladamente e como constituintes de frações e extratos de *Digitalis lanata*.

Embora a monocamada de células Caco-2 seja o melhor modelo de células epiteliais para demonstrar a potencial absorção de compostos, não possui todas as características morfológicas e fisiológicas do intestino. No presente trabalho, os resultados de absorção obtidos *in vivo* para o bornesitol diferiram dos obtidos *in vitro* em modelo Caco-2. Isso provavelmente se deve ao complexo mecanismo que envolve a absorção de substâncias via epitélio gastrintestinal (TGI). Como por exemplo, o suco gástrico, sais biliares e líquidos intestinais afetam a solubilidade de fármacos bem como dependendo da substância, podem levar a precipitação no local

de absorção, ou a adsorção do fármaco no lúmen devido à presença de outros compostos. A degradação química, bacteriana e os diferentes mecanismos de transporte no TGI, influenciam também no processo de absorção do fármaco, além das características das junções oclusivas e expressão de enzimas e transportadores (SUN *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2012).

A biodisponibilidade do bornesitol determinada nos experimentos de administração por via oral foi de 63,9 %, 29,4 % e 22,8 % para as doses de 3, 15 e 25 mg/Kg, respectivamente. A ausência de correlação observada entre dados *in vivo* de biodisponibilidade e *in vitro* de permeação é subsidiada por dados da literatura. Larregieu & Benet (2013) relataram que compostos hidrofílicos, que tendem a ser absorvidos por difusão passiva paracelular, e compostos que são substratos de transportadores altamente expressos, podem apresentar fraca correlação *in vitro/in vivo*. Isso se deve a algumas características da monocamada de células Caco-2, que apresentam um número bem menor de poros do que o intestino (LINNANKOSKI *et al.*, 2007), além das junções oclusivas serem mais interligadas na monocamada de células Caco-2 diferenciadas, em comparação com o epitélio intestinal (YANG *et al.*, 2007). Larregieu & Benet (2013) afirmam que, para compostos lipofílicos, a relação da permeabilidade *in vitro/in vivo* é mais coerente; no entanto, quando as substâncias analisadas são substratos de transportadores, a variabilidade entre os dados *in vitro/in vitro* é maior ou igual a 10 vezes, em comparação com o modelo de células Caco-2 e o intestino humano.

## 6 CONCLUSÃO

O bornesitol, administrado por via intravenosa, reduz a pressão arterial de ratos, com mecanismo de ação semelhante ao anteriormente demonstrado para o extrato e fração padronizada de folhas de *Hancornia speciosa*, por meio da inibição da ECA e aumento da concentração de NO plasmático. Portanto, o bornesitol pode ser usado como marcador ativo do efeito hipotensor de *H. speciosa*.

O método bioanalítico desenvolvido e validado para quantificação de bornesitol em plasma de rato por UPLC-ESI-MS/MS apresentou-se adequado para o estudo farmacocinético. As condições de extração do plasma por precipitação de proteínas com acetonitrila se mostraram eficientes e resultaram em altas taxas de recuperação do bornesitol. O mesmo mostrou-se linear, exato, preciso, específico e



sensível, sendo adequado para a determinação dos perfis plasmáticos do composto após diferentes doses e vias de administração.

O conjunto de resultados da investigação farmacocinética do bornesitol revelou que o composto possui características farmacocinéticas não lineares e que o melhor modelo que se aplica é o bicompartimental. Os resultados encontrados demonstram ser um composto de baixa biodisponibilidade para as doses de 15 e 25 mg/Kg e moderada biodisponibilidade para a dose de 3 mg/Kg. Meia-vida de eliminação, *clearance* e volume de distribuição apresentam-se não correlacionados com as doses administradas.

Os resultados de validação do método analítico desenvolvido para a quantificação do bornesitol por UPLC-ESI-MS/MS foram adequados, possibilitando seu emprego nos ensaios de permeabilidade com células Caco-2.

A monocamada celular Caco-2 apresentou-se íntegra e apta para a realização dos experimentos de permeabilidade celular. Os resultados de permeabilidade obtidos apontam o bornesitol com tendo baixa permeabilidade, sugerindo que isso se deva à elevada hidrofília do composto. A permeabilidade do bornesitol foi aparentemente aumentada quando ele foi administrado em associação com rutina, ou como constituinte da matriz de uma fração padronizada de *H. speciosa*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R. N. D. C.; ROCHA, L. A.; ALBUQUERQUE, A. L. P.; FIALHO, A. V. M.; MOREIRA, T. M. M. Análise da produção do conhecimento em enfermagem acerca da temática hipertensão arterial, 1995 a 2005. **Online Brazilian Journal of Nursing**, v. 5, n. 3, 2006.

AGYENMANG, C.; BHOPAL, R. Hypertension and cardiovascular disease endpoints by ethnic group: the promise of data linkage. **Heart**, v. 99, n. 13, p. 675-676, 2013.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C.; J. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences**, v. 774, p. 215-222, 2002.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras: Conhecimentos populares e científicos**. Hemus, 1993. 341p.

ALPERT, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography**, v. 499, p. 177-196, 1990.

ARRUA, R. D.; TALEBIA, M.; CAUSONA, T. J. F.; HILDER, E. F. Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 1-12, 2012.

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

AUSTRALIAN GOVERNMENT. Department of Health. **Australian regulatory guidelines for complementary medicines, ARGCM**

<https://www.tga.gov.au/sites/default/files/australian-regulatory-guidelines-complementary-medicines-argcm-v8.0.pdf> (Accessed May 15, 2019).

AWADA, H.; KHAMISAB, M. M.; EL-ANEEDA, A. Mass spectrometry, review of the basics: Ionization. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, p. 158-175, 2015.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray ionization mass spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-41, 2012.

BANSAL, S.; De STEFANO, A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. **The AAPS Journal**, v. 9, p.E.109-E.114, 2007.

BANSAL, T.; JAGGI, M.; TALEGAONKAR, S. Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. - 1, p. 48-78, 2009.

BARROS, I. M. C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2008. 194p.

BATES S. H., JONES R. B., BAILEY C. J. Insulin-like effect of pentaeritritol. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 1944-1948, 2000.

BATHENA, S. P.; HUANG, J.; EPSTEIN, A. A.; GENDELMAN, H. E.; BOSKA, M. D.; ALNOUTI, Y. Rapid and reliable quantitation of amino acids and myo-inositol in mouse brain by high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 893, p. 15-20, 2012.

BAUMGARTNER, S.; GENNER-RITZMANN, R.; HAAS, J.; AMADB, R.; NEUKOM, R.; Isolation and identification of cyclitols in carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 34, p. 827-829, 1986.

BENJAMIN, D. I.; LOUIE, S. M.; MULVIHILL, M. M.; KOHNZ, R. A.; LI, D. S.; CHAN, L. G.; SORRENTINO, A.; BANDYOPADHYAY, S.; COZZO, A.; OHIRI, A.; GOGA, A.; NG, S.; NOMURA, D. K. Inositol phosphate recycling regulates glycolytic and lipid metabolism that drives cancer aggressiveness. **ACS Chemical Biology**, v.9, n. 6, p. 1340-1350, 2014.

BOROUJERDI, M. Noncompartmental approach in pharmacokinetics based on statistical moments. In: **Pharmacokinetics: Principles and applications**. New York: Mc Graw-Hill, cap. 17, p. 331-341, 2002.

BRAGA, F. C.; KREIS, W. ; OLIVEIRA, A. B. Effect of *Digitalis lanata* matrix composition on the lanatoside C partition coefficient and its consequence on rotation locular counter-current chromatography efficiency. **Journal of Chromatography**, v. 822, p. 37-44, 1998.

BRAGA, F. C.; RATES, S. M. K.; SIMÕES, C. M. O. **Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento. São Paulo: editora Artmed, 2017. cap 6.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas de registro e notificações de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira - Primeiro Suplemento. **ANVISA**, Brasília, 2018, 160p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 898, de 29 de maio de 2003. “Guia para planejamento e realização da etapa estatística de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2009, 136p

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2009, 2p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas Integrativas e Complementares: Plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2012, 156p

BRIVIBA, K.; SCHOLLENBERGER, M.; RODEHUTSCORD, M.; GREINER, R. Dephosphorylation of myo-inositol phosphates in the in vitro intestinal Caco-2 cell

model International. **Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 69, n. 1, p. 46-51, 2018.

BRODIE, R. R.; HILL, H. M. Validation issues arising from the new FDA guidance for industry on bioanalytical method validation. **Chromatographia**, v.55, supplement 1, S91-S94, 2002.

BRONSEMA, K. J.; BISCHOFF, R.; MERBEL, N. C. V. Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, p. 893-894, 2012.

BRONSERT, M. R.; HENDERSON, W. G.; VALUCK, R.; HOSOKAWA, P.; HAMMERMEISTER, K. Comparative effectiveness of antihypertensive therapeutic classes and treatment strategies in the initiation of therapy in primary care patients: a Distributed Ambulatory Research in Therapeutics Network (DARTNet) study. **The Journal of the American Board of Family Medicine**, v. 26, n. 5, p. 529-538, 2013.

BRUGTS, J. J.; VARK, L. V.; AKKERHUIS, M.; BERTRAND, M.; FOX, K.; MOURAD, J.; BOERSMA, E. Impact of renin–angiotensin system inhibitors on mortality and major cardiovascular endpoints in hypertension: A number-needed-to-treat analysis. **International Journal of Cardiology**, v. 181, p. 425-429, 2015.

CALHOUN, D. A.; BOOTH, J. N.; OPARIL, S.; IRVIN, M. R.; SHIMBO, D.; LACKLAND, D. T.; HOWARD, G.; SAFFORD, M. M.; MUNTNER, P. Refractory hypertension: Determination of prevalence, risk factors, and comorbidities in a large, population-based cohort. **Hypertension**, v. 63, n. 3, p. 451-458, 2014.

CÂMARA, D. V. Ação vasodilatadora de Inositóis. **[Tese de doutorado]** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais: 2015.

CAO, D.; WANG, J.; ZHOU, R.; LI, Y.; YU, H.; HOU, T. ADMET Evaluation in Drug Discovery. 11. Pharmacokinetics knowledge base (PKKB): A comprehensive

database of pharmacokinetic and toxic properties for drugs. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, p. 1132-1137, 2012.

CARLOMAGNO, G.; DE GRAZIA, S.; UNFER, V.; MANNA, F. Myo-inositol in a new pharmaceutical form: a step forward to a broader clinical use. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 3, p. 267-271, 2012.

CASPARY, W. F.; CRANE, R. K. Active transport of myo-inositol and its relation to the sugar transport system in hamster small intestine. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 16, p. 203:308, 1970.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CASTILLO-GARIT, J. A.; MARRERO-PONCE, Y.; TORRENS, F.; GARCÍA-DOMENECH, R. Estimation of ADME properties in drug discovery: Predicting Caco-2 cell permeability using atom-based stochastic and non-stochastic linear indices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 5, p. 1946-1974, 2008.

CASTILLO, R.; CHIRIBOGA, C.; FONTANILLA, M. Estandarización de un modelo basado en monocapas de células caco-2 com aplicación em estudios de absorción de fármacos. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 35, n.2, 2006.

CHANG, M. S.; J. I., Q.; ZHANG, J.; EL-SHOUBAGY, T. A. Historical review of sample preparation for chromatographic cioanalysis: Pros and cons. **Drug Development Research**, v. 68, n. 3, p. 107-133, 2007.

CHAVES, J. S.; LEAL, P. C.; PIANOWISKY, L.; CALIXTO, J. B. Pharmacokinetics and tissue distribution of the sesquiterpene alpha-humulene in mice. **Planta Medica**, v. 74, p. 1678-1683, 2008.

CHENG, S.; LIN, L.C.; LIN, C.H.; TSAI, T.H. Comparative oral bioavailability of geniposide following oral administration of geniposide, gardenia jasminoides ellis fruits extracts and gardenia herbal formulation in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 705-712, 2014.

CHIEN, H.; ZUR, A. A.; MAURER, T. S.; YEE, S. W.; TOLSMA, J.; JASPER, P.; SCOTT, D. O.; GIACOMINI, K. M. Rapid method to determine intracellular drug concentrations in cellular uptake assays: application to metformin in organic cation transporter 1-transfected human embryonic kidney 293 cells. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, n. 3, p. 356-364, 2016.

CHINA. **SFDA Order No. 28. China, 2007.** <http://www.sfdachina.com/info/64-1.htm> (Accessed May 15, 2019).

CHOI, R. J.; KIM, Y. X. Evaluating the regulation of p-glycoprotein by phytochemicals using caco-2 cell permeability assay system. **Natural Product Sciences**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2014.

CONSIGLIERI, V. O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 36, n. 1, p. 13-21, 2000.

COSTA, E. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, E. O.; SUCUPIRA, G. C.; BERTOLIN, A. O.; LOLIS, S. F.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, Review, p. 3670-3695, 2013.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E. M.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p. 620-636, 2001.



CYPROTEX. **Caco-2 permeability assay:** Cyprotex 2018.  
<https://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-permeability/caco-2-permeability/>  
(Accessed Jul 06, 2019).

D'ANTUONO, I.; GARBETTA, A.; LINSALATA, V.; MINERVINI, F.; CARDINALI A. Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): *In vitro* bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. **Food & Function**, v. 6, n. 4, p. 1268-1277, 2015.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432-455, 2016.

DEVANSHU, S.; RAHUL, M.; ANNU, G.; KISHAN, S.; ANROOP, N. Quantitative bioanalysis by LC-MS/MS: A Review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2010.

DIALLO, A.; EKLUGA-DEGBEKE, K.; AMEGBOR, K.; AGBONON, A.; AKLIKOKOU, K., CREPPY, E.; GBEASSOR, M. *In vivo* and *in vitro* toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p.1214-1218, 2014.

DI STEFANO, V.; AVELLONEA, G.; BONGIORNO, D.; CUNSOLO, V.; MUCCILLI, V.; SFORZAC, S.; DOSSENAC, A.; DRAHOS, L.; VÉKEY, K.; Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 74-85, 2012.

DOYLE, L. A.; YANG, W.; ABRUZZO, L. V.; KROGMANN, T.; GAO, Y.; RISHI, A. K.; ROSS, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy Sciences of the USA**, v. 95, n. 26, p. 15665-15670, 1998.

DROZDZIK, M.; GRÖER, C.; PENSKI, J.; LAPCZUK, J.; OSTROWSKI, M.; LAI, Y.; PRASAD.; UNADKAT, J. D.; SIEGMUND, W.; OSWALD, S. Protein abundance of clinically relevant multidrug transporters along the entire length of the human intestine. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 10, p. 3547-3555, 2014.

DUARTE, J.; PÉREZ-PALENCIA, R.; VARGAS, F.; OCETE, M. A.; PÉREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A. Tamargo, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 117-124, 2001.

DUDENBOSTEL, T.; ACELAJADO, M. C.; PISONI, R.; LI, P.; OPARIL, S.; CALHOUN, D.A. Refractory Hypertension, Evidence of Heightened Sympathetic Activity as a Cause of Antihypertensive Treatment Failure. **Hypertension**, v.66, p.126-133, 2015.

EGAN, B. M.; KJELDSEN, S. E.; GRASSI, G.; ESLER, M.; MANCIA, G. The global burden of hypertension exceeds 1.4 billion people: should a systolic blood pressure target below 130 become the universal standard? **Journal of Hypertension**, v. 37, n. 6, p. 1-6, 2019.

EGAN, W. J.; LAURI, G. Prediction of intestinal permeability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 273-289, 2002.

ESTUDANTE, M.; SOVERAL, G.; MORAIS, J. G.; BENET, L. Z. Insights into solute carriers: physiological functions and implications in disease and pharmacokinetics. **Royal Society of Chemistry**, v. 2016, n. 7, p. 1462-1478, 2016.

EU (European Union). **Directive 2004/24/EC of the european parliament and of the council.** [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir\\_2004\\_24/dir\\_2004\\_24\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2004_24/dir_2004_24_en.pdf) (Accessed May 15, 2019).

ENDRINGER, D. C. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na

quimioprevenção de câncer. **[Tese de doutorado]** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais: 2007.

ENDRINGER, D. C.; OLIVEIRA, O. V.; BRAGA, F. C. *In vitro* and *in silico* inhibition of angiotensin-converting enzyme by carbohydrates and cyclitols. **Chemical Papers**, v. 68, p. 37–45, 2014.

ENDRINGER, D. C.; PEZZUTO, J. M.; BRAGA, F. C. NF- $\kappa$ B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 1064-1069, 2009.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Guideline on Bioanalytical Method Validation**. London, jul. 2011.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. **Pharmacokinetics**. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 93-120, 2014.

FANG, Y.; CAO, W.; XIA, M.; PAN, S.; XU, X. Study of structure and permeability relationship of flavonoids in caco-2 cells. **Nutrients**, v. 9, n.1301, p. 1-15, 2017.

FERRARI, R.; ROSANO, G. M. Not just numbers, but years of science: putting the ACE inhibitor-ARB meta-analyses into context. **International Journal of Cardiology**, v. 166, p. 286-288, 2013.

FERREC, E. L.; CHESNE, C.; ARTUSSON, P.; BRAYDEN, D.; FABRE, G.; GIRES, P.; GUILLOU, F.; ROUSSET, M.; RUBAS, W.; SCARINO M. L. In vitro models of the intestinal barrier. **ATLA**, v. 29, p. 649-668, 2001.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; ENDRINGER, D. C.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, v. 14, p. 473-478, 2007a.

FERREIRA, H. C.; SERRA, C. P.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol-3-kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 1, p. 161-164, 2007b.

FLORES, M. I. A.; MORENO, J. L. F.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M. Fast determination of myo-inositol in milk powder by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.129, p. 1281-1286, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation**. Rockville, sep. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry. Botanical Drug Products, 2016**. Rockville, sep. 2016.

FREEMAN, R. Neurogenic orthostatic hypotension. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 6, p. 615-624, 2008.

FRIELER, R. A.; MITTENESSA, D. J.; GOLOVKO, M. Y.; GIENGERA, H. M.; ROSENBERGER, T. A. Quantitative determination of free glycerol and myo-inositol from plasma and tissue by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 3667-3672, 2009.

FROMM, M. F.; KIM, R. B. **Drug Transporters**. Springer, 2011. 457 p.

FUSI, F.; SAPONARA, S.; PESSINA, F.; GORELLI, B; SGARAGLI, G. Effects of quercetin and rutin on vascular preparations: A comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 10-7, 2003.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; GASPAROTTO, F. M.; LOURENÇO, E. L. B.; CRESTANI, S.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J.; SILVA-SANTOS, J. E.;

MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 363–372, 2011.

GHFAR, A. A.; WABAIDUR, S. M. , AHMED, A. Y. B. H.; ALOTHMAN, Z. A. KHAN, M. R.; AL-SHAALA, N. H. Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in dates using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 176, p. 487-492, 2015.

GILBERT, B.; ALVES, L. F. Synergy in Plant Medicines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 13-20, 2003.

GOMES, J. H. S. Estabilidade de L-(+)-bornesitol, marcador químico de *Hancornia speciosa* Gomes, frente a diferentes condições de estresse. **[Tese de doutorado]** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais: 2016.

GOMES, J. H. S.; SILVA, G. C.; CÔRTEZ, S. F.; PÁDUA, R. M.; BRAGA, F. C. Forced degradation of L-(+)-bornesitol, a bioactive marker of *Hancornia speciosa*: Development and validation of stability indicating UHPLC-MS method and effect of degraded products on ACE inhibition. **Journal of Chromatography B**, v. 1093-1094, p. 31-38, 2018.

GONÇALVES, J. E; DE SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. **Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares**. In. STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIAN, C.; GAI, M. N. Ciências Farmacêuticas, Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap 19.

GONÇALVES, J. E; FERNANDES, M. B.; CHIANN, C.; GAI, M. N.; DE SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Effect of pH, mucin and bovine serum on rifampicin permeability through Caco-2 cells. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 33, n. 6, p. 316-23, 2012.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n°. 1, p. 131-138, 1982.

HAGENBUCH, B.; STIEGER, B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2-3, p. 396-412, 2013.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, p. 686-699, 2005.

HASHEK, W. M.; ROUSSEAUX, C. G. WALLING, M. **Haschek and Rousseaux's Handbook of toxicologic pathology**. 3° Ed. Boston, Academic Press, p. 39-59, 2013.

HENRY, O. Y. F.; VILLENAVE, R.; CRONCE, M. J.; LEINWEBER, W. D.; BENZ, M. A.; INGBER, D. E. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. **Lab on a Chip**, v. 17, p. 2264-2271, 2017.

HIGGINS, J. W.; BAO, J. Q.; KE, A. B.; MANRO, J. R.; FALLON, J. K.; SMITH, P. C.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J. Utility of Oatp1a/1b-knockout and OATP1B1/3-humanized mice in the study of OATP-mediated pharmacokinetics and tissue distribution: case studies with pravastatin, atorvastatin, simvastatin, and carboxydichlorofluorescein. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 42, p. 182-192, 2014.

HO, P. M.; ZENG, C.; TAVEL, H. M.; SELBY, J. V.; O'CONNOR, P. J.; MARGOLIS, K. L.; MAGID, D. J. Trends in first-line therapy for hypertension in the cardiovascular research network hypertension registry, 2002-2007. **Archives of Internal Medicine**, v. 170, n. 10, p. 912-913, 2010.

HOOPER, N. M.; TURNER, A. J. An ACE structure. **Nature. Structure. Biology**, v. 10, n. 3, p. 155-157, 2003.

HU, Z.; YANG, X.; HO, P. C.; CHAN, S. Y.; HENG, P. W.; CHAN, E. Herb-drug interactions: a literature review. **Drugs**, v. 65, n. 9, p. 1239-1282, 2005.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use - ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/96)**. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996.

IGLESIAS, A. H., **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massas**. Waters Technologies do Brasil, Barueri, SP. Disponível em<<http://www.cnpsa.embrapa.br/portalmat/images/arquivos/17MET/minicursos/introducao%20ao%20acoplamento%20cromatografia%20liquida%20-%20espectrometria%20de%20massas.pdf>> . Acesso em: 31 mai. 2017.

ITC (International Transporter Consortium). Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215-236, 2010.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Atomic Weights of the Elements 1989 (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 975-990, 1991.

JIANG, W.; FISCHER, G.; GIRMAY, Y.; IRGUM, K., J. Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode. **Chromatography A**, v. 1127, p. 82-91, 2006.

JIN, L.; MENG, X.; MING-YI, Z.; YUN, F. Chemoreversal metabolites from the endophytic fungus *Penicillium citrinum* isolated from a mangrove *Avicennia marina*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 7, p. 1203-1205, 2015.

JU, X. H.; SHI, Y.; LIU, N.; GUO, D. M.; CUI, X. Determination and pharmacokinetics of gastrodin in human plasma by HPLC coupled with photodiode array detector. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 1982-1986, 2010.

KASILO, O.M.; TRAPSIDA, J.M. Regulation of traditional medicine in the WHO african region. **The African Health Monitor**, v. 14, p. 25-31, 2013.

KHAN, M.; MARYAM, A.; MEHMOOD, T.; ZHANG, Y.; MA, T. Enhancing activity of anticancer drugs in multidrug resistant tumors by modulating p-glycoprotein through dietary nutraceuticals. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 16, p. 6831-6839, 2015.

KIM, B. H.; PARK, J. Y.; JANG, J. B.; MOON, D. C. LC-MS/MS method for the quantification of myo- and chiro-inositol as the urinary biomarkers of insulin resistance in human urine. **Biomedical Chromatography**, v. 26, p. 429-433, 2012.

KINDT, E.; SHUM, Y.; BADURA, L.; SNYDER, P. J.; BRANT, A.; FOUNTAIN, S.; SZEKELY-KLEPSE, G. Development and validation of an LC/MS/MS procedure for the quantification of endogenous myo-inositol concentrations in rat brain tissue homogenates. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 4901-4908, 2004.

KOH, H. L.; LAU, A. J.; CHAN, E. C. Y. Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of underivatized dencichine ( $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ ,  $\beta$ -diaminopropionic acid) in Panax medicinal plant species. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1237-1244, 2005.

KOEPSELL, H. Role of organic cation transporters in drug-drug interaction. **Expert Opinion Drug Metabolism & Toxicology**, v. 11, n. 10, p. 1619-1633, 2015.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J.; RATCLIFFE, R. G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 255-265, 2005.



KUMAR, Y. S.; ADUKONDALU, D.; SATHISH, D.; VISHNU, Y. V.; RAMESH, G.; LATHA, A. B.; REDDY, P. C.; SARANGAPANI, M.; RAO, Y. M. P-Glycoprotein- and cytochrome P-450-mediated herbal drug interactions. **Drug Metabolism and Personalized Therapy**, v. 25, n. 1-4, p. 3-16, 2010.

KWON, Y. **Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism for industrial scientists**. Springer, 2002.

JANDERA, P.; JANÁS, P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 967, p.12-32, 2017.

LAI, R. E.; JAY, C. E.; SWEET, D. H. Organic solute carrier 22 (SLC22) family: Potential for interactions with food, herbal/dietary supplements, endogenous compounds, and drugs. **Journal of Food Drug Analysis**, v. 26, n. 2S, p. S45-S60, 2018.

LANÇAS, F. M.; Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2010.

LANÇAS, F. M. Validação em cromatografia líquida. In: (Ed.). **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas: Átomo, 2009. cap. 13, 382 p.

LARREGIEU, C. A.; BENET, L. Z. Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements. **The AAPS Journal**, v.15, n. 2, p. 483-497, 2013.

LENNERNA, H.; LUNDQVIST, T.; AUTHI, K. S.; LINDAHL, A.; OKKOLA, S.; GUSTAFSSON, T. O. The pharmacokinetics and metabolism of  $\alpha$ -trinositol (D-myoinositol 1,2,6-trisphosphate) Studies involving intravenous infusion in rats, metabolism in human platelets and leukocytes, and dephosphorylation by bovine

alkaline phosphatases. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 267-275, 1997.

LEUNG, K. Y.; MILLS, K.; BURREN, K. A.; COPP, A. J.; GREENE, N. D. E. Quantitative analysis of myo-inositol in urine, blood and nutritional supplements by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 2759-2763, 2011.

LIANG, E.; GARZONE, P.; CEDARBAUM, J. M.; KOLLER, M.; TRAN, T.; XU, V.; ROSS, B.; JHEE, S. S.; ERESHEFSKY, L.; PASTRAK, A.; ABUSHAKRA, S. Pharmacokinetic profile of orally administered scyllo-inositol (eInd005) in plasma, cerebrospinal fluid and brain, and corresponding effect on amyloid-beta in healthy subjects. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 2, n. 2, 0. 186-194, 2013.

LI, D.; WANG, W.; XU, L.; LI, M.; JING, X.; ZHANG, L. Pharmacokinetic study of three active flavonoid glycosides in rat after intravenous administration of *Trollius ledebourii* extract by liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p.1130-1136, 2008.

LI, L.; FU, Q.; XIA, M.; XIN, L.; SHEN, H.; LI, G.; JI, G.; MENG, Q.; XIE, Y. Inhibition of P-glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cells by phytic acid **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 988-998, 2018.

LINDER, L.; KIOWSKI, W.; BUHLER, F. R.; LUSCHER, T. F. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo: Blunted response in essential hypertension. **Circulation**, v. 81, p. 1762–1767,1990.

LINNANKOSKI, J.; MAKELA, J.; PALMGREN, J.; MAURIALA, T.; VEDIN, C.; UNGELL, A.; LAZOROVA, L.; ARTURSSON, P.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M. Paracellular porosity and pore size of the human intestinal epithelium in tissue and cell culture models. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2166-2175, 2007.

LIU, Y.; URGAONKAR, S.; VERKADE, J. G.; DANIEL, W. Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1079, p. 146-152, 2005.

LI, Y.; REVALDE, J.; PAXTON, J. W. The effects of dietary and herbal phytochemicals on drug transporters. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 116, p. 45-62, 2017.

LOIZZO M. R., TUNDIS R., MENICHINI F., STATTI G. A., MENICHINI F. Hypotensive natural products: Current status. **Mini-Reviews in Medical Chemistry**, v. 8, p. 828-855, 2008.

LONDHE, V.; RAJADHYAKSHA, M. Review of recommendations for bioanalytical method validation: Chromatographic assays and ligand binding assays. **Chromatographia**, v. 82, p. 523-535, 2019.

LORENZI, H. Mangabeira. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, v. 1, p. 127, 2009.

LOZANO, E.; BRIZ, O.; MACIAS, R. I. R.; SERRANO, M. A.; MARIN, J. J. G.; HERRAEZ, E. Genetic heterogeneity of SLC22 family of transporters in drug disposition. **Journal of Personalized Medicine**, v. 8, n. 2, p. 1-27, 2018.

LUCAS-FILHO, M. D.; SILVA, C. G.; CORTES, S. F.; MARES-GUIA, T. R.; FERRAZ, V. P.; SERRA, C. P.; BRAGA, F. C. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz. **Phytomedicine**, v. 17, p. 383–387, 2010.

LU, X.; CHAN, T.; ZHU, L.; BAO, X.; VELKOV, T.; ZHOU, W. T.; LI, J.; CHAN, H.; ZHOU, F. The inhibitory effects of eighteen front-line antibiotics on the substrate uptake mediated by human Organic anion/cation transporters, Organic anion

transporting polypeptides and Oligopeptide transporters in *in vitro* models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, p. 132-143, 2018.

MAKI, N.; HAFKEMEYER, P.; DEY, S. Allosteric modulation of human P-glycoprotein. Inhibition of transport by preventing substrate translocation and dissociation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 18132-18139, 2003.

MALACHIAS, M. V. B.; SOUZA, W. K. S. B.; PLAVNIK, F. L.; RODRIGUES, C. I. S.; BRANDÃO, A. A.; NEVES, M. F. T.; BORTOLOTTI, L. A.; FRANCO, R. JS; POLI-DE-FIGUEIREDO, CE; JARDIM, PCBV; AMODEO, C; BARBOSA, E. C. D; KOCH, V.; GOMES, M. A. M.; PAULA, R. B.; PÓVOA, R. M. S.; COLOMBO, F. C.; FERREIRA FILHO, S.; MIRANDA, R. D.; MACHADO, C. A.; NOBRE, F.; NOGUEIRA, A. R.; MION JÚNIOR, D.; KAISER, S.; FORJAZ, C. L. M.; ALMEIDA, F. A.; MARTIM, J. F. V.; SASS, N.; DRAGER, L. F.; MUXFELDT, E.; BODANESE, L. C.; FEITOSA, A. D.; MALTA, D.; FUCHS, S.; MAGALHÃES, M. E.; OIGMAN, W.; MOREIRA FILHO, O.; PIERIN, A. M. G.; FEITOSA, G. S.; BORTOLOTTI, M. R. F.L.; MAGALHÃES, L. B. N. C.; SILVA, A. C. S.; RIBEIRO, J. M.; BORELLI, F. A. O.; GUS, M.; PASSARELLI JÚNIOR, O.; TOLEDO, J. Y.; SALLES, G. F.; MARTINS, L. C.; JARDIM, T. S. V.; GUIMARÃES, I. C. B.; ANTONELLO, I. C.; LIMA JÚNIOR, E.; MATSUDO, V.; SILVA, G. V.; COSTA, L. S.; ALESSI, A.; SCALA, L. C. N.; COELHO, E. B.; SOUZA, D.; LOPES, H. F.; GOWDAK, M. M. G.; CORDEIRO JÚNIOR, A. C.; TORLONI, M. R.; KLEIN, M. R. S. T.; NOGUEIRA, P. K.; LOTAIF, L. A. D.; ROSITO, G. B. A.; MORENO JÚNIOR, H. 7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**; v. 107 (3 supl. 3); p. 1-83; 2016.

MANCIA, G.; BACKER, G.; DOMINICZAK, A.; CIFKOVA, R.; FAGARD, R.; GERMANO, G.; GRASSI, G.; HEAGERTY, A. M.; KJELDSEN, S. E.; LAURENT, S.; NARKIEWICZ, K.; RUILOPE, L.; RYNKIEWICZ, A.; SCHMIEDER, R. E.; BOUDIER, H. A. J. S.; ZANCHETTI, A. Guidelines for the management of arterial hypertension. The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **Journal of Hypertension**, v. 25, p.1105-1187, 2007.

MAO, Q.; UNADKAT, J. D. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 7, n. 1, p. E118-E133, 2005.

MARINHO D. G.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 530-537, 2011.

MA, S. G.; ZHU, M. S. Recent advances in applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites. **Chemico Biological Interactions**, v. 179, n. 1, p. 25-37, 2009.

MASHOUR, N. H.; LIN, G. I.; FRISHMAN, W. H. Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 158, p. 2225-2234, 1998.

MATCHAR, D. B.; MCCRORY, D. C.; ORLANDO, L. A.; PATEL, M. R.; PATEL, U. D.; PATWARDHAN, M. B.; POWERS, B.; SAMSA, G. P.; GRAY, R. N. Systematic review: Comparative effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers for treating essential hypertension. **Annals of Internal Medicine**, v. 148, p. 16-29, 2008.

MATTIAS CARLSTROM, M.; LIU, M.; YANG, T.; ZOLLBRECHT, C.; HUANG, L.; PELELI, M.; BORNIQUEL, S.; KISHIKAWA, H.; HEZEL, M.; PERSSON, A. E. G.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. cross-talk between nitrate-nitrite-NO and no synthase pathways in control of vascular no homeostasis. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 23, n. 4, p. 295-306, 2015.

MAZZARI, A.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: Pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 162, p. 1-12, 2014a.

MAZZARI, A.; PRIETO, J. M. Monitoramento de interações farmacocinéticas entre plantas medicinais e fitoterápicos e os medicamentos convencionais pelo sistema de farmacovigilância brasileiro. **Infarma: Pharmaceutical Scinces**, v. 26, n. 3, p. 193-198, 2014b.

MCCALLEY, D. V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1523, p. 49-71, 2017.

MEDEIROS R, PASSOS GF, VITOR CE, KOEPP J, MAZZUCO TL, PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618-627, 2007.

MEHTA, P.; SHAH, R.; LOHIDASAN, S.; MAHADIK, K. R. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants - A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, p. 207-227, 2015.

MEIER, Y.; ELORANTA, J. J.; DARIMONT, J.; ISMAIR, M. G.; HILLER, C.; FRIED, M.; KULLAK-UBLICK, G. A.; VAVRICKA, S. R. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 4, p. 590-594, 2007.

MEIJA, J.; COPLEN, T. B.; BERGLUND, M.; BRAND, W. A.; DE BIEVRE, P.; GRONING, M.; HOLDEN, N. E.; IRRGEHER, J.; LOSS, R. D.; WALCZYK, T.; PROHASKA, T. Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 265-291, 2016.

MENDES, G. S.; MORAES, C. F.; GOMES, L. Prevalência de hipertensão arterial sistêmica em idosos no Brasil entre 2006 e 2010. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 9, n. 32, p. 273-278, 2014.

MERCIER, K.; SMITH, H.; BIEDERMAN, J. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibition overview of the therapeutic use of angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers, mineralocorticoid receptor antagonists, and direct renin inhibitors. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 41, p. 765-778, 2014.

MILMAN, B. L. General principles of identification by mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 24-33, 2015.

MILTON, S. G.; ROBINSON, K.; MA, J.; WEI, B.; POON, I. O.; LIANG, D. Biotransformation and pharmacokinetics of inositol hexanicotinate in rats. **Xenobiotica**, v. 43, n. 9, p. 817-822, 2013.

MINOZZI, M.; NORDIO, N.; PAJALICH, R. The combined therapy myo-inositol plus D-chiro-inositol, in a physiological ratio, reduces the cardiovascular risk by improving the lipid profile in PCOS patients. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 4, p. 53-554, 2013.

MOEINA, M. M.; A BEQQALIB, A. E.; ABDEL-REHIMB, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concept sand strategies. **Journal of Chromatography B**, v. 1043, p. 3-11, 2017.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MORAES, T. M.; RODRIGUES, C. M.; KUSHIMAA, H.; BAUABC, T. M.; VILLEGAS, W.; PELLIZZON, C. H.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-Helicobacter pylori actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 161-168, 2008.

MORÉ, G. P. D.; CÁRDENAS, P. A.; COSTA, G. M.; SIMÕES, C. M. O.; ARAGÓN, D. M. Pharmacokinetics of botanical drugs and plant extracts. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1646-1664, 2017.

MOREIRA, L. N.; SILVA, J. F.; SILVA, G. C.; LEMOS, V. S.; CORTES, S. F. Activation of eNOS by D-pinitol induces an endothelium-dependent vasodilatation in mouse mesenteric artery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1-9, 2018.

MOREIRA, Y. A. **As plantas que curam**. v. 1, LI-BRA, 1984. 410p.

MUELLER, M. S., KARHAGOMBA, I. B., HIRT, H. M.; WEMAKOR, E. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. **Journal Ethnopharmacology**, v. 73, p. 487-493, 2000.

MÜLLER, J.; KEISER, M.; DROZDZIK, M.; OSWALD, S. Expression, regulation and function of intestinal drug transporters: an update. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 175-192, 2017.

NEWMAN, D. J. AND CRAGG, G. M. Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2013.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry**. 3 ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

OH, H.; KANG, D.G.; KWON, T.O.; JANG, L.L.; CHAI, K.Y., YUN, Y.; CHUNG, H.T., LEE, H.S. Four glycosides from the leaves of *Abeliophyllum distichum* with inhibitory effects on angiotensin converting enzyme. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 7, p. 811-3, 2003



OLIVEIRA, M. E. B.; OLIVEIRA, M. A.; LEMOS, I. C. S.; SILVA, L. G.; MENEZES, I. R. A.; FERNANDES, G. P.; KERNTOPF, M. R. Uso de plantas medicinais por portadores de hipertensão arterial sistêmica. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 18, n. 3, p. 137-142, 2014.

PASIKANTI, K. K.; HO, P. C.; CHAN, E. C. Y. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 2, p. 202-211, 2008.

PEÑA-SOLORZANO, D.; STARK, S. A.; KONIG, B.; SIERRA, C. A.; OCHOA-PUENTES, C. ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, n. 5, p. 987-1050, 2016.

PEREIRA, A. B. D. Padronização químico-biológica de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes (mangaba): Estudos de relação entre composição química e atividades anti-hipertensiva e antidiabética. **[Tese de doutorado]** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais: 2016.

PEREIRA, A. B. D.; VERÍSSIMO, T. M.; OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, I. A.; ALVES, R. J.; BRAGA, F. C. Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. **Journal of Chromatography B**, v. 887-888, p. 133-137, 2012.

PEREIRA, A. C.; PEREIRA, A. B. D.; MOREIRA, C. C. L.; BOTION, L. M.; LEMOS, V. S.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 30-35, 2015.

PEREIRA, I. M. O. Hipertensão arterial sistêmica: projeto de intervenção para hospitalizações evitáveis. **Liph Science**, v. 2, n. 2, p. 21-40, 2015.

PERSON, M.; HAZOTTE, A.; ELFAKIR, C.; LAFOSSE, M., J. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, p. 174-181, 2005.

PHELPS, D. L.; WARD, R. M.; WILLIAMS, R. L.; WATTERBERG, K. L.; LAPTOOK, A. R.; WRAGE, L. A.; NOLEN, T. L.; FENNELL, T. R.; EHRENKRANZ, R. A.; POINDEXTER, B. B.; COTTEN, C. M.; HALLMAN, M. K.; FRANTZ III, I. D.; FAIX, R. G.; ZATERKA-BAXTER, K. M.; DAS, A.; BALL, M. B.; O'SHEA, T. M.; LACY, C. B.; WALSH, M. C.; SHANKARAN, S.; SÁNCHEZ, P. J.; BELL, E. F.; HIGGINS, R. D. Pharmacokinetics and safety of a single intravenous dose of *myo*-inositol in preterm infants of 23–29 wk. **Pediatric Research**, v. 74, n. 6, p.721-729, 2013.

POLSON, C.; SARKAR, P.; INCLEDON, B.; RAGUVARAN, V.; GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 263-275, 2003.

POULIN, P. Drug distribution to human tissues: prediction and examination of the basic assumption in vivo pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK/PD) research. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 6, p. 2110-2118, 2015.

PUBCHEM. Banco de dados e moléculas **National Center for Biotechnology Information (NCBI)**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440079> (Accessed Aug 09, 2019).

QIAO, L.; SHI, X.; XU, G. Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 81, p. 23-33, 2016.

RAINVILLE, P. D.; SMITH, N. W.; COWAN, D.; PLUMB, R. S. Comprehensive investigation of the influence of acidic, basic, and organic mobile phase compositions on bioanalytical assay sensitivity in positive ESI mode LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 138-150, 2012.

RODRIGUES, C. M.; BRITO, A. R. M. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae) **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 29, Águas de Lindóia. Resumos. São Paulo, 2006.

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v. 21, p. 1907-1914, 2007.

ROMERO-CASTRO, A.; GUTIÉRREZ-SANCHÉZ, M.; CORREA-BASURTO, J.; HERNÁNDEZ, C. R.; MARTÍNEZ, I. I. P.; MENDIETA-WEJEB, J. E. Pharmacokinetics in Wistar rats of 5-[(4-carboxybutanoyl)amino]-2-hydroxybenzoic acid: A novel synthetic derivative of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) with possible anti-inflammatory activity. **Plos One**, p. 1-16, 2016.

ROTH, M.; OBAIDAT, A.; HAGENBUCH, B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1260-1287, 2012.

RUBAS, W.; JEZYK, N.; GRASS, G. M. Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 113-118, 1993.

RUSSIA. **Federal Law No. 61 FZ, 2010.**  
[https://www.unodc.org/res/cld/document/rus/federal-law-on-circulation-of-medicines\\_html/Russian\\_Federation\\_Federal\\_Law\\_On\\_Circulation\\_of\\_Medicines\\_61-FZ\\_EN.pdf](https://www.unodc.org/res/cld/document/rus/federal-law-on-circulation-of-medicines_html/Russian_Federation_Federal_Law_On_Circulation_of_Medicines_61-FZ_EN.pdf) (Accessed May 15, 2019).

SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 95, p. 606-610, 2006.

SANTOS, E. A.; SAMPAIO, T. S.; FEITOSA, J. G .R.; RIBEIRO, A. O.; NOGUEIRA, P. C. L. Constituintes voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). In **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 29, Águas de Lindóia. Resumos. São Paulo, 2006.

SAVOIE, N.; BOOTH, B. P.; BRADLEY, T.; GAROFOLO, F.; HUGHES, N. C.; HUSSAIN, S.; KING, S. P.; LINDSAY, M.; LOWES, S.; ORMSBY, E.; PHULL, R.; ROCCI ML, J. R.; VALLANO, P. T.; VIAU, A.; ZHU, Z. The 2nd calibration and validation group workshop on recent issues in good laboratory practice bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 1, n. 1, p. 19-30, 2009.

SCHOENWALD, R. D. **Basic principles**. In. SCHOENWALD, R. D. Pharmacokinetics in drug discovery and development. Florida: CRC Press 2002. Cap 1.

SCOTT-BURDEN, T.; VANHOUTTE, P. M. Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. **Texas Heart Institute Journal**, v. 21, p. 91–97, 1994.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, p. 2216-2231, 2013.

SERRA, C. P.; CORTES, S. F.; LOMBARDID, J. A.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v. 12, p. 424-432, 2005.

SHITARA, Y.; MAEDA, K.; IKEJIRI, K.; YOSHIDA, K.; HORIE, T.; SUGIYAMA, Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. **Biopharm Drug Dispos**, v. 34, n. 1, p. 45-78, 2013.

SILVA, G. C.; BRAGA, F. C.; LEMOS, V. S.; CORTES, S. F. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. **Phytomedicine**, v. 23, p. 214-219, 2016.

SILVA, G. C.; BRAGA, F. C.; LIMA, M. P.; PESQUERO, J. L.; LEMOS, V. S.; CORTES, S. F. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 709-713, 2011.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**, On-Line, p. 1-14, 2000.

SINGTOROJ, T.; TARNING, J.; ANNERBERG, A.; ASHTON, M.; BERGQVIST, Y.; WHITE, N. J.; LINDEGARDH, N.; DAY, N. P. J. A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 219-227, 2006.

SMITH, D. A.; BEAUMONT, K.; MAURER, T. S.; DI, L. Volume of distribution in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p.5691-5698, 2015.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997, 765 p.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, p. 135-142, 2006.

SPH. Sociedade Portuguesa de Hipertensão. Guidelines de 2013 da ESH/ESC para o tratamento da hipertensão arterial. **Revista Portuguesa de Hipertensão e Risco Cardiovascular**, n. 39, 2014.

SPINELLA, M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. (Herbal Synergy Review). **Alternative Medicine Review**, v. 7, n. 2, p. 130-137, 2002.

SRINIVASAN, B.; KOLLI, A. R.; ESCH, M. B.; ABACI, H. E.; SHULER, M. L.; HICKMAN, J. J. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. **Journal of Laboratory Automation**, v. 20, n. 2, p. 107-126, 2015.

STAHNKE, H.; KITTLAUS, S.; KEMPE, G.; ALDER, L. Reduction of matrix effects in liquid chromatography–Electrospray ionization–mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 1474-1482, 2012.

STAPLETON, P. A; GOODWILL, A. G.; JAMES, M. E., BROCK, R. W.; FRISBEE J. C. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. **Journal of Inflammation**, v. 7, n. 54, p. 1-10, 2010.

STAUD, F.; PAVEK, P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). The **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 4, p. 720-725, 2005.

STOLKER, A. A. M.; STEPHANY, R. W.; GINKEL, L. A. Identification of residues by LC-MS. The application of new EU guidelines. **Analysis**, v. 28, n. 10, p. 947-951, 2000.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; DE CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética: Conceitos, definições e relação com a farmacodinâmica e a biofarmácia (biofarmacotécnica)**. In. STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; DE CAMPOS,

D. R.; GONÇALVES, J. E. Farmacocinética Básica e Aplicada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap 1.

SUN, H.; CHOW, E. C.; LIU, S.; DU, Y.; PANG, K. S. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. **Expert Opinion Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 4, 2008.

SUZUKI, A.; KAGAWA, D.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Hypertensive Research**, v. 25, n. 1, p. 99-107, 2002.

TAKAHASHI, H., YOSHIMOTO, M., HIGUCHI, H. Different effects of L-type and T-type calcium channel blockers on the hypnotic potency of triazolam and zolpidem in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, p. 317-321, 1999.

TAUR, J. S.; RODRIGUEZ-PROTEAU, R. Effects of dietary flavonoids on the transport of cimetidine via P-glycoprotein and cationic transporters in Caco-2 and LLC-PK1 cell models. **Xenobiotica**, v. 38, n. 12, p. 1536-1550, 2008.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 328, 2005.

THANOU, M. M.; KOTZE´, A. F.; SCHARRINGHAUSEN, T.; LUEßEN, H. L.; DE BOER, A. G.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers. **Journal of Controlled Release**, v. 64, p.15-25, 2000.

TOLONEN, A.; TURPEINEN, M.; PELKONEN, O. Liquid chromatography mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 3-4, p. 120-133, 2009.

TOUTAIN, P.; FERRAN, A.; BOUSQUET-MÉLOU, A. **Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics.** Handbook of Experimental Pharmacology, New York, v. 199, n. 1, p. 19-48, 2010.

TOZER, T. M.; ROWLAND, M. **Introdução à farmacocinética e farmacodinâmica: As bases quantitativas da terapia farmacológica.** Porto Alegre: Artmed, 2009. 336p.

TZAKOS, A. G.; GALANIS, A. S.; SPYROULIAS, G. A.; CORDOPATIS, P.; MANESSIZOUPA, E.; GEROTHANASSIS, I. P. Structure-function discrimination of the N- and C- catalytic domains of human angiotensin-converting enzyme: implications for Cl<sup>-</sup> activation and peptide hydrolysis mechanisms. **Protein Engineering**, v. 16, n. 12, p. 993-1003, 2003.

ULRICH-MERZENICHA, G.; PANEKB, D.; ZEITLERB, H.; VETTERA, H.; WAGNERC, H. Drug development from natural products: Exploiting synergistic effects. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 208-219, 2010.

VAN DER HEYDEN, Y.; JIMIDAR, M.; HUND, E.; NIEMEIJER, N.; PEETERS, R.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L.; HOOGMARTENS, J. Determination of system suitability limits with a robustness test. **Journal of Chromatography A**, v. 845, p. 145-154, 1999.

VARK, L. C. V.; BERTRAND, M.; AKKERHUIS, K. M. BRUGHTS, J. J.; FOX, K.; MOURAD, J. J.; BOERSMA, E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce mortality in hypertension-a meta-analysis of randomized clinical trials of renin-angiotensin-aldosterone-system inhibitors involving 158,998 patients. **European Heart Journal**, v. 33, p.2088-2097, 2012.

VERJEE, S.; KELBER, O.; KOLB, C.; ABDEL-AZIZ, H.; BUTTERWECK, V. Permeation characteristics of hypericin across Caco-2 monolayers in the presence of single flavonoids, defined flavonoid mixtures or Hypericum extract matrix. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, p. 58-69, 2019.



VERSARI, D.; DAGHINI, E.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man. **Experimental Physiology**, v. 94.3, p. 317-321, 2008.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.

VIEIRA, N. R; CAMPOS, D. R. **Manual de Bioequivalência**. Série Pesquisa Clínica. 1. ed. São Paulo: Dendrix, 2011. 208 p.

VISWANATHAN, C. T.; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A. J.; ROSE, M. J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V. P.; SKELLY, J. P.; SWANN, P. G.; WEINER, R. Workshop/Conference Report – Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 10, p. 1962-1973, 2007.

VLADIMIROVA-KITOVA, L.; DENEVA, T.; ANGELOVA, E.; NIKOLOV, F.; MARINOV, B.; MATEVA, N. Relationship of asymmetric dimethylarginine with flow-mediated dilatation in subjects with newly detected severe hypercholesterolemia. **Clinical Physiology Functional Imaging**, v. 28, p.417-425, 2008.

WANG, P. G.; HE, W. **Hidrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and advanced applications**. New York: CRC Press Taylor and Francis Group, LLC, 2011, 596 p

WATSON, M. K.; PAPICH, M. G.; CHINNADURAI, S. K. Pharmacokinetics of intravenous clindamycin phosphate in captive Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*). **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 40:682-686, 2017.

WHO. World Health Organization – **A global brief on hypertension, silent killer, global public health crisis**. Geneva: World Health Organization, 2013.

WHO. World Health organization. **Cardiovascular Diseases (CVDs): 2017**. [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). (Accessed Jun 27, 2019).

WHO. World Health Organization. **Prevention of Cardiovascular Disease Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk**, 2007.

WOLKING, S.; SCHAEFFELER, E.; LERCHE, H.; SCHWAB, M.; NIES, A. T. Impact of genetic polymorphisms of abcb1 (MDR1, p-glycoprotein) on drug disposition and potential clinical implications: Update of the literature. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 54, n. 7, p. 709-735, 2015.

WOLLNY, T.; AIELLO, L.; DI TOMMASO, D.; BELLAVIA, V.; ROTILIO, D.; DONATI, M. B.; DE GAETANO, G.; IACOVIELLO, L. Modulation of hemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 3, p. 747-755, 1999.

YAMASHITA, S.; TFURUBAYASHI, T.; KATAOKA, M.; SAKANE, T.; SEZAKI, H.; TOKUDA, H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using caco-2 cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 195-204, 2000.

YAMASHITA, Y.; YAMAOKA, M.; HASUNUMA, T.; ASHIDA, H.; YOSHIDA, K. Y. Detection of orally administered inositol stereoisomers in mouse blood plasma and their effects on translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4850-4854, 2013.

YANG, M.; CHENG, C.; YANG, J.; GUO, D. Metabolite profiling and characterization for medicinal herbal remedies. **Current Drug Metabolism**, v. 13, p. 535-557, 2012.

YANG, Y.; BAI, L.; LI, X.; XIONG, J.; XU, P.; GUO, C.; XUE, M. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood-

brain barrier cell and Caco-2 cell models. **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 388-396, 2014.

YANG, Y.; FAUSTINO, P. J.; VOLPE, D. A.; ELLISON, C. D.; LYON, R. C.; YU, L. X. Biopharmaceutics classification of selected  $\beta$ -blockers: Solubility and permeability class membership. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 4, p. 608-614, 2007.

YANG, Y.; ZHANG, Z.; LI, S.; YE, X.; LI, X.; HE, K. Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. **Fitoterapia**, v. 92, p. 133-147, 2014.

YANG, Z. Online hyphenated liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry for drug metabolite and nature product analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 3, p. 516-527, 2006.

ZAKERI-MILANI, P.; VALIZADEH, H. Intestinal transporters: enhanced absorption through P-glycoprotein-related drug interactions. **Expert Opinion Drug Metabolism Toxicology**, v. 10, n. 6, p. 859-871, 2014.

ZHANG, H. Y.; ZHANG, D. L.; RAY, K.; ZHU, M. S. Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 7, p. 999-1016, 2009.

ZHANG, X.; SONG, J.; SHI, X.; MIAO, S.; LI, Y.; WEN, A. Absorption and metabolism characteristics of rutin in caco-2 cells. **The ScientificWorld Journal**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

ZHOU, J.; OUEDRAOGO, M.; QU, F.; DUEZ, P. Potential genotoxicity of traditional chinese medicinal plants and phytochemicals: An overview **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 1745-1755, 2013.

**ANEXOS**

RELATÓRIO DE APROVAÇÃO CEUA

PAPEL MONO-LOG DEMONSTRANDO O MODELO BICOMPARTIMENTAL EM  
ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA