

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

RAFAEL ROCHA DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE *IN VITRO* E DA SOLUBILIDADE EM
EQUILÍBRIO DE KAVAÍNA ISOLADA E EM EXTRATO SECO DE KAVA-
KAVA**

Belo Horizonte – MG

2021

RAFAEL ROCHA DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE *IN VITRO* E DA SOLUBILIDADE EM
EQUILÍBRIO DE KAVAÍNA ISOLADA E EM EXTRATO SECO DE KAVA-
KAVA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Isabela da Costa César

Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves

Belo Horizonte – MG

2021

Santos, Rafael Rocha da Silva.

S237a Avaliação da permeabilidade *in vitro* e da solubilidade em equilíbrio de kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava / Rafael Rocha da Silva Santos. – 2021.

120 f. : il.

Orientadora: Isabela da Costa Cesár.
Coorientador: José Eduardo Gonçalves.

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

1. Piper methysticum (Homeopatia)/uso terapêutico – Teses. 2. Extratos vegetais – Teses. 3. Permeabilidade – Teses. 4. Solubilidade

Elaborado por Luciene Aparecida Costa – CRB-6/28



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

*“AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE IN VITRO E DA SOLUBILIDADE EM EQUILÍBRIO DE KAVAÍNA
ISOLADA E EM EXTRATO SECO DE KAVA-KAVA”*

RAFAEL ROCHA DA SILVA SANTOS

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

Profa. Dra. Jacqueline de Souza
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Profa. Dra. Marina Scopel
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Isabela da Costa César - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 08 de dezembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Marina Scopel, Professora do Magistério Superior**, em 08/12/2021, às 11:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela da Costa Cesar, Professora do Magistério Superior**, em 08/12/2021, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose Eduardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 08/12/2021, às 19:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline de Souza, Usuária Externa**, em 09/12/2021, às 11:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1132626** e o código CRC **E79E5BFD**.

*“Não tenho medo de nada.
Temos que ensinar o medo a ter medo de nós.”*

Elza Soares

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi desenvolvido de 2019 a 2021, simultaneamente a uma das maiores crises sanitárias da história. No momento da escrita deste texto o Brasil ultrapassara os 21,7 milhões de casos, e 606 mil óbitos por COVID-19, a grande maioria evitável. Meu primeiro agradecimento é pela minha vida; pela vida dos meus familiares Juliana, José, Vó Lia e Meu irmão Felipe. Aos meus amigos, colegas e todos que de alguma forma torceram por mim. Agradeço também a Deus e a Ciência por permitir ter esperança em dias melhores.

Agradeço a querida, incrível e maravilhosa orientadora e professora Dra. Isabela da Costa César por idealizar esse projeto, confiar em mim a responsabilidade de executá-lo e principalmente me acolher na Universidade Federal de Minas Gerais. Seu jeito delicado, sereno e sempre alegre foi muito mais que uma inspiração. Principalmente nesse período em que estamos necessitados de carinho e aconchego, com você ele nunca faltou.

Agradeço ao ilustríssimo e magnífico coorientador e professor Dr. José Eduardo Gonçalves, pela confiança, apoio, paciência e tamanha disponibilidade. Você se tornou um exemplo profissional e de vida, é possível visualizar em seus olhos todo carinho, dedicação e amor quando está no laboratório, agradeço a todos os treinamentos no cultivo celular e na instrumentação analítica. Você com certeza foi o motor desse trabalho e sem sua ajuda ele não seria possível! Sou muito privilegiado por ser orientado por vocês

A Me. Melina Diniz, Jéssica Maurício e Me. Sara Nascimento pela convivência diária nesses períodos difíceis e nublados. Ao Matheus Corrêa Ramos que foi muito mais que um braço para etapas de cultivo celular, Gabriel, Isabela, Luan e professores.

Pela minha família em Belo Horizonte, Guilherme Otavio, Iuri Rodrigues, Emanuel Viana e John Coimbra pelos ótimos momentos vividos, apoio e amizade.

As melhores pessoas do mundo que alguém pode ter o prazer e privilégio de conhecer. Me. Bárbara Chaves, Camila Almeida, Daniela Simião, Deborah Caroline, Emilly Valentine, Gabriela Teodoro, João Macedo, Kaique Rodrigues, Natalha Vicentina, Lucas Vilela, Luma Costa, Samuel Silveira, Thalita Gabriela, e Washington Rodrigues, por existirem. Contar sempre com vocês.

Não posso deixar de mencionar ao meu primeiro orientador. Dr. Frank Andrade, que foi quem mais incentivou a entrar no mestrado, e um grande exemplo pra mim, e aos demais professores, amigos e colegas da universidade federal de são João del-Rei.

RESUMO

Kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst) é um arbusto perene, pertencente à família Piperaceae, originária dos arquipélagos do sul do Oceano Pacífico e utilizada como planta medicinal desde 1000 a.C. Possui ação no sistema nervoso central e é empregada no tratamento de insônia, agitação, estresse, epilepsia, psicose e depressão. O efeito farmacológico é decorrente da presença das kavalactonas, principalmente a kavaína encontrados no rizoma da planta. Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a biodisponibilidade de kavaína foi consideravelmente maior quando o marcador químico foi administrado em extratos secos de kava-kava, comparando-se com sua administração na forma isolada. Assim, objetivou-se, com o presente estudo, realizar uma avaliação biofarmacêutica deste marcador isolado e em extratos secos de kava-kava. Os métodos CLAE-DAD desenvolvidos para quantificação de kavaína nos estudos foram considerados lineares, precisos, exatos, seletivos e com robustez satisfatória. Estudos de solubilidade pelo método de agitação em orbital em pH 1,2; 4,5 e 6,8 para o marcador químico isolado e em extrato seco, demonstraram valores de razão Dose/Solubilidade acima de 250 mL, sendo respectivamente 1311,2 mL; 2888,7 mL; 1445,4 mL para kavaína e 1450,5 mL; 1103,7 mL e 1279,3 mL para o extrato seco. Os resultados demonstraram que tanto kavaína isolada quanto na presença de extrato seco de kava-kava apresentou valores elevados de permeabilidade, com valores de *Papp* (A-B) variando de $25 \pm 1,45$ a $28 \pm 2,75$ cm.s⁻¹. Não foi observado mecanismo de efluxo significativo. O marcador vegetal pode ser considerado um composto de baixa solubilidade, sendo a sua dissolução em meio fisiológico o fator limitante para a absorção.

Palavras-chave: *Piper methysticum*; kavaína; permeabilidade aparente; células Caco-2; solubilidade em equilíbrio; CLAE-DAD.

ABSTRACT

Kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst) is a perennial shrub, belonging to Piperaceae family, from the archipelagos of South Pacific Ocean and used as a medicinal plant since 1000 BC. It has an action in the central nervous system and is used in the treatment of insomnia, agitation, stress, epilepsy, psychosis and depression. The pharmacological effect is due to the presence of kavalactones, mainly kavain found in rhizomes. Previous studies of our research group demonstrated that the oral bioavailability of kavain was considerably higher when it was administered in dry extracts of kava-kava, compared to its administration in the isolated form. Thus, we aimed, with this study, to conduct a biopharmaceutical evaluation of this compound isolated and in dry extracts of kava-kava. The HPLC-DAD methods developed for kavain quantitation in the studies were linear, precise, exact, selective and with satisfactory robustness. Equilibrium solubility studies carried out by the orbital shake flasks method at buffer solutions pH 1.2; 4.5 and 6.8 demonstrated dose /solubility ration higher than 250 mL, being respectively 1311.2 mL; 2888.7 mL; 1445.4 mL for kavain and 1450.5 mL; 1103.7 mL e 1279.3 mL for the extract. Results of the intestinal permeability study showed that both kavain alone and in the presence of kava-kava dry extract presented high permeability values, with Papp values varying from 25 ± 1.45 to 28 ± 2.75 cm.s⁻¹. It was observed no significant efflux mechanism. The plant marker can be considered a compound with low solubility, and its dissolution in a physiological fluid is the limiting factor for absorption.

Keywords: *Piper methysticum*; kavain; apparent permeability; Caco-2 cells; equilibrium solubility; HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas (A) e rizoma (B) de <i>Piper methysticum</i> G. Forst.	26
Figura 2 - Estrutura geral das kavalactonas.....	27
Figura 3 - Estruturas das principais kavalactonas presentes no extrato seco de kava-kava.....	29
Figura 4-Representação da inibição da enzima monoamino oxidase B pelas kavalactonas administradas de forma isolada.....	31
Figura 5 - Processo de absorção de fármacos pelo trato gastrointestinal até se encontrarem biodisponíveis na circulação sistêmica.....	39
Figura 6 - Vias de absorção de fármacos através da membrana intestinal, por transporte intercelular, transporte intracelular passivo, transporte mediados por carreadores e por endocitose.	40
Figura 7- (A) Esquema do cultivo celular placas transwell. (B) Placas transwell de 6 poços com a presença de células tipo caco-2 em meio de cultura.....	43
Figura 8 - Esquema da reação de redução do composto MTT (amarelo) em formazan (violeta).....	45
Figura 9 – Soluções de extrato seco de kava-kava a 10 mg. mL ⁻¹ e kavaína isolada 1mg.mL ⁻¹ solubilizados em DMSO.....	70
Figura 10 - Cromatograma obtido nas condições otimizadas do método cromatográfico por CLAE-DAD para solução de kavaína a 2 µg.mL ⁻¹ . Condições: coluna C:18-Água: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (66:07:09:18).....	71
Figura 11 - Cromatogramas obtidos para avaliação da seletividade: (A) solução padrão de kavaína 4000 ng. mL ⁻¹ (B) solução de extrato seco de <i>Piper methysticum</i> G. Forst equivalente a 4000 ng. mL ⁻¹ de kavaína e (C) tampão HBSS, analisadas por método bioanalítico CLAE-DAD para estudo de permeabilidade. Condições: coluna C:18-Água: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (66:07:09:18).....	72
Figura 12- Espectros de varredura na região do ultravioleta (190 – 400 nm) para as soluções padrão de kavaína obtida no presente trabalho (A) e descrito no trabalho de Ferreira (2019) (B).....	73
Figura 13 - Curvas analíticas obtidas para kavaína em nove níveis de concentração, e curva analítica média (n=3) para avaliação da linearidade do método bioanalítico por CLAE-DAD para a quantificação de kavaína no estudo de permeabilidade.	75
Figura 14 - Resíduos padronizado <i>versus</i> valores ajustados do parâmetro linearidade do método bioanalítico desenvolvido para a quantificação de kavaína para estudo de permeabilidade.	76

Figura 16 - Cromatograma obtido para kavaína a 250 ng. mL⁻¹ quantificada por CLAE-DAD para avaliação do limite de quantificação do método bioanalítico para estudo de permeabilidade. Condições: coluna C:18-Água: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (66:07:09:18).

Figura 17 - Análise comparativa de amostras de kavaína quantificadas pelo método bioanalítico por CLAE-DAD para avaliação do parâmetro robustez para estudo de permeabilidade. 81

Figura 18 – Análise da estabilidade de kavaína nos níveis CQA e CQB, quantificados pelo método bioanalítico CLAE-DAD desenvolvido ao longo de 7 dias, armazenados em temperatura refrigerada e temperatura ambiente. 84

Figura 19- Avaliação da estabilidade das amostras de kavaína nos níveis CQA e CQB, quantificadas por CLAE-DAD, armazenadas em temperatura ambiente e em ambiente refrigerado. 85

Figura 20 - Células caco-2 observada em microscópio de fundo escuro (A), e garrafas de cultivo celular, contendo suspensão de células caco-2 em meio DMEM (B). 86

Figura 21-Viabilidade celular (%) do pós tratamento com 10 µg. mL⁻¹, 20 µg. mL⁻¹ e 40 µg. mL⁻¹ de kavaína isolada e em extrato de kava-kava. Exposição por 24h 87

Figura 22 – Representação gráfica da viabilidade celular após tratamento com 10, 20 e 40 µg. mL⁻¹ de kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava (B). Exposição por 4h 88

Figura 23 – Relação da concentração obtida no compartimento receptor em função do tempo nos sentidos A-B e B-A para kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava em experimentos de permeabilidade em células Caco-2. 90

Figura 24- Relação da concentração obtida no compartimento receptor em função do tempo nos sentidos A-B e B-A para kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava na presença de verapamil em experimentos de permeabilidade em células Caco-2. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Classificação dos fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	38
Tabela 2 - Condições cromatográficas utilizadas para determinação de kavaína por CLAE-DAD em tampão HBSS para desenvolvimento de método bioanalítico estudo de permeabilidade.	52
Tabela 3-Sequência de injeções para avaliação do carry over do método analítico por CLAE-DAD desenvolvido.	53
Tabela 4 - Diluições para construção da curva analítica de kavaína em tampão HBSS por CLAE-DAD, a partir de solução estoque (SE) a 0,1 mg. mL ⁻¹ para o método bioanalítico por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.....	55
Tabela 5 - Preparo das soluções de kavaína em tampão HBSS para avaliação da precisão do método bioanalítico por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.....	56
Tabela 6 - Parâmetros e variações para avaliação da robustez do método bioanalítico cromatográfico para quantificação de kavaína por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.	58
Tabela 7 - Construção da curva analítica para kavaína SQR em fase móvel por CLAE-DAD, a partir de solução de trabalho a 5 mg. mL ⁻¹ em DMSO para o parâmetro linearidade do método analítico para estudo de solubilidade.....	64
Tabela 8 - Preparo das soluções de kavaína SQR em fase móvel para avaliação da precisão do método analítico por CLAE-DAD para estudo de solubilidade.	65
Tabela 9 - Parâmetros e variações para avaliação da robustez de método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína para estudo de solubilidade.	67
Tabela 10 - Preparo dos meios tamponados utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio de kavaína.	69
Tabela 11 – Avaliação da linearidade do método bioanalítico desenvolvido, empregando-se o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados.	77
Tabela 12 - Valores de DPR obtidos para a precisão intracorrída (n= 5 para cada nível de concentração) para kavaína quantificada por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.....	78

Tabela 13 - Concentração média real e valores de DPR (n=15 para cada nível) obtidos para a precisão intercorrida para kavaína por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.....	78
Tabela 14 - Erros padrão relativos obtidos para o estudo de exatidão intracorrida de kavaína (n=5 para cada nível) quantificado por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.....	79
Tabela 15 - Concentração média real e valores de erro padrão relativo (n=15) obtidos para o estudo de exatidão intercorridas de kavaína quantificado por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.....	79
Tabela 16 – Concentrações de kavaína (ng. mL ⁻¹) obtidas na avaliação da robustez do método bioanalítico por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.	81
Tabela 17 – Resultados obtidos no experimento de estabilidade de kavaína em solução, quantificada por método bioanalítico por CLAE-DAD, em função do tempo, em temperatura ambiente.	82
Tabela 18- Resultados obtidos no experimento de estabilidade de kavaína em solução, quantificada por método bioanalítico por CLAE-DAD, em função do tempo, em ambiente refrigerado.	82
Tabela 19 - Média dos resultados de <i>Papp</i> x 10 ⁻⁶ (cm.s ⁻¹) para kavaína, obtidos no experimento de permeabilidade em células Caco-2.....	93
Tabela 20- Resumo das resultados da avaliação da linearidade do método analítico, empregando-se o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários.....	100
Tabela 21 - Valores de DPR obtidos para a precisão intracorrida (n= 3 para cada nível de concentração) quantificados por método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína em estudo de solubilidade.	101
Tabela 22 - Concentrações médias reais e respectivos valores de DPR obtidos para a precisão intercorridas (n=6 para cada nível de concentração) quantificados por método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína em estudo de solubilidade.....	101
Tabela 23 - Erro padrão relativo obtido para o estudo de exatidão intracorrida (n=3 para cada nível de concentração) quantificados por método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína em estudo de solubilidade.....	102
Tabela 24 - Concentração média real e erro padrão relativo obtidos para o estudo de exatidão intercorridas (n=6 para cada nível de concentração) quantificados	

por método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína em estudo de solubilidade.	102
Tabela 25 – Concentrações de kavaína (ng/mL) obtidas para avaliação da robustez do método analítico por CLAE-DAD (n=5) para o estudo de solubilidade.	103
Tabela 26 – Valores médios de solubilidades obtidos para kavaína nos meios tamponados pH 1,5; pH4,5 e pH 6,8.	109
Tabela 27 - Cálculo da razão D/S de kavaína obtida nos meios pH 1,5; pH 4,5 e pH 6,8.....	111

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da Papp.....	44
Equação 2 - Desvio Padrão Relativo.....	57
Equação 3 - Erro Padrao Relativo.....	57
Equação 4 - Limite de Detecção	66
Equação 5 - Limite de Quantificação.....	66
Equação 6 - Razão dose/solubilidade	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Coeficiente linear
AAS	Ácido acetilsalicílico
ACN	Acetonitrila
µg	Micrograma
µg.mL ⁻¹	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ATCC	<i>American type culture collection</i>
b	Coeficiente angular
C18	Sílica ligada a grupos octadecilsilano
cel/cm ²	Células / centímetro quadrado
CQA	Controle de qualidade de nível alto
CQB	Controle de qualidade de nível baixo
CQD	Controle de qualidade acima do limite de quantificação
CQM	Controle de qualidade de nível médio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CME	Concentração média experimental
COX	Ciclo-oxigenases
CV	Coeficiente de variação
Dc/Dt	Diferencial de concentração em relação ao tempo de experimento
DAD	Detector de arranjo de diodos

/continua

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DHK	Dihidrokaína
DHM	Dihidrometiscina
DMY	Desmetoxyangonina
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPR	Erro padrão relativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIP	Federação Internacional Farmacêutica
FM	Fase móvel
HBSS	Solução tampão Hanks' Balanced Salt Solution
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IMAO	Inibidores da monoaminoxidase
ISO	Isopropanol
K	Kaína
Kg	Quilogramas
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
M	Metisticina
MAO-A	Monoamina oxidases tipo a
MET	Metanol
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
Papp	Permeabilidade aparente
STK	Solução de Trabalho Kaína

/continua

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema Nervoso Central
STEPM	Solução de Trabalho Extrato de <i>Piper Methysticum</i>
STV	Solução de Trabalho de Verapamil
SQR	Substância química de referência
TR	Tempo de retenção
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV-Vis	Ultravioleta-visível
WHO	<i>World Health Organization</i>
Y	Yangonina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1	<i>Piper methysticum</i> G. Forst	25
2.2	Constituição Fitoquímica	27
2.3	Farmacodinâmica e Farmacocinética	29
2.4	Toxicidade e Efeitos Adversos	32
2.5	Métodos analíticos para quantificação de kavaína	35
2.6	Sistema de Classificação Biofarmacêutica	37
2.7	Estudos de Permeabilidade.....	39
2.8	Ensaio para determinação da viabilidade das células Caco-2 pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).....	44
2.9	Estudos de Solubilidade	45
3.	OBJETIVOS	47
3.1	Objetivos específicos.....	47
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1	Materiais.....	48
4.1.1	Substâncias Químicas de Referencia (SQR) e amostra.....	48
4.1.2	Reagentes e solventes.....	48
4.1.3	Coluna cromatográfica	49
4.1.4	Acessórios e vidrarias	49
4.1.5	Equipamentos	49
4.2	MÉTODOS	50
4.2.1	Desenvolvimento de método bioanalítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em matriz proveniente de cultivo celular	50
4.2.2	Validação do método bioanalítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em matriz proveniente de cultivo celular.....	52
4.2.4	Cultivo da linhagem de células Caco-2	58
4.2.1	Ensaio de determinação da viabilidade celular	59
4.2.5	Estudo de permeabilidade de kavaína isolada e em extrato seco de <i>Piper methysticum</i> G Forst.....	60

4.2.6 Validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em meios tamponados para estudo de solubilidade em equilíbrio	62
4.2.5 Estudo de solubilidade em equilíbrio de kavaína isolada e em extrato seco de <i>Piper methysticum</i> G. Forst.....	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 Desenvolvimento de método analítico para a quantificação de kavaína em tampão HBSS por CLAE-DAD	70
5.2 Validação de método analítico para a quantificação de kavaína em tampão HBSS por CLAE-DAD	71
5.2.1 Seletividade.....	71
5.2.2 Carry Over	74
5.3.3 Precisão.....	78
5.3.4 Exatidão.....	78
5.3.6 Estabilidade	82
5.4 Cultivo da linhagem de células Caco-2.....	85
5.1 Estudo de citotoxicidade.....	86
5.2 Estudo de permeabilidade celular em linhagem de células Caco-2	88
5.5 Validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em meios tamponados para estudo de solubilidade em equilíbrio.....	96
5.5.1 Seletividade	96
5.5.2 Linearidade	98
5.5.3 Precisão.....	100
5.5.4 Exatidão.....	101
5.6.5 Limites de detecção e quantificação	102
5.6.6 Robustez	102
5.7 Estudo de solubilidade em equilíbrio de kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava.....	104
6. CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS.....	113

1. INTRODUÇÃO

Para que qualquer substância biologicamente ativa exerça sua atividade farmacológica a nível sistêmico, primeiramente é necessário que ela se encontre biodisponível na circulação sistêmica. Desse modo, é preciso que o fármaco se encontre dissolvido no lúmen intestinal, e que consiga permear pelas membranas dos enterócitos (AMIDON et al., 1995; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

A biodisponibilidade pode ser definida como a velocidade e a extensão com que um fármaco alcança a corrente sanguínea, tornando-se disponível para seu efeito sistêmico. Considerando que variados fatores podem influenciar a biodisponibilidade, tais como as características físico-químicas do fármaco, as propriedades da formulação e as características biológicas dos indivíduos, nota-se grande interesse no meio científico e regulatório em compreender a interrelação desses fatores com os processos farmacocinéticos, com destaque na absorção no processo de desenvolvimento de medicamentos administrados por via oral (BRASIL, 1999; SHARGEL, YU; 2005). Nesse contexto, surge o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), desenvolvido por Amidon e colaboradores (1995) que permite o estudo e a correlação das propriedades biofarmacêuticas, que influenciam diretamente na biodisponibilidade dos fármacos. O sistema destaca-se por agilizar e reduzir os custos das pesquisas, visto que utiliza modelos *in-vitro*, reduzindo processos burocráticos e éticos, além de evitar a exposição de voluntários sadios aos fármacos. (AMIDON et al., 1995; LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

O SCB classifica os fármacos em categorias que variam de I a IV, baseado nas características de permeabilidade e na solubilidade em meios aquosos com variados valores de pH, ambos em condições que se assemelham às condições fisiológicas. Fármacos da Classe I apresentam alta permeabilidade e alta solubilidade, Classe II alta permeabilidade e baixa solubilidade, Classe III baixa permeabilidade e alta solubilidade e Classe IV baixa permeabilidade e baixa solubilidade (AMIDON et al., 1995).

A solubilidade em equilíbrio é definida como a medida na qual uma substância é encontrada dissolvida em determinado meio, em condições

controladas, gerando um sistema de equilíbrio termodinâmico (FARMACOPEIA, 2017; USP, 2017). Um fármaco é considerado altamente solúvel quando a maior dose administrada é completamente solúvel em 250 mililitros (ml) de soluções tamponadas que mimetizam a faixa de pH e temperatura do meio fisiológico (DAHAN et al., 2010; EMAMI, 2006; GONZÁLEZ-GARCÍA et al., 2015).

A permeabilidade é a propriedade biofísica que define a capacidade que um fármaco apresenta, solubilizado nas condições supracitadas, em atravessar membranas biológicas, sendo disponibilizados na corrente sanguínea. Uma molécula é classificada como de alta permeabilidade quando apresenta absorção igual ou maior que 85% da dose administrada (BRASIL, 2011, EMA, 2010; FDA, 2000; WHO, 2006). O principal parâmetro utilizado na classificação da permeabilidade é a biodisponibilidade absoluta por via oral, entretanto, na ausência dessa informação, ela pode ser determinada utilizando modelos *in vitro*, como por exemplo, células humanas da linhagem Caco-2 e *in situ* com a experimentação em modelo animal (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VAN BREEMEN; LI, 2005).

Os conceitos e métodos disponibilizados pelo SCB, embora comumente associados a fármacos isolados e quimicamente definidos, também tem sido empregado em estudos envolvendo substâncias bioativas. Por sua vez, tais estudos tendem a apresentar maior complexidade, visto que podem ser constituídos por matrizes complexas (BRASIL, 2002; WALDMANN et al., 2012).

Os medicamentos fitoterápicos são produzidos em indústrias farmacêuticas e obtidos com emprego de insumos farmacêuticos ativos de origem vegetal. Devem apresentar eficácia e segurança comprovados por estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos, devidamente registrados nos órgãos regulatórios nacionais (BRASIL, 1999).

Os medicamentos fitoterápicos possuem normas de padronização e legislações específicas para desenvolvimento, registro e controle de qualidade dos produtos. Enquanto em países como Estados Unidos muitos destes produtos se enquadram como suplementos alimentares, outras legislações como a brasileira, a canadenses e a europeia apresentam critérios mais rigorosos. Em contrapartida ao que ocorre com os medicamentos alopáticos, não existem produtos que podem considerados medicamento referência. Apesar destes

empecilhos, é possível avaliar as propriedades biofarmacêuticas e definir padrões aceitáveis de qualidade com auxílio de metodologias analíticas e biomarcadores vegetais padronizados. (WALDMANN et al., 2012).

Dentre os medicamentos fitoterápicos, é possível destacar os derivados de extratos de rizoma de *Piper methysticum* G. Forst. Popularmente conhecida como kava-kava, é uma espécie vegetal cultivada há milênios por nativos da Oceania. A espécie apresenta rica diversidade de constituintes químicos, responsáveis por inúmeros efeitos farmacológicos. Dentre os metabólitos ativos presentes no extrato de kava-kava, destacam-se o subgrupo das kavalactonas, responsável pelos efeitos terapêuticos (ANDREATINI et al., 2001; BARBOSA et al., 2013; CHUA et al., 2016; JUSTO E SILVA, 2008; NETO, 2004).

As kavalactonas possuem ação no sistema nervoso central (SNC), sendo os extratos de kava-kava empregados no tratamento de insônia, agitação, estresse, epilepsia, psicose e depressão, além de outros usos, como analgesia, cicatrização e tratamento de infecções e doenças inflamatórias (ANDREATINI et al., 2001; BARBOSA et al., 2013; CHUA et al., 2016; JUSTO E SILVA, 2008; NETO, 2004).

Em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisas, foi observada diferença na biodisponibilidade oral entre a kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava após administração em camundongos (FERREIRA et al., 2020). Assim, para continuidade deste estudo, torna-se importante realizar uma avaliação biofarmacêutica deste marcador químico, substância utilizada para caracterização e controle de qualidade de extratos secos da planta.

Para isso, é necessário avaliar os parâmetros de solubilidade em equilíbrio, pelo método de agitação orbital em frascos, e permeabilidade empregando o modelo de célula Caco-2 que mimetiza as condições histofisiológicas do intestino humano. A classificação da kavaína isolada e presente nos extratos de kava-kava de acordo com o SCB representa uma contribuição importante para o melhor entendimento dos processos farmacocinéticos deste marcador vegetal após administração oral de extratos de kava-kava.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Piper methysticum* G. Forst

A espécie *Piper methysticum* G. Forst é um arbusto perene pertencente à família das Piperaceae (pimentas), nativa dos arquipélagos da região sul do Oceano Pacífico. Foi descrita pelos botânicos suecos Daniel Scholander e Sydney Parkinson, provavelmente os primeiros ocidentais a ter contato com a espécie (SINGH, 1992). Posteriormente, foi catalogada pelo naturalista Johann Georg Adam Forster, membro de uma expedição direcionada ao continente da Oceania liderada pelo inglês James Cook (BILIA et al., 2004; CORDEIRO et al., 2005.; FERREIRA et al., 2021).

Popularmente conhecida como kava-kava, kawa yati, yagona ou yangona, a espécie possui nome homônimo a uma tradicional bebida psicoativa utilizada em cerimônias religiosas e atividades recreativas pela população nativa. Nos idiomas nativos significa “amargo” ou “azedo”, uma alusão às características organolépticas da espécie vegetal (BILIA et al., 2004; CÔTÉ et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2009; SINGH, 1992).

A bebida kava é consumida há mais de 2000 anos, com intuito de fortalecer o corpo e angariar conhecimento. Seu uso era tradicionalmente restrito aos “Kahunas”, membros mais experientes, conselheiros e líderes das comunidades (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005; SINGH, 1992; WHO, 2016;).

A preparação da bebida kava é realizada de maneira artesanal. São retirados os rizomas laterais de *Piper methysticum* G. Forst, faz-se a limpeza com água corrente, realiza-se a maceração em água fria seguida de percolação do líquido. Após a filtração, a preparação está pronta para o consumo (JUSTO E SILVA, 2008; ROBINSON et al., 2009).

Devido ao apelo comercial, a espécie vegetal praticamente não é mais encontrada naturalmente nos ecossistemas. O cultivo é destinado principalmente à exportação para países produtores de medicamentos e para comercialização local. O uso popular pode ser comparado ao consumo de folhas de coca, *Erythroxylum coca*, pelos povos andinos da América do Sul (BARBOSA et al.; 2013; SINGH, 1992).

As folhas são grandes, rígidas, apresentam coloração verde escuro contendo entre 9 a 13 nervuras bem demarcadas, superfícies lisas e formato semelhante a um coração. A espécie é dioica, contém inúmeras e pequenas flores dispostas em formato conífero assemelhando-se a espigas. O caule é do tipo rizoma, disposto de maneira horizontal, subterrâneo, poroso e ramificado, podendo alcançar 10 kg, e apresenta exteriormente uma coloração negro-acinzentada com interior branco. As folhas e rizomas estão ilustradas a seguir em figura 1 (BARBOSA; LENARDON; PARTATA, 2013; METHYSTICUM; JUSTO E SILVA, 2008 ; SINGH, 1992).

Figura 1 - Folhas (A) e rizoma (B) de *Piper methysticum* G. Forst.



A



B

Adaptado de JUSTO E SILVA, 2008.

A espécie é usada no tratamento de distúrbios do sistema nervoso, como insônia, agitação, estresse, epilepsia, psicose e depressão. Relatos presentes na medicina popular indicam seu uso como agente cicatrizante, analgésico e no tratamento de doenças do sistema respiratório, trato gastrointestinal, tuberculose, infecções, abscessos, doenças sexualmente transmissíveis, reumatismo e distúrbios dos sistemas urogenitais (AMORIM et al., 2007; CORDEIRO et al., 2005).

Quando comparado a outros agentes que atuam no SNC, a kava-kava apresenta algumas vantagens, como por exemplo, a bebida não está

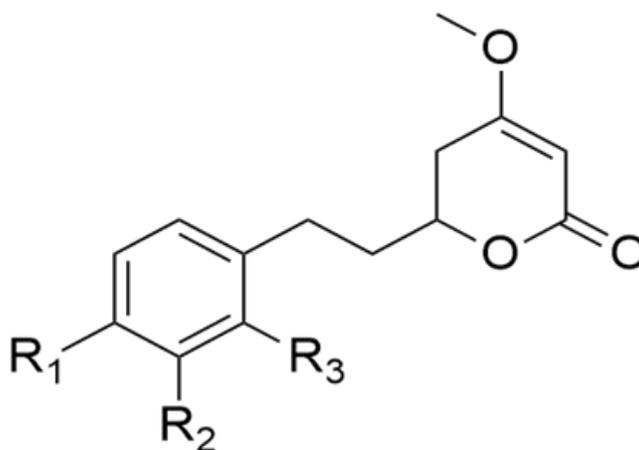
relacionada a indução de comportamento violento, ao contrário do que ocorre com usuários de bebidas etílicas (CAWTE, 1985).

2.2 Constituição Fitoquímica

Os primeiros relatos sobre caracterização fitoquímica de *Piper methysticum* G. Forst. datam dos anos de 1860 (NETO, 2004). A espécie é constituída de diversos metabólitos secundários. Os compostos lactônicos presentes em kava-kava são denominados kavalactonas ou kavapironas e possuem grande interesse comercial e científico. Taninos, ácido, benzoico, ácido cinâmico, açúcares, bornil-cinamato, estigmasterol, flavokavaínas, mucilagens, tetrahydroiangoninas também podem ser observados nas triagens fitoquímicas (BARBOSA et al., 2013 ; PATEL et al., 2005; ULBRICHT et al., 2005).

A atividade farmacológica do extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst está relacionada à presença dos grupamentos lactônicos. A estrutura básica das kavalactonas está representada na Figura 2. Os radicais R₁, R₂ e R₃ representam respectivamente ramificações moleculares que possibilitam diferenciar as estruturas químicas do grupo (NETO, 2004).

Figura 2 - Estrutura geral das kavalactonas.



Adaptado de BARBOSA et al., 2013.

Triagens fitoquímicas conduzidas por Petersen e colaboradores (2019) envolveram uma análise qualitativa e quantitativa dos metabólitos secundários

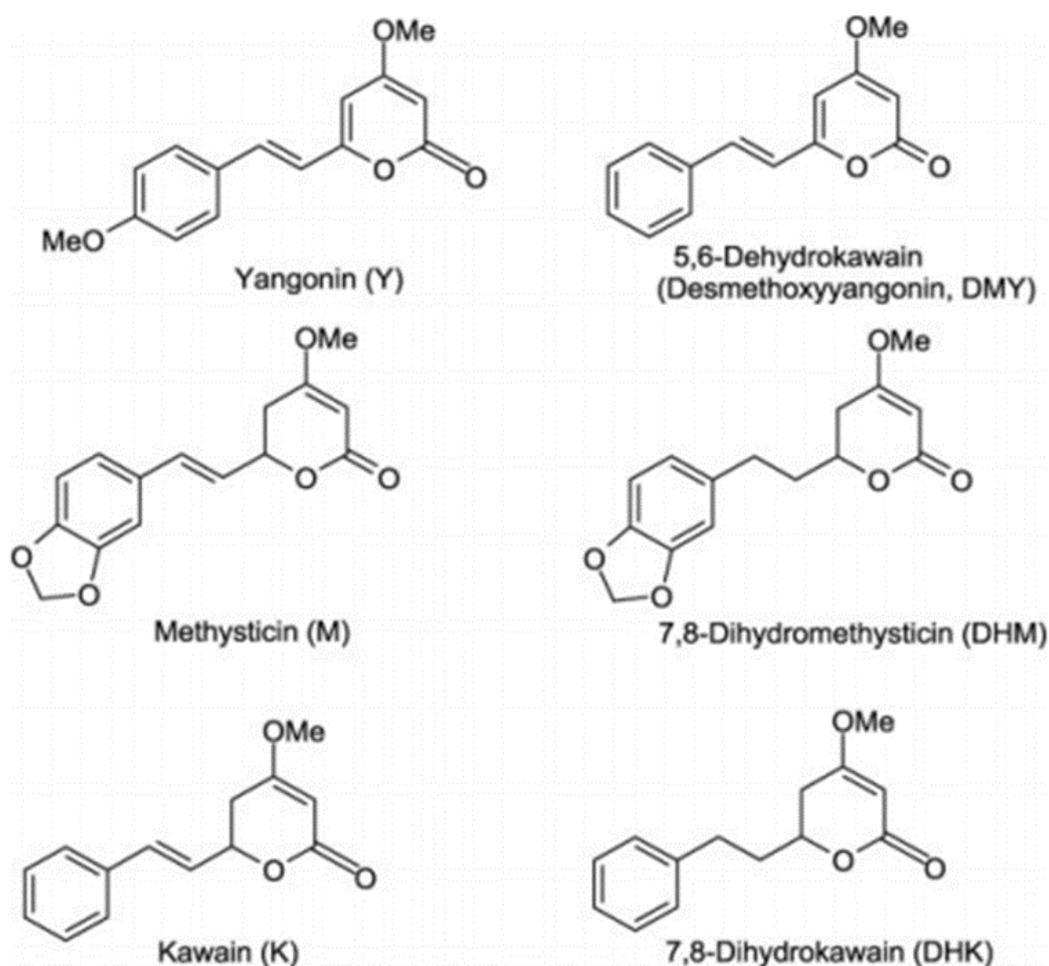
no rizoma *Piper methysticum* G Forst. Foram isolados cerca de 18 compostos distintos. Os constituintes yangonina (Y), 5,5-diidro-kavaína ou desmetoxyangonina (DMY); metisticina (M); 7,8-diidrometisticina (DHM), kavaína (K) e 7,8-diidro-kavaína (DHK) representam aproximadamente 96% do total de kavalactonas encontradas na planta. Suas estruturas químicas são demonstradas na Figura 3 (PETERSEN et al., 2019).

Em trabalhos de Cheng e colaboradores (apud NETO, 2004) foram observadas diferenças nas concentrações dos marcadores vegetais nos extratos em decorrência das diferenças do cultivo. As proporções dos metabólitos variam com a sazonalidade, o que demonstra a necessidade de padronizar os extratos utilizando-se metodologias analíticas eficazes e validadas (BARBOSA et al., 2013; NETO, 2004).

Bilia e colaboradores (2004) demonstraram que as concentrações de kavalactonas presentes no extrato de rizoma seco dependem de fatores específicos, como a idade da planta e a maneira em que foram cultivadas. Foi observado que as kavalactonas, embora presentes em todas as partes da planta, sofrem um decréscimo proporcional com o distanciamento da raiz. As folhas apresentam diidro-kavaína, metisticina e 7,8-diidrometisticina em maior quantidade, contrastando com a maior proporção de kavaína nos rizomas (BILIA et al., 2004; NETO, 2004).

As preparações de kava-kava utilizadas nos rituais religiosos passam por um procedimento que envolve a extração por via aquosa dos marcadores vegetais. Todavia, nos extratos comercializados, o processo envolve extração com solventes orgânicos. Devido às características físico-químicas das moléculas de kavalactonas, é esperada uma maior concentração nos extratos industrializados, que utilizam solvente orgânico, em comparação à bebida tradicional (XUAN et al., 2008).

Figura 3 - Estruturas das principais kavalactonas presentes no extrato seco de kava-kava.



Fonte: MATHEWS et al., 2005.

2.3 Farmacodinâmica e Farmacocinética

As plantas medicinais apresentam uma diversidade de substâncias que podem agir de maneira sinérgica. Em grande parte dos casos, essas interações são determinantes para promover o efeito farmacológico (SPINELLA, 2002).

São aceitas várias hipóteses que justifiquem o mecanismo de ação das kavalactonas. Os estudos indicam que devido à sua elevada lipofilicidade, os metabólitos consigam atravessar membranas biológicas, como a barreira hematoencefálica (BHE) e as membranas celulares, permitindo agir no SNC e

em demais órgãos (BARBOSA et al., 2013; CAIRNEY et al., 2003; LIANG et al., 2009)

Mathews e colaboradores (2005) observaram e compararam os efeitos farmacológicos das kavalactonas isoladas. Os efeitos dos metabólitos isolados são significativamente reduzidos em comparação com o extrato bruto. O resultado sugere que o extrato pode influenciar o metabolismo e/ou transporte das kavalactonas de maneira sinérgica (MATHEWS et al., 2005).

As propriedades sedativas e ansiolíticas estão relacionadas à capacidade dos compostos em interagir com o receptor ácido gama-aminobutírico (GABA), atividade semelhante à induzida por fármacos pertencentes à classe dos benzodiazepínicos (BARBOSA et al., 2013).

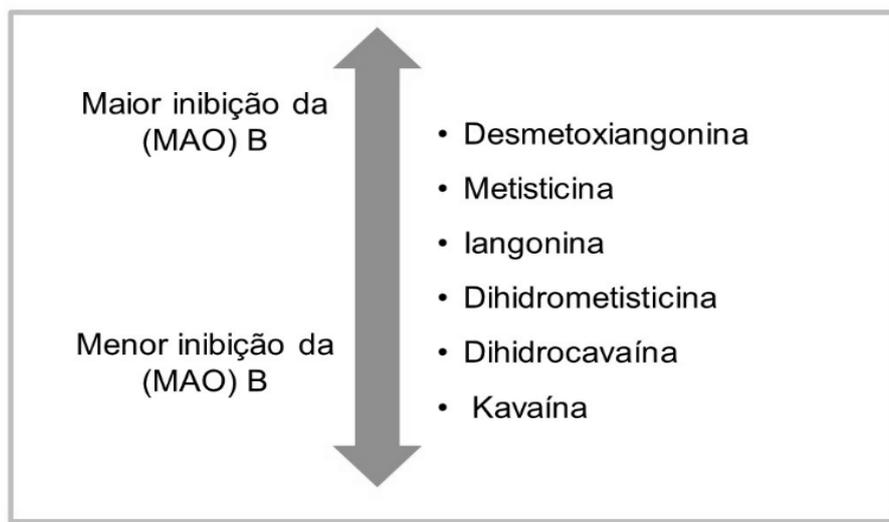
Trabalhos como o de Meissner e Haberlein (2005) confirmaram por estudos clínicos o potencial das preparações contendo kava-kava em sua constituição. Extratos apresentaram efeitos benéficos para o tratamento de ansiedade (CHUA et al., 2016; MEISSNER; HÄBERLEIN, 2005).

Jussofie e colaboradores (1994) (apud NETO 2004) realizaram experimentação animal. Os mecanismos se assemelharam aos induzidos por medicamentos das classes dos barbitúricos e anestésicos (NETO, 2004). A ação ansiolítica também pode ser atribuída à ativação da transmissão dopaminérgica e serotoninérgica, que implica na redução da excitabilidade emocional (SPINELLA, 2002).

Outro possível mecanismo para os efeitos psicotrópicos seria a capacidade de inibição da enzima monoaminoxidase (MAO), responsável por metabolizar neurotransmissores como dopamina e serotonina. Assim, as kavalactonas levariam a um aumento das concentrações destes neurotransmissores no organismo. Agindo por este mecanismo, os efeitos adversos seriam semelhantes àqueles dos antidepressivos convencionais, como sono excessivo, alterações de apetite, alterações do peso e confusão. Estes efeitos podem ser observados principalmente quando a planta é utilizada indiscriminadamente e concomitantemente com fármacos de ação central (JUSTO e SILVA et al., 2008; SCHULZ et al., 2002).

Uebelhack e colaboradores (1998) observaram que tanto o extrato quando as kavalactonas isoladas induziram uma inibição reversível da MAO-B. Entretanto, a potência farmacológica foi distinta entre as moléculas, decrescendo de desmetoxiangonina para kavaína, como pode ser observado na Figura 4 (UEBELHACK; FRANKE; SCHEWE, 1998).

Figura 4-Representação da inibição da enzima monoamino oxidase B pelas kavalactonas administradas de forma isolada.



Fonte: UEBELHACK et al., 1998.

Outra atividade decorrente dos constituintes químicos da kava-kava é a indução de analgesia. Os compostos diidroxikavaína e diidrometisticina apresentam maior potencial terapêutico do que outros fármacos, como o ácido acetilsalicílico (AAS), e demonstraram ação neuroprotetora (WU et al., 2002).

Em um estudo observacional envolvendo habitantes das Ilhas Fiji, em comparação aqueles das regiões da Polinésia, Micronésia e Nova Caledônia (grupos étnicos com hábitos semelhantes e características genéticas próximas), foi observada que a incidência de alguns tipos de câncer, como estômago, pulmão e próstata, eram consideravelmente menores no primeiro país. Dentre as características que distinguem dos habitantes de Fiji, notou-se o hábito de ingerir kava-kava, em busca de analgesia, costume que não se repetia nos demais países. Por fim, foi identificado o composto 7,8-epoxiyangonina, uma

kavalactona com atividade potencial em diminuir a liberação do fator α de necrose tumoral (TNF- α) (HASHIMOTO et al., 2003).

No trabalho de Ferreira e colaboradores (2020), após o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico por LC-MS/MS, foi demonstrado um possível sinergismo farmacocinético entre kavaína e os demais constituintes do extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst, uma vez que a biodisponibilidade oral de kavaína foi maior quando este marcador estava presente no extrato, em comparação ao composto isolado.

Os trabalhos de Tarbah e colaboradores (2003) demonstraram que após a ingestão de uma dose oral de 200 mg do extrato de kava-kava, foi alcançada uma concentração sanguínea de 18 ng/mL dos isômeros D e L de kavaína. A absorção intestinal do composto levou cerca de 15 minutos para ser iniciada e apresentou um máximo de concentração entre uma hora e meia e duas horas. A meia vida de eliminação foi estimada em 9 horas.

A excreção, por via urinária, foi estudada em modelo animal, envolvendo camundongos, após administração oral e intravenosa de kavaína. Foram encontrados os metabólitos hidroxí-6-fenil-5-hexen-2-ona, 4-hidroxí-6-hidroxifenil, 5-hexen-2-ona e 12-hidroxí-di-hidro-kavaína na urina e o metabólito 12-hidroxí-kavaína foi caracterizado no plasma (TARBAH et al., 2003)

Estudos de Silva e colaboradores (2010) avaliaram o uso de extrato de kava-kava misturada na ração de codornas em período de postura, na redução do estresse e aumento da qualidade dos ovos, uma vez que o estresse influencia no agravamento de comportamentos agitados e agressivos das codornas. Foi observado que o extrato de *Piper methysticum* G. Forst quando utilizado como medicamento fitoterápico não provocou alterações no desempenho e qualidade dos ovos e causou a redução do estresse nas aves (SILVA et al., 2010).

2.4 Toxicidade e Efeitos Adversos

As doses utilizadas nos tratamentos envolvendo *Piper Methistycum* G. Forst se baseiam tanto no uso tradicional quanto em ensaios clínicos. Produtos fitoterápicos tendem a apresentar maior complexidade no ajuste terapêutico

quando comparados a medicamentos alopáticos. O principal motivo são as interações como sinergismo ou competição entre a diversidade de metabólitos presentes nas espécies vegetais (ULBRICHT et al., 2005).

Estudos clínicos realizados por Ulbricht e colaboradores (2005) relataram que indivíduos adultos tendem a tolerar uma dose de até 300 mg dia do extrato seco de *Piper Methistycum* G. Forst. podendo ser administrado de forma fracionada ou não. Normalmente os extratos são prescritos em doses que variam entre 70 e 280 mg/dia, sendo recomendado iniciar o tratamento com doses menores, e caso necessário, o aumento deve ocorrer de maneira crescente e em etapas (ULBRICHT et al., 2005).

Alguns fitoterápicos são contraindicados a pacientes portadores de hepatopatias e usuários de bebidas alcoólicas, por induzirem alterações na expressão de enzimas hepáticas. Deste modo, os pesquisadores Jamieson e Duffield (1990) avaliaram a interação entre álcool e *Piper Methistycum* G. Forst, utilizando modelos de camundongos Balb/c em ambiente aquecido a 32 °C, administrando por via oral, extrato de kava-kava 300 mg/Kg associado a álcool 10% diluído em solução salina, administrado por via intraperitoneal. Foi observado que o álcool potencializa os efeitos sedativos do fitoterápico, em doses superiores a 250-300 mg do extrato (JAMIESON; DUFFIELD, 1990).

No caso de portadores de doenças de Parkinson, depressão ou psicose é recomendado evitar o uso da espécie vegetal, visto que alguns metabólitos podem induzir sintomas extrapiramidais. O fitoterápico não é recomendado a gestantes e crianças com idade inferior a 12 anos (BARBOSA et al., 2013).

Estudos demonstraram que indivíduos intoxicados pelo extrato de *Piper Methistycum* G. Forst apresentaram sintomas como tremor, ataxia, sedação, anormalidades na coordenação motora e na visão (BARBOSA et al., 2013; MATHEWS et al., 2005).

Em trabalhos de Pierce, foi avaliado o potencial tóxico de kava-kava pelo monitoramento da função hepática. Foi observado que o fitoterápico influencia negativamente nos prognósticos de pacientes portadores de hepatopatias. *Piper*

methysticum G Forst. também foi associada a indução de processos inflamatórios agudos, e necrose tecidual em pacientes sem históricos de hepatopatias, utilizando a dose terapêutica. Após a suspensão do medicamento, os parâmetros clínicos foram restabelecidos em intervalos de até dois meses (PIERCE citado por CORDEIRO et al, 2005).

A correlação de hepatotoxicidade com o uso de *Piper methysticum* G. Forst, no meio científico, angariou maiores interesses após a associação de vários casos de hepatite grave, insuficiência e falência hepática em pacientes na Europa e América do Norte, no período de 1990 e 2002 (AMORIM et al., 2007; TESCHKE; QIU; LEBOT, 2011).

Nas comunidades oceânicas que fazem um uso milenar da bebida o número de casos de hepatite, ou demais complicações relacionadas ao fitoterápico não é significativo. Uma provável justificativa para essa discrepância de resultados pode estar relacionada ao fato de que nas preparações ocidentais são empregados solventes orgânicos para um maior aproveitamento das kavalactonas, enquanto no processo de produção tradicional utiliza um meio aquoso, assim como o maior consumo álcool e a maior exposição a agentes hepatóxicos e medicamentos nas populações ocidentais (AMORIM et al., 2007; TESCHKE; QIU; LEBOT, 2011).

Baseado nestes casos de hepatotoxicidade, as agências sanitárias de países como Alemanha, França, Estados Unidos, Canadá, Suíça e Reino Unido recomendaram restrições da comercialização dos medicamentos contendo *Piper methysticum* G. Forst, em sua formulação (BARBOSA et al, 2013; CORDEIRO et al., 2005; LIM et al., 2007).

Após estas restrições, estudos de Kutcha e colaboradores (2015) demonstraram que a toxicidade dos extratos está diretamente ligada às variedades da planta utilizada, denominadas *two-day* kava ou *noble* kava. A variedade *noble* kava apresenta elevados teores de kavaína, associados a baixas quantidades de flavokavaína, sendo que estudos prévios demonstraram que a flavokavaína B está diretamente ligada a casos de hepatotoxicidade. Lebot e colaboradores (2014) analisaram flavokavaína B em extratos de kava-kava de diferentes variedades e demonstraram que a razão flavokavaína B/kavalactonas

foi consideravelmente maior em *two-day* kava, comparada a *noble* kava. Desta forma, flavokavaína B atualmente é considerada um marcador importante para avaliação da toxicidade dos extratos (KUCHTA; SCHMIDT; NAHRSTEDT, 2015; LEBOT; DO; LEGENDRE, 2014).

As kavalactonas são metabolizadas por enzimas do sistema do citocromo P450 (CYP450), como CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP4A9 e CYP4A9/11. Deste modo, o uso concomitante de substâncias que inibam estas enzimas pode induzir alterações na metabolização, aumentando o risco de toxicidade (CORDEIRO et al., 2005 ; JUSTO E SILVA, 2008).

Estudos delineados por Lim e colaboradores (2007) avaliaram o efeito do alcaloide pipermetistina, abundante nas partes aéreas de *Piper methysticum* G. Forst. Foi observado a indução de toxicidade em células HepG2 em modelo *in vitro*. Entretanto, com a experimentação animal, tanto pipermetistina quanto kavalactonas não levaram à hepatotoxicidade (LIM et al., 2007).

2.5 Métodos analíticos para quantificação de kavaína

Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas analíticas de separação e quantificação mais utilizadas na atualidade. Seus princípios são baseados nas diferenças de interação entre o analito com as fases móvel e estacionária. A CLAE permite o acoplamento com várias opções de detectores, utilizando diversos mecanismos de retenção, e permitindo utilizar diversas combinações entre fase estacionária e fase móvel (CIOLA, 1998; SNYDER, et al, 1997).

O detector de arranjo de diodos (DAD) apresenta fundamento baseado na transição eletrônica dos elétrons excitáveis de determinado tipo de ligação, que tentem a migrar do estado fundamental para o de maior energia. Dentre suas características, apresenta a possibilidade de análise simultânea em diferentes comprimentos de onda em uma mesma corrida cromatográfica, por estas características apresentam vantagens a outros detectores como o de comprimento de onda fixo ou comprimento de onda variável (NETO, 2004; LABOT e LEVESQUE, 1989; SKOOG et al, 2006; SNYDER et al. 1997).

Nas análises cromatográficas, são empregadas colunas de comprimento variável, preenchidas por sílica ou alumina no caso de fase normal e uma fase móvel de caráter apolar, como por exemplo hexano. No caso de cromatografia de fase reversa, o grupamento silanol da sílica ligado a uma fase mais apolar como grupo octadesilsilano, e a fase móvel é composta de solvente polares como a água, metanol, acetonitrila e isopropanol. Devido ao diâmetro reduzido das partículas, é necessário um sistema de bombeamento que permita que a fase móvel percorra a coluna, realizando assim a separação. O cromatógrafo é composto de bomba, injetor, coluna, detector e sistema de análise de dados (CIOLA, 1998; SNYDER et al, 1997).

Trabalhos de Smith e colaboradores (1984) inicialmente utilizaram a técnica de cromatografia gás-líquido para realizar a determinação dos constituintes de kava-kava. Entretanto, tal metodologia levou à degradação de alguns constituintes, como metisticina. A CLAE foi usada como método alternativo, apresentado resultados satisfatórios em experimentos envolvendo colunas de sílica gel e fase reversa (SMITH et al., 1984).

Em trabalhos realizados pelos pesquisadores Labot e Levesquel (1989) foram analisadas mais de 300 amostras da planta provenientes de ilhas tropicais da Oceania. Os rizomas foram amostrados, pulverizados, extraídos com clorofórmio e sua quantificação foi realizada por CLAE. Foi possível separar as seis principais kavalactonas, yangonina, metisticina, kavaína, desmetoxyyangonina, diidro-kavaína e diidrometisticina (BARBOSA, 2013; LABOT e LEVESQUE, 1989; NETO 2004).

Dentre os métodos desenvolvidos para caracterização das kavalactonas, a cromatografia em camada delgada e detectores espectrofotométricos na região do UV-Vis são bastante utilizados. Trabalhos que empregaram técnicas mais sofisticadas em seu desenvolvimento, como cromatografia gasosa (CG), tiveram resultados de precisão significativamente melhores, entretanto os resultados mais promissores foram obtidos empregando-se CLAE (BILIA et al., 2004).

Nos trabalhos de Ferreira e colaboradores, foi desenvolvido um método bioanalítico usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM). O método foi validado de acordo com guias das agências regulatórias internacionais. Em seguida, o método foi usado para quantificação de kavaína no plasma de camundongos previamente tratados com kavaína isolada ou extrato de kava-kava por via oral (FERREIRA et al., 2020). O mesmo grupo de pesquisas também desenvolveu e validou um método analítico por CLAE-DAD para quantificação simultânea das seis principais kavalactonas em extratos secos de kava-kava (FERREIRA et al., 2021).

2.6 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) foi desenvolvido por Amidon e colaboradores e permite estudar e agrupar fármacos baseado em suas propriedades biofarmacêuticas. Neste sistema, são determinados parâmetros de solubilidade e a permeabilidade intestinal dos fármacos, que influenciam diretamente o processo de absorção (AMIDON et al., 1995; ARRUNÁTEGUI et al., 2015).

Embora crescentes estudos e diversas alternativas de vias de administração de medicamentos, a via oral ainda continua sendo a via preferencial, tanto pelo seu baixo custo e comodidade, quanto pelo maior índice de adesão ao tratamento. Para garantia do efeito farmacológico, os fármacos administrados por via oral necessitam apresentar características físico-químicas que permitam a adequada solubilidade em meio aquoso e a permeabilidade frente às células intestinais, garantindo assim sua absorção efetiva. A não conformidade com estes preceitos físico-químicos podem levar a casos de ineficácia medicamentosa, causada por uma baixa biodisponibilidade (SOUZA, 2007).

De acordo com o SCB, os fármacos podem ser classificados em classes de I a IV, como pode ser observado na Tabela 1. Os fármacos pertencentes a Classe I são caracterizados por apresentar alta permeabilidade intestinal e alta solubilidade nas condições fisiológicas. Os fármacos presentes nesta classe

apresentam uma boa absorção e conseqüentemente melhores valores de biodisponibilidade oral (AMIDON et al., 1995).

Os fármacos Classe II apresentam baixa solubilidade e alta permeabilidade pelas membranas das células intestinais. Neste caso, a dissolução do fármaco é o fator que mais influenciará o processo de absorção. Dessa maneira, a baixa solubilidade pode ser influenciada por um baixo volume de fluidos biológicos disponíveis no TGI, ou por questões cinéticas, quando a dissolução do fármaco acontece muito lentamente, ultrapassando os sítios de absorção (AMIDON et al., 1995; MANADAS et al., 2002)

A Classe III apresenta fármacos com alta solubilidade e baixa permeabilidade intestinal. Neste caso, o fator que mais influenciará na absorção é a permeabilidade. Por fim, os fármacos Classe IV demonstram baixa permeabilidade e solubilidade, apresentam dificuldades de serem absorvidos por via oral e conseqüentemente, apresentam uma disponibilidade oral reduzida (AMIDON et al., 1995; MANADAS et al., 2002).

Tabela 1-Classificação dos fármacos de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Classe biofarmacêutica	Solubilidade	Permeabilidade
Classe I	Alta	Alta
Classe II	Baixa	Alta
Classe III	Alta	Baixa
Classe IV	Baixa	Baixa

Múltiplos fatores contribuem para a variabilidade da biodisponibilidade de fármacos, sendo eles fisiológicos ou inerentes ao próprio fármaco ou medicamento. Dentre as variáveis fisiológicas, destacam-se peso e idade do paciente, pH do trato gastrintestinal, integridade intestinal, colonização por microrganismos e influência enzimática na metabolização e degradações. Dentre as características relacionadas ao fármaco ou à formulação, pode-se citar

a estabilidade da molécula, tipo e constituintes da formulação, tamanho da partícula e polimorfismo (BRASIL, 2011, FDA, 2017).

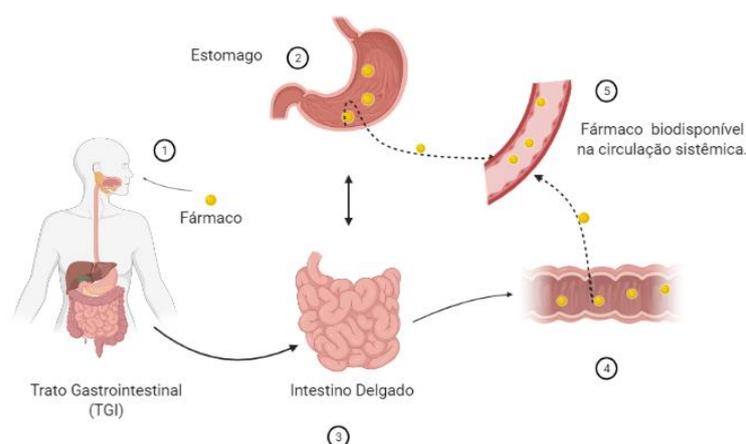
2.7 Estudos de Permeabilidade

Segundo o SCB, um fármaco é classificado como de alta permeabilidade quando apresentar uma absorção superior ou igual a 85% da dose administrada (EMA, 2010; WHO, 2017).

Para avaliação dos parâmetros de absorção e biodisponibilidade por via oral, os fármacos de interesse necessitam atravessar as membranas biológicas do epitélio de revestimento intestinal. Os processos de absorção pelo TGI estão esquematizados na Figura 5 (CAO et al., 2006; CÁRDENAS et al., 2017; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

Segundo os trabalhos de Lobenberg e Amidon (2000), existem duas principais vias de transporte de fármacos pelo epitélio gastrointestinal, a via paracelular ou intercelular e a via transcelular (CAO et al., 2006; CÁRDENAS et al., 2017; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

Figura 5 - Processo de absorção de fármacos pelo trato gastrointestinal até se encontrarem biodisponíveis na circulação sistêmica.



Na primeira via, os fármacos não penetram as membranas celulares. Eles alcançam o sistema circulatório permeando os interstícios e ultrapassando as junções oclusivas. Para fármacos com baixa massa molecular e muito

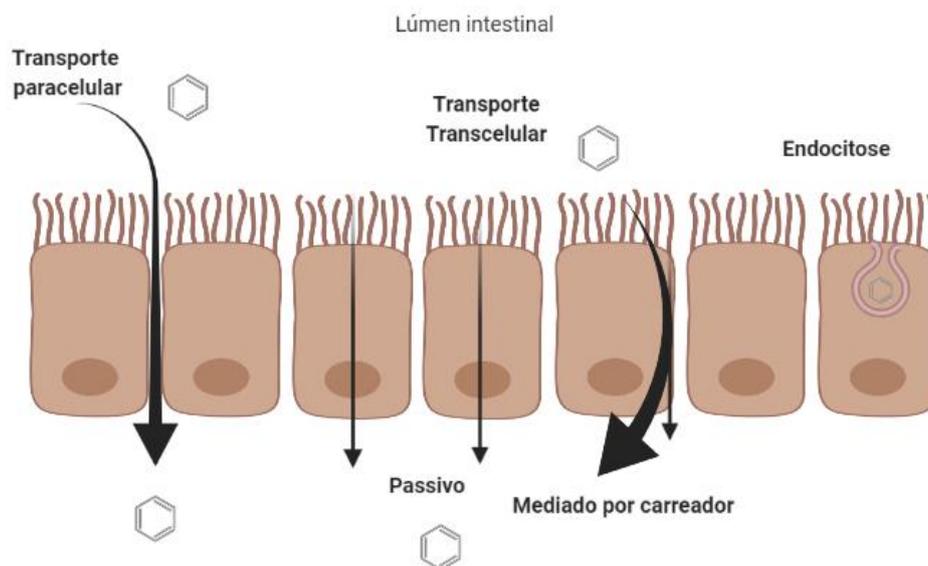
hidrofílicos, esta é uma via importante para absorção (CAO et al., 2006; CÁRDENAS et al., 2017; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

A via transcelular pode ser subdividida em passiva e mediada por carreadores. O transporte passivo está relacionado à maior parte da absorção de compostos de natureza lipofílica, que são moléculas que atravessam as bicamadas lipídicas e posteriormente alcançam a circulação sanguínea (CAO et al., 2006; CÁRDENAS et al., 2017; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

Durante o transporte mediado por carreadores, os fármacos atravessam as membranas celulares com o auxílio de proteínas carreadoras, havendo, neste caso, um gasto energético (CAO et al., 2006; CÁRDENAS et al., 2017; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

A endocitose de fármacos se apresenta também como uma via alternativa de permeação, onde as moléculas de interesse interagem com receptores na superfície da membrana que culminam na formação vesicular, englobando e absorvendo o fármaco, como observado na Figura 6 (CAO et al., 2006; CÁRDENAS et al., 2017; LÖBENBERG; AMIDON, 2000).

Figura 6 - Vias de absorção de fármacos através da membrana intestinal, por transporte intercelular, transporte intracelular passivo, transporte mediados por carreadores e por endocitose.



Adaptado de BALIMANE et al., 2000.

Dentre as técnicas empregadas para estudos de permeabilidade intestinal, o modelo *in vitro* utilizando células humanas da linhagem Caco-2 é uma das mais utilizadas. Primeiramente por evitar o uso de modelos *in vivo* para realizar experimentos, e por mimetizar com eficácia as condições anatômicas e fisiológicas das células do intestino humano (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VAN BREEMEN; LI, 2005).

As células tipo Caco-2 são linhagem provenientes de adenocarcinoma de cólon humano, utilizadas inicialmente nos estudos de terapias antineoplásicas. Contudo, seu principal uso tem se alterado nos últimos anos, após apresentar características que permitem o estudo das propriedades de permeabilidade de fármacos (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VAN BREEMEN; LI, 2005).

As linhagens de células Caco-2, quando cultivadas em condições de crescimento adequadas (temperatura, umidade, atmosfera e superfície para desenvolvimento), possuem a capacidade de se diferenciar em células que mimetizam as células de intestino delgado humano (enterócitos). Apresentam diferenciações como monocamadas cilíndricas, justaposição de células, microvilosidades na extremidade apical, expressão de proteínas transportadoras, enzimas e bombas de efluxo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VAN BREEMEN; LI, 2005).

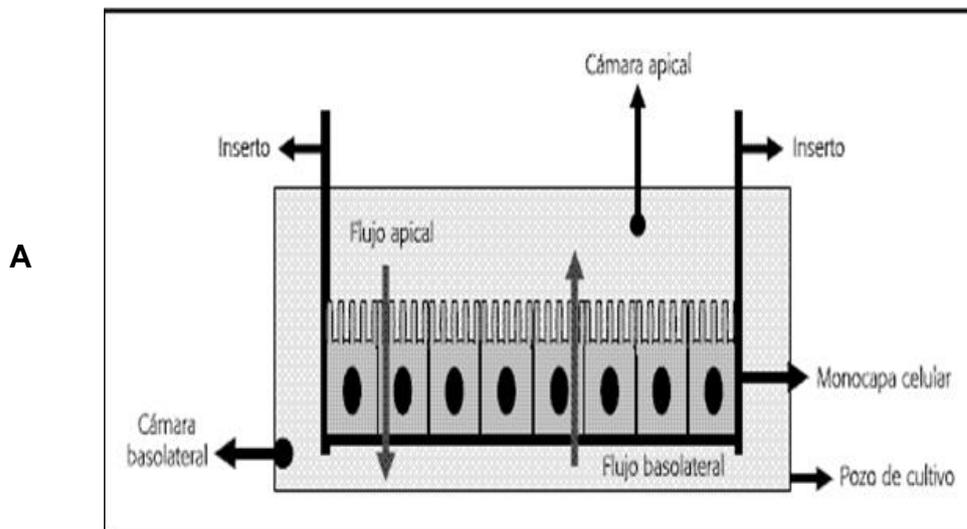
Nos trabalhos envolvendo células Caco-2, devem ser observadas algumas etapas críticas, como o prolongado tempo para formação da monocamada e diferenciação celular. É necessário um período de aproximadamente 21 dias, até que as células estejam aptas para o experimento (VAN BREEMEN; LI, 2005).

As monocamadas são cultivadas em suportes constituídos de membranas semipermeáveis, depositadas em placas de cultura com múltiplos poços (Figura 7). A adição de meio nutriente é realizada na porção superior, ou compartimento apical, e no compartimento basolateral, favorecendo um fluxo contínuo de nutrientes e promovendo o crescimento e diferenciação celular (BALIMANE et al., 2000; VAN BREEMEN; LI, 2005).

O estudo de permeabilidade envolvendo as células tipo Caco-2 necessita da integridade da monocamada celular, que pode ser avaliada por meio da

medida da resistência elétrica transepitelial (RET). Para avaliação da permeabilidade de fármacos, faz-se a adição de solução contendo o fármaco em meio compatível com as condições de cultivo, podendo ser testado nos compartimentos apical ou basolateral e determina-se os mecanismos de transporte celular (transporte passivo ou efluxo) (YEE, 1997; (VAN BREEMEN; LI, 2005).

Figura 7- (A) Esquema do cultivo celular placas transwell. (B) Placas transwell de 6 poços com a presença de células tipo caco-2 em meio de cultura.



Fonte: CASTILLO, 2006.

Para avaliação da permeabilidade celular, é calculado o coeficiente de permeabilidade aparente (P_{app}), conforme apresentado na Equação 1, onde as variáveis V_R , A , C_0 e dC/dt representam, respectivamente, o volume do compartimento receptor em cm^3 ; área do suporte permeável de cultivo celular; concentração inicial adicionada no compartimento doador; e o diferencial da

concentração em relação ao tempo do experimento (YEE, 1997; VAN BREEMEN; LI, 2005).

Equação 1 - Cálculo da Papp.

$$P_{app} = \frac{VR}{(AxCO)} \times \frac{dC}{dT} \quad (1)$$

Contudo, o cultivo de células Caco-2 apresenta etapas críticas, que podem vir a inviabilizar seu uso. Dentre elas pode-se citar (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000; VAN BREEMEN; LI, 2005):

- 1) A necessidade do uso de solventes para estudos envolvendo fármacos baixa solubilidade em meios aquosos.
- 2) A reduzida permeabilidade de compostos hidrofílicos com baixo peso molecular.
- 3) A reduzida expressão de proteínas transportadoras, que criam um contraponto entre fármacos que são muito absorvidos em sistema *in vivo*, entretanto não apresentam o mesmo êxito em modelos *in vitro*.
- 4) O elevado tempo para a cultivo e diferenciação das linhagens (aproximadamente 21 dias).
- 5) Custo de manutenção significativo e necessidade de adaptação do ambiente laboratorial, para minimizar contaminações.

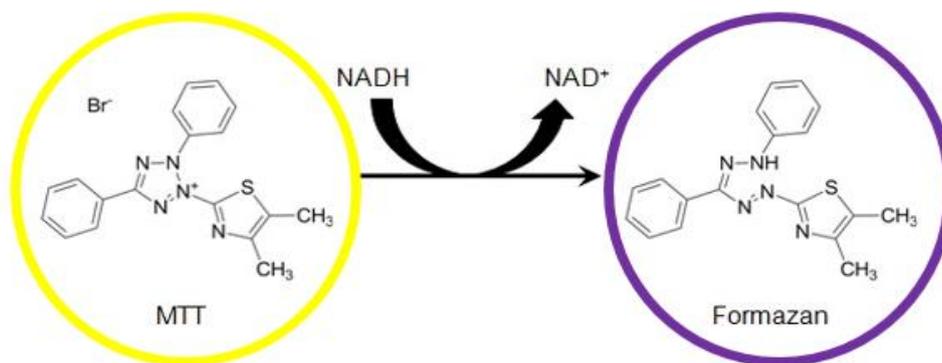
Todavia, mesmo com as limitações supracitadas, o modelo ainda é considerado um ótimo método de correlação das propriedades *in vivo* e *in vitro* e é amplamente utilizado para trabalhos envolvendo parâmetros do SCB (BREEMEN; LI, 2005; FDA 2017).

2.8 Ensaio para determinação da viabilidade das células Caco-2 pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazoli)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)

Em estudos *in vitro* envolvendo compostos inéditos ou com carência de estudos na literatura, a toxicidade perante os modelos celulares se apresenta como uma etapa crítica nos estudos de permeabilidade. (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

Dentre as muitas técnicas que permitem avaliar o metabolismo e conseqüentemente a viabilidade do estudo em curto prazo, destaca-se o ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difeniltetrazólio), um sal tetrazólico. O ensaio é caracterizado pela conversão mitocondrial do sal MTT, reagente de coloração amarela, em formazan, produto de coloração púrpura, e a mensuração desta conversão pode ser realizada através de espectrofotometria. A reação química do ensaio está esquematizada na Figura 8 (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

Figura 8 - Esquema da reação de redução do composto MTT (amarelo) em formazan (violeta)



2.9 Estudos de Solubilidade

A solubilidade dos fármacos é um fator crítico para o processo de liberação dos fármacos, e conseqüentemente sua absorção (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000). Segundo o SCB, um fármaco é classificado como altamente solúvel quando a sua maior dose terapêutica for completamente solúvel em meio aquoso de volume menor ou igual a 250 mL, nas condições de pH entre 1,2 e 6,8 e temperatura de 37 ± 1 °C (ICH, 2018).

A solubilidade em equilíbrio pode ser mensurada quando uma substância no estado sólido se encontra em equilíbrio dinâmico com a substância em solução. Essa mensuração deve ser realizada pela quantificação da concentração da substância em uma solução saturada, considerando fatores como tempo e temperatura (FARMACOPEIA, 2019; USP, 2017).

O método mais indicado segundo as Farmacopeias Brasileira e Americana para avaliação da solubilidade em equilíbrio é a agitação em orbital em frascos, em velocidades entre 50 e 150 rpm. Devem ser utilizados meios tamponados em pH fisiológico e temperatura semelhante às condições do organismo humano, e deve-se adicionar um excesso de fármaco para se obter uma solução saturada (FARMACOPEIA, 2019; USP, 2017).

A Farmacopeia Brasileira 6ª edição determina que para os testes de solubilidade em equilíbrio devem ser utilizados fluido gástrico simulado pH solução tampão acetato 0,05 M pH 4,5 e solução tampão fosfato de pH 6,8 ou 1,5 fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8 (FARMACOPEIA, 2019). É possível encontrar na literatura trabalhos que utilizam outras condições, inclusive em pH 7,5, que representaria a porção distal do íleo (EMAMI, 2006; YAZDANIAN, 2004; YU et al., 2002).

Considerando os efeitos do pH e a partição das moléculas, é esperado que fármacos classificados como ácidos fracos e bases fracas sejam melhores absorvidos no estômago e intestino respectivamente, visto que se encontraram na forma não-ionizada (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000). Por sua vez, em estudos de biodisponibilidade *in vivo*, podem ser avaliadas outras variáveis referentes ao SCB. A área superficial dos órgãos que integram o TGI são extremamente críticas para a biodisponibilidade oral. Mesmo em um ambiente onde a proporção entre moléculas protonadas e não-protonadas é desfavorecidas, o intestino delgado é responsável pela maior parte da permeação dos xenobióticos. Este evento é favorecido pela grande área superficial do órgão (CAO et al., 2006; DAHAN et al., 2010; LÖBENBERG; AMIDON, 2000; PANCHAGNULA; THOMAS, 2000).

Outra variável que pode influenciar em uma maior absorção é o tempo de residência dos fármacos no órgão. Mesmo em um ambiente fisiológico onde a absorção é favorecida no estômago, o trânsito no órgão acontece de maneira ligeira, necessitando ser completada no órgão adjacente (CAO et al., 2006; DAHAN et al., 2010; LÖBENBERG; AMIDON, 2000; PANCHAGNULA; THOMAS, 2000).

3. OBJETIVOS

Avaliar as características biofarmacêuticas de kavaína isolada e em extratos secos de kava-kava, por meio de estudos de permeabilidade intestinal em células Caco-2 e de estudos de solubilidade em equilíbrio.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em tampão Hanks, utilizado em estudos de permeabilidade *in vitro*.
- Desenvolver e validar método analítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em meios tamponados, utilizados em estudos de solubilidade em equilíbrio.
- Avaliar a citotoxicidade do composto perante o modelo células Caco-2.
- Realizar o estudo de permeabilidade intestinal *in vitro* de kavaína isolada e em extratos secos de kava-kava, utilizando modelo de células Caco-2.
- Realizar o estudo de permeabilidade intestinal *in vitro* de kavaína isolada e em extratos secos de kava-kava, utilizando modelo de células Caco-2 com verapamil para avaliar possível transporte de efluxo.
- Realizar o estudo de solubilidade em equilíbrio de kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava, utilizando o método de agitação orbital em frascos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias Químicas de Referência (SQR) e amostra

- D,L-Kavaína substância química de referência (Sigma-Aldrich – Suíça), pureza 100%, lote BCBG5132V; validade maio/2023.
- Cloridrato de Verapamil substância química de referência (Ariston Ltda-Brasil), pureza 100%, lote 5216; validade dezembro/2022.
- Extratos secos de kava-kava comerciais contendo 10% de kavaína (Genix Indústria farmacêutica Ltda.- Brasil), validade março/2022.

4.1.2 Reagentes e solventes

- Acetonitrila grau cromatográfico;
- água ultrapura;
- álcool etílico 70% v/v;
- dimetilsulfóxido P.A.
- fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2;
- fluido intestinal simulado sem enzimas pH 6,8;
- isopropanol grau cromatográfico;
- metanol grau cromatográfico;
- tampão acetato 0,05 M pH 4,5;
- tampão HBSS Hanks;
- meio Dulbecco MEM (DMEM), GIBCO;
- solução de aminoácidos não essenciais, SIGMA ALDRICH;
- solução de glutamina 200 mM, SIGMA ALDRICH;
- soro fetal bovino, GIBCO;
- solução tampão Hanks (HBSS) 1X, GIBCO;
- solução de tripsina 0,25% e EDTA 1 mM, GIBCO.

4.1.3 Coluna cromatográfica

- Agela Technologies Innoval C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m) (Phenomenex® – EUA).

4.1.4 Acessórios e vidrarias

- Balões volumétricos 5, 10, 25, 50, 100, 1000 e 2000 mL;
- bastões de vidro;
- béqueres;
- erlenmeyer de 250 mL;
- frascos de vidro para soluções;
- kit para filtração de soluções a vácuo;
- membrana de celulose regenerada para filtração com 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 μ m, SARTORIUS;
- filtros de seringa de celulose regenerada (CR) de 25 mm de diâmetro e poros de 0,45 μ m Chromafil® Xtra, MACHEREY-NAGEL;
- pipetas graduadas;
- pipetas volumétricas;
- ponteiros de 200 e 1000 μ L para uso em micropipetas;
- provetas;
- tubos de fundo cônico tipo Falcon de 15 e 50 mL.

4.1.5 Equipamentos

- Agitador tipo vórtex MS1, IKA;
- balança analítica com precisão de 0,01 mg BP211D, SARTORIUS;
- banho aquecedor EM4B, IKA
- banho de ultrassom 1400, UNIQUE;
- bomba de vácuo KNF N842, LABOPORT;
- capela de fluxo laminar VLFS-12M, VECO;

- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno de colunas, injetor automático, detector de arranjo de diodos (DAD), software Class-VP Ver.6.1 (LC-10ADvp, Shimadzu);
- estufa TR 60, NABERTHERM;
- freezer vertical -70 °C (UTL-2186, Revco);
- garrafas de cultivo celular 25 e 75 cm²;
- incubadora com plataforma de agitação orbital KS 4000i control, IKA;
- kits esterilizantes de meios de cultura;
- micropipeta 20 a 200 µL FINNPIPETTE® F3, Thermo SCIENTIFIC;
- micropipeta 100 a 1000 µL FINNPIPETTE® F3, Thermo SCIENTIFIC;
- microscópio Invertido, OLIMPUS CXX41;
- microscópio SM-LUX, LEITZ;
- minivoltímetro Milicell ERS®, Millipore;
- pipetas descartáveis estéreis 5 e 10 mL;
- placas Transwell® Corning de 12 poços de 12 mm de diâmetro, com *inserts* de policarbonato de porosidade 0,4 µm;
- ponteiras e pipeta de Pasteur estéreis.
- purificador de água (Milli-Q-Plus, Millipore, Bedford, MA, USA);
- refrigerador 240, CONSUL;
- sistema de purificação de água Direct-Q, MILLIPORE.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento de método bioanalítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em matriz proveniente de cultivo celular

O método bioanalítico foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFMG para análise de kavaína isolada e na presença dos demais componentes do extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst em matriz biológica proveniente de cultivo celular (tampão HBSS). Inicialmente, foi realizada a adaptação do método previamente desenvolvido por Ferreira e colaboradores (2020).

A otimização do método foi realizada utilizando-se soluções padrão de kavaína e soluções amostra de extratos secos de *Piper methysticum* G. Forst doados por farmácias magistrais do município de Belo Horizonte - MG.

Para otimizar a solubilização da kavaína, foi preparada inicialmente uma solução padrão estoque a $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$ e uma solução amostra contendo $2,0 \text{ mg. mL}^{-1}$ do extrato de kava-kava (valor correspondente a mesma concentração de kavaína).

Solução estoque padrão de kavaína ($0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$): pesou-se com exatidão 1 mg de kavaína SQR, dissolveu-se em dimetilsulfóxido (DMSO) e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL . Submeteu-se a banho ultrassônico por 15 minutos e ajustou-se o volume com o mesmo solvente. Homogeneizou-se e a solução foi filtrada com auxílio de dispositivos filtrantes de celulose regenerada de tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$.

Solução estoque de extrato de *Piper methysticum* G. Forst ($2,0 \text{ mg. mL}^{-1}$): pesou-se com exatidão cerca de 20 mg do extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst, dissolveu-se em dimetilsulfóxido (DMSO) e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL . Completou-se o volume com o mesmo solvente. Homogeneizou-se e a solução foi filtrada com auxílio de dispositivos filtrantes de celulose regenerada de tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$.

Para determinar as melhores condições de análise cromatográfica, foram testados diferentes volumes de injeção (10 a $20 \mu\text{L}$), solventes da amostra e comprimentos de onda de detecção. As demais condições cromatográficas utilizadas foram descritas em tabela 2.

Com o intuito de avaliar a adequabilidade das condições cromatográficas, foram avaliados os parâmetros de resolução (R), fator de retenção (k), fator de cauda (T) e a pureza do pico referente ao analito.

Tabela 2 - Condições cromatográficas utilizadas para determinação de kavaína por CLAE-DAD em tampão HBSS para desenvolvimento de método bioanalítico estudo de permeabilidade.

Parâmetros	Condições
Modo de injeção	Automático
Fase móvel	Água: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (66:07:09:18).
Modo de eluição	Isocrático
Fluxo da fase móvel	1 mL.min ⁻¹
Coluna	C18 150 x 4,6 mm; 5 µm (Agela Technologies®)
Temperatura da coluna	40 °C
Tempo de corrida	10 min.

4.2.2 Validação do método bioanalítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em matriz proveniente de cultivo celular

O método bioanalítico para quantificação de kavaína por CLAE-DAD em matriz proveniente de cultivo celular foi validado de acordo com os parâmetros e especificações recomendados pela RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da ANVISA (BRASIL, 2012) e pelo *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation* preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2018). Foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, robustez e estabilidade.

4.2.3.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada injetando-se uma solução branco, contendo apenas a solução tampão HBSS, e uma solução amostra de extrato de *Piper methysticum* G. Forst, nas mesmas condições da análise do padrão de kavaína, a fim de se demonstrar a inexistência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.

A seletividade também foi avaliada pela determinação da pureza espectral do pico de kavaína, obtida com auxílio do detector DAD, no intervalo 200 nm a

400 nm. Considerou-se uma pureza mínima de 99,0% como valor aceitável, demonstrando-se que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

4.2.3.2 Carry over

A presença de efeito *carry over* nas corridas cromatográficas foi avaliada com injeções alternadas de soluções branco, soluções contendo concentração referente a 4000 ng. mL⁻¹ de kavaína isolada, e solução de extrato seco de kava-kava, contendo a mesma concentração do analito (Tabela 3). A solução branco foi constituída de tampão HBSS.

Tabela 3-Sequência de injeções para avaliação do carry over do método analítico por CLAE-DAD desenvolvido.

Sequência de injeção	Soluções analisadas
1	Solução branco (tampão HBSS)
2	Solução padrão de kavaína 4000 ng.mL ⁻¹
3	Solução branco (tampão HBSS)
4	Solução do extrato seco de kava-kava equivalente a 4000 ng.mL ⁻¹ de kavaína.
5	Solução branco (tampão HBSS)

4.2.3.3. Linearidade

A linearidade foi verificada por meio da construção de três curvas analíticas, utilizando-se kavaína SQR em nove níveis de concentração (tabela 4). Prepararam-se soluções estoque e de trabalho de kavaína em metanol, além de solução padrão em tampão HBSS, conforme descrito a seguir.

Solução padrão estoque de kavaína (SP, 0,1 mg.mL⁻¹): Foi pesado com exatidão 1 mg de kavaína SQR, dissolveu em dimetilsulfóxido (DMSO) e transferiu quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Completou o volume com o mesmo solvente, seguido de homogeneização. A solução foi

filtrada com auxílio de dispositivos filtrantes de celulose regenerada de tamanho de poro de 0,45 μm .

Da solução supracitada, retiraram-se alíquotas e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, ajustando o volume das soluções de trabalho (ST) com tampão HBSS, conforme Tabela 4. As soluções foram filtradas, transferidas para *vials* e injetadas no cromatógrafo.

A faixa linear avaliada para kavaína foi de 12,5% a 200% da concentração de trabalho (2000 ng. mL⁻¹) que corresponde à faixa de concentração de 250 ng/mL a 4000 ng/mL. A curva analítica foi construída com os valores de área dos picos de kavaína em cada nível de concentração. A equação da reta e os dados estatísticos foram obtidos a partir da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se o *software* Action Stat[®]. Foram realizadas as seguintes análises estatísticas com os respectivos testes: significância do coeficiente angular (teste F da ANOVA); significância do intercepto ou coeficiente linear (teste *t* de Student); normalidade dos resíduos (Ryan-Joiner) e homoscedasticidade dos resíduos (Teste de Cochran).

Tabela 4 - Diluições para construção da curva analítica de kavaína em tampão HBSS por CLAE-DAD, a partir de solução estoque (SE) a 0,1 mg. mL⁻¹ para o método bioanalítico por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.

Nível de concentração	Volume pipetado da SE (µL)	Volume final ST (mL)	Concentração (ng.mL ⁻¹)	Concentração (%)
1	25	10,0	250	12,5
2	50	10,0	500	25,0
3	100	10,0	1000	50,0
4	150	10,0	1500	150,0
5	200	10,0	2000	100,0
6	250	10,0	2500	125,0
7	300	10,0	3000	150,0
8	350	10,0	3500	175,0
9	400	10,0	4000	200,0

4.2.3.4 Limite de quantificação

Para determinação do limite inferior de quantificação (LIQ), foi avaliada a razão sinal/ruído, que deve ser superior a 10, em injeções de soluções diluídas de kavaína. Além disso, os parâmetros precisão e exatidão do LIQ encontrado foram determinados.

4.2.3.5 Precisão

A avaliação da precisão intracorrída (repetitividade) foi realizada por meio de cálculo do desvio padrão relativo (DPR), partindo de soluções contendo kavaína SQR em cinco níveis de concentração, preparadas de forma independente.

Da solução padrão estoque de kavaína (SE) a 0,1 mg. mL⁻¹, retiraram-se alíquotas e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, ajustando o volume

das soluções de trabalho (ST) com tampão HBSS, conforme Tabela 5. Filtrou-se, transferiu-se cada solução para *vial* e injetou-se 20 μL no cromatógrafo.

Tabela 5 - Preparo das soluções de kavaína em tampão HBSS para avaliação da precisão do método bioanalítico por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.

Nível de concentração	Volume pipetado da SE (μL)	Volume final ST (mL)	Concentração (ng.mL^{-1})	Concentração (%)
1 (LIQ)	25	10,0	250	12,5
2 (CQB)	75	10,0	750	37,5
3 (CQM)	160	10,0	1600	80,0
4 (CQA)	320	10,0	3200	160,0
5 (CQD)	500	10,0	5000	250,0

Os teores de kavaína nas amostras foram calculados a partir das áreas dos picos obtidos e com os dados da curva analítica construída conforme o parâmetro da linearidade.

A precisão intracorrída (repetitividade) foi avaliada no mesmo dia ($n = 5$). A precisão intercorridas foi avaliada pelo mesmo procedimento, em três dias consecutivos ($n = 15$).

Recomenda-se que o valor de DPR seja inferior a 20% para o LIQ e inferior a 15% para os demais níveis de concentração estudados (BRASIL, 2012). O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), foi utilizado para expressar a precisão do método, sendo calculado com base nos valores obtidos, conforme a Equação (2).

Equação 2 - Desvio Padrão Relativo

$$DPR(\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

DP = Desvio padrão.

CMD = Concentração média determinada.

4.2.3.5 Exatidão

A avaliação da exatidão foi realizada pelo cálculo do erro padrão relativo (EPR), partindo de soluções contendo kavaína SQR em cinco níveis de concentração, preparadas de forma independente. As soluções foram preparadas de maneira idêntica ao experimento de precisão, nas mesmas concentrações (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD). Foram aceitos valores dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual a variação permitida foi de $\pm 20\%$.

A exatidão intracorrída foi avaliada pelo erro padrão em uma mesma corrida, contendo as cinco concentrações supracitadas. A exatidão intercorridas foi avaliada em três corridas injetadas em dias distintos. 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).

Equação 3 - Erro Padrão Relativo

$$EPR(\%) = \frac{CT - CME}{CT} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

CME = Concentração média experimental.

CT = Concentração teórica.

4.2.3.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio da avaliação da resposta do analito com alterações nas condições nas quais o método foi inicialmente desenvolvido. As amostras do CQM do estudo de precisão foram utilizadas para avaliação da robustez. Os parâmetros avaliados foram temperatura do forno, comprimento de onda e fluxo da fase móvel, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros e variações para avaliação da robustez do método bioanalítico cromatográfico para quantificação de kavaína por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.

Parâmetro	Varição inferior	Nominal	Varição superior
Temperatura (°C)	38.0	40.0	42.0
Comprimento de onda (nm)	240	245	250
Fluxo (mL.min ⁻¹)	0,8	1,0	1,2

Após as análises, os dados foram tratados e avaliados com o auxílio de análise de variância (ANOVA), a fim de avaliar se as alterações dos parâmetros cromatográficos levaram a variações significativas na resposta do método.

4.2.3.7 Estabilidade de kavaína em solução

Prepararam-se três soluções de kavaína SQR na concentração CQB e três soluções na concentração CQA, preparados de acordo com o item 4.2.3.5 *Precisão*. Cada solução foi dividida em duas alíquotas. A primeira alíquota foi mantida em temperatura ambiente e a segunda em ambiente refrigerado (11 °C). Alíquotas das soluções foram retiradas analisadas nos tempos: 0, 3, 6, 24 horas e 7 dias para determinação da concentração de kavaína.

4.2.4 Cultivo da linhagem de células Caco-2

Os estudos de permeabilidade celular iniciaram-se com subcultivo de linhagens de células tipo Caco-2 provenientes do Instituto Adolfo Lutz (São

Paulo, SP, Brasil). Para o início do cultivo celular, as células foram rapidamente descongeladas com auxílio de banho-maria a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, e posteriormente transferidas para garrafas de cultivo.

O cultivo celular em garrafas foi realizado em meio DMEM com alta concentração de glicose (4,5 g/L), com suplementação de 10% de soro fetal bovino, 1% de solução de aminoácidos não essenciais e 1% de solução de glutamina 200 mM em incubadoras a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$, e atmosfera de 5% de CO_2 e 90% de umidade relativa. Foi realizada troca do meio de cultivo a cada 48 horas.

O subcultivo das células foi feito quando a confluência atingiu aproximadamente 90%. Para tal, usou-se solução de tripsina (0,25%) com EDTA (1 mM) para lavagens (1,5 mL) da monocamada celular formada na parede da garrafa e posteriormente descolamento (0,5 mL) das células aderidas, mantendo-se a garrafa com a solução por 2 min em incubadora a 37°C . Foi adicionada uma alíquota de 3,5 mL de meio DMEM, proporcionando uma passagem celular 4:1. Transferiu-se 1 mL da suspensão celular obtida para garrafa nova contendo 13 mL de meio DMEM suplementado e seguiu-se o cultivo nas condições citadas.

As garrafas foram observadas diariamente, sendo realizado o subcultivo quando a cultura atingia um mínimo de 60 cm^2 equivalente a 80% da área disponível para crescimento celular, o que ocorria geralmente em um intervalo de 4 a 5 dias. O meio de cultivo foi aspirado e descartado, as células que estavam aderidas à parede da garrafa foram isoladas com 0,5 mL de solução de tripsina (0,25 %) e EDTA (1 mM) e incubadas a 37°C por 2 minutos. Posteriormente as células foram ressuspensas em meio DMEM e divididas na proporção 1:4 em novas garrafas contendo 13 mL do meio DMEM.

4.2.1 Ensaio de determinação da viabilidade celular

As células Caco-2 foram cultivadas na densidade de 3×10^4 células/poço em microplacas com 96 poços, incubadas por 24 h a 37°C , em atmosfera contendo 5% de CO_2 e 90% de umidade.

Após período de incubação, as placas foram inclinadas em ângulo de aproximadamente 30° e os meios foram cuidadosamente aspirados, evitando o contato da pipeta com o tapete celular. Foram adicionados 100 µL em sextuplicata das soluções contendo kavaína nas concentrações de 10 µg. mL⁻¹, 20 µg. mL⁻¹ e 40 µg. µg.mL⁻¹, e extrato de kava-kava contendo as mesmas concentrações de kavaína, solubilizados em meio DMEM sem fenol, também, em sextuplicatas, foram preparados: o controle positivo (solução DMEM:DMSO 1:1) e o controle negativo (apenas DMEM).

A placas foram incubadas por 24 h e 4 h, nas mesmas condições supracitadas. Após tempo de incubação, as soluções foram retiradas utilizando os mesmos cuidados, e adicionaram-se 30 µL da solução de MTT 5 mg. mL⁻¹ diluída em DMEM sem fenol, e novamente incubadas nas mesmas condições por 2 h. Após incubação, adicionaram-se 70 µL de solução de solubilização (HCl 0,1 M em isopropanol anidro). A placa foi deixada em estufa com agitação orbital a 100 rpm por 15 minutos para favorecer a solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 690 nm. Os resultados foram expressos em % de viabilidade celular em relação ao controle negativo.

4.2.5 Estudo de permeabilidade de kavaína isolada e em extrato seco de *Piper methysticum* G Forst.

Para realizar o estudo de permeabilidade celular, foi transferida uma alíquota contendo a densidade de aproximadamente 5 x 10⁴ cel/cm², em fase lag de crescimento, para placas Transwell® compostas de doze poços com suporte de policarbonato com porosidade de 0,4 µm e área 1,12 cm².

O cultivo celular nas placas foi realizado com 0,5 mL de meio DMEM na porção apical da membrana celular formada e 1,5 mL do mesmo meio na porção basolateral. A cada 48 h os meios foram substituídos nas duas superfícies, até completar 21 dias de cultivo celular nas placas.

Durante os 21 dias de cultivo celular em placas Transwell®, ocorre diferenciação das células levando a formação de uma monocamada celular, mimetizando o epitélio do intestino delgado

As membranas das células em cultivo em placas Transwell® usadas no experimento de permeabilidade foram monitoradas quanto à integridade, observando-se a resistividade elétrica em minivoltímetro Milicell ERS® (marca Millipore). Os valores medidos acima de $200 \Omega \times \text{cm}^2$ indicam integridade da membrana celular e, portanto, viabilidade para realização do estudo de permeabilidade (STORPIRTIS *et. al.*, 2009).

O estudo de permeabilidade foi realizado usando-se poços cuja membrana foi considerada íntegra a partir da medição da resistência elétrica transepitelial. Todo o meio DMEM foi retirado do compartimento apical e basolateral. Foi adicionado 1,5 mL de tampão HBSS na porção basolateral e 0,5 mL de solução contendo os fármacos em tampão HBSS na porção apical.

As soluções contendo kavaína (SK) e o extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst (SEPM) foram preparadas em tampão HBSS na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de kavaína e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do extrato (equivalente a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de kavaína). Para quantificação dos fármacos durante o estudo, preparou-se curva analítica na faixa de 250 a 4000 ng. mL^{-1} de kavaína.

Solução de trabalho kavaína (STK, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$): pesaram-se com exatidão 2,0 mg de kavaína SQR e transferiu-se para microtubo tipo eppendorff®. Adicionou-se 1 mL de solução de DMSO e agitou-se até completa solubilização. Uma alíquota de 500 μL foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, ajustou-se o volume com tampão HBSS, obtendo-se a concentração final de $20 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de kavaína em meio contendo 0,5% de DMSO.

Solução de trabalho do extrato de *Piper methysticum* G Forst. (STEPM, referente a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de kavaína): pesou com exatidão 20 mg do extrato seco (equivalente a 2,0 mg de kavaína), e transferiu-se para microtubos tipo eppendorff®. Adicionou-se 1 mL de solução de DMSO e agitou-se até completa solubilização. Uma alíquota de 500 μL foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, ajustou-se o volume com tampão HBSS, obtendo-se a concentração final de extrato de kava-kava a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de kavaína, em meio contendo 0,5% de DMSO.

Solução de trabalho de verapamil (STV $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$): pesou-se com exatidão 20 mg de verapamil, transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 1mL de etanol, agitou-se até completa solubilização e ajustou-se o

volume com tampão HBSS. Uma alíquota de 500 μL foi transferida para balão de 50 mL e ajustou-se o volume com HBSS.

Inicialmente, as soluções STK e STEPM foram adicionadas na porção apical dos poços. Realizou a quantificação de kavaína nas soluções adicionadas, por meio da injeção das amostras em sistema CLAE-DAD, usando o método desenvolvido e validado. As placas permaneceram durante o estudo em incubadora com agitação orbital a 50 rpm e 37 °C.

Foram coletados 200 μL de solução do compartimento basolateral nos tempos 0, 30, 60, 120 e 180 minutos após o início do estudo. As amostras coletadas foram imediatamente analisadas por CLAE-DAD. Foi realizada a reposição de tampão retirado, adicionando-se 200 μL de tampão HBSS.

Para verificar o possível mecanismo de efluxo celular de kavaína, utilizou-se verapamil, um inibidor da glicoproteína-P. As soluções de kavaína e extrato seco foram preparados substituindo-se o tampão HBSS pela solução de verapamil. Neste experimento, os poços foram preenchidos com solução STK apenas, como os mesmos volumes da solução tampão HBSS supracitados, e deixou-se em repouso por 20 minutos. Posteriormente, aspirou-se a solução e prosseguiu-se com os protocolos dos estudos de permeabilidade utilizando as soluções de kavaína e extrato de kava-kava em meios contendo a presença do verapamil.

As concentrações das amostras foram calculadas a partir da equação da curva analítica e plotadas em uma curva de concentração *versus* tempo. A avaliação da permeabilidade de kavaína isolada em extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst foi realizada por meio dos valores calculados de permeabilidade aparente (P_{app}) em $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.2.6 Validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em meios tamponados para estudo de solubilidade em equilíbrio

O método analítico para quantificação de kavaína por CLAE-DAD aplicado em estudos de solubilidade em equilíbrio foi validado de acordo com os parâmetros e especificações recomendados pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e da Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014

(BRASIL, 2014) da ANVISA. Foram observadas também orientações presentes em guias internacionais como o International Conference on Harmonization (ICH): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2R1 (ICH, 1996) e AOAC: *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals* (AOAC, 2003).

Foram avaliados os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção. Os cálculos foram realizados com auxílio do software Microsoft Excel 2010® e Action Stat. 3.6®.

4.2.6.1 Seletividade

A seletividade foi avaliada injetando-se os meios tamponados utilizados nos estudos de solubilidade em equilíbrio (pH 1,5; 4,5 e 6,8) e uma solução do extrato de *Piper methysticum* G. Forst, nas mesmas condições da análise de kavaína, afim de se demonstrar a inexistência de picos interferentes no tempo de retenção do analito.

A seletividade também foi avaliada pela determinação da pureza espectral do pico de kavaína, obtida com auxílio do detector DAD, no intervalo 200 nm a 400 nm, para avaliar se o pico cromatográfico pode ser atribuído a um só componente.

4.2.6.2 Linearidade

A linearidade foi verificada pela construção de três curvas analíticas, utilizando-se kavaína SQR em 6 níveis de concentração. Preparou-se solução estoque de kavaína em DMSO e soluções de trabalho diluídas em fase móvel, conforme Tabela 7.

Solução estoque de kavaína (SE, 5 mg.mL⁻¹): pesaram-se com exatidão 25 mg de kavaína SQR, dissolveu-se em DMSO e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 5 mL. Completou-se o volume com o mesmo solvente e homogeneizou-se.

Da solução estoque a 5 mg.mL⁻¹, foram retiradas alíquotas de 200, 400, 600, 800 e 1000 µL e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, ajustando

o volume com fase móvel. A solução de concentração $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi preparada a partir de uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ da solução 2 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Filtrou-se em dispositivos filtrantes de celulose regenerada de tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ para *vial* e injetou-se no cromatógrafo.

Tabela 7 - Construção da curva analítica para kavaína SQR em fase móvel por CLAE-DAD, a partir de solução de trabalho a 5 mg. mL^{-1} em DMSO para o parâmetro linearidade do método analítico para estudo de solubilidade.

Nível de concentração	Volume pipetado da ST (μL)	Volume final SP (mL)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	100*	10,0	1
2	200	10,0	100
3	400	10,0	200
4	600	10,0	300
5	800	10,0	400
6	1000	10,0	500

*Volume pipetado da solução de concentração 2.

A faixa linear avaliada para kavaína foi de 1 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A curva analítica foi construída com os valores de área dos picos do marcador químico em cada nível de concentração. A equação da reta e os dados estatísticos foram obtidos a partir da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa Microsoft Excel®. Foram realizadas as seguintes análises estatísticas com os respectivos testes: significância do coeficiente angular (teste F da ANOVA); significância do intercepto ou coeficiente linear (teste *t* de Student); normalidade dos resíduos (Ryan-Joiner) e homoscedasticidade dos resíduos (Teste de Cochran).

O coeficiente de correlação (*r*) deve ser superior a 0,99 e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

4.2.6.3 Precisão

Para sua avaliação, foi calculado o desvio padrão relativo (DPR), partindo de soluções contendo kavaína SQR em três níveis de concentração, preparadas de forma independente.

A partir da solução estoque de kavaína a 5 mg. mL⁻¹, foram transferidas alíquotas para balões volumétricos de 10 mL, conforme Tabela 8. Completou-se o volume com fase móvel e homogeneizou-se, obtendo-se três níveis de concentração. Filtrou-se em dispositivos filtrantes de celulose regenerada de tamanho de poro de 0,45 µm para *vial* e injetou-se no cromatógrafo.

Tabela 8 - Preparo das soluções de kavaína SQR em fase móvel para avaliação da precisão do método analítico por CLAE-DAD para estudo de solubilidade.

Nível de concentração	Volume pipetado da ST (µL)	Volume final SP (mL)	Concentração (µg.mL ⁻¹)
1(CQB)	150	10,0	75
2(CQM)	500	10,0	250
3 (CQA)	900	10,0	450

Os teores de kavaína nas amostras foram calculados a partir das áreas dos picos obtidos com as soluções amostra e com os dados da curva analítica construída conforme o parâmetro da linearidade.

A repetitividade foi avaliada no mesmo dia com o mesmo analista (n = 3). A precisão intermediária foi avaliada em dois dias distintos, com analistas diferentes (n = 6). Os resultados foram agrupados, e posteriormente foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) para cada nível estudado.

4.2.6.4 Exatidão

A avaliação da exatidão foi realizada pelo cálculo do erro padrão relativo (EPR), partindo de soluções contendo kavaína SQR em três níveis de

concentração, preparadas de forma independente. As soluções foram preparadas de maneira idêntica ao experimento de precisão, nas mesmas concentrações (CQB, CQM, CQA).

A exatidão intracorrída foi avaliada pelo erro padrão relativo obtido em uma mesma corrida, enquanto a exatidão intercorridas foi avaliada em três corridas realizadas em dias distintos.

A concentração média experimental foi obtida usando a equação da reta correspondente ao teste de linearidade.

4.2.6.5 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para a determinação de kavaína foram estimados por meio das Equações 4 e 5, respectivamente, estabelecidas pela RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017). Além disso, os valores encontrados foram confirmados pela razão sinal ruído obtida com injeções de soluções diluídas do analito.

Equação 4 - Limite de Detecção

$$LD = \frac{3,3\sigma}{S} \quad (4)$$

Equação 5 - Limite de Quantificação

$$LD = \frac{10\sigma}{S} \quad (5)$$

Em que:

σ : desvio padrão do intercepto da curva analítica

S: inclinação da mesma curva.

4.2.6.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de alterações nas condições analíticas previamente otimizadas para o método. Foram avaliados os parâmetros: temperatura do forno da coluna, comprimento de onda de detecção e fluxo da fase móvel, conforme descrito na Tabela 9. As soluções foram preparadas em quintuplicata e os resultados foram tratados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA).

Tabela 9 - Parâmetros e variações para avaliação da robustez de método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína para estudo de solubilidade.

Parâmetro	Variação inferior	Nominal	Variação superior
Temperatura (°C)	37,0	40,0	43,0
Comprimento de onda (nm)	240	245	250
Fluxo (mL.min ⁻¹)	0,9	1,0	1,1

4.2.5 Estudo de solubilidade em equilíbrio de kavaína isolada e em extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst

Para avaliação e determinação da solubilidade em equilíbrio de kavaína isolada e em extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst, foi realizado o método da agitação orbital em frascos (*shake flask*). Três meios tamponados com valores de pH distintos foram avaliados, seguindo as recomendações da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019): fluido gástrico simulado pH 1,2 sem enzimas; tampão acetato 0,05 M pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8 (ou fluido intestinal simulado pH 6,8 sem enzimas). O preparo dos meios tamponados utilizados no estudo da solubilidade em equilíbrio está descrito na Tabela 10.

Dados da literatura demonstram que a kavaína apresenta uma baixa solubilidade em meios aquosos, cerca de 16 µg.ml⁻¹ em água, em uma

temperatura de 25 °C. Baseado nesses resultados, foi pesado o equivalente a 1 mg do analito e 10 mg do extrato seco de kava-kava. Estas massas foram adicionadas em 3 mL dos meios tamponados, em frascos de penicilina. As amostras ficaram em agitação de 150 rpm por 24 horas, e após esse período foi observado o saturamento das soluções pela presença de pó nos frascos.

Foram realizadas coletas de 200 µL nos tempos 1, 4, 6, 8, 24 e 36 horas. As alíquotas coletadas foram transferidas para tubos tipo eppendorff® e centrifugadas a 9800 g. Destes tubos, 100 µL do sobrenadante foram diluídos em 300 µL de fase móvel. Após homogeneização, as soluções foram injetadas no sistema cromatográfico, empregando-se o método analítico validado. O experimento foi realizado em triplicata em cada meio avaliado.

O pH dos meios foi determinado no início e ao final dos experimentos. Em todas as condições, foi verificado se havia excesso de pó ao final do experimento.

De acordo com os resultados de solubilidade determinados, foi calculada a razão entre a dose máxima de kavaína (baseada na dose máxima do extrato de kava-kava recomendada), e a solubilidade em equilíbrio, conforme demonstrado na Equação (6). De acordo com o SCB, valores maiores do que 250 mL indicam que o composto apresenta baixa solubilidade.

Tabela 10 - Preparo dos meios tamponados utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio de kavaína.

Meio	pH	Preparo
Fluido gástrico simulado sem enzimas.	1,2	Transferir 2 g de cloreto de sódio e 7 mL ácido clorídrico para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH se necessário para $1,2 \pm 0,1$ com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 10 M.
Tampão acetato 0,05 M	4,5	Transferir 2,99 g de acetato de sódio trihidratado e 1,66 mL de ácido acético glacial para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH se necessário.
Fluido intestinal simulado sem enzimas	6,8	Transferir 6,8 g de fosfato de potássio monobásico e 112 mL de hidróxido de sódio 0,2 M para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente. Ajustar o pH se necessário.

Equação 6 - Razão dose/solubilidade

$$D/S = \frac{\text{Maior dose administrada (mg)}}{\text{Solubilidade (mg/mL)}} \quad (6)$$

Em que:

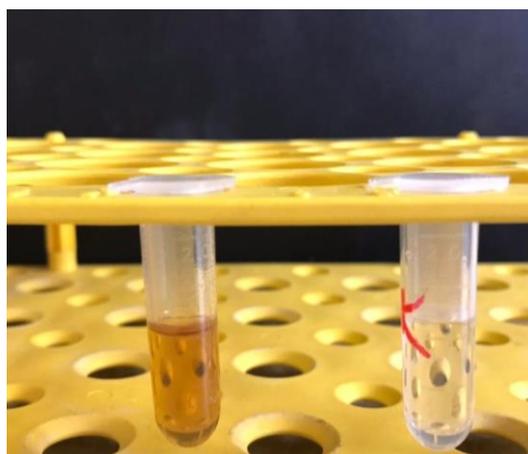
D/S: razão dose/solubilidade

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento de método analítico para a quantificação de kavaína em tampão HBSS por CLAE-DAD

No início do desenvolvimento do método, foi avaliada a solubilidade do analito e do extrato seco em tampão HBSS. Pesou-se 1 mg de kavaína e 10 mg do extrato seco de kava-kava. Os solutos foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL e deixados em banho de ultrassom por 15 minutos. Após procedimento, verificou-se que não foi possível solubilizar totalmente as amostras em tampão HBSS puro. Assim, foi realizada a substituição do tampão HBSS por DMSO. Com este solvente, foi obtida solubilização adequada de kavaína e do extrato seco de kava-kava (Figura 9).

Figura 9 – Soluções de extrato seco de kava-kava a 10 mg. mL⁻¹ e kavaína isolada 1mg.mL⁻¹ solubilizados em DMSO.

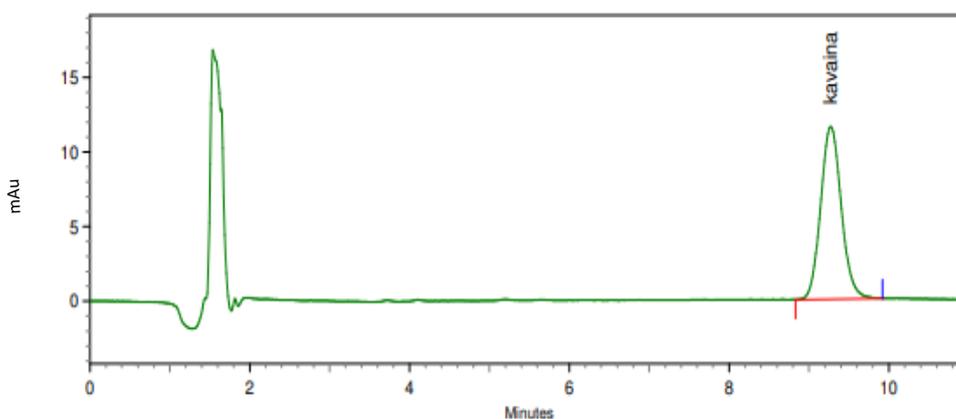


As condições cromatográficas iniciais foram estabelecidas a partir do método analítico desenvolvido e validado para quantificação simultânea de kavalactonas desenvolvido por Ferreira e colaboradores (2021).

Inicialmente foi empregado um volume de injeção de 10 μ L, com picos bem resolvidos, simétricos e com tempos de retenção satisfatórios. Entretanto, no ponto com menor concentração da curva analítica, a área obtida dos picos foi consideravelmente baixa, de forma que o volume de injeção foi aumentado para 20 μ L (Figura 10).

Durante o desenvolvimento do método, foi verificado que o armazenamento da solução tampão HBSS consiste em um fator crítico para as análises, devido às suas características nutritivas que levam à proliferação de microrganismos. Para minimizar possíveis contaminações, foi realizada a assepsia com álcool 70% (v/v) dos recipientes de armazenamento e respectivas tampas e estipulado um prazo de validade da solução de no máximo 30 dias em ambiente refrigerado.

Figura 10 - Cromatograma obtido nas condições otimizadas do método cromatográfico por CLAE-DAD para solução de kavaína a $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Condições: coluna C:18-Água: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (66:07:09:18).

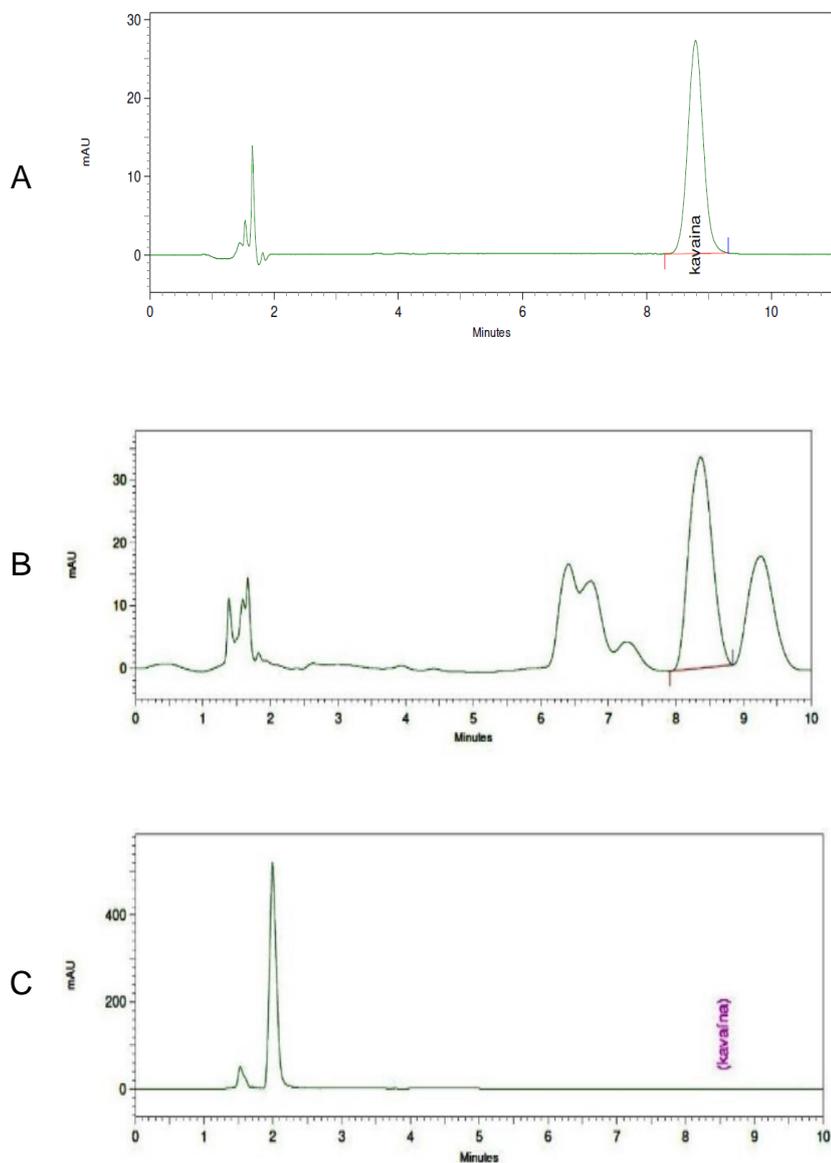


5.2 Validação de método analítico para a quantificação de kavaína em tampão HBSS por CLAE-DAD

5.2.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada com a injeção de amostras de solução branco, contendo o tampão HBSS e extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst nas condições otimizadas do método. Em todas as análises, não foram observados picos cromatográficos interferentes no tempo de retenção do analito (Figura 11).

Figura 11 - Cromatogramas obtidos para avaliação da seletividade: (A) solução padrão de kavaína 4000 ng. mL⁻¹ (B) solução de extrato seco de Piper methysticum G. Forst equivalente a 4000 ng. mL⁻¹ de kavaína e (C) tampão HBSS, analisadas por método bioanalítico CLAE-DAD para estudo de permeabilidade. Condições: coluna C:18-Água: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (66:07:09:18).

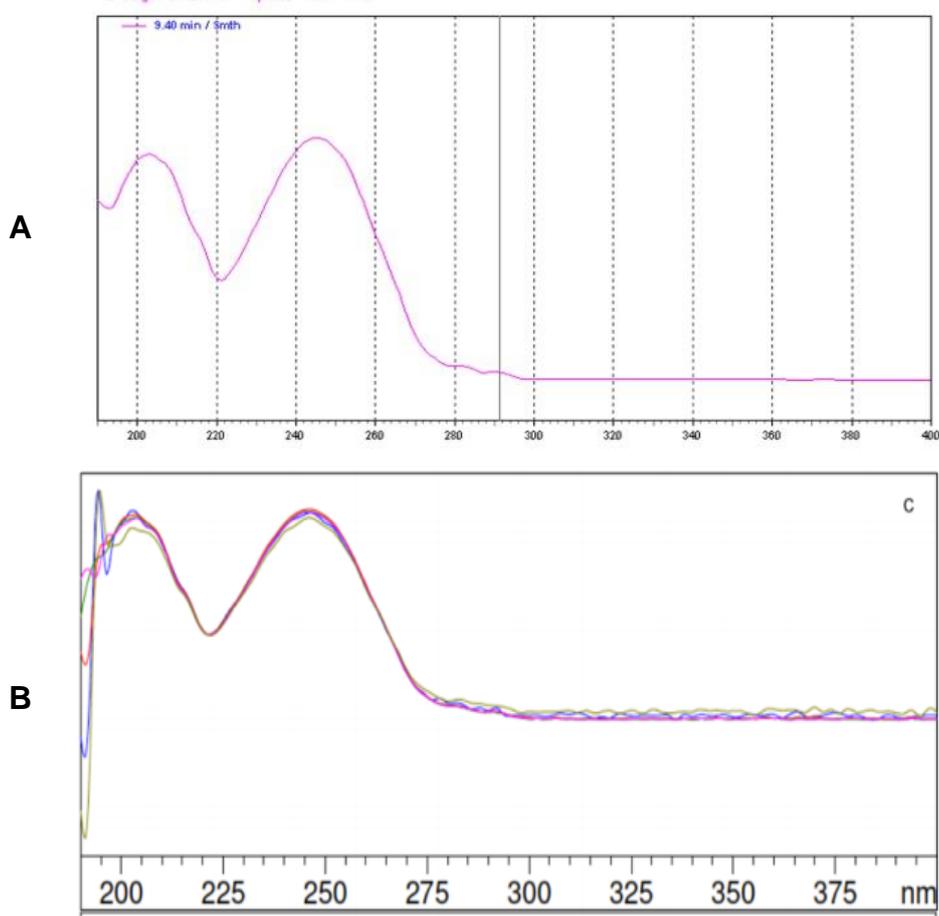


Foi realizada também a determinação da pureza espectral do pico de kavaína, obtida com auxílio do detector DAD, no intervalo 200 nm a 400 nm. Foi observada uma pureza de 99,9% para o pico cromatográfico de kavaína obtida com a solução padrão e uma pureza de 99,9% com a solução contendo extrato seco de kava-kava. O resultado considerado satisfatório, principalmente para a solução do extrato seco, visto que as demais kavalactonas possuem estruturas

químicas semelhantes e muitas compartilham os mesmos grupamentos cromóforos (Mathews et al., 2005).

A fim de caracterizar a substância utilizada na validação do método, os espectros de varredura de 190 a 400 nm. Estes espectros foram comparados com aquele apresentado no trabalho de Ferreira (2019). Foi possível observar semelhança espectral (Figura 12), o que comprova a identidade do composto avaliado.

Figura 12- Espectros de varredura na região do ultravioleta (190 – 400 nm) para as soluções padrão de kavaína obtida no presente trabalho (A) e descrito no trabalho de Ferreira (2019) (B).



(

A partir destes resultados, é possível afirmar que o método desenvolvido é seletivo tanto para quantificação de kavaína isolada quanto na presença dos demais componentes do extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst.

A fim de garantir que interferentes proveniente da matriz vegetal na qual são cultivadas as células tipo Caco-2 também não interfiram nas análises, foram adicionados solução padrão de kavaína e do extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst em matriz contendo as células, cultivadas nas mesmas condições do estudo de permeabilidade. A solução ficou em contato com as células por 4 horas, posteriormente foi retirada uma alíquota de 200 uL, filtrada e injetada no cromatógrafo. Os resultados indicaram que em um período de 4 horas, não houve indícios de degradação e/ou metabolização do analito.

5.2.2 Carry Over

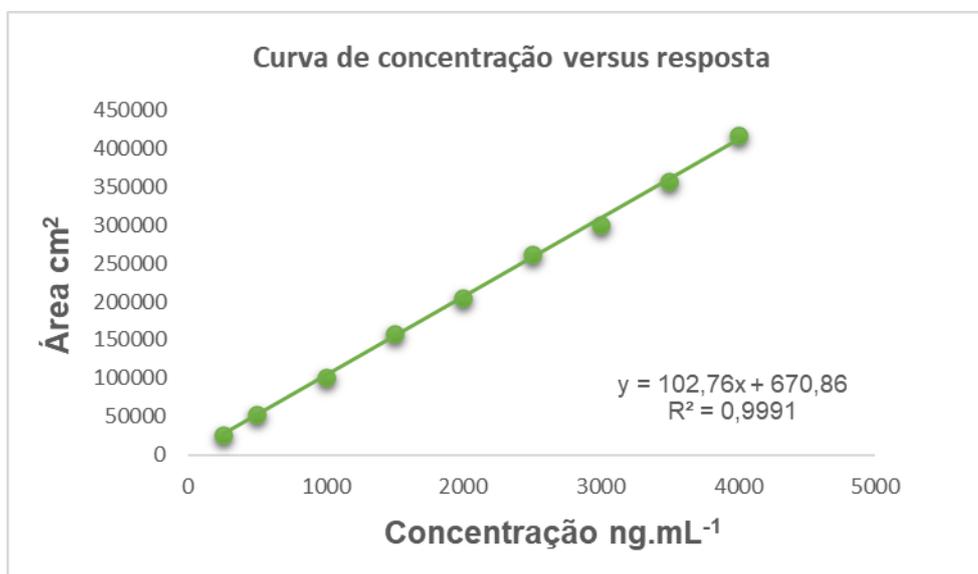
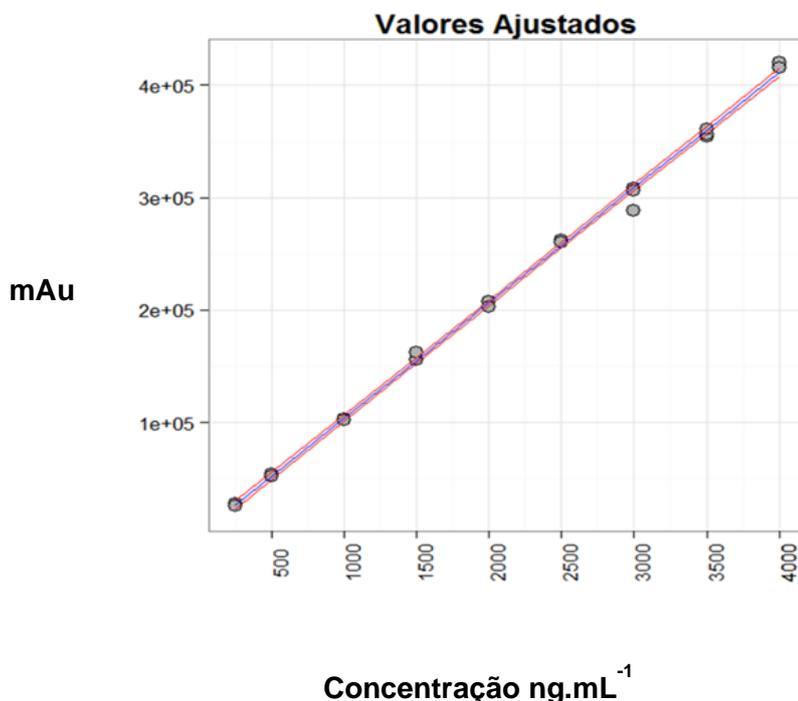
Foi avaliada a presença de efeito *carry over* nas análises cromatográficas. Para tal avaliação, a solução branca contendo apenas tampão HBSS foi injetada após soluções concentradas contendo kavaína padrão ou extrato seco de kava-kava.

Após as sequências de injeções realizadas, não foi observado a presença de picos nos cromatogramas das soluções branco HBSS, indicativo da ausência do efeito de *carry over* nas análises.

5.3.2 Linearidade

A linearidade do método bioanalítico foi comprovada pela construção de três curvas contendo nove níveis de concentração de 250 a 4000 ng. mL⁻¹. O modelo de regressão utilizado foi $y = ax + b$ sendo, y a área sob os picos dos analitos, a o coeficiente angular, x a concentração nominal de kavaína e b o coeficiente linear. A equação da reta obtida foi $y = 102,76x + 670,86$, com um R² de 0,9991. A representação gráfica da curva e a equação da reta estão representadas na Figura 13.

Figura 13 - Curvas analíticas obtidas para kavaína em nove níveis de concentração, e curva analítica média (n=3) para avaliação da linearidade do método bioanalítico por CLAE-DAD para a quantificação de kavaína no estudo de permeabilidade.

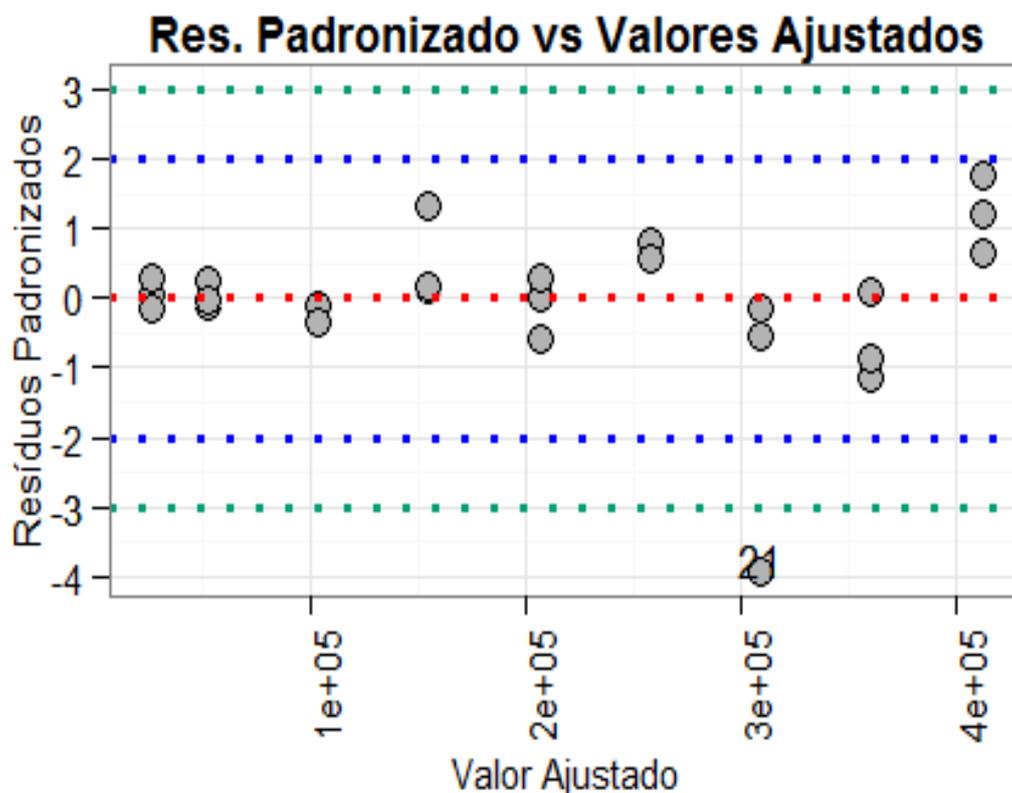


A homoscedasticidade foi avaliada pelo teste de Cochran. O P-valor calculado (0,0002) foi menor do que 0,05, indicando um modelo heteroscedástico. Como a hipótese de homoscedasticidade foi rejeitada, os dados foram reavaliados utilizando o método dos mínimos quadrados

ponderados, com fator de ponderação $w = ((1/s^2)/\text{SOMA}(1/s^2))^*k$, em que s é a estimativa do desvio padrão e k é o número de concentrações no modelo. A homoscedasticidade foi novamente avaliada pelo Teste de Cochran e foi obtido um P-valor (1,00), maior do que 0,05. Assim, aceitou-se a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%, indicando um modelo homoscedástico.

Para avaliação dos resíduos extremos, ou outliers, foi preconizada a exclusão de no máximo 3 pontos como aceitável. No entanto, não foram encontrados valores extremos nos gráficos de resíduos padronizados *versus* valores ajustados, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14 - Resíduos padronizado *versus* valores ajustados do parâmetro linearidade do método bioanalítico desenvolvido para a quantificação de kavaina para estudo de permeabilidade.



O diagrama de dispersão permite avaliar a possível correlação entre as variáveis quantitativas (concentração *versus* área). Os resultados estão representando na Figura 15 e demonstram a proporcionalidade dos resultados, confirmando o modelo linear.

A significância do modelo foi avaliada utilizando o teste ANOVA. Como P-valor do teste (0,00) foi menor do que 0,05, rejeitou-se a hipótese nula, de forma que o coeficiente angular foi diferente de zero ao nível de significância de 5%. O intercepto (coeficiente linear) foi avaliado através do teste *t* de Student, no qual o P-valor do teste (0,24) foi maior do que 0,05. Assim, aceitou-se a hipótese nula e o intercepto foi considerado igual a zero, ao nível de significância de 5%.

O coeficiente de correlação avalia a proporcionalidade entre a variável explicativa e variável teórica. Como o coeficiente de correlação (0,9992) foi maior do que 0,99, conforme especificado, concluiu-se que existe uma relação linear adequada.

A normalidade foi avaliada com o auxílio do teste de Ryan-Joiner. Como o P-valor (0,5762) foi maior do que 0,05, a hipótese de normalidade dos resíduos foi confirmada ao nível de significância de 5%.

As premissas avaliadas na linearidade estão descritas na Tabela 11

Tabela 11 – Avaliação da linearidade do método bioanalítico desenvolvido, empregando-se o Método dos Mínimos Quadrados Ponderados.

Teste	Conclusão
ANOVA	Comprovada a significância do modelo linear
Coeficiente de Correlação de Pearson	R = 0,9992 , maior do que a especificação (0,99)
Teste de Ryan-Joiner	Comprovada a normalidade dos resíduos
Teste de Cochran	Comprovada a homoscedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Pontos extremos não detectados

5.3.3 Precisão

A precisão do método desenvolvido foi avaliada por meio da análise da repetibilidade (precisão intracorrída) e da precisão intermediária (precisão intercorrídas). Foram avaliados 5 níveis de concentração: LIQ, CQB, CQM, CQA e QLD, respectivamente 250, 750, 1600, 3200, e 5000 ng/mL, em quintuplicata (Tabelas 12 e 13).

O método bioanalítico foi considerado preciso, uma vez que o desvio padrão relativo foi inferior a 15% (BRASIL, 2012) para todos os níveis avaliados, tanto para precisão intracorrída quanto para intercorrídas.

Tabela 12 - Valores de DPR obtidos para a precisão intracorrída (n= 5 para cada nível de concentração) para kavaína quantificada por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.

Concentração teórica ng.mL ⁻¹	DPR% 1° DIA	DPR% 2°DIA	DPR% 3°DIA
250	7,21	6,61	10,41
750	3,24	2,40	0,50
1600	1,67	0,99	1,02
3200	0,59	1,02	2,36
5000	0,53	0,30	3,40

Tabela 13 - Concentração média real e valores de DPR (n=15 para cada nível) obtidos para a precisão intercorrída para kavaína por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.

Concentração teórica ng.mL ⁻¹	Concentração média real ng. mL ⁻¹ (n=15)	DPR%
250	278,53	11,41
750	777,37	1,90
1600	1609,08	0,57
3200	3170,16	0,93
5000	4952,53	0,95

5.3.4 Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada por meio da análise da exatidão intracorridas e intercorridas em cinco níveis de concentração: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD, respectivamente 250, 750, 1600, 3200, e 5000 ng/mL em triplicatas (Tabelas 14 e 15).

O método bioanalítico foi considerado exato, uma vez que foi observado um erro padrão relativo inferior a $\pm 15\%$ para todos os níveis de concentração.

Tabela 14 - Erros padrão relativos obtidos para o estudo de exatidão intracorrida de kavaína (n=5 para cada nível) quantificado por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade

Concentração técnica ng.mL ⁻¹	EPR% 1° DIA	EPR% 2° DIA	EPR% 3° DIA
250	13,21	7,13	10,41
750	3,24	3,00	5,30
1600	1,67	1,12	1,02
3200	-0,18	-1,34	0,23
5000	-5,26	1,39	-3,40

Tabela 15 - Concentração média real e valores de erro padrão relativo (n=15) obtidos para o estudo de exatidão intercorridas de kavaína quantificado por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.

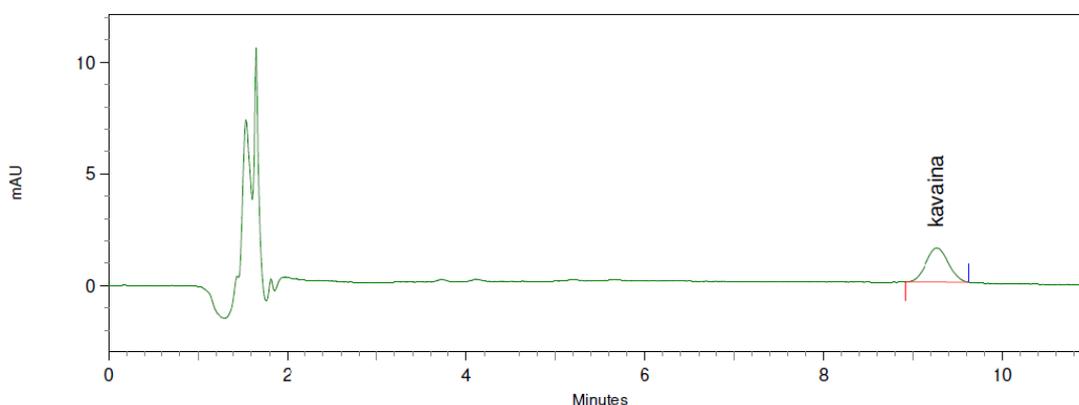
Concentração técnica ng.mL ⁻¹	Concentração média real (n=15) ng.mL ⁻¹	EPR %
250	278,53	11,41
750	777,37	3,65
1600	1609,08	0,57
3200	3170,16	-0,93
5000	4952,53	-0,95

5.3.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi calculado pela razão sinal/ruído, em triplicata, injetando-se soluções nas concentrações 200 e 250 ng. mL⁻¹. Foram observados os valores de razão 8 e 12, respectivamente, de forma que a concentração 250 ng. mL⁻¹ foi considerada o LIQ do método desenvolvido.

Os resultados foram confirmados pelo cálculo do DPR%, demonstrado no item 5.3.3 *Precisão*, que foram inferiores a 20%, e pela análise do cromatograma demonstrado na Figura 16.

Figura 15 - Cromatograma obtido para kavaína a 250 ng. mL⁻¹ quantificada por CLAE-DAD para avaliação do limite de quantificação do método bioanalítico para estudo de permeabilidade. Condições: coluna C:18-Água: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (66:07:09:18



5.3.7 Robustez

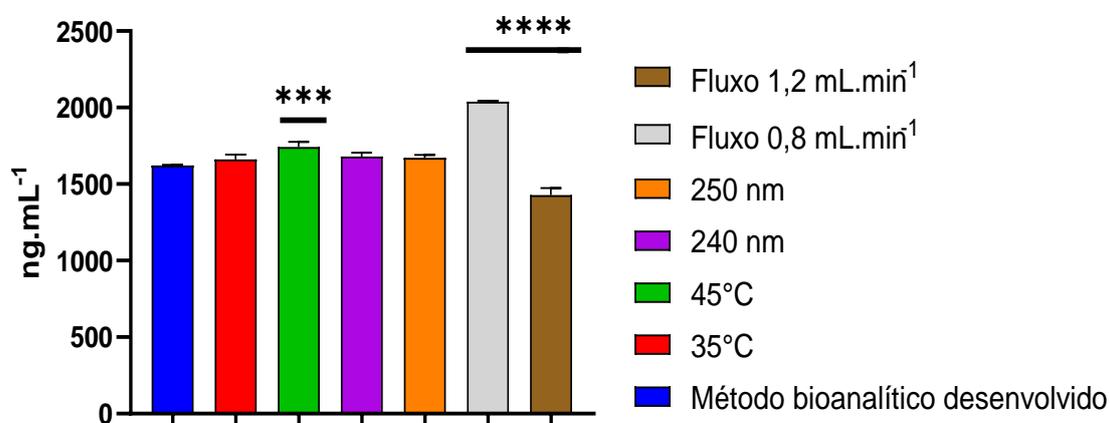
A robustez do método foi avaliada utilizando análise de comparação multivariada ANOVA, em que seis condições distintas foram comparadas com as condições otimizadas do método analítico desenvolvido. As concentrações de kavaína obtidas em cada condição estão descritas na Tabela 16.

Tabela 16 – Concentrações de kavaína (ng. mL⁻¹) obtidas na avaliação da robustez do método bioanalítico por CLAE-DAD para estudo de permeabilidade.

Condição otimizada	35°C	45°C	240 λ	250λ	Fluxo 0.8	Fluxo 1.2
	1618,90	1669,10	1785,60	1577,30	1515,30	2050,00
	1619,00	1636,90	1732,50	1593,60	1487,30	2047,10
	1626,70	1695,60	1730,20	1741,30	1472,90	2038,70
Média	1621,53	1667,20	1749,43	1637,40	1491,83	2045,27
DPR(%)	0,28	1,76	1,79	5,52	1,45	0,29

Após análises estatísticas utilizando um p valor > 0,05, foram observadas diferenças significativas ao comparar as concentrações obtidas pelo método bioanalítico desenvolvido e pelas variações nos parâmetros temperatura a 45°C e fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e 1,2 mL.min⁻¹. O principal motivo para essa variação nas respostas analíticas e consequentemente concentração de kavaína foi a alteração do tempo de retenção e área do pico. Desta forma, estes parâmetros devem ser controlados de forma mais rigorosa durante a aplicação do método. Os resultados representados na Figura 17 demonstram que para as demais condições, o método se mostrou robusto.

Figura 16 - Análise comparativa de amostras de kavaína quantificadas pelo método bioanalítico por CLAE-DAD para avaliação do parâmetro robustez para estudo de permeabilidade.



5.3.6 Estabilidade

O estudo de estabilidade permitiu avaliar possíveis degradações do analito em um período de 7 dias, analisando-se triplicatas de soluções nos níveis CQB e CQA.

As médias, desvio padrão e desvio padrão relativo dos resultados obtidos em cada coleta estão descritos nas Tabelas 17 e 18. A representação gráfica dos resultados está demonstrada na Figura 18.

Tabela 17 – Resultados obtidos no experimento de estabilidade de kavaína em solução, quantificada por método bioanalítico por CLAE-DAD, em função do tempo, em temperatura ambiente.

Tempo	TEMPERATURA AMBIENTE									
	T0 horas		T3 horas		12horas		24 horas		168 horas	
	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB
Concentração média (ng. mL⁻¹)	3453,3	836,0	3447,2	799,1	3506,8	848,6	3487,9	847,7	3629,1	839,8
d.p	62,9	29,2	20,8	47,3	162,6	45,0	240,7	44,4	220,5	44,3
DPR (%)	1,8	3,5	0,6	5,9	4,6	5,3	6,9	5,2	6,1	5,3

Tabela 18- Resultados obtidos no experimento de estabilidade de kavaína em solução, quantificada por método bioanalítico por CLAE-DAD, em função do tempo, em ambiente refrigerado.

Tempo	AMBIENTE REFRIGERADO									
	T0 horas		T3 horas		6horas		24 horas		168 horas	
	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB
Concentração média (ng. mL⁻¹)	3895,5	790,9	3854,5	768,1	3901,3	759,9	3750,0	783,2	3969,0	823,7
d.p	68,9	39,6	116,1	38,3	60,3	31,8	74,1	41,7	62,1	36,9
DPR (%)	1,8	5,0	3,0	5,0	1,5	4,2	2,0	5,3	1,6	4,5

Para avaliar as degradações e/ou instabilidade das amostras durante o período de tempo ou temperatura de armazenamento, foi realizado a análise multivariada ANOVA.

Após análise estatística comparativa entre os níveis CQA e CQB armazenados em ambientes refrigerados, comparados todos os grupos, não foi observado diferenças estatísticas significativas.

Nas análises conduzidas com o CQA armazenado em temperatura ambiente, foi observado uma diferença significativa entre os grupos no tempo de 24 horas em comparação com o tempo de 168 horas (0,0426). Entretanto, a concentração aumentou em 168 horas em relação a 24 horas, o que pode ter ocorrido devido à evaporação do solvente, não sendo, portanto, indício de degradação da kavaína.

Ao realizar a análise estatística entre os grupamentos CQB refrigerado e ambiente, não foi observado diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos tempos avaliados (Figura 19).

Figura 17 – Análise da estabilidade de kavaína nos níveis CQA e CQB, quantificados pelo método bioanalítico CLAE-DAD desenvolvido ao longo de 7 dias, armazenados em temperatura refrigerada e temperatura ambiente.

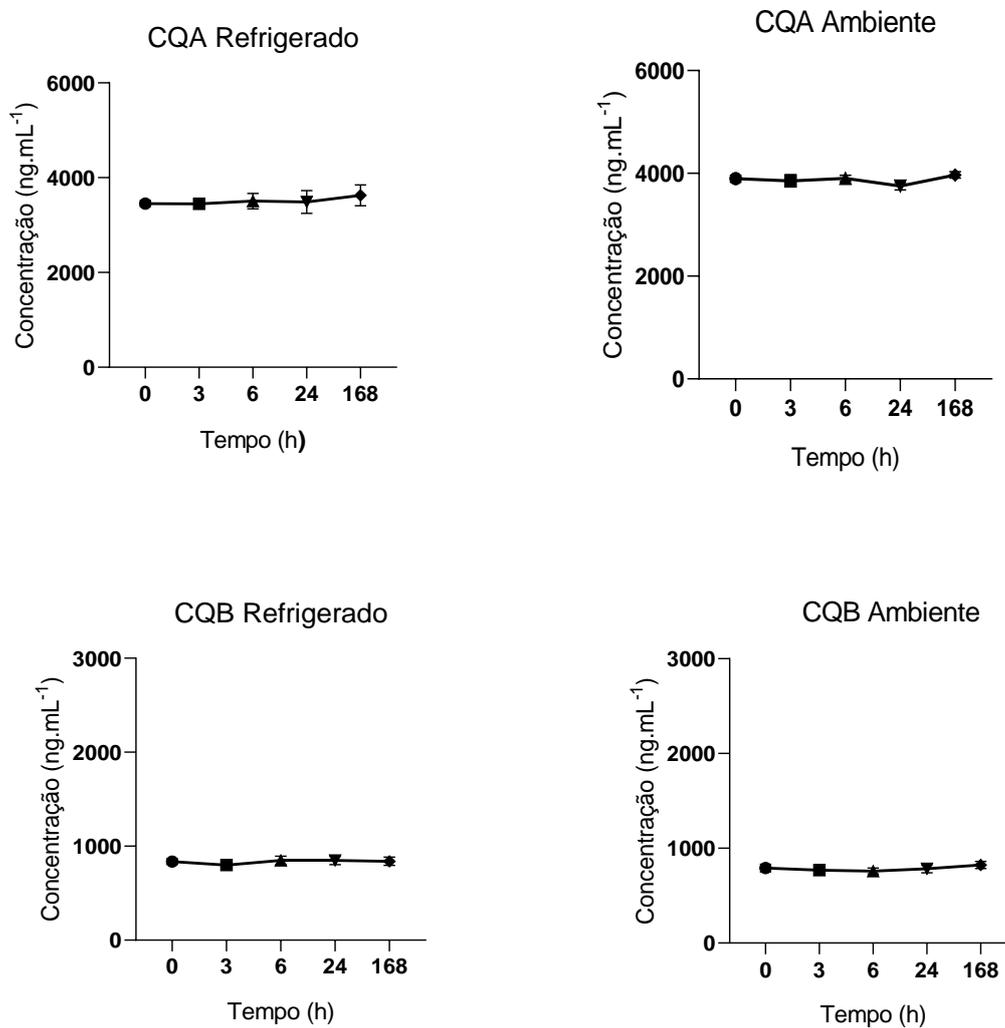
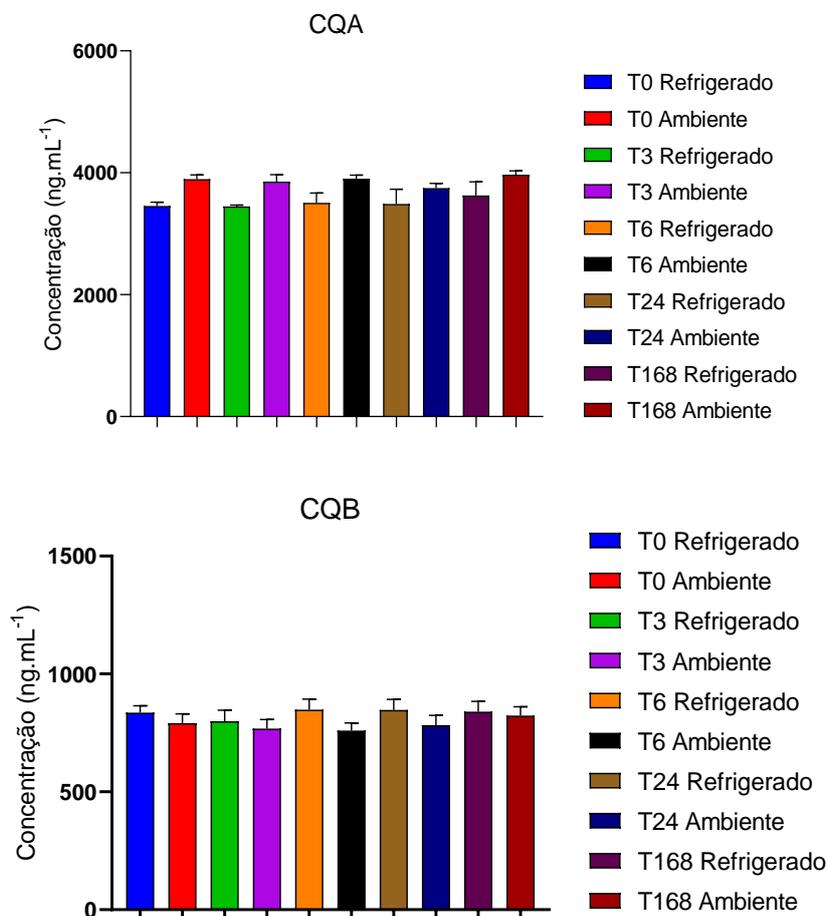


Figura 18- Avaliação da estabilidade das amostras de kavaína nos níveis CQA e CQB, quantificadas por CLAE-DAD, armazenadas em temperatura ambiente e em ambiente refrigerado.

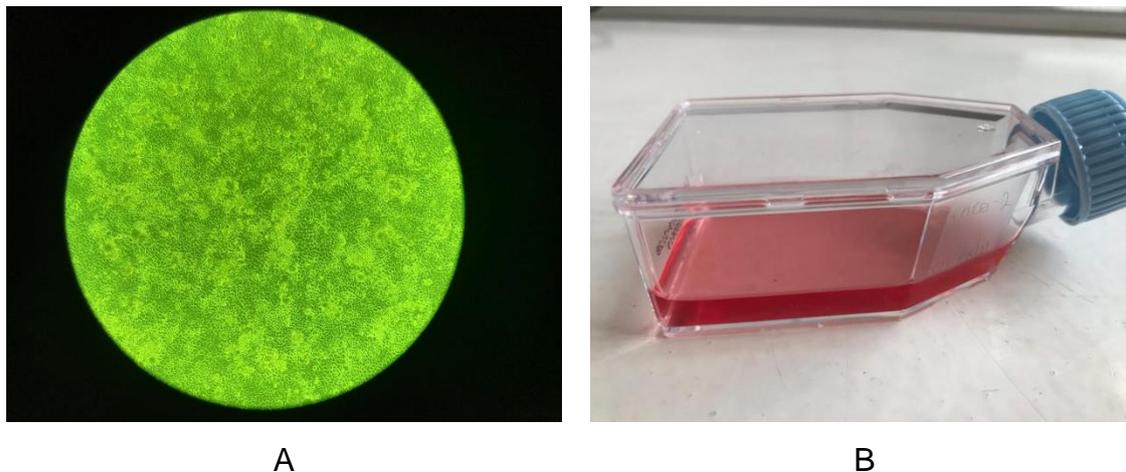


Os resultados demonstraram ainda que o armazenamento em temperatura ambiente não levou a decréscimo de concentração em comparação às soluções armazenadas em ambiente refrigerado. Todavia, foi padronizado para a execução do método o armazenamento de soluções em ambiente refrigerado por no máximo 7 dias, devido ao maior controle de temperatura.

5.4 Cultivo da linhagem de células Caco-2

As células Caco-2 provenientes do instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP, Brasil) foram descongeladas e mantidas em garrafas de cultivo seguindo as condições descritas na seção 4.2.4. As garrafas foram observadas diariamente, e foi retirada uma alíquota de 10 mL de meio DMEM para fazer o controle de esterilidade do meio de cultivo. O crescimento e diferenciação celular podem ser observados na Figura 20.

Figura 19 - Células caco-2 observada em microscópio de fundo escuro (A), e garrafas de cultivo celular, contendo suspensão de células caco-2 em meio DMEM (B).



5.1 Estudo de citotoxicidade

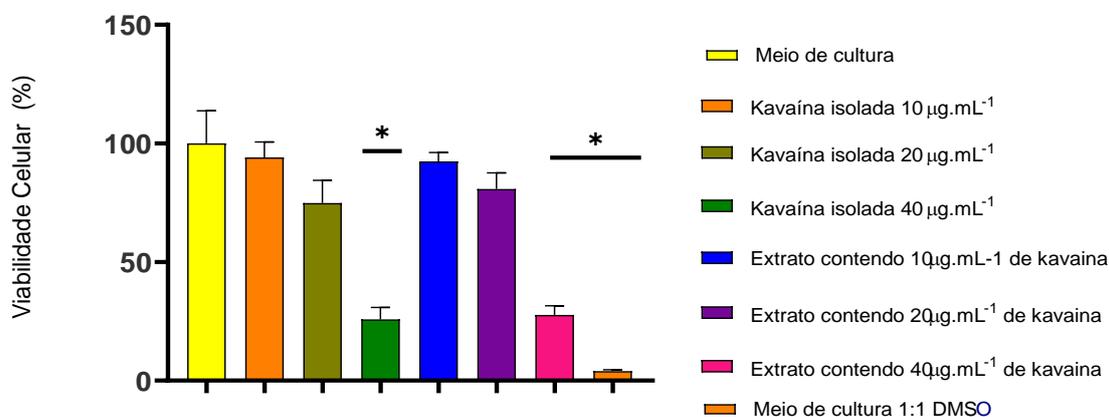
Dentre as técnicas que permitem avaliar o metabolismo e consequentemente a viabilidade celular em curto prazo, destaca-se o ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio um sal tetrazólico. Neste ensaio, a conversão do sal ocorre majoritariamente em mitocôndrias intactas, sendo o MTT, reagente de coloração amarela, convertido ao composto formazan, produto de coloração púrpura, em uma reação de redução. A concentração de formazan é então mensurada por meio de espectrofotometria (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

Os resultados das células Caco-2 incubadas com kavaína isolada ($10 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$) e com extrato seco de kava-kava (contendo as mesmas concentrações do analito) por 24 horas estão representados em porcentagem de viabilidade celular em comparação ao controle negativo (meio de cultura) (Figura 21).

Os resultados mostraram que no período de 24 horas, as células Caco-2 permaneceram com viabilidade acima de 70%, em comparação ao controle negativo, nas concentrações de $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{g. mL}^{-1}$, tanto para o composto isolado quanto para o extrato. Como esperado, a viabilidade celular do grupo tratado com o controle positivo (meio de cultura: DMSO 1:1), apresentou uma viabilidade celular inferior a 5%. O estudo demonstrou que a concentração de 40

$\mu\text{g. mg. mL}^{-1}$ apresentou diferença estatisticamente significativa e baixa viabilidade celular.

Figura 20-Viabilidade celular (%) do pós tratamento com $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de kavaína isolada e em extrato de kava-kava. Exposição por 24h

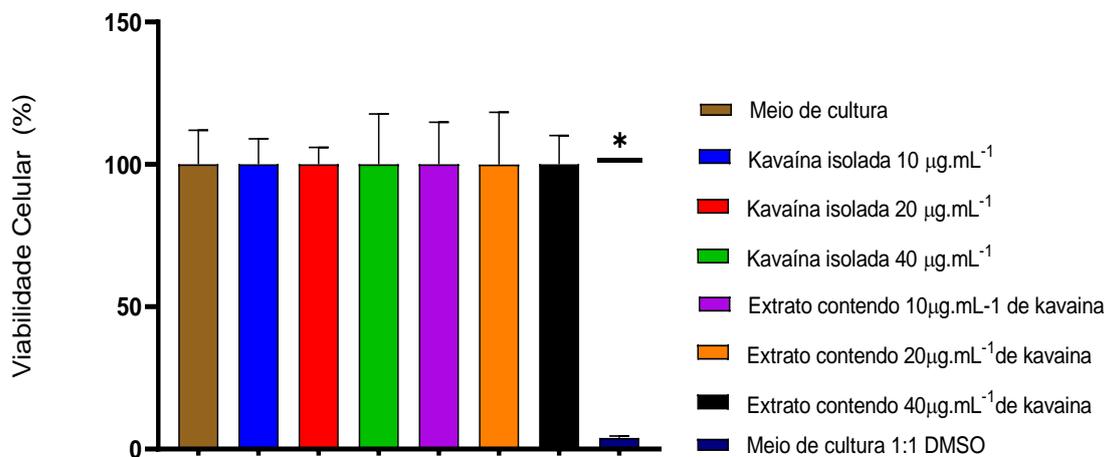


Como o experimento de permeabilidade celular é realizado com coletas nos tempos de 0, 30, 60, 120 e 180 minutos, foi realizado também o estudo de viabilidade celular no período de duração do experimento, a fim de avaliar a viabilidade celular no intervalo de 4 horas, tempo suficiente para a realização de todo o estudo.

Os resultados obtidos após estudo de citotoxicidade para os compostos kavaína isolada ($10 \mu\text{g. mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e extrato seco de kava-kava (contendo as mesmas concentrações do analito) por 4 horas estão representados na Figura 22.

Os resultados mostraram que no período de 4 horas, as células Caco-2 permaneceram com viabilidade de 70% em comparação ao grupo controle negativo, excetuando o controle positivo, onde a viabilidade ficou inferior a 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com kavaína isolada e com o extrato, para um p valor $< 0,05$.

Figura 21 – Representação gráfica da viabilidade celular após tratamento com 10, 20 e 40 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava (B). Exposição por 4h



Os resultados obtidos indicam ausência de citotoxicidade em um período de 4 horas e corroboram com estudos de Amaral e colaboradores (2009) que avaliaram o potencial citotóxico de derivados semelhantes ao composto kavaína perante a linhagens de células tumorais B16-F1 (melanoma; ATCC CRL-6323) e A375 (ATCC CRL-1619) e linhagens celulares de câncer murino B16-F1 (melanoma; ATCC CRL-6323) (AMARAL et al., 2009), demonstrando que as substâncias não apresentam ação citotóxica, o que é requerido para o experimento *in vitro* com modelos de células Caco-2.

5.2 Estudo de permeabilidade celular em linhagem de células Caco-2

Os estudos de permeabilidade foram realizados em placas Transwell® contendo 12 poços, em quadruplicata. O experimento atendeu às premissas necessárias para a validação do estudo, como controle de temperatura, rotação, e garantia da integridade da membrana por meio da medida da resistência transepitelial. Além disso, o teste de citotoxicidade descrito na seção 5.1 *Estudo de citotoxicidade*, garantiu a viabilidade celular na presença de solução contendo kavaína isolada ou do extrato de kava-kava na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A medida da resistência transepitelial (RET) foi utilizada para avaliar a integridade das membranas das células Caco-2 e a formação dos complexos de junções intercelulares, cultivadas nas placas. Trabalhos de Rothen-Rutishauser e colaboradores (2000) demonstraram uma relação linear entre o aumento dos valores de RET e o tempo de cultivo celular, até a estabilidade em valores

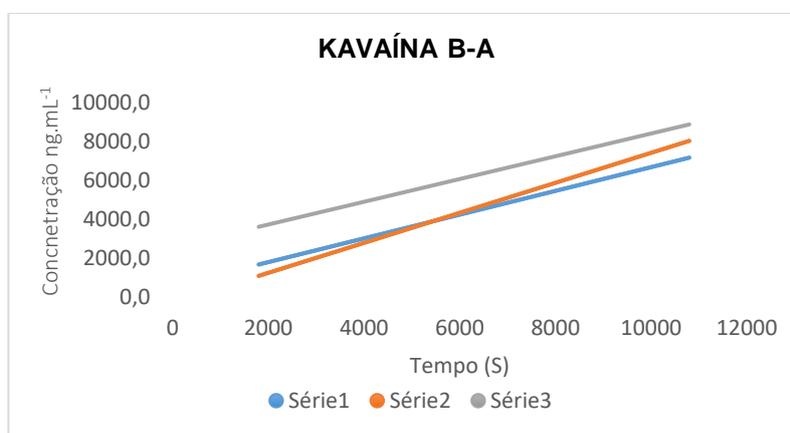
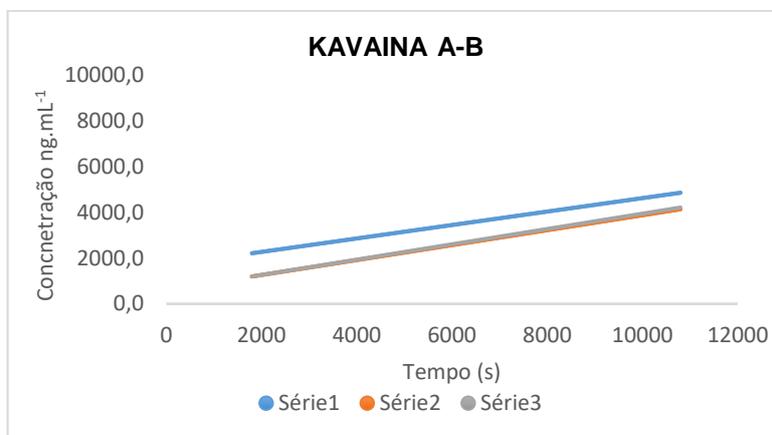
próximos de 650 a 700 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ a partir do 15º dia de cultivo (ROTHEN-RUTISHAUSER et al., 2000). Em todos os poços de todas as placas avaliadas, os valores de RET medidos foram superiores a 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Os resultados do estudo de permeabilidade demonstraram uma relação linear, indicando um aumento da concentração permeada de kavaína ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) por tempo (segundos), tanto para o composto isolado quanto em extrato seco de kava-kava. Não foi observada a presença de platôs, indicativo que não houve saturação dos sítios de ligação celular. Os resultados em cada sentido de permeação (A-B e B-A) estão representados na Figura 23.

A maioria dos fármacos é transportada pelo epitélio intestinal por transporte passivo, sendo paracelular ou transcelular. Uma pequena parcela pode ser transportada com auxílio ou exclusivamente por carreadores. Neste caso, quando o transportador é saturável, pode haver um modelo farmacocinético não linear (COLLETT et al., 2004).

Outro parâmetro avaliado no estudo foi a ocorrência de efluxo. Alguns xenobióticos são pouco absorvidos no trato gastrointestinal devido à presença de efluxo ativo. Dentre as proteínas envolvidas nesse mecanismo, destaca-se a glicoproteína-P (P-gp) (BENET; CUMMINS; WU, 2004). Para avaliação de efluxo, os mesmos experimentos foram realizados na presença de verapamil, um fármaco antiarrítmico inibidor da P-gp. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 24.

Figura 22 – Relação da concentração obtida no compartimento receptor em função do tempo nos sentidos A-B e B-A para kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava em experimentos de permeabilidade em células Caco-2.



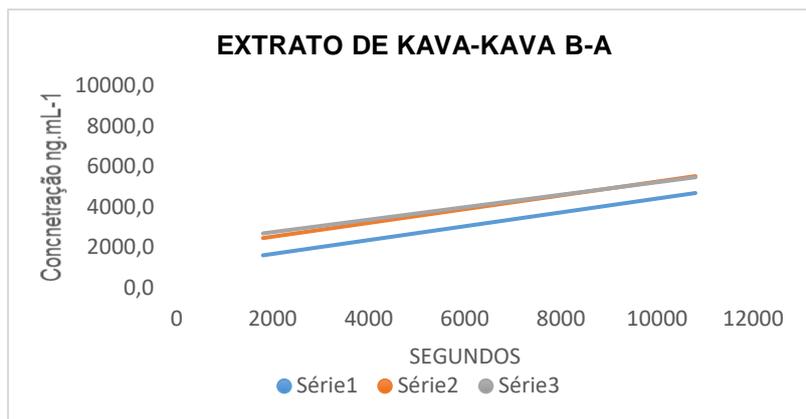
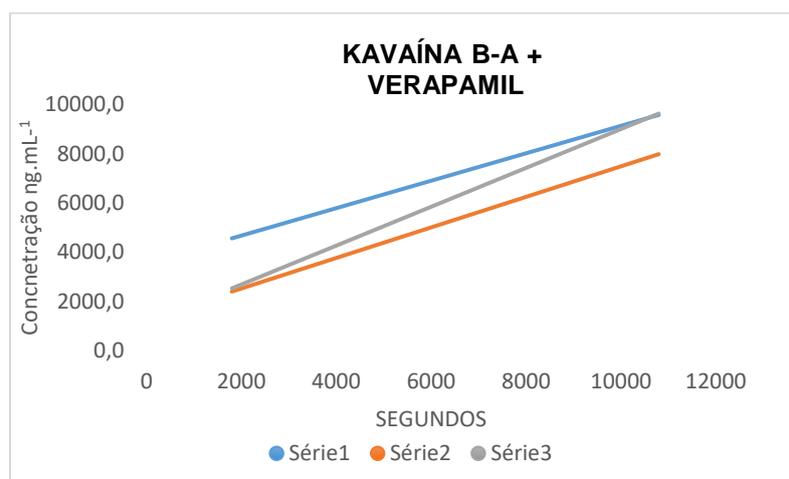
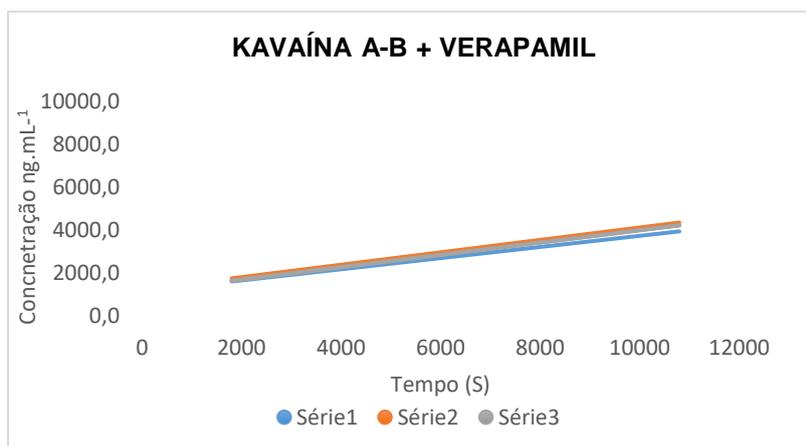
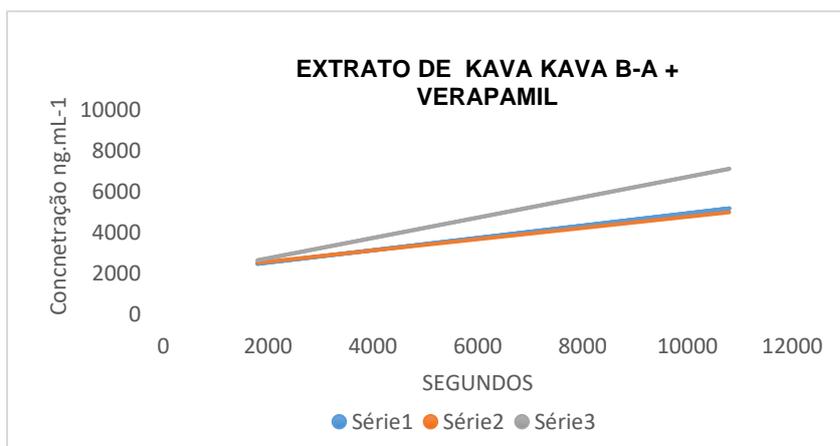
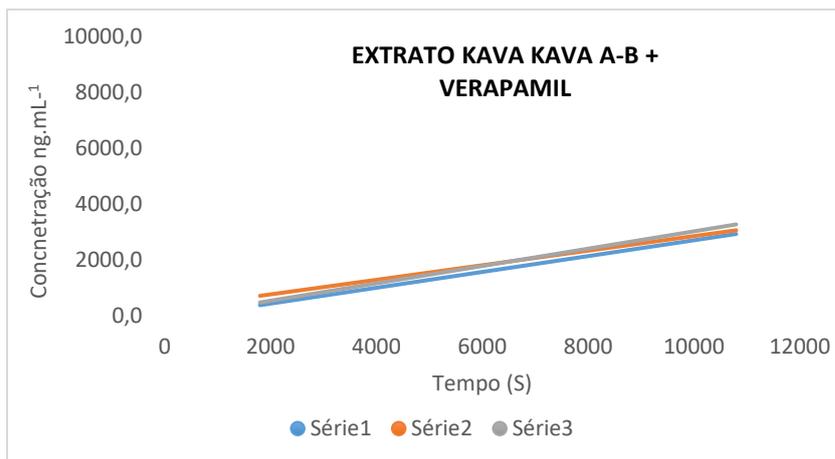


Figura 23- Relação da concentração obtida no compartimento receptor em função do tempo nos sentidos A-B e B-A para kavaina isolada e em extrato seco de kava-kava na presença de verapamil em experimentos de permeabilidade em células Caco-2.





Foram realizados os cálculos de correção para compensar as retiradas sequenciais das amostras dos compartimentos. Empregando-se as concentrações de kavaína obtidas no ensaio e os coeficientes angulares das retas demonstradas nas Figuras 23 e 24, foi possível calcular o coeficiente de permeabilidade P_{app} ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), conforme Tabela 19.

Tabela 19 - Média dos resultados de P_{app} x 10^{-6} (cm.s⁻¹) para kavaína, obtidos no experimento de permeabilidade em células Caco-2.

Condição	Sentido	Papp . 10 ⁻⁶ (cm.s ⁻¹) (n=3)	DPR (%)	Papp
				A-B/B-A (cm.s ⁻¹)
Kavaína isolada	A-B	28 ± 2,75	9,9	0,71
	B-A	20 ± 3,00	1,5	
Extrato de kava-kava	A-B	27 ± 1,75	8,5	1,35
	B-A	15 ± 1292	9,9	
Kavaína isolada em meio contendo verapamil	A-B	25 ± 1,45	5,7	0,80
	B-A	20 ± 2,80	14,0	
Extrato de kava-kava em meio contendo verapamil	A-B	24 ± 2,34	6,8	0,87
	B-A	21 ± 5,94	28	

No estudo de permeabilidade em células Caco-2, fármacos que apresentam P_{app} menor do que 1×10^{-6} são considerados de baixa permeabilidade, com uma taxa de absorção intestinal de até 20%. Fármacos com valores de P_{app} entre 1 e 10×10^{-6} são classificados como de permeabilidade moderada, com absorção intestinal de 20 até 70%. Acima de 10×10^{-6} , os fármacos são considerados de alta permeabilidade (YEE, 1997). Baseados nestes valores, os resultados demonstraram que tanto a kavaína isolada quanto na presença de extrato seco de kava-kava pode ser classificada como um composto de alta permeabilidade.

Os resultados obtidos pelos cálculos da razão P_{app} A-B/B-A demonstraram valores inferiores a 2,00, o que é indicativo que o efluxo não é um mecanismo significativo no processo de absorção da kavaína, tanto isolada quanto em extrato seco de kava-kava. Para confirmar este resultado, calculou-se o P_{app} em placas contendo kavaína na presença do fármaco verapamil e os

resultados foram comparados com os grupos sem o fármaco, utilizando ANOVA, com um intervalo de confiança de 0,05.

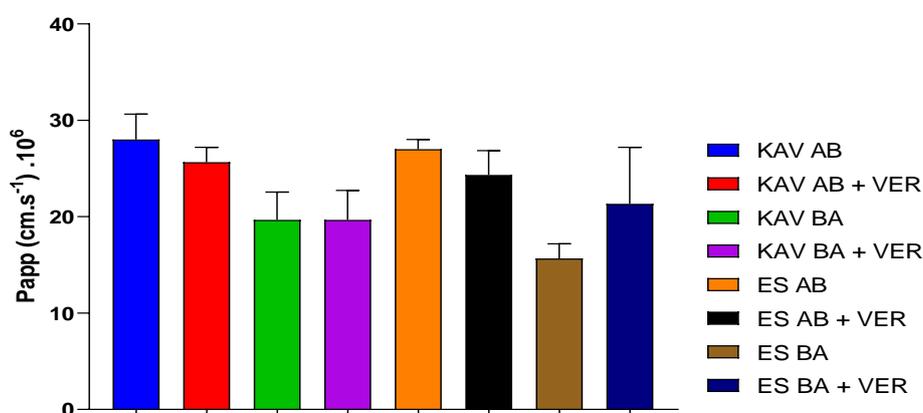
Os resultados demonstraram ausência de diferença estatisticamente significativa entre os seguintes grupos:

- kavaína sentido A-B e kavaína sentido A-B com verapamil;
- kavaína sentido B-A e kavaína sentido B-A com verapamil;
- extrato de kava-kava sentido A-B e extrato de kava-kava sentido A-B com verapamil;
- extrato de kava-kava sentido B-A e extrato de kava-kava sentido B-A com verapamil.

Os resultados confirmaram que o mecanismo de efluxo mediado pela P-gp não é significativo no processo de permeação da kavaína.

Foi realizada também a comparação estatística dos valores de permeabilidade de kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava (Figura 25). Apesar de valores de *Papp* ligeiramente maiores terem sido obtidos para kavaína isolada, não foi verificada diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo com extrato seco de kava-kava. Tal resultado demonstra que outros compostos presentes na matriz vegetal do extrato não influenciam de forma significativa o processo de permeação intestinal de kavaína. Entretanto, a permeabilidade ligeiramente menor observada no extrato pode ser explicada pela presença de outras kavalactonas, que competem com a kavaína no processo de permeação.

Figura 25- Valores de Papp obtidos para os grupos de kavaína isolada (KAV) e extrato seco de kava-kava (ES), na presença e ausência de verapamil (VER).



Resultados semelhantes foram obtidos por Mauro e colaboradores (2019), que avaliaram a permeabilidade intestinal dos metabólitos ácido copálico e ácido caurenóico, diterpenos da copaibeira (*Copaifera langsdorffii*). Neste estudo, os analitos apresentaram permeabilidade moderada, razão Papp A-B/B-A inferior a 2, indicando ausência de efluxo. A presença de verapamil não levou a alterações na permeabilidade intestinal, indícios que os compostos não são substratos da glicoproteína-P (MAURO et al., 2019).

Os estudos de Quianga e colaboradores (2011) avaliaram a permeabilidade do ácido rosmarínico isolado e na presença de extrato de *Prunella vulgaris* e do ácido ursólico isolado e na presença de *Salvia officinalis*. Foi observado que os analitos se comportaram de maneira semelhante, independentemente de estarem na forma isolada ou na presença dos demais componentes da matriz vegetal. O aumento da permeabilidade dos compostos foi diretamente proporcional ao aumento da concentração, indicando que o modelo é linear, sem indicativos de saturação das proteínas transportadoras. Além disso, os dados indicaram um modelo de permeabilidade passiva, semelhantes aos resultados obtidos neste estudo (QIANG et al., 2011).

Um estudo farmacocinético foi realizado por Ferreira e colaboradores (2020), no qual foi feita a administração *per os* de kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava em camundongos. A biodisponibilidade de kavaína foi cerca de 69 vezes maior quando o extrato seco de kava-kava foi administrado, comparando-se com a administração do composto isolado, na mesma dose.

Com os dados do presente estudo, pode-se inferir que a maior biodisponibilidade de kavaína verificada no trabalho de Ferreira e colaboradores (2020) não se deve ao aumento da sua permeabilidade intestinal na presença dos constituintes do extrato de kava-kava.

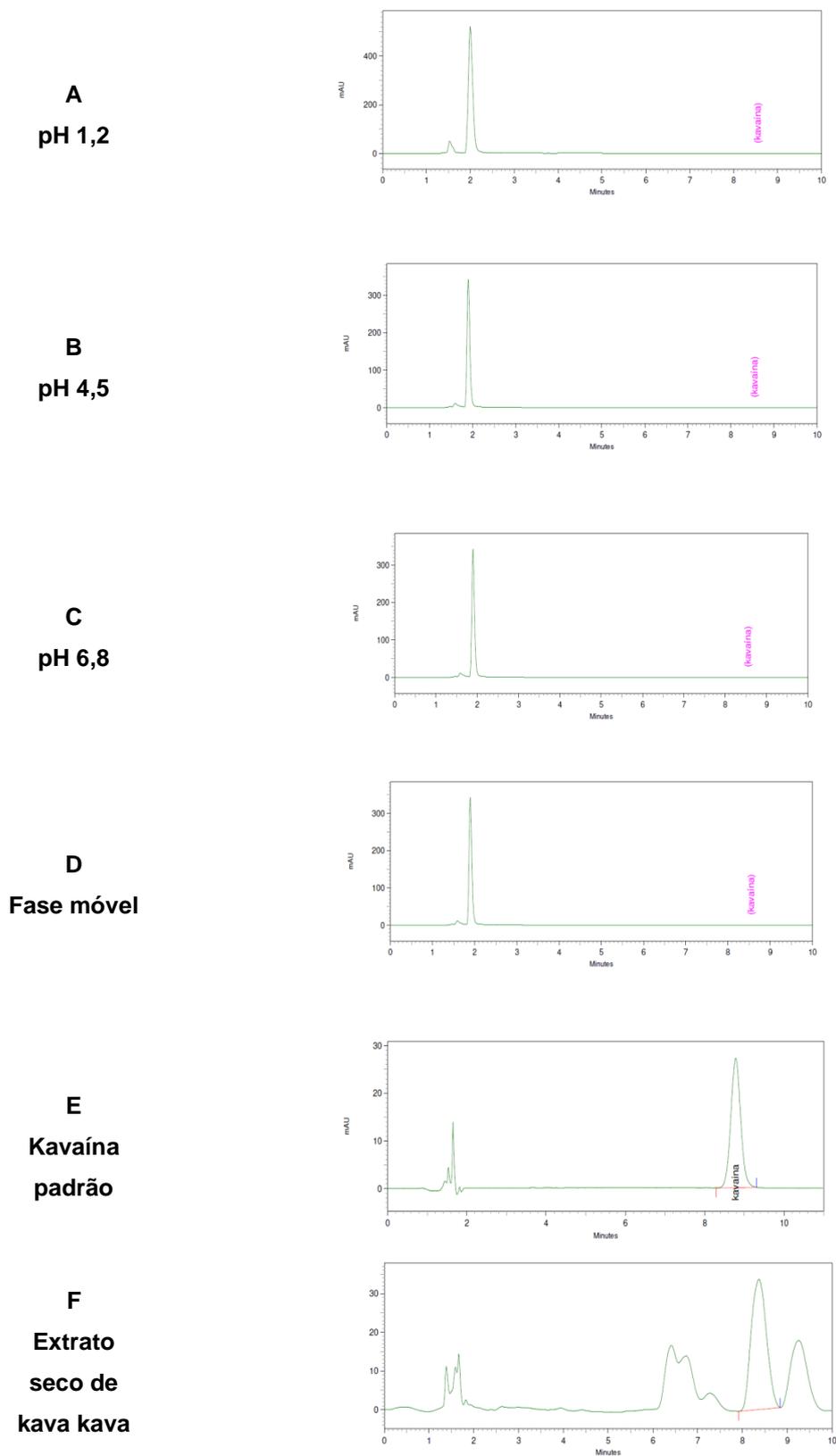
5.5 Validação de método analítico por CLAE-DAD para quantificação de kavaína em meios tamponados para estudo de solubilidade em equilíbrio

5.5.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela injeção individual de amostras de solução branco, contendo os meios tamponados e a fase móvel, além do extrato seco de kava-kava. Em todas as análises, não foi observada a presença de picos cromatográficos interferentes no mesmo tempo de retenção do analito. A pureza do pico de kavaína foi avaliada utilizando-se os mesmos parâmetros do método bioanalítico previamente desenvolvido para o estudo de permeabilidade. Para todas as soluções analisadas, foi obtida pureza espectral do pico de 99,9%.

Os cromatogramas obtidos na avaliação da seletividade do método estão representados na Figura 26

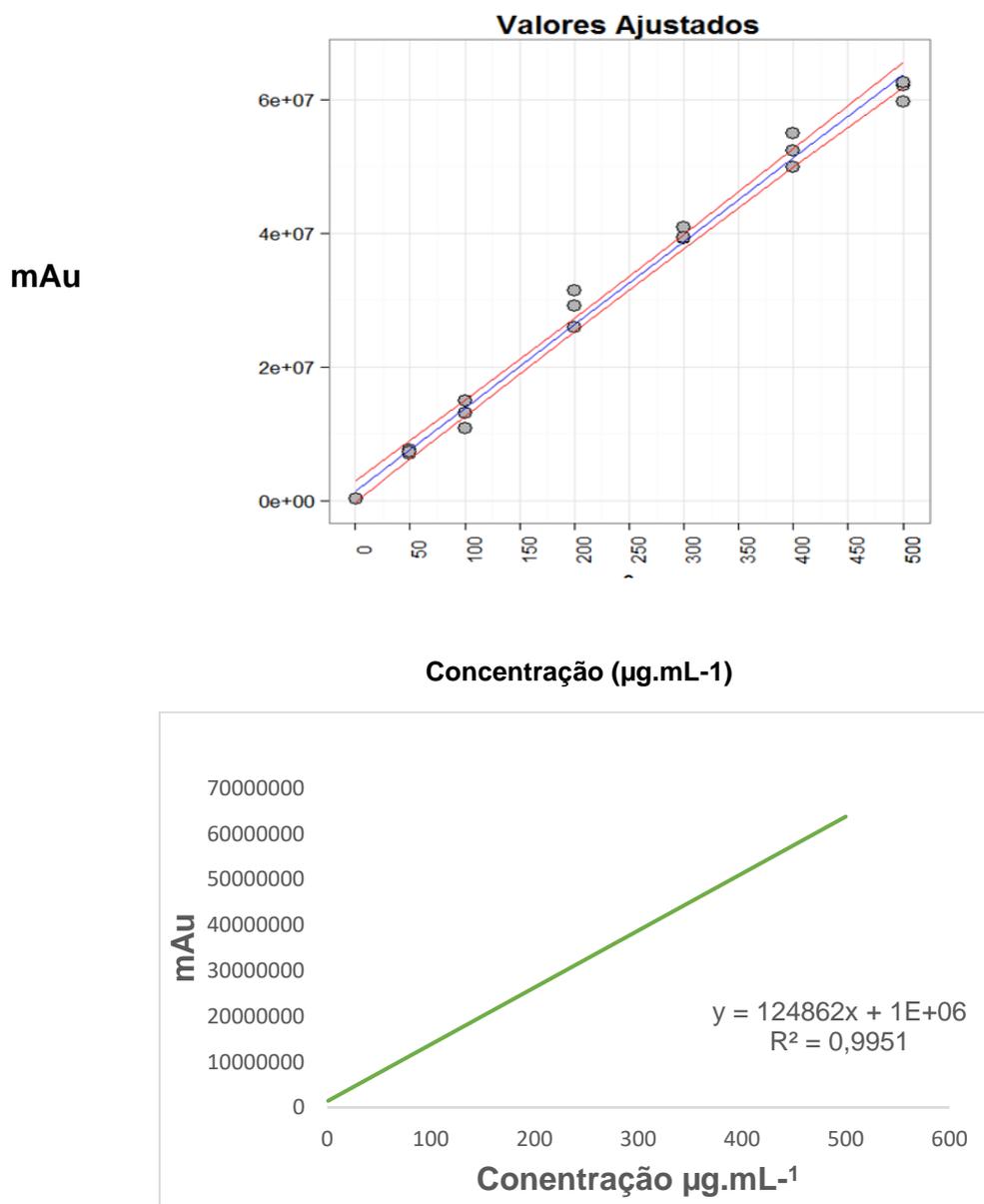
Figura 26 - Cromatogramas obtidos para avaliação da seletividade do método analítico (A) solução tampão pH 1,2; (B) solução tampão pH 4,5; (C) solução tampão pH 6,8; (D) fase móvel (E), solução padrão de kavaína 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, (F) solução do extrato seco, desenvolvidos para estudo de solubilidade Condições: coluna C:18-Água: Metanol: Acetonitrila: Isopropanol (66:07:09:18).



5.5.2 Linearidade

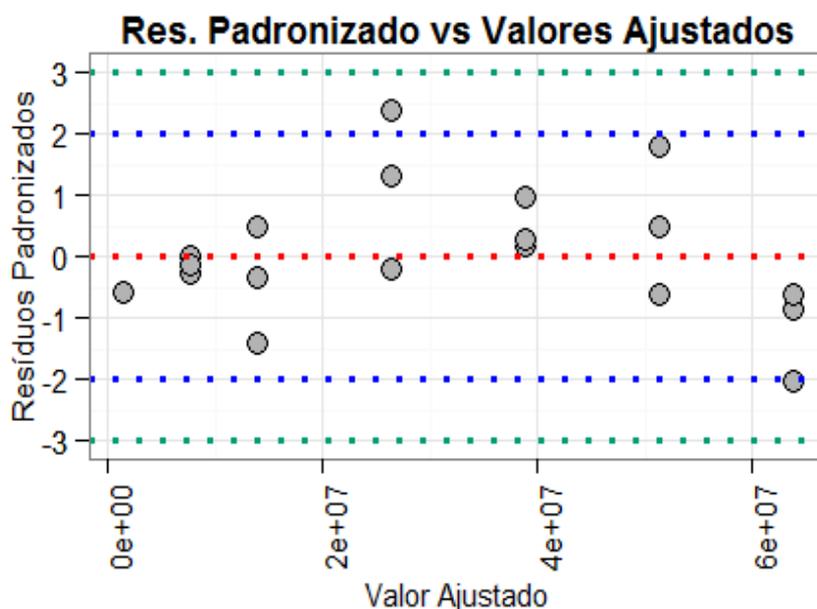
A linearidade do método analítico foi comprovada pela construção de três curvas contendo sete níveis de concentração que variaram de 1 a 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A equação da reta obtida foi $y = 124862x + 10^6$ com R^2 de 0,9951, conforme representado na Figura 27.

Figura 27- Curvas analíticas obtidas para kavaína em sete níveis de concentração, e curva analítica média (n=3) para avaliação da linearidade do método analítico por CLAE-DAD para a quantificação de kavaína no estudo de permeabilidade.



Para avaliação dos resíduos extremos, ou outliers, foi preconizada a exclusão de no máximo 3 pontos como aceitável. No entanto, não foram encontrados valores extremos nos gráficos de resíduos padronizados *versus* valores ajustados, como pode ser observado na Figura 28.

Figura 28- Resíduos padronizado versus valores ajustados do parâmetro linearidade do método analítico desenvolvido para a quantificação de kavaina em estudo de solubilidade.



A homoscedasticidade foi avaliada pelo teste de Cochran, no qual o P-valor obtido (0,469) foi menor do que 0,05. Portanto, não foi rejeitada a hipótese de igualdade entre as variâncias, indicando um modelo homoscedástico. Além disso, a inspeção visual do gráfico de resíduos (Figura 28) indica a distribuição homogênea e, portanto, confirma a hipótese da homoscedasticidade dos resultados.

O diagrama de dispersão permite avaliar a possível correlação entre as variáveis quantitativas (concentração *versus* área). Os resultados representados na Figura 29 demonstram a proporcionalidade dos valores, confirmando os resultados de linearidade.

A normalidade dos resíduos foi avaliada com o auxílio do teste de Ryan-Joiner. Como o P-valor (0,2542) obtido foi maior do que 0,05, a hipótese de normalidade dos resíduos foi aceita ao nível de significância de 5%.

A significância do modelo foi avaliada utilizando o teste ANOVA. Como P-valor do teste (0,00) foi menor do que 0,05, rejeitou-se a hipótese nula, de forma que o coeficiente angular foi diferente de zero ao nível de significância de 5%. O intercepto (coeficiente linear) foi avaliado através do teste *t* de Student, no qual o P-valor do teste (0,2419) foi maior do que 0,05. Assim, aceitou-se a hipótese nula e o intercepto foi considerado igual a zero, ao nível de significância de 5%. Por fim, como o coeficiente de correlação (0,9954) foi maior do que 0,99, conforme especificado, e concluiu-se que existe uma relação linear adequada.

Os resultados obtidos na regressão linear foram satisfatórios, e o método considerado linear. As premissas avaliadas na linearidade estão descritas na Tabela 20.

Tabela 20- Resumo das resultados da avaliação da linearidade do método analítico, empregando-se o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários.

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Comprovada a significância do modelo linear
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0,9954 , maior do que a especificação (0,99)
Teste de Ryan- Joiner	Comprovada a normalidade dos resíduos
Teste de Cochran	Comprovada a homoscedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Pontos extremos não detectados

5.5.3 Precisão

A precisão do método desenvolvido foi avaliada por meio da análise da repetibilidade (precisão intracorrída) e da precisão intermediária (precisão intercorrídas), em três níveis, CQB, CQM e CQA, respectivamente 75 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹, 450 µg.mL⁻¹ em triplicatas. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Tabelas 21 e 22.

A precisão do método analítico foi considerada satisfatória, uma vez que os valores de desvio padrão relativo foram inferiores a 1,5% para todos os níveis avaliados.

Tabela 21 - Valores de DPR obtidos para a precisão intracorrida (n= 3 para cada nível de concentração) quantificados por método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína em estudo de solubilidade.

Concentração teórica ng.mL ⁻¹	DPR% 1° DIA	DPR% 2°DIA	DPR% 3°DIA
75	1,02	0,61	0,64
250	1,30	0,73	0,10
450	1,47	0,80	0,79

Tabela 22 - Concentrações médias reais e respectivos valores de DPR obtidos para a precisão intercorridas (n=6 para cada nível de concentração) quantificados por método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína em estudo de solubilidade.

Concentração teórica ng.mL ⁻¹	Concentração média real ng. mL ⁻¹ (n=6)	DPR%
75	75,69	1,30
250	243,76	0,95
450	458,07	1,35

5.5.4 Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada por meio da análise da exatidão intracorrida e intercorridas em três níveis: CQB, CQM e CQA, respectivamente 75 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹, 450 µg.mL⁻¹ em triplicatas. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 23 e 24.

A exatidão do método analítico foi considerada satisfatória, uma vez que foram observados erros padrões relativos inferiores a ±5% para todos os níveis de concentração.

Tabela 23 - Erro padrão relativo obtido para o estudo de exatidão intracorrida (n=3 para cada nível de concentração) quantificados por método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína em estudo de solubilidade.

Concentração teórica ng.mL ⁻¹	EPR% 1° DIA	EPR% 2° DIA	EPR% 3° DIA
75	-1,04	1,66	0,50
250	-3,81	2,40	-3,22
450	-0,11	2,46	2,82

Tabela 24 - Concentração média real e erro padrão relativo obtidos para o estudo de exatidão intercorridas (n=6 para cada nível de concentração) quantificados por método analítico CLAE-DAD para quantificação de kavaína em estudo de solubilidade.

Concentração teórica ng.mL ⁻¹	Concentração média real (n=6) ng.mL ⁻¹	EPR %
75	75,69	0,92
250	243,76	-2,50
450	458,07	1,79

5.6.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método analítico foram calculados pela equação que leva em consideração os parâmetros da equação da reta obtida no estudo da linearidade. Os valores obtidos para o limite de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 0,13 ng/mL e 0,41 ng/mL.

Os valores obtidos foram inferiores ao menor ponto da faixa de trabalho, considerados assim adequados para o método estabelecido. Os valores de LQ calculados foram confirmados por meio da razão sinal/ruído igual a 12, que foi superior ao limite mínimo estabelecido.

5.6.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada utilizando análise de comparação multivariada ANOVA, em que seis condições distintas foram comparadas com

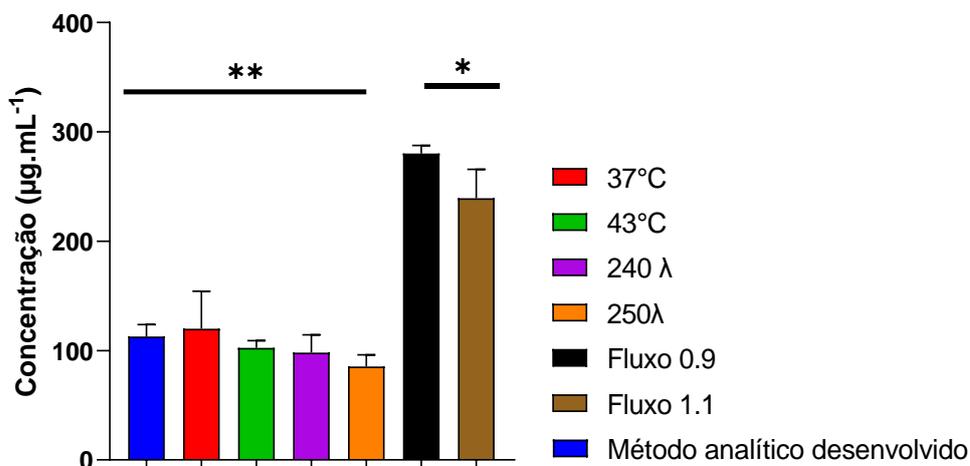
as condições do método analítico otimizado. Os resultados estão descritos na Tabela 25.

Tabela 25 – Concentrações de kavaína (ng/mL) obtidas para avaliação da robustez do método analítico por CLAE-DAD (n=5) para o estudo de solubilidade.

Ordem	MÉTODO DESENVOLVIDO	Temperatura				Fluxo	
		37°	43°	240 λ	250λ	0.9	1.1
1	123	115	109	101	217	220	123
2	94	99	99	82	229	267	94
3	118	87	106	110	233	281	118
4	113	123	106	117	233	284	113
5	116	176	93	81	285	285	116
Média	112,80	120,00	102,60	98,20	239,40	267,40	112,80
DPR%	9,86	28,57	6,34	16,57	10,99	10,27	9,86

Após análises estatísticas utilizando um p valor > 0,05, foi observado diferenças significativas ao comparar as concentrações obtidas pelo método analítico desenvolvido e pelas variações no parâmetro fluxo de 0,9 mL.min⁻¹ e 1,1 mL.min⁻¹. O principal motivo para essa variação nas respostas analíticas e consequentemente a concentração de kavaína foi a alteração do tempo de retenção e área do pico, de forma que este parâmetro cromatográfico deve ser controlado de forma adequada durante as análises. Os resultados representados na Figura 30 demonstram que para as demais condições, o método se mostrou robusto.

Figura 30 - Análise comparativa de amostras de kavaína quantificadas pelo método analítico CLAE-DAD para avaliação do parâmetro robustez.



5.7 Estudo de solubilidade em equilíbrio de kavaína isolada e em extrato seco de kava-kava

A solubilidade em equilíbrio do composto kavaína, isolado e na presença dos demais componentes do extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst foi determinada utilizando o método analítico validado por CLAE-DAD. As análises foram realizadas pelo método de agitação orbital em frasco (*shake-flask*), em três meios tamponados (pH 1,5; 4,5 e 6,8), que mimetizam os valores de pH do TGI.

Durante o estudo, deve ser respeitada a formação de um sistema heterogêneo, sendo a fase líquida composta das soluções tampão, e a fase sólida contendo analito em excesso (EMAMI, 2006; FARMACOPEIA, 2017; USP, 2017; YAZDANIAN, 2004; YU et al., 2002).

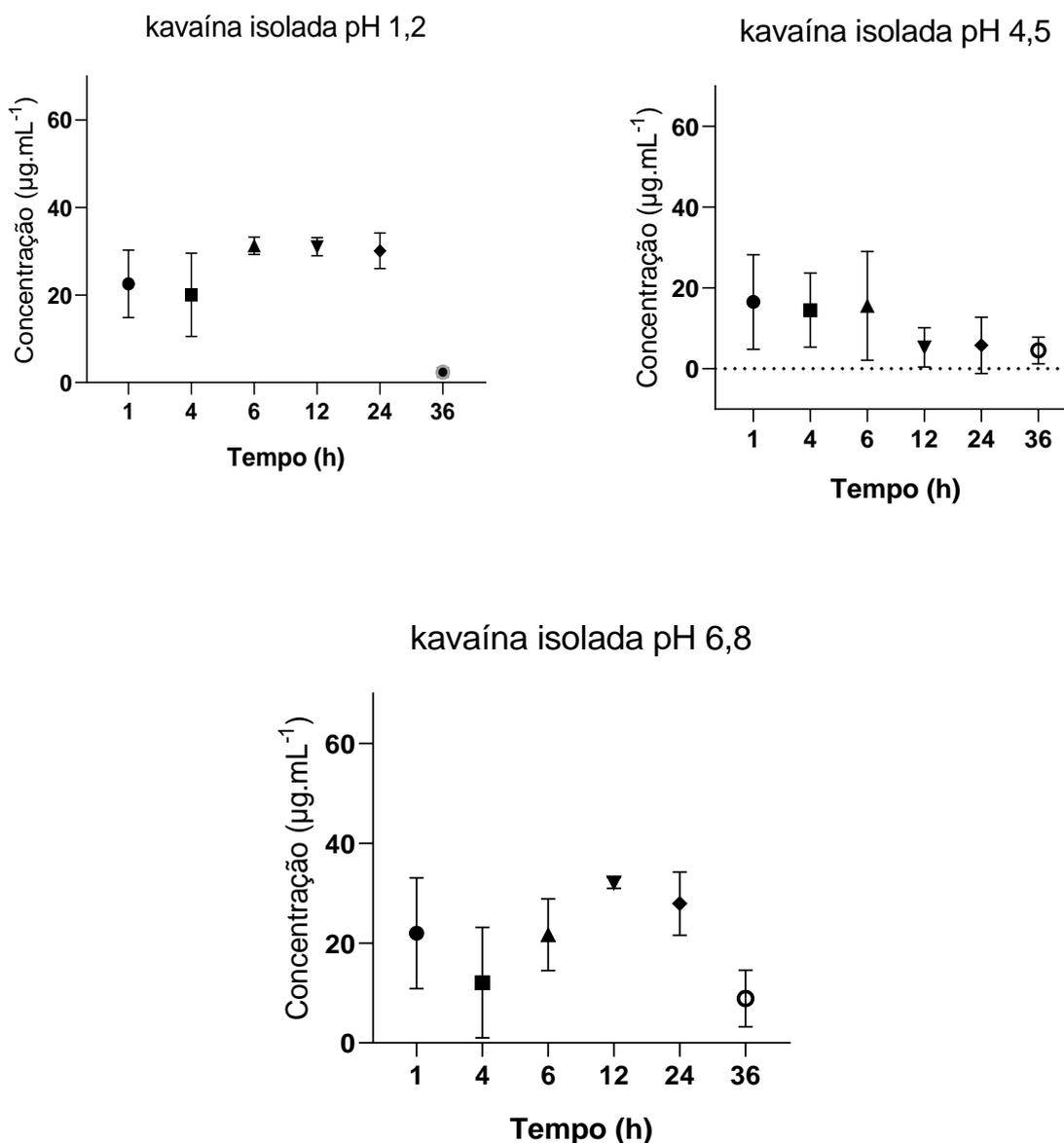
Os valores de pH de todos os meios foram aferidos no início e no final dos experimentos. Não foram observadas alterações que ultrapassassem a variação de 0,1 unidades de pH.

Foram retiradas alíquotas para avaliação da solubilidade nos tempos de 1, 4, 6, 12, 24 e 36 horas, para o composto kavaína isolada e na presença de extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst (n = 3). As amostras foram injetadas e analisadas por CLAE-DAD. Os resultados foram tratados por ANOVA, utilizando um intervalo de confiança de 95%. Os gráficos de solubilidade de

kavaína isolada e em extrato de kava-kava estão demonstrados nas Figuras 31 e 32, respectivamente.

Foi observado que a solubilidade de kavaína isolada no pH 1,2 se manteve constante nas primeiras 24 horas. Foi observado um decréscimo da solubilidade na análise de 36 horas, que pode ser um indício de degradação ou pode ter ocorrido algum erro experimental. No meio pH 4,5, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos em todos os tempos de coleta, indicando que o equilíbrio foi mantido durante as 36 horas de análise. No meio pH 6,8, os resultados foram mais variáveis ao longo do tempo, entretanto não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de coleta, excetuando a comparação dos tempos 12 horas e 36 horas. Os resultados indicaram que foi atingido um equilíbrio de solubilidade do composto analisado, que foi alcançado rapidamente, persistindo por pelo menos 24 horas.

Figura 31- Avaliação da solubilidade de kavaína isolada em meios tamponados pH 1,2; pH 4,5 e pH 6,8.

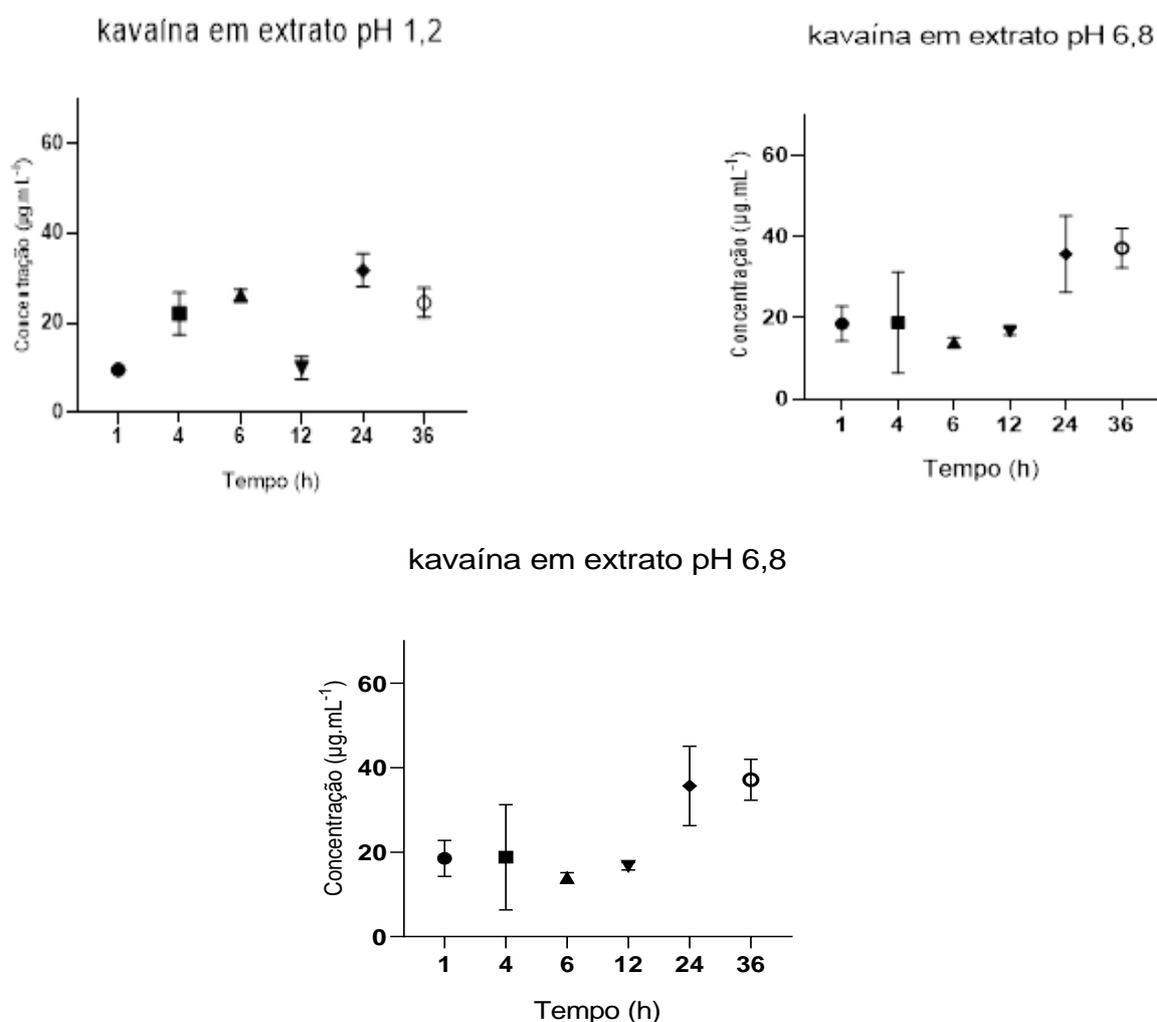


Nas análises envolvendo o extrato seco kava-kava, foi observado que a kavaína em meio tamponado pH 1,2 apresentou valores mais heterogêneos ao longo do tempo. Foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação dos resultados obtidos em diferentes tempos, principalmente em relação a 1 e 12 horas. Entretanto, foi observada a ausência de diferença

estatisticamente significativa nas comparações entre os tempos 24 horas e 36 horas.

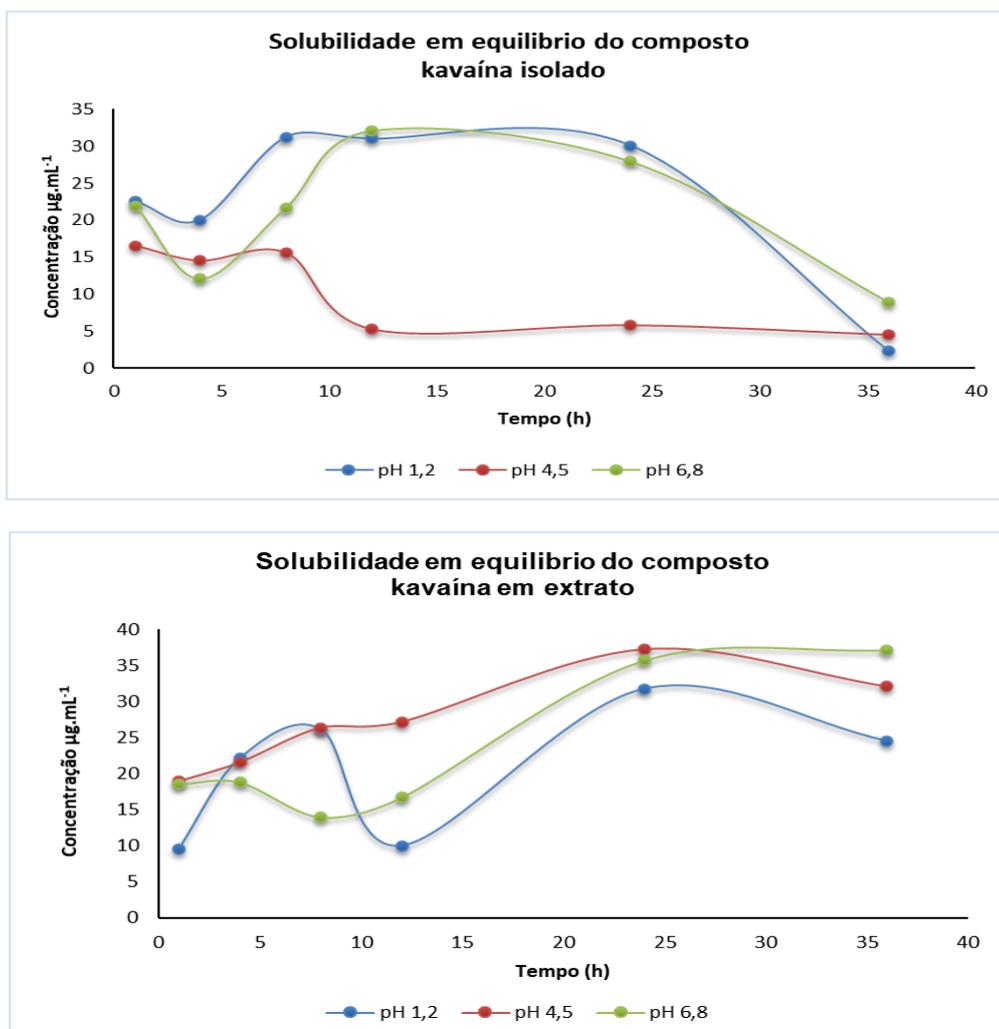
Nas análises em tampão pH 4,5, não foi observada diferença estatística entre os todos os tempos avaliados, indicando que a solubilidade foi mantida durante as 36 horas de análise. No meio tamponado pH 6,8, não foi observado diferença estatística na maioria tempos avaliados, com exceção dos tempos 24 e 36 horas. Os resultados indicaram o estabelecimento de um equilíbrio de solubilidade do composto analisado, que foi alcançado de forma mais significativa a partir das 6 horas.

Figura 32 - Avaliação da solubilidade de kavaína em extrato seco de kava-kava em meios tamponados pH 1,2; pH 4,5 e pH 6,8.



Curvas com as médias de solubilidade dos compostos kavaína isolada e na presença do extrato seco de kava-kava foram plotadas e representadas na Figura 33. Não foi observada grande variação nos valores de solubilidade de kavaína em função do pH do meio. Tal observação pode ser justificada pela ausência de grupos ionizáveis na estrutura química da kavaína, de forma que o pH não exerceu influência significativa na sua solubilidade em meio aquoso.

Figura 33- Avaliação da solubilidade em equilíbrio das amostras contendo kavaína isolada e na presença de extrato seco de kava-kava em meios tamponados.



De maneira geral, os extratos secos de kava-kava apresentaram uma solubilidade de kavaína superior quando comparada ao composto isolado. A kavaína na presença do extrato seco de kava-kava em meio tamponado pH 4,5

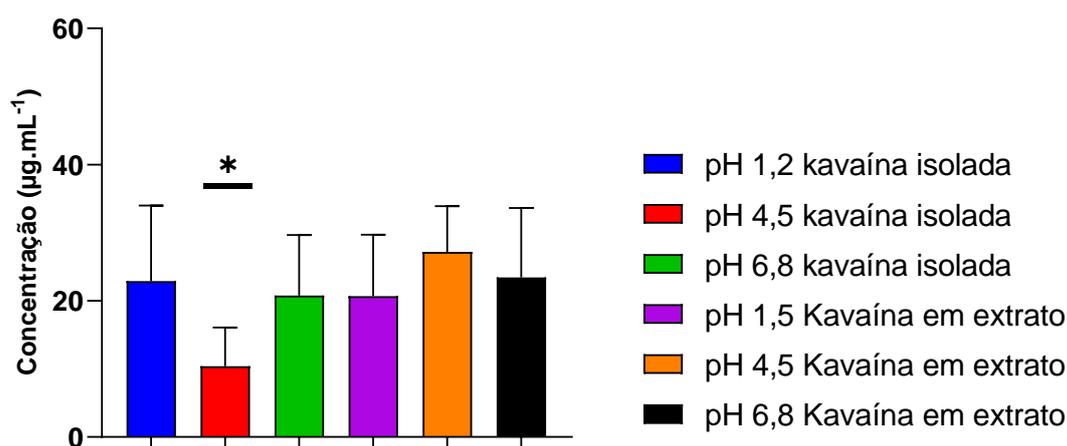
foi a condição com maior solubilidade ($27,18 \pm 6,71 \mu\text{g/mL}$). Os resultados estão representados na Tabela 26.

Tabela 26 – Valores médios de solubilidades obtidos para kavaína nos meios tamponados pH 1,2; pH 4,5 e pH 6,8.

Condição	pH	Solubilidade média ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Desvio padrão
Kavaína Isolada	1,2	22,88	11,87
	4,5	10,38	5,70
	6,8	20,75	8,91
Kavaína em extrato de kava-kava	1,2	20,68	9,03
	4,5	27,18	6,71
	6,8	23,45	10,19

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente por ANOVA, com intervalo de confiança de 95%. As diferenças não foram estatisticamente significativas, excetuando as comparações entre kavaína isolada e no extrato em meio tamponado pH 4,5. Os resultados podem ser observados na Figura 33.

Figura 33 - Comparação dos resultados obtidos no estudo de solubilidade em equilíbrio entre kavaína isolada e na presença do extratos seco de kava-kava, nos meios pH 1,2; pH 4,5 e pH 6,8.



As plantas possuem grande variedade de metabólitos secundários como por exemplo, saponinas, que se caracterizam por apresentar um comportamento anfifílico, agindo como um detergente ou tensoativo e podendo contribuir para a

solubilização de componentes dos extratos em meios aquosos (ELISABETSHY, 2001).

Outro fator que pode justificar a maior solubilidade da kavaína no extrato em comparação ao composto isolado é o uso de solventes orgânicos nos processos extração e manufatura dos extratos seco de kava-kava e também no processo de síntese da kavaína comercializada como padrão analítico, empregado neste estudo. Diferenças nos solventes, nos processos de extração ou síntese podem estar relacionadas a processos de recristalização distintos, levando a diferenças no polimorfismo da molécula de kavaína, e conseqüentemente, na sua solubilidade.

Em trabalhos de Keledjian e colaboradores (1988), foi observada maior ação no sistema nervoso central do extrato de kava-kava, em comparação as kavalactonas isoladas. Esse efeito foi justificado pela maior competição dos componentes do extrato por sítios de ligação plasmática, deixando uma maior quantidade de moléculas biodisponíveis para atravessar a barreira hematoencefálica e induzir efeitos neurológicos (KELEDJIAN et al., 1988).

Citando o estudo farmacocinético realizado por Ferreira e colaboradores (2020), no qual foi verificada maior biodisponibilidade de kavaína após administração do extrato seco de kava-kava em comparação ao composto isolado, verifica-se com os resultados do presente trabalho que tal variação não pode ser atribuída à maior solubilização de kavaína no meio fisiológico quando o composto se encontra inserido na matriz vegetal da kava-kava.

Estudos de Ulbricht e colaboradores (2005) avaliaram a maior dose diária tolerada do extrato de kava-kava e verificaram que 300 mg é uma dose eficaz para obtenção do efeito farmacológico desejado, sem indução de efeitos adversos (ULBRICHT et al., 2005). Baseado neste valor e considerando o teor de kavaína de 10% (p/p) no extrato seco empregado no ensaio, determinou-se a dose máxima diária de kavaína como 30 mg. Assim, foi calculada a razão dose/solubilidade (D/S) e os resultados obtidos para cada condição estão descritos na Tabela 27.

Tabela 27 - Cálculo da razão D/S de kavaína obtida nos meios pH 1,2; pH 4,5 e pH 6,8.

Condição	pH	Concentração média do estudo de solubilidade (mg. mL ⁻¹)	Razão D/S (mL)
Kavaína Isolada	1,2	0,023	1311,2
	4,5	0,010	2888,7
	6,8	0,021	1445,4
Kavaína em extrato de kava-kava	1,2	0,021	1450,5
	4,5	0,027	1103,7
	6,8	0,023	1279,3

Os resultados de razão D/S demonstraram valores acima de 250 mL em todas as condições avaliadas. Deste modo, o composto kavaína tanto isolado quanto na presença dos demais componentes do extrato seco de kava-kava pode ser considerado como de baixa solubilidade.

Por fim, tendo como base os resultados obtidos nos estudos de permeabilidade intestinal e solubilidade em equilíbrio desenvolvidos no presente estudo, a kavaína, tanto isolada quanto inserida na matriz vegetal da kava-kava, pode ser classificada como Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, ou seja, um composto de alta permeabilidade e baixa solubilidade. Assim, pode-se inferir que os fatores limitantes para a absorção da kavaína são a velocidade de dissolução e o esvaziamento gástrico (AMIDON et al., 1995).

6. CONCLUSÃO

Os métodos por CLAE-DAD desenvolvidos e validados no presente trabalho apresentaram resultados satisfatórios, sendo considerados lineares, precisos, exatos, seletivos e com sensibilidade adequada. Tais métodos foram aplicados com sucesso nos estudos de permeabilidade e solubilidade em equilíbrio desenvolvido no trabalho.

O estudo de citotoxicidade demonstrou que as células Caco-2 continuaram viáveis nas condições e concentrações de kavaína empregadas no estudo. Os resultados do estudo de permeabilidade em células Caco-2 demonstraram que tanto kavaína isolada quanto na presente no extrato seco de kava-kava apresentaram valores elevados de permeabilidade, sem mecanismo de efluxo significativo.

Por sua vez, os resultados da solubilidade em equilíbrio indicaram maior solubilidade de kavaína presente no extrato, mas sem diferença significativa em relação aos valores de solubilidade obtidos para o composto isolado. Como a razão D/S foi superior a 250 mL em todos os meios avaliados, a kavaína pode ser considerada um composto de baixa solubilidade, sendo a sua dissolução no meio fisiológico o fator limitante para a absorção.

O presente trabalho trouxe informações e contribuições importantes sobre as características biofarmacêuticas de kavaína, tanto isolada como inserida na matriz vegetal de kava-kava, contribuindo para a elucidação dos processos envolvidos na absorção e farmacocinética deste marcador químico.

REFERÊNCIAS

AMARAL, P. DE A. et al. Synthesis of Novel Kavain-like derivatives and evaluation of their cytotoxic activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 9, p. 1687–1697, 2009.

AMIDON, G.L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharmaceutical Research*, New York, v.12, n. 3, p.413- 420, 1995.

AMORIM, M. F. D. et al. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 3, p. 448–454, 2007.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO, D. Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: Perspectivas futuras. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 23, n. 4, p. 233–242, 2001.

ANVISA. Farmacopeia Brasileira, Segundo Suplemento. 24/07/2017, p. 1.016, 2017.

ARRUNÁTEGUI, L. B. et al. Biopharmaceutics classification system: Importance and inclusion in biowaiver guidance. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 51, n. 1, p. 143–154, 2015.

ARTURSSON, P.; MAGNUSSON, C. Epithelial transport of drug in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.*, v.79, n.7, p.595-600, 1990

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BARBOSA, D. R.; LENARDON, L.; PARTATA, A. K. Kava-Kava (*Piper methysticum*): Uma Revisão Geral. *Revista Científica do ITPAC*, v. 6, n. 1983–6708, p. 1–19, 2013.

BENET, L. Z.; CUMMINS, C. L.; WU, C. Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 277, n. 1–2, p. 3–9, 2004.

BILIA, A. R. et al. Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 812, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 203–214, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual

de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência. 1 ed. v.1. 146 p., Brasília, 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/publicacoes/index.asp>>. Acesso em: maio de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 27, de 17 de maio de 2003. 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, DF, mai. 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: maio de 2020.

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, DF, jul. 2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: maio de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 463, de 26 de janeiro de 1999. Dispõe sobre a aprovação do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao>>. Acesso em: julho de 2019.

CAIRNEY, S. et al. Saccade and cognitive function in chronic kava users. *Neuropsychopharmacology*, v. 28, n. 2, p. 389–396, 2003.

CAO, X. et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharmaceutical Research*, v. 23, n. 8, p. 1675–1686, 2006.

CÁRDENAS, P. A. et al. In vitro intestinal permeability studies, pharmacokinetics and tissue distribution of 6-methylcoumarin after oral and intraperitoneal administration in Wistar rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n. 1, 2017.

CASTILLO, R.; CHIRIBOGA, C.; FONTANILLA, M. R. Estandarización de un modelo basado en monocapas de células Caco-2 con aplicación en estudios de absorción de fármacos. *Revista colombiana ciencias e química farmacêutica*. vol.35 no.2 Bogotá July/Dec. 2006

CAWTE, J. Psychoactive substances of the south seas: Betel, kava and pituri. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, v. 19, n. 1, p. 83–87, 1985.
CHUA, H. C. et al. Kavain, the major constituent of the anxiolytic kava extract, potentiates gaba_A receptors: Functional characteristics and molecular mechanism. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2016.

CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 1998. 179 p.

COLLETT, A. et al. Predicting P-glycoprotein effects on oral absorption: Correlation of transport in Caco-2 with drug pharmacokinetics in wild-type and *mdr1a(-/-)* mice in vivo. *Pharmaceutical Research*, v. 21, n. 5, p. 819–826, 2004.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. DO. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 3, p. 272–278, 2005.

CÔTÉ, C. S. et al. Composition and biological activity of traditional and commercial kava extracts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 322, n. 1, p. 147–152, 2004.

DAHAN, A. et al. High-permeability criterion for BCS classification: Segmental/pH dependent permeability considerations. *Molecular Pharmaceutics*, v. 7, n. 5, p. 1827–1834, 2010.

EMAMI, J. In vitro - In vivo Correlation: From Theory to Applications. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v. 9, p. 30-50, 2006.

ELISABETSHY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre:Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. cap.6, p.87-99.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the Investigation of Bioequivalence. 2010: Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf >. Acesso em: março de 2019

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. v 1 e 2. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeias-virtuais>>. Acesso em: maio de 2021.

FAUSTINO, T. T; ALMEIDA, R. B; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. v.32, n.4, p.429-436, dez./2010.

FERREIRA, Juliana Veloso Ferreira. Extrato secos do rizoma de kava-kava *Piper methysticum* G. Forst) – Avaliação da qualidade, toxicidade aguda, atividades biológicas e biodisponibilidade de kavaína. 2019. 169 f. Tese (Doutorado em Farmácia)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte, 2019.

FERREIRA, J. V. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

bioanalytical method for the determination of kavain in mice plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1137, n. December 2019, p. 121939, 2020.

FERREIRA, J. V. et al. Simultaneous quantitation of kavalactones in kava dry extracts: comparison of multi-standards and single standard validation approaches. *Phytochemical Analysis*, v. 32, n. 5, p. 740–748, 2021.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION (FDA). Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. Rockville: FDA, 2017. p.1-13. Disponível em : <<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/3657gd3.pdf>>. Acesso em: maio de 2021.

GAI, M. N. Influência dos alimentos sobre a biodisponibilidade dos medicamentos. In: STORPIRITIS et al.; *Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas*

GONZÁLEZ-GARCÍA, I. et al. In vitro-in vivo correlations: General concepts, methodologies and regulatory applications. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 41, n. 12, p. 1935–1947, 2015.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, v. 119, n. 2, p. 203–210, 1989.

HASHIMOTO, T. et al. Isolation and synthesis of TNF- α release inhibitors from Fijian kava (*Piper methysticum*). p. 309–317, 2003.

ICH. International Conference on Harmonization. Harmonized Guideline. Biopharmaceutics classification system-based biowaivers. M9. n. June, p. 1–16, 2018.

JAMIESON, D. D.; DUFFIELD, P. H. Positive Interaction of Ethanol and Kava Resin in Mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 17, n. 7, p. 509–514, 1990.

JUSTO, S. C.; SILVA, C. M. *Piper methysticum* G. Forster (Kava-Kava): uma abordagem geral. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v.5,n.1, p.73-82, 2008b.

KELEDJIAN, J. et al. Uptake into mouse brain of four compounds present in the psychoactive beverage kava. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 77, n. 12, p. 1003–1006, 1988.

KUCHTA, K.; SCHMIDT, M.; NAHRSTEDT, A. German Kava Ban Lifted by Court:

The Alleged Hepatotoxicity of Kava (*Piper methysticum*) as a Case of Ill-Defined Herbal Drug Identity, Lacking Quality Control, and Misguided Regulatory Politics. *Planta Medica*, v. 81, n. 18, p. 1647–1653, 2015.

LEBOT, V.; DO, T. K. T.; LEGENDRE, L. Detection of flavokavins (A, B, C) in cultivars of kava (*Piper methysticum*) using high performance thin layer chromatography (HPTLC). *Food Chemistry*, v. 151, p. 554–560, 2014.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 57, n. 3, p. 273–285, 2005.

LIANG, X. MIAO et al. Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 11, p. 2033–2044, 2009.

LIM, S. T. S. et al. Effects of kava alkaloid, pipermethystine, and kavalactones on oxidative stress and cytochrome P450 in F-344 rats. *Toxicological Sciences*, v. 97, n. 1, p. 214–221, 2007.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 3–12, 2000.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n. 4, p. 375–399, 2002.

MATHEWS, J.M, ETHERIDGE, A.S, VALENTINE J.L., BLACK, S.R., COLEMAN. D.P, PATEL.P, SO, J.BURKA, L.T. Pharmacokinetics And Disposition Of The Kavalactone Kawain: Drug metabolismo and disposition U.S. Government work not protected by U.S. copyright 4317/3055127DMD 33:1555–1563, accepted July 20, 2005 .

MAURO, M. et al. Acid diterpenes from Copaiba oleoresin (*Copaifera langsdorffii*): Chemical and plasma stability and intestinal permeability using Caco-2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 235, n. February, p. 183–189, 2019.

MEISSNER, O.; HÄBERLEIN, H. HPLC analysis of flavokavins and kavapyrones from *Piper methysticum* Forst. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 826, n. 1–2, p. 46–49, 2005.

NASCIMENTO, D. F. et al. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico

contendo *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Salix alba* L. em voluntários saudáveis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 19, n. 1 B, p. 261–268, 2009.

NETO, A. R.; *Farmacognosia Kava-Kava*. 31f.(Curso de Fitomedicina). Campinas, Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa e Associação Argentina de Fitomedicina, 2004.

PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 201, n. 2, p. 131–150, 2000.

PETERSEN, G. E.; TANG, Y.; FIELDS, C. Chemical and in vitro toxicity analysis of a supercritical fluid extract of Kava kava (*Piper methysticum*). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 235, p. 301–308, 2019.

PIERCE, A. *The American Pharmaceutical Association Practical Guide to Natural Medicines*. New York: The Stonesong Press. Apud Quackwatch Therapeutic Research Faculty, Stockton, Califórnia, 2001.

QIANG, Z. et al. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, n. 3, p. 1107–1112, 2011.

QIANG, Z. et al. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, n. 3, p. 1107–1112, 2011.

ROBINSON, V. et al. Final report on the safety assessment of piper methysticum Leaf/Root/Stem extract and piper methysticum root extract. *International Journal of Toxicology*, v. 28, n. 6_suppl, p. 175S-188S, 2009.

ROTHEN-RUTISHAUSER, B. et al. Formation of multilayers in the Caco-2 cell culture model: A confocal laser scanning microscopy study. *Pharmaceutical Research*, v. 17, n. 4, p. 460–465, 2000.

SCHÜLZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. *Fitoterapia Racional - Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. 4º ed. Barueri: Manole, 2002.

SHARGEL, L.; YU, A.B.C.; PONG, S.W.; *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*. 5.ed, New York. Appleton & Lange Reviews, MacGraw- Hill, 2005. 892p.

SILVA, J. D. T. DA et al. Kava-kava como aditivo fitoterápico na alimentação de codornas de postura. *Biotemas*, v. 23, n. 4, p. 77–82, 2010.

SINGH, Y. N. Kava: an overview. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 37, n. 1, p.

13–45, 1992.

SMITH, R.M., THAKRAR, H., AROWOLO, A. High-performance liquid chromatography of kava lactones from *Piper methysticum*. *J Chromatography* 1984; 283:303-8.

SNYDER, LOYD R; KIRKLAND, J. J; GLAJCH, JOSEPH L. *Practical HPLC method development*. 2. ed. New York: Wiley, c1997. 765 p.

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

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M. F.; STORPIRTIS, S. In vitro models for the determination of drug absorption and a prediction of dissolution/absorption relationships. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, n. 4, 2007.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. *Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 321 p

TARBAH, F. et al. Kinetics of kavain and its metabolites after oral application. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 789, n. 1, p. 115–130, 2003.

TESCHKE, R.; QIU, S. X.; LEBOT, V. Herbal hepatotoxicity by kava: Update on pipermethystine, flavokavain B, and mould hepatotoxins as primarily assumed culprits. *Digestive and Liver Disease*, v. 43, n. 9, p. 676–681, 2011.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). Revision: <1236> *Solubility Measurements*, 43(2) InProcess. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2017.

UEBELHACK, R.; FRANKE, L.; SCHEWE, H. J. Inhibition of platelet MAO-B by kava pyrone-enriched extract from *piper methysticum forster* (kava-kava). *Pharmacopsychiatry*, v. 31, n. 5, p. 187–192, 1998.

ULBRICHT, C. et al. Safety review of kava (*Piper methysticum*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Expert Opinion on Drug Safety*, v. 4, n. 4, p. 779–794, 2005.

VAN BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, v. 1, n. 2, p. 175–185, 2005.

WALDMANN, S. et al. Provisional biopharmaceutical classification of some common herbs used in western medicine. *Molecular Pharmaceutics*, v. 9, n. 4, p. 815–822, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms. Technical Report Series, nº 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. 2006. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf>. Acesso em: maio de 2018.

WU, D. et al. Cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds with antioxidant activities from Piper methysticum (kava kava) roots. p. 41–47, 2002.

XUAN, T. D. et al. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (Piper methysticum) roots. Journal of Natural Medicines, v. 62, n. 2, p. 188–194, 2008.

YAZDANIAN, M.; BRIGGS, K.; JANKOVSKY, C.; HAWI, A. The “high solubility” definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs Pharmaceutical Research, New York, v. 21, n.2, p.293–299, 2004.

YU, L.X.; AMIDON, G.L.; POLLI, J.E.; ZHAO, H.; MEHTA, M.U.; CONNER, D.P.; SHAH, V.P.; LESKO, L.J.; CHEN, M.L.; LEE, V.H.; HUSSAIN, A.S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. Pharmaceutical Research, New York, v.19, n.7, p. 921-925, 2002.