

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Avaliação do perfil farmacocinético do flavonóide avicularina em
ratos”**

Gabriela Amaral Buqui

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Avaliação do perfil farmacocinético do flavonóide avicularina em ratos”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Gabriela Amaral Buqui

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 23/08/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

RESUMO

Buqui, G. A. **Avaliação do perfil farmacocinético do flavonóide avicularina em ratos**. 119f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, FCFRP-USP, Ribeirão Preto-SP, 2013.

A substância 3-O- α -arabinofuranosil-quercetina (avicularina) é um flavonol já relatado em uma grande variedade de espécies vegetais, podendo ser encontrada em diversas frutas e plantas medicinais. Neste trabalho o flavonóide foi isolado da espécie *Bidens sulphurea*, popularmente conhecida como cosmo-amarelo, picão-grande e áster-do-méxico, com pureza de 93,27%. O flavonóide avicularina apresenta diversas propriedades biológicas descritas na literatura, e estudos científicos que comprovam a eficácia deste composto. No entanto não há estudos que avaliem os mecanismos que envolvem a farmacocinética (ADME) deste flavonóide, bem como sua biodisponibilidade. Sendo assim este trabalho teve como objetivo a determinação dos perfis farmacocinéticos de absorção da avicularina em ratos na presença e ausência de sais biliares e inibidor da glicoproteína-P, pelo ensaio de perfusão intestinal *in situ*. Neste trabalho também foi realizada a avaliação do perfil farmacocinético de distribuição e eliminação através de administração intravascular do flavonóide avicularina na dose de 1mg/kg em ratos. Para ambos os ensaios um método analítico sensível por CLUE-DAD-EM/EM foi desenvolvido e validado obedecendo às diretrizes do guia para validação de métodos bioanalíticos da ANVISA. Os ensaios de absorção com este flavonóide revelaram que sua taxa de absorção intestinal é baixa, em torno de 30% para as duas doses testadas (1 e 5 mg/kg), sugerindo uma baixa biodisponibilidade para este flavonóide. No entanto na presença do inibidor de glicoproteína-P, verapamil, o percentual absorvido final de avicularina foi de aproximadamente 80%, o que sugere o envolvimento de proteínas de efluxo em sua absorção. Através do estudo de farmacocinética com administração intravascular de avicularina pudemos concluir que o perfil farmacocinético do flavonóide em questão é bicompartimental, e possui rápida distribuição e eliminação do organismo, sendo o $t_{1/2\alpha}$ de 8 minutos e $t_{1/2\beta}$ de 45 minutos, e, portanto baixa afinidade por tecidos, sendo baixa ou numa sua acumulação tecidual.

Palavras-chave: Avicularina, perfusão intestinal, farmacocinética, P-gp.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Apesar de todo o avanço da medicina moderna, os produtos de origem vegetal ainda possuem uma importante colaboração para a melhora no estado de saúde das pessoas, sendo que, o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais pode ser utilizado para nortear o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos produzidos a partir de partes da planta.

No Brasil diversas plantas medicinais encontram-se ainda sem total comprovação científica de sua atividade biológica e/ou toxicológica, bem como a definição dos parâmetros farmacocinéticos de seus ativos. Neste contexto, este trabalho apresenta o estudo farmacocinético de um flavonóide isolado de uma espécie de picão, a *Bidens sulphurea*, já conhecida no Brasil por seu amplo uso popular. Os compostos presentes nesta espécie vegetal já foram objetivo de diversos estudos fitoquímicos e farmacológicos os quais fundamentam desenvolvimento dessa proposta.

Na seqüência será apresentada revisão bibliográfica sobre a espécie estudada, bem como o estado da arte de temas relevantes à discussão deste trabalho.

1.1 Espécie vegetal e composto químico

Polifenóis é uma das classes de compostos de origem vegetal de grande interesse farmacêutico devido a sua ampla ocorrência na dieta humana e devido as suas atividades biológicas. A classificação química desses compostos os divide em muitas subclasses. Entre eles estão os flavonóides, taninos e antraquinonas. Os flavonóides possuem muitas variações estruturais no anel flavonoídico, e são subdivididos em antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavanas, flavanonas, flavananas, flavonóis, chalconas, diidroflavonóis, auronas e isoflavonas, (FARIAS *et al.*, 1999).

A substância 3-O- α -arabinofuranosil-quercetina ou avicularina (Figura 1), substância de escolha para a realização deste trabalho, é um flavonol já relatado em uma grande variedade de espécies vegetais e apresenta diversas propriedades biológicas descritas na literatura. Podemos destacar as atividades antioxidante (AN *et al.*, 2005), antiinflamatória (VO *et al.*, 2012), antibacteriana (GREGOIRE *et al.*,

2007), antimutagênica (CHOI *et al.*, 1994), antiobesidade (FUJIMORI *et al.*, 2013), antialérgica (YAMADA *et al.*, 1999), hepatoprotetora (AN *et al.*, 2005), ação inibitória sobre algumas enzimas do vírus HIV (transcriptase reversa e proteases) (YU *et al.*, 2007) e sobre o fator III da coagulação sanguínea (LEE *et al.*, 2002). O flavonóide avicularina pode ser encontrado em frutas, como a maçã (HE; LIU, 2008), no suco de cranberry (HE; LIU, 2006) e em diversas plantas medicinais, entre as quais estão espécies pertencentes ao gênero *Bidens*.

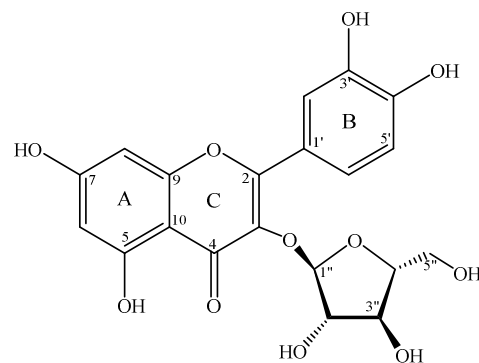


Figura 1. Estrutura química do flavonóide *O*-glicosilado avicularina.

O primeiro relato da presença de avicularina no gênero *Bidens* ocorreu em 2009, sendo a espécie do referido estudo a *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. (SILVA, 2009), pertencente à família Asteraceae. É uma herbácea anual, ereta e muito ramificada (Figura 2). Originária do México é uma espécie intensamente disseminada e naturalizada no território brasileiro, sendo encontrada nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Popularmente é conhecida como cosmo-amarelo, picão-grande e áster-do-méxico, e é considerada uma planta invasora (LORENZI; SOUZA, 2001). Cientificamente, seus sinônimos são *Cosmos sulphureus* Cav. e *Cosmos asthemisioefolius* Jacq.

O uso popular desta espécie é bastante disseminado, sendo principalmente para a o tratamento da icterícia, febre intermitente (malária), esplenomegalia e como hepatoprotetora (BOTSARIS, 2007). Há também o relato de pesquisas mais avançadas utilizando a mistura dos extratos de *B. sulphurea* com de outras espécies em formulações dermatológicas com resultados promissores de inibição de proteases e tratamento do câncer (BEHR *et al.*, 2006; CYR, 2002). Também vale ressaltar a citotoxicidade apresentada pelo extrato apolar das folhas de *B. sulphurea* (ZEID *et al.*, 2009).



Figura 2. Partes aéreas (caules, folhas e flores) de *Bidens sulphurea*.
(Fonte: SILVA, B.D.)

1.2 Isolamento e caracterização

Um passo fundamental no desenvolvimento de estudos envolvendo produtos vegetais é a caracterização química dos extratos para a obtenção de seu perfil fitoquímico, visando o estabelecimento e obtenção de marcadores químicos e seus padrões de referência.

De acordo com a RDC 14/2010 – ANVISA, um marcador é um “composto ou classe de compostos químicos presentes na matéria prima vegetal, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle da qualidade”. Este composto deve ser completamente caracterizado e com a mais alta pureza, determinada por técnicas absolutas de análise e sem referência a outros padrões. A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999) define uma substância química de referência primária como uma substância reconhecida pelas suas qualidades dentro de um contexto especificado e cujo conteúdo atribuído quando utilizado como um padrão de teste é aceito sem exigir comparação com outra substância química.

Esses padrões de referência nem sempre estão disponíveis oficialmente pela Farmacopéia Brasileira ou outros códigos autorizados pela legislação vigente, embora sejam fundamentais para a realização dos ensaios pré-clínicos e clínicos,

bem como os estudos de estabilidade e desenvolvimento analítico. Nesses casos, os padrões podem ser isolados da matéria prima vegetal, desde sejam submetidos às análises que garantam sua identidade, teor, qualidade, pureza e potência adequadas (RDC 17/2010 – ANVISA).

Para a determinação qualitativa de uma substância, técnicas como espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) e hidrogênio (RMN ^1H), espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectrofotometria de ultravioleta (UV), espectrometria de dicroísmo circular (CD) e de massas (EM) tem sido empregadas em função de sua precisão. Isso possibilita ao pesquisador a caracterização de um dado composto de origem vegetal desconhecido, por meio da combinação dos resultados obtidos por essas técnicas.

A determinação de pureza de uma substância, por sua vez, pode ser mensurada pela quantificação de suas impurezas orgânicas e inorgânicas, além de solventes residuais, teor de água e análises cromatográficas. Esses resultados são tratados matematicamente para o cálculo da pureza ajustada. Para isso, técnicas como cromatografia, análise termogravimétrica e espectrometria de massas com plasma acoplado Indutivamente (ICP-MS) são comumente empregadas (WHO, 1999).

1.3 Estudos Farmacocinéticos

A farmacocinética pode ser compreendida como o estudo dos processos de absorção (A), distribuição (D), biotransformação (B) ou metabolismo (M) e excreção (E) de um fármaco e o modo pelo qual esses processos determinam seu destino no organismo (SCHELLACK, 2005).

A absorção, principal processo que vamos avaliar neste estudo, é definida como a transferência da substância do local da administração para a circulação (líquido circulante do organismo; normalmente o sangue). Para que ocorra a absorção de uma substância são requeridas duas etapas:

- atravessar a membrana do epitélio gastrointestinal, geralmente por via transcelular ou paracelular (Figura 3), acessando a circulação sistêmica por meio dos capilares sanguíneos;
- passar pelo sistema porta-hepático intacto, alcançando a circulação sistêmica.

A absorção de uma substância por via oral está relacionada à sua capacidade de permeação através das membranas do trato gastrointestinal (TGI). As três principais propriedades moleculares que afetam, e muitas vezes limitam a passagem de um fármaco através da membrana são: tamanho molecular, lipofilicidade, e carga ou grau de ionização (TOZER; ROWLAND, 2006).

O transporte passivo transcelular é o mecanismo mais comum e corresponde a um fenômeno passivo, sem gasto de energia, que ocorre em função do gradiente de concentração. Entretanto, substâncias muito hidrossolúveis e de tamanho molecular reduzido podem ser absorvidos por meio do transporte paracelular (TOZER; ROWLAND, 2006). Na Figura 3 pode ser visto o esquema dos processos de transporte celular.

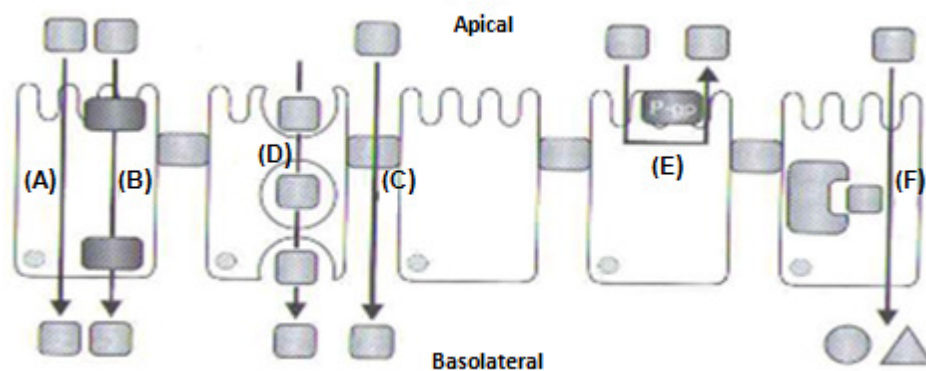


Figura 3. Mecanismos envolvidos no processo de transferência de fármacos do lúmen do TGI para a circulação sanguínea. (A) transporte celular passivo ou difusão passiva; (B) transporte mediado por carreadores de membrana; (C) transporte passivo paracelular; (D) transporte vesicular; (E) efluxo intermediado pela glicoproteína-P; (F) eliminação pré-sistêmica no epitélio gastrintestinal (Adaptado de STORPIRTS *et al.*, 2011).

Por outro lado, há moléculas que são absorvidas por meio de um transporte ativo mediado por carreadores de membrana, com gasto de energia. Os transportadores de membrana também estão associados ao processo de efluxo de certas substâncias, ou seja, a molécula entra na célula do epitélio gastrointestinal, mas é secretada por intermédio de transportadores específicos, voltando para o lúmen do TGI. O mais conhecido sistema de efluxo de fármacos é aquele que envolve a glicoproteína de permeabilidade ou glicoproteína-P (P-gp), que atua sobre fármacos catiônicos ou neutros. Ela também é conhecida como receptor de

resistência a múltiplos fármacos, principalmente quimioterápicos, e também é chamada, em algumas situações, de MDR1 (TOZER; ROWLAND, 2009).

Muitos são os fatores que determinam o tipo de processo envolvido na absorção de uma molécula. Storpirtis e colaboradores (2011) relataram que os principais deles podem ser:

- Grau de solubilidade: para serem bem absorvidas, as substâncias devem ser hidrossolúveis para se difundirem nos líquidos do organismo (suco gástrico, líquido intestinal). Entretanto, devem também possuir certa lipossolubilidade para serem capazes de atravessar as membranas biológicas que tem constituição lipoproteica;
- Área da superfície do sítio de absorção: determina a velocidade do processo de absorção e depende da via de administração da substância;
- Circulação local: afeta a passagem da substância para os líquidos de distribuição no organismo;
- pH no sítio de absorção: uma substância que corresponde a um ácido fraco será melhor absorvida em locais com pH mais baixos, enquanto a absorção de uma base fraca será favorecida em pH's mais elevados;
- pKa da substância: valor do pH em que 50% das moléculas encontram-se na forma não ionizada, mais lipossolúvel e capaz de atravessar a membrana;
- Concentração da substância: o gradiente de concentração da substância é um fator importante, uma vez que, na maioria dos casos, a absorção ocorre por difusão passiva (transcelular). No caso de uma substância ser absorvida por meio desse mecanismo, com uma cinética de primeira ordem, diz-se que o aumento da dose administrada corresponde ao aumento da absorção da substância;
- Formação cristalina ou amorfa: a ocorrência de polimorfismo estrutural pode levar a estruturas cristalinas com distintas características de solubilidade, assim como, a ocorrência de estruturas amorfas pode facilitar a solubilidade.

A principal prerrogativa físico-química relacionada à absorção é que qualquer substância para ser absorvida deve primeiramente estar solubilizada no local de absorção. Sendo assim, todos os fatores acima discutidos, influenciam,

principalmente, a etapa que antecede a absorção propriamente dita, ou seja, a solubilização da molécula (STORPIRTIS *et al.*, 2011).

Além da relação solubilidade-absorção, outras relações como a absorção, permeabilidade e biodisponibilidade foram estudadas por Amidon e seus colaboradores ao longo de décadas. O resultado desses estudos foi a proposição de uma classificação de fármacos de acordo com seu grau de solubilidade e de permeabilidade. Esse sistema classificatório foi denominado Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (AMIDON *et al.*, 1995), e é adotado no mundo todo, até mesmo pelas agências regulatórias em saúde, para a determinação ou exclusão de estudos comprobatórios em função das classes a que pertencem as moléculas.

Nesse trabalho os autores classificam os compostos em quatro classes. São elas:

- Classe 1: compostos de alta solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 2: compostos de baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe 3: compostos de alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- Classe 4: compostos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade.

Recentemente, esse grupo de pesquisadores publicou um trabalho sobre a classificação biofarmacêutica para alguns compostos oriundos de plantas medicinais em sistema *in vitro* e que são utilizados como marcadores químicos. Nesse estudo os autores ressaltaram a dificuldade na realização dos ensaios propostos, uma vez que a composição de extratos e produtos de origem natural é altamente complexa e variável (AMIDON *et al.*, 2012).

Entre as diversas classes de compostos apresentadas no referido estudo, alguns compostos flavonoídicos foram avaliados e classificados de acordo com o SCB: silibina A e B (classe 3), biochanina A (classe 4), daidzeína (classe 4), formononetina (classe 2), genistéína (classe 4), quercetina-3-*O*-coumaroil-glicosilramnosídeo (classe 3), quercetina (classe 4) e apigenina (classe 4). Esses dados indicam que, com exceção da formononetina, todos os outros compostos flavonoídicos testados foram agrupados em classes de baixa permeabilidade, o que leva a grande variação no parâmetro da biodisponibilidade.

Sendo assim estudos farmacocinéticos com flavonóides que tenham como objetivo determinar os parâmetros que caracterizam a absorção e a disposição

(distribuição e eliminação) e metabolismo do flavonóide no organismo tornam-se muito importantes para essa classe de compostos.

Os estudos farmacocinéticos resultam na determinação de modelos matemáticos complexos (modelos farmacocinéticos) que sejam capazes de explicar a movimentação de uma dada molécula no organismo vivo. No caso de estudos pré-clínicos, os organismos de escolha são, inicialmente, os roedores (STORPIRTIS *et al.*, 2011; TOZER; ROWLAND, 2009).

1.3.1 Modelos Farmacocinéticos

Segundo os modelos compartimentais, o organismo é concebido como compartimentos que o representam do ponto de vista da cinética dos fármacos. Esses modelos podem ser classificados em: monocompartimental (um compartimento) ou multicompartimentais (mais que um compartimento). Por meio desses modelos matemáticos, simulam-se os processos de absorção, distribuição e eliminação de uma substância no organismo. Os modelos compartimentais têm como premissa a homogeneidade de distribuição e o equilíbrio instantâneo das concentrações do fármaco dentro de cada compartimento.

Desse modo é possível obter uma simplificação das equações que descrevem o modelo. Para a definição do modelo compartimental que melhor se ajusta a disposição cinética de um fármaco, é necessária a transformação dos dados de concentração em logaritmo natural ("ln") da concentração e então plotar esses dados *versus* tempo utilizando um software de regressão não linear, que fornece estimativas de incerteza dos parâmetros em análise através de desvio-padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança, sendo que desvios sistemáticos indicam a não adequação do modelo (GIBALDI *et al.*, 1982; STORPIRTS *et al.*, 2011).

Após administração intravascular (i.v.) de um medicamento, em uma única dose, e a seleção do melhor modelo, torna-se possível definir e calcular os principais parâmetros farmacocinéticos relacionados à etapa de distribuição e eliminação. Os parâmetros farmacocinéticos podem ser definidos como constantes biológicas ou relações de proporcionalidade obtidas por meio da aplicação de um modelo farmacocinético na interpretação do destino de uma substância no organismo. Os principais parâmetros farmacocinéticos são: volume aparente de distribuição (Vd),

clearance (C_l), meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) e área sob a curva (ASC) (STORPIRTS *et al.*, 2011).

Já para a determinação dos parâmetros relacionados à fase de absorção estudos que utilizando a via oral de administração ou a avaliação da absorção diretamente no intestino delgado por perfusão intestinal, por exemplo, podem ser utilizados (Muñoz *et al.*, 2005). Os parâmetros farmacocinéticos que explicam essa fase são a constante de absorção (k_a) que pode ser de ordens cinéticas distintas (zero ou primeira ordem), meia-vida de absorção ($t_{1/2abs}$), fração absorvida (F_{abs}) e a biodisponibilidade (BD).

Muitos são os métodos que podem ser utilizados para estudos de absorção intestinal de uma dada molécula. A seguir, explicaremos um pouco sobre essas técnicas.

1.3.2 Ensaio de absorção intestinal

Um dos pré-requisitos para a extrapolação de propriedades biológicas verificadas *in vitro* para os efeitos farmacodinâmicos esperados *in vivo* é o conhecimento do comportamento farmacocinético e da biodisponibilidade após administração oral, sendo essas informações essenciais para a etapa pré-clínica de desenvolvimento de um novo produto (GRAEFE *et al.*, 1999).

Modelos de absorção *in vitro* e *in situ*, como o uso de células Caco-2, e perfusão intestinal em animais são amplamente utilizados para investigar mecanismos de transporte, classificar a permeabilidade do composto e prever sua absorção *in vivo* em humanos (AMIDON *et al.*, 1995; LENNERNÄS *et al.*, 1997). Tem sido relatado que esses modelos se correspondem muito bem à permeabilidade obtida *in vivo* e a fração de dose absorvida em humanos tendo, portanto, uma previsão adequada de valores (FAGERHOLM *et al.*, 1996). Uma das principais vantagens da técnica de perfusão intestinal *in situ* é a presença de um sistema sanguíneo e nervoso intacto dos animais durante a realização do experimento. Essa técnica nos permite calcular a permeabilidade intestinal da substância, sua constante de absorção, e avaliar seu mecanismo de transporte, bem como utilizar os dados obtidos para correlações com modelos farmacocinéticos. Nos ensaios de perfusão intestinal é possível associar outras técnicas que possibilitam a elucidação de mecanismos de inibição da absorção, utilizando, por exemplo, um inibidor de

glicoproteína-P (P-gp) (XU *et al.*, 2008) ou técnicas de obstrução do ducto biliar, que permitem avaliar a reabsorção enterohepática da substância em estudo (ROBERTS *et al.*, 2002).

A P-gp é uma proteína transmembrana que funciona como uma bomba de efluxo ATP - dependente, promovendo ativamente a retirada de xenobióticos da célula. Ela está expressa na superfície celular de todo trato gastrointestinal, além de outros tecidos como o cérebro, agindo como uma barreira bioquímica importante para a biodisponibilidade de fármacos. Ela também desempenha um papel significativo na distribuição, metabolismo e eliminação de muitos substratos terapêuticos clinicamente importantes (VARMA *et al.*, 2003).

Mesmo sendo a difusão passiva o mecanismo de absorção predominante de muitos fármacos, tem sido relatado que o efluxo mediado pela P-gp e outras proteínas podem afetar a taxa e a extensão de absorção e metabolismo de primeira-passage em intestino de humanos e ratos (GAN *et al.*, 1996; KRUIJTZER *et al.*, 2002). Uma melhor compreensão da regulação fisiológica da P-gp é a chave para delinear estratégias para a melhoria na eficácia terapêutica destes fármacos. Os fármacos verapamil e digoxina são conhecidos substratos da P-gp e são amplamente utilizados para a compreensão mecanismos da ação dessa proteína (XU *et al.*, 2008). Neste trabalho utilizamos o verapamil nos ensaios de absorção intestinal como inibidor da P-gp para avaliação do seu envolvimento na absorção do flavonóide.

A recirculação enterohepática é outro fator fisiológico que pode alterar a extensão e taxa de absorção de um dado composto. Ocorre através da excreção biliar e reabsorção intestinal de uma substância, às vezes com conjugação hepática e desconjugação intestinal. Essa recirculação é observada no aparecimento de múltiplos picos de concentração plasmática máxima, em estudos *in vivo*, tendo como consequência um aumento no tempo de meia vida de eliminação.

Fatores que influenciam a excreção biliar incluem as características da substância como sua estrutura química, polaridade e tamanho molecular, seu transporte através de membranas, sua biotransformação e possíveis reabsorções nos ductos biliares intra-hepáticos. A biodisponibilidade de uma substância pode ser afetada pela sua taxa de absorção intestinal, influência da P-gp e o metabolismo que pode ocorrer na parede intestinal (ARIAS *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.*, 2002).

Sem sombra de dúvidas, entre os compostos polifenólicos, a classe dos flavonóides é a que possui mais estudos sobre suas etapas farmacocinéticas e, entre os flavonóides, a quercetina é o composto mais estudado. Esse interesse pelo flavonóide quercetina ocorre devido a sua ampla distribuição em plantas medicinais e alimentos, por sua fácil obtenção e por suas propriedades farmacológicas amplamente estudadas. A quercetina é a aglicona do flavonóide em estudo nesse trabalho, a avicularina. Sendo assim, os ensaios realizados com a quercetina aglicona foram significativos para delineamento dos ensaios propostos com o flavonóide glicosilado avicularina.

As extensões da absorção de uma substância assim como sua biodisponibilidade sistêmica dependem de vários fatores: estabilidade química do composto a partir do momento de sua administração até o local da absorção; taxa de degradação devido ao pH e microorganismos intestinais; mecanismos do processo de absorção; taxa de ligação a proteínas plasmáticas e finalmente, da extensão do efeito de primeira passagem (MESKIN *et al.*, 2004).

Para a avaliação do perfil farmacocinético de uma substância e a determinação dos seus parâmetros farmacocinéticos faz-se necessário o planejamento de um estudo com animais saudáveis e a disposição de um método bioanalítico sensível, seletivo, preciso e corretamente validado para a quantificação da substância e de seus produtos de biotransformação na matriz biológica, de acordo com guias e protocolos disponíveis (ANVISA, 2012; PAIVA *et al.*, 2005).

1.4 Ensaios Analíticos

1.4.1 Métodos analíticos de quantificação

Métodos como a colorimetria, a cromatografia planar e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são utilizados para quantificação de flavonóides (MAGNANI *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2002, NIRANJAN *et al.*, 2009; CINTIA *et al.*, 2004). Com o avanço das técnicas de separação, desenvolveu-se a cromatografia de ultra eficiência (CLUE) que abrange os mesmos princípios da CLAE, porém com partículas menores (2 µm) na coluna e bombas mais potentes, com a pressão máxima até 15000 psi, aumentando assim a eficiência e diminuindo consideravelmente o tempo de análise (MALDANER *et al.*, 2009).

Tanto a CLAE como a CLUE podem ser acopladas a diferentes sistemas de detecção, dentre eles: detector de arranjos diodo (DAD), fluorescência, infravermelho, índice de refração, eletroquímicos e o espectrômetro de massas (EM). O acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade e sensibilidade) (VÉKEY, 2001).

Dentre as fontes de ionização disponíveis, a mais utilizada para acoplamento com CLAE é a ESI (ionização por *electrospray*). A transferência de espécies iônicas de uma solução para a fase gasosa na técnica de ESI envolve três passos: dispersão de um fino spray de gotas carregadas, positiva ou negativa, evaporação do solvente, e saída dos íons das gotículas altamente carregadas do capilar, mantido em alta voltagem (2,5 a 6 kv) (HO *et al.*, 2003).

Na técnica de ionização por *electrospray* o processo de ionização ocorre principalmente por reações ácido-base de Bronsted-Lowry, pela protonação ou desprotonação de moléculas (CECH; ENKE, 2001; CROTTI *et al.*, 2006). Assim, as substâncias que apresentam grupos funcionais básicos (aminas, amidas, ésteres, lactonas) tendem a ionizar melhor no modo de ionização positiva, dada a maior facilidade com que estes grupos são protonados em solução. Inversamente, moléculas contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, serão melhor ionizadas no modo de ionização negativa, produzindo moléculas desprotonadas relativamente estáveis (GOBBO-NETO, 2007).

Este método é considerado um método muito brando, e pouca energia residual é retida pelo analito após a ionização, normalmente acarretando baixa fragmentação. Para contornar este problema, foram desenvolvidos equipamentos de espectrometria de massas seqüencial (EM/EM), no qual as moléculas podem sofrer fragmentação. Em uma análise EM/EM, um íon do primeiro estágio, chamado íon precursor, é selecionado e transferido para uma célula de colisão. A fragmentação do íon precursor se dá através da dissociação induzida por colisão (CID) utilizando um gás inerte (Ar, N₂ ou CO₂). Os íons resultantes (íons produto ou de segunda geração) são, de modo geral, altamente indicativos da estrutura do íon precursor (HO *et al.*, 2003).

Existem diversos tipos de analisadores de massas, dentre eles: analisador quadrupolar, analisador de tempo de voo (TOF) e o *ion-trap*, sendo que neste

trabalho foi utilizado um equipamento contendo três analisadores de massas quadrupolar ligados em série, constituindo um triplo quadrupolo (TQD).

O analisador quadrupolar é composto de quatro hastes metálicas paralelas onde é aplicado um potencial RF (rádio frequência) e uma corrente elétrica do tipo DC (Direct Current). Os íons gerados na fonte de ionização do instrumento são direcionados ao centro das quatro hastes, atravessando axialmente o quadrupolo, gerando uma trajetória dependente do campo elétrico produzido, sendo que somente íons de uma determinada razão m/z (massa/carga) chegarão ao detector por ter uma trajetória estável. A RF será alterada para que íons de m/z diferentes tenham uma trajetória estável ao longo do quadrupolo e possam ser detectados pelo detector, gerando um espectro de massas (ARDREY *et al.*, 2003).

O funcionamento de um espectrômetro de massas triplo quadrupolar (TQD) consiste em algumas etapas comuns a todos os equipamentos. Inicialmente, uma mistura de íons é inserida no quadrupolo 1 (Q1), liberando apenas um íon precursor. O segundo estágio quadrupolo 2 (Q2), o íon precursor colide com as moléculas de N₂ ou Ar em uma pressão de aproximadamente 10^{-8} a 10^{-6} bar e se fragmenta formando os íons filhos. O quadrupolo 3 (Q3) atua como um segundo filtro, permitindo que somente determinados íons filhos passem para o detector (HARRIS, 2003).

Existem diferentes modos de operação para a fragmentação (EM/EM) no espectrômetro de massas TQD. No modo MRM (multiple reaction monitoring) o primeiro (Q1) e o último (Q3) analisadores de massa são utilizados como filtros de massa para o isolamento do íon e seu fragmento correspondente. O sinal do fragmento do íon é monitorado ao longo do tempo de eluição cromatográfica, selecionado de acordo com seu tempo de retenção, o que confere uma alta sensibilidade e especificidade a essa análise. Este modo é indicado para análises quantitativas, permitindo que o íon de interesse seja analisado com a menor interferência associada a oscilações na linha de base (WATERS, 2006).

1.4.2 Desenvolvimento e validação de metodologia

Para que um método analítico seja considerado confiável é fundamental sua validação para garantir, através de estudos experimentais, a eficácia e reprodução deste método, atendendo as exigências necessárias para sua aplicação analítica e assegurando a confiabilidade dos resultados (RIBANI, *et al.*, 2004).

Os desenvolvimentos e validações das metodologias desenvolvidas nesse trabalho foram baseados na Resolução – RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que consiste em um guia para validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Dentre os ensaios aplicados para validação de um método bioanalítico podemos destacar os ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração (linearidade), efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, conforme suas especificações, descritas abaixo (ANVISA, 2012).

Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado como um valor exato, sob as condições experimentais estabelecidas, produzindo um sinal de três vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Esta faixa de variação deve ser linear e abranger a faixa de concentração da amostra a ser analisada.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser subdividido em:

- Limite Inferior de Quantificação (LIQ): menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão.
- Limite Superior de Quantificação (LSQ): maior quantidade do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão.

Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra

complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o sinal de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.

Efeito Residual

Caracteriza-se por um efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. São feitas injeções de uma amostra branco antes e depois da injeção do último ponto da curva, sendo que os resultados devem ser comparados com os obtidos do limite inferior de quantificação (LIQ). Os resultados de picos interferentes tempo de retenção do analito devem ser menores que 20% da resposta do LIQ, enquanto que os resultados de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser menores que 5% da resposta do padrão interno.

Efeito Matriz

O efeito matriz é determinado no intuito de averiguar possíveis interferências geradas pelas substâncias que constituem a matriz amostral, provocando fenômenos de diminuição ou ampliação de sinal ou resposta instrumental.

Precisão e Exatidão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas do método. Ela é caracterizada por uma estimativa da dispersão dos resultados entre ensaios independentes, por meio da repetitividade de amostras diferentes, em condições pré-determinadas. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

Estes parâmetros devem ser determinados em uma mesma corrida (intracorrída) e em corridas diferentes (intercorrídas) em dias distintos. Em cada corrida devem ser realizadas cinco replicatas em quatro concentrações: CQB (Controle de Qualidade Baixo), CQM (Controle de Qualidade Médio) e CQA (Controle de Qualidade Alto) e LIQ (Limite Inferior de Quantificação), seguidas do

cálculo da média dos valores obtidos de cada concentração, avaliação do coeficiente de variação e do erro padrão relativo.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho, foi possível concluir que:

A técnica de isolamento de avicularina das partes aéreas de *Bidens sulphurea* mostrou-se eficaz e específica, com a obtenção final de um padrão isolado de avicularina com alto teor de pureza ajustada (93,27%).

As metodologias desenvolvidas para a quantificação da avicularina e vermelho de fenol em perfundido intestinal e de avicularina em plasma por CLUEDAD-EM/EM foram satisfatórias, obedecendo aos critérios estabelecidos pelo Guia de Validação de métodos bioanalíticos da ANVISA.

Os perfis de absorção intestinal de avicularina em ratos nas doses de 1mg/kg e 5 mg/kg foram determinados sendo a fração absorvida final para os dois grupos de 30,56 e 39,49%, respectivamente. Pode-se observar também que apesar da fração final absorvida ser próxima para ambos os grupos, a constante de absorção para a dose de 1mg/kg foi significativamente maior que para 5 mg/kg, o que sugere o envolvimento de transportadores na absorção da avicularina.

Em relação à influência dos sais biliares no perfil de absorção da avicularina pudemos concluir que, na dose testada de 1mg/kg, não foi observado alteração no perfil, sendo a fração absorvida final de 24,81%.

Com a determinação da influência da glicoproteína-P no perfil de absorção intestinal da avicularina pudemos observar que o flavonóide em questão sofre influência da proteína de efluxo, sendo a fração final absorvida de 87,43%.

Em relação aos modelos de absorção testados, pudemos concluir que para os grupos AV1, AV5 e DB foi assumido o modelo de absorção de primeira ordem e secreção ativa, e para o grupo VP o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o modelo de absorção de Michaelis-Menten (ativa) e secreção ativa.

O ensaio de taxa de ligação da avicularina as proteínas plasmáticas totais de ratos revelou os valores de 53,2%, 68,5% e 69,8% para as concentrações de 50, 750 e 1500 ng/mL respectivamente.

O modelo farmacocinético escolhido após administração intravascular de avicularina foi o modelo bicompartimental e de acordo com os valores encontrados nos parâmetros farmacocinéticos pode-se concluir que o flavonóide avicularina possui rápida distribuição e eliminação do organismo.

Os resultados obtidos de fração absorvida do flavonóide no intestino sugerem uma baixa biodisponibilidade da avicularina, assim como relatada para outros flavonóides.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA BRASIL (ANVISA). **Guia para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos**. Brasília, DF, 2012

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Disponível em: <http://www.farmacotecnica.ufc.br/arquivos/RDC17_2010c.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2013.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, A. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, p. 413–420, 1995.

AMIDON, et al. Provisional Biopharmaceutical Classification of Some Common Herbs Used in Western Medicine. **Mol Pharmaceutics**, v. 9, p. 815-822, 2012.

AN, R. B.; KIM, H.C.; TIAN, Y.H.; KIM, Y.C. Free radical scavenging and hepatoprotective constituents from the leaves of *Juglans sinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 529-533, 2005.

ARIAS, M.; SAUER-LEHNEN, S.; TREPTAU, J.; JANOSCHECK, N.; THEUERKAUF, I.; BUETTNER, R.; GRESSNER, A.; WEISKIRCHEN, R. Adenoviral expression of a transforming growth factor- β I antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. **BMC Gastroenterology**, v.3, p.29, 2003.

AZSALOS, A. Role of ATP-Binding Cassete (ABC) Transporters in Interactions Between Natural Products and Drugs. **Current Drug Metabolism**, v.9, p. 1010-1018, 2008.

BARNES, S. The importance of *in vivo* metabolism polyphenols and their biological actions. In: Meskin, M. et al. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton :CR CombiPress, p. 51 – 60, 2004

BEHR, S.; DURET, P.; GENDRON, N.; GUAY, J.; LAVALLE, B.; PAGE, B. **Plant extract having matrix metalloprotease inhibiting activity and dermatological uses thereof**. Patente WO 2006053415, PCT Int. Appl., 2006,

BISCHOFF, S. C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Currente Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, p. 733-740, 2008.

BOTSARIS, A.S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of flora medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.3, p. 2007.

BOURNE, D.W.A. **Mathematical modeling of pharmacokinetic data**. College of pharmacy, health and sciences center. Oklahoma University. Lancaster: Technomic Publishing, 1995.

BRANDÃO, M. G. L.; KRETTLI, A. U.; SOARES, L. S. R.; NERY, C. G. C.; MARINUZZI, H. C. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteracea) correlated with the presence of acetylene and flavonoids compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, p. 131-138, 1997.

BRANDÃO, M. G. L.; NERY, C. G. C.; MAMÃO, M. A. S.; KRETTLI, A. U. Two methoxylated flavones glycosides from *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v.48, p. 397-399, 1998.

BUGGINS, T.R.; DICKINSON, P.A.; TAYLOR, G. The effects oh pharmaceutical excipients on drug disposition. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.1482-1503, 2007.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CECH, N.B.; ENKE, C.G. Pratical implications of some recent studies in eletrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**, v.20, p. 362-387, 2001.

CHANG, S.; CHIANG, Y.; CHANG, C. L.; YEH, H.; SHYUR, L.; KUO,Y.; WU, T.; YANG, W. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN- γ expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 232-236, 2007.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada a espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

CHOI, J.S.; PARK, K.Y. MOON, S.H., RHEE, S.H.; YOUNG, H.S. Antimutagenic effect of plant flavonoids in the *salmonella* assay system. **Archives of Pharmacal Research**, v.17, p.71-75, 1994.

CHOI, J.S.; SONG, J.H.; PARK, K.Y.; KWOM, D.H. Inhibitory effects of quercetina-3 rhamnoside on influenza A virus replication. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 329-333, 2009.

CRESPY, V.; MORAND, C.; BESSON, C.; MANACH, C.; DÉMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Comparison of the Intestinal Absorption of Quercetin, Phloretin and Their Glucosides in Rats. **Journal of Nutrition**, v.131, p.2109-2114, 2001.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria De Massas Com Ionização Por “*Electrospray*”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.287-292, 2006.

CYR, B. **Plant extracts and composition containing extracellular protease inhibitors**. Patente WO 2002069992, 2002.

DAY, A.J.; CANADA, F.J.; DIAZ, C.J.; KROON, P.A.; MCLAUCHLAN, W.R.; FAULDS, C.B.; PLUMB, G.W.; MORGAN, M.R.A. and WILLIAMSON, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS Letters**, v.2, p.166-170, 2000.

DINIZ, A. **Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonóide**. 2008. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DINIZ, A.; ESCUDER-GILABERT, L.; LOPES, N.P.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R.M.; SAGRADO, S.; MEDINA-HERNÁNDEZ, M.J. Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. **Bioanalytical Chemistry**, v. 391, p. 625-632, 2008.

DOLUISIO, J.T. BILLUPS, N.F., DITTER, L.W. et al. Sugita and J.V. Swintosky, Drugs absorption I: an *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, n.10, p.1196–1199, 1969.

FAGERHOLM, U.; JOHANSSON, M.; LENNERNÄS, H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. **Pharmaceutical Research**, v.13, p.1336–1342, 1996.

FARIAS, M. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. ORG: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gossmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. e Petrovick, P.R. Santa Catarina: Editora UFRGS e UFSC, 1999.

FENN, J. B.; WHITEHOUSE, G. M.; DREYER, R. N.; YAMASHITA, M. H.; Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 675-679, 1984.

Food and Drug Administration. **Guidance for industry: bioanalytical method validation**. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, 2001.

FUJIMORI, K.; SHIBANO, M. Avicularin, a plant flavonoid, suppresses lipid accumulation through repression of C/EBP α -activated GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, Osaka, v.61, p. 5139-5147, 2013.

GAN, L.-S. L.; MOSELEY, M. A.; KHOSLA, B.; AUGUSTIJNS, P. F.; BRADSHAW, T. P.; HENDREN, R.W.; et al. CYP3A-like cytochrome P450-mediated metabolism and polarized efflux of cyclosporin A in Caco-2 cells: Interaction between the two biochemical barriers to intestinal transport. **Drug and Metabolism Disposition**, v. 24, p. 344–349, 1996.

GEE, J.M.; DUPONT, M.S.; RHODES, M.J.C.; JOHNSON, I.T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, p.19-25, 1998.

GEE, J.M.; DUPONT, S.; DAY, A.J.; PLUMB, G.W.; WILLIAMSON, G.; JOHNSON, I.T. Intestinal Transporte of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 2765-2771, 2000.

GIBALDI, M.; PERRIER, D. **Pharmacokinetics**. Segunda edição. New York: Marcel Dekker, 1989.

GOBBO-NETO, L. Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. 2007. 245 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

GRAEFE, E.U.; DERENDORF, H. and VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quecetin in humans. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.37, n.5, p. 219-233, 1999.

GRAF, B. A.; AMEHO, C.; DOLNIKOWSKI, G.G.; MILLBURRY, P.E.; CHEN, C.; BLUMBERG, J.B. Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. **Journal of Nutrition**, v.136, p. 39-44, 2006.

GREGOIRE, S.; SINGH, A.P.; VORSA, N.; KOO, H. Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferase and *Streptococcus mutans* acidogenicity. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1960-1968, 2007.

HARRIS, D.C.; **Análise Química Quantitativa**. Sexta Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HE, X.; LIU, R. H. Cranberry phytochemicals: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7069-7074, 2006.

HE, X.; LIU, R. H. Phytochemicals of apple peels: isolation, structure elucidation, and their antiproliferative and antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p. 9905–9910, 2008.

HO, C.S.; LAM, CWK, CHAN, M.H.M; CHEUNG, R.C.K; LAW, L.K. LIT, L.C.W.; NG, K.F., SUEN, M.W.M; TAI, H.L. Electrospray ionization mass spectrometry: principles and clinical applications. **Clinical Biochemist Reviews**, v.24, p.3-12, 2003.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). AVICULARIN. Disponível em <<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB30860>>. Acessado em 05 de maio de 2012.

KRUIJTZER, C. M. F., BEIJNEN, J. H., ROSING, H., TEN BOKKEL HUININK, W. W., SCHOT, M., JEWELL, R.C., et al. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. **Journal of Clinical Oncology**, v.20, p.2943–2950, 2002.

LEE, M.H.; SON, Y.K.; HAN, Y.N. Tissue factor inhibitory flavonoids from fruits of *Chaenomeles sinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v.25, p.842-850, 2002.

LENNERNÄS, H.; NYLANDER, S.; UNGELL, A. L. Jejunal permeability: A comparison between the Ussing chamber technique and the single-pass perfusion in humans. *Pharmaceutical Research*, v.14, p. 667–671, 1997.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**, 3ª Edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001.

MARI, A.; TEDESCO, I.; NAPOO, A.; RUSSO, G.L.; MALORNI, A.; CARBONE, V. Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar. **Food Chemistry**, v.123, p.157-164, 2010.

MESKIN, M.; BIDLACK, W.R.; DAVIES, A.J.; LEWIS, D.S.; RANDOLPH, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p.21 – 33.

MUÑOZ, M. J. M. MERINO-SANJUÁN, R. LLEDÓ-GARCÍA, V.G. CASABÓ, F.J. MÁÑEZ-CASTILLEJO; A. NÁCHER.. Use of nonlinear mixed effect modeling for the intestinal absorption data: Application to ritonavir in the rat. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.61, p. 20-26, 2005.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

PAIVA, F.P.; MAFFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Salvador: FIOCRUZ, 2005.

PASSAMONTI, S.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F. The interaction of anthocyanins with biliverdin reductase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.296, p.631-636, 2002.

PIETRO, A.D.; CONSEIL, G.; PEREZ-VITÓRIA, J.M.; DAYAN, G.; BAUBICHON-CORTAY, H.; TROMPIER, D.; STEIN-FELS, E.; JAULT, J.M.; WET, H.; MAITREJEAN, M.; COMTE, G.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A. M.; DUMONTET, C.; MELNTOSE, D.B.; GOFFEAU, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BARRON, D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. **Cellular and molecular life sciences**, v. 59, p. 307-322, 2002.

PRIOR, R.L. Absorption and metabolism of anthocyanins: Potential health effects. In: Meskin, M.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 1-20.

RASKIN I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; LLIC, N.; POULEY, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends Biotechnoly**, v. 20, p. 522-531, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.

ROBERTS, M.S; MAGNUSSON, B.M; BURCZYNSKI, F.J. Enterohepatic circulation -Physiological, pharmacokinetic and clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v.41, p.751-790, 2002.

SCHELLACK, G. **Farmacologia. Uma abordagem didática**. São Paulo: Fundamento Educacional, 2005.

SILVA, D. B. **Atividade antialérgica e estudos químicos das espécies *Bidens gardneri* Bak. E *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. (Asteraceae)**. 2009. 408f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica De Compostos Orgânicos**. Sétima Edição. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SONG, N.; LI, Q.; LIU, C. Intestinal permeability of metformin using single-pass intestinal perfusion in rats. **World Journal of Gastroenterology**. v. 12, n.25, p. 4064-4070, 2006.

STORPIRTS, S., GAI, M. N., CAMPOS, D. R., GONÇALVES, J.E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUTTON, S.C., RINALDI, M.T.S. Comparison of the Gravimetric, Phenol Red, and 14C-PEG-3350 Methods to Determine Water Absorption in the Rat Single-Pass Intestinal Perfusion Model. **AAPS Pharmaceutical Science**, v.3, p. 93-97, 2001.

TASSO, L.; NEVES, G; MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.; EIFLER-LIMA, V.; RATES, S.M.K.; COSTA, T.D. Pharmacokinetics and tissue distribution of a new heterocyclic N-phenylpiperazine derivative (LaSSBio-581) in rats. **Pharmaceuticals Sciences**, v. 26, p. 194-202, 2005.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. **Introdução a Farmacocinética e a Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. São Paulo: Artmed; 2009.

VANHOUTTE, G.; VERHOYE, M.; RAMAN, E.; VAN DER LINDEN, A. In-vivo non-invasive study of the thermoregulatory function of the blood vessels in the rat tail using magnetic resonance angiography (MRA). **NMR in Biomedicine**, v.15, p.263-26, 1995.

VARMA, M. V. S., ASHOKRA, Y. J, DEY, C. S., & PANCHAGNULA, R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: A perspective from bioavailability enhancement. **Pharmacology Research**, v. 48, p. 347–356, 2003.

VÉKEY, K; Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Cromatography A**, v.921, p.921, 227, 2001.

VO, A. V.; LEE, J.; KIM, J.; LEE, H.J.; KIM, S.; CHUN, W.; KWON, Y. Avicularin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by suppressing ERK phosphorylation in RAW 264.7 macrophages. **Biomolecules and Therapeutics**, v.20, n.6, p.532-537, 2012.

WALLE, T.; OTAKE, H.; WALLE, U.K.; WILSON, F.A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. **Journal of Nutrution**, Chuncheon, v.130, p. 2658-2661, 2000.

WILLIAMSON, G. Common features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids. In: Meskin, M.; Bidlack, W.R.; Davies, A.J.; Lewis, D.S.; Randolph, R.K. **Phytochemicals mechanisms of action**. Boca Raton: CRC Press, p. 21 – 33, 2004.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical references substances**. WHO Technical Reports Series, n. 885, Part A, 5. Genebra: World Health Organization, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Bulletin of the World Health Organization (1998). **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review**. Geneva, p.1-43, 1998.

XU, Y.; FAN, G.; GAO, S.; HONG, Z. Assesment of intestinal absorption of vitexin-2''-O-Rhamnoside in hawthorn leaves flavonoids in rat using in situ and in vitro absorption models. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.34, p. 164-170, 2008.

YAMADA, K.; SHOJI, K.; MORI, M.; UHEYAMA, T.; MATSUO, N.; OKA, S.; NISHIYAMA, K.; SUGANO, M. Structure-activity relationship of polyphenols on inhibition of chemical mediator release from rat peritoneal exudate cells. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal**, v.35, p. 169-174, 1999.

YING, X.; GAO, S.; ZHU, W.; BI, Y.; QIN, F.; LI, X.; LI, F. High-performance liquid chromatographic determination and pharmacokinetic study of vitexin-2''-O-rhamnoside in rat plasma after intravenous administration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.802-806, 2007.

YU, Y.B.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. PARK, J.C. Effects of triterpenoids and flavonoids isolated from *Alnus firma* on HIV-1 viral enzymes. **Archives of Pharmacal Research**, v.30, p.820-826, 2007.

ZEID, A. H. S. A.; MOTAWA, H. M. Cytotoxic lipoidal constituents of *Cosmos sulphureus* (Cav.) leaves. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy**, v.40, p. 189-199, 2002.