



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDERSON MARQUINI MARONEZZI

**PREVISÃO DA TAXA DE ABSORÇÃO INTESTINAL DE
FLAVONÓIDES POR CROMATOGRÁFIA MICELAR DE
BIOPARTIÇÃO**

Londrina
2013

ANDERSON MARQUINI MARONEZZI

**PREVISÃO DA TAXA DE ABSORÇÃO INTESTINAL DE
FLAVONÓIDES POR CROMATOGRÁFIA MICELAR DE
BIOPARTIÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andréa Diniz.
Co-orientador: Prof^a. Dr^a Ieda Spacino Scarminio.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M354p Maronezzi, Anderson Marquini.

Previsão da taxa de absorção intestinal de flavonóides por cromatografia micelar de biopartição / Anderson Marquini Maronezzi. – Londrina, 2013.
39 f.

Orientador: Andréa Diniz.

Coorientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Flavonóides – Teses. 2. Farmacocinética – Teses. 3. Absorção intestinal – Teses. 4. Medicamentos – Biodisponibilidade – Teses. 5. Cromatografia micelar de biopartição – Teses. I. Diniz, Andréa. II. Scarminio, Ieda Spacino. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 615.015

ANDERSON MARQUINI MARONEZZI

**PREVISÃO DA TAXA DE ABSORÇÃO INTESTINAL DE
FLAVONÓIDES POR CROMATOGRÁFIA MICELAR DE
BIOPARTIÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Andréa Diniz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Adriano Valim Reis
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Estefânia G. Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de julho de 2013.

À todos que transformaram esse sonho
em realidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A meus pais, pela benção da vida.

À minha mãe, por todo o apoio durante todos esses anos.

À minha irmã Aline pela companhia.

À Quinha, que mesmo partindo antes da hora continua presente em meus pensamentos. Sua determinação me inspirará pelo resto da vida, pois sei que você estará ao meu lado até o fim. Sua alegria e vontade de viver faz falta em um mundo tão cinza.

À minha tia Maria Fatima, por durante todo esse tempo estar presente em minha vida e em todas as minhas conquistas, e por me ensinar que desistir nunca é uma solução.

Ao meu tio Valter por me mostrar que quem acredita no que faz vai longe.

A todos meus outros familiares por existirem na minha vida.

À minha orientadora, professora Dra. Andréa Diniz, que por muitas vezes foi além do seu papel como orientadora de uma dissertação, sendo praticamente minha mãe em outra cidade. Muito obrigado pela confiança em mim depositada.

À professora Dra. Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni pela ajuda dispendida.

Às professoras Dra. Marlene Maria Fregonezi Nery e Dra. Mirela Fulgencio Rabito por abrir as portas das disciplinas por elas ministradas na UEL.

Ao professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa pelo entendimento e apoio nas horas que precisei. Pelo seu modo de agir, caráter e a grande pessoa que é, ganhou meu respeito e admiração.

À secretaria do programa, por me responder as inúmeras dúvidas que surgiram no decorrer desse processo.

Aos meus amigos do curso de graduação em farmácia da UEL por

propiciarem excelentes momentos durante e depois do curso, em especial ao Vitor Hugo Peijo Galerani pelo companherismo que mesmo o tempo e a distância não conseguem diminuir.

Aos meus amigos de outros lugares pelo simples fato de deixarem a vida mais alegre, em especial à Allinne Daniele Ribeiro pela enorme paciência que tem comigo, mesmo quando eu reclamo sem parar das coisas.

À Larissa Lachi Silva, Alinne Correa e Maurilio Bernini pela parceria nos trabalhos com cromatografia.

À Central Multiusuário da Universidade Estadual de Maringá (Comcap) pelo uso dos equipamentos.

Aos professores Dra. Selma Lucy Franco, Dr. Marcos Luciano Brusqui e Dr. João Carlos Palazzo de Mello pelo acolhimento em seus laboratórios e oportunidade de uso de seus equipamentos.

A todos os técnicos de laboratório por deixar a realização desse trabalho um pouco mais fácil.

A todas as outras pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho.

A Capes pela bolsa concedida.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

MARONEZZI, Anderson Marquini. **Previsão da taxa de absorção intestinal de flavonóides por cromatografia micelar de biopartição**. 2013. 39 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Os flavonóides são moléculas de grande interesse na área de saúde em função de suas propriedades farmacológicas. No entanto, poucas moléculas desta classe possuem dados farmacocinéticos disponíveis na literatura. Mais informações sobre o perfil farmacocinético são necessárias para o estabelecimento do uso racional de medicamentos contendo esses compostos, mas isso significaria o uso de um grande número de animais de experimentação, o que está na contramão das tendências éticas da atualidade, como os 3 Rs. Aliando-se as duas necessidades, de aumento de informações farmacocinéticas de flavonóides e necessidade de reduzir o número de animais de experimentação, busca-se técnicas alternativas para triagem de comportamento farmacocinético. Uma dessas técnicas é a cromatografia micelar biopartição (BMC), que pode prever parâmetros farmacocinéticos de fármacos e compostos fenólicos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um modelo matemático para prever a absorção intestinal de um grupo de flavonóides utilizando BMC. Medicamentos com absorção e retenção cromatográfica por BMC conhecidos juntamente com seus descritores moleculares químicos foram analisados pelo método estatístico dos mínimos quadrados parciais (PLS) e os descritores moleculares que mais se correlacionaram com os dados de absorção foram selecionados para gerar o modelo matemático preditivo, obtido por regressão multivariada. As equações geradas pelos modelos apresentaram um bom ajuste, o que demonstra que a técnica pode ser utilizada para a seleção inicial de compostos. O modelo gerado foi aplicado aos dados dos flavonóides e os percentuais absorvidos (%A) preditos foram obtidos. Os resultados indicaram baixa absorção intestinal para todas as moléculas analisadas (33-58%) o que está de acordo com os dados *in vivo* descritos na literatura. Comparando os dados de biodisponibilidade (BD) *in vivo* com %A previsto por BMC mostrou-se a eficácia do modelo em prever a absorção intestinal/BD dos flavonóides cuja informação até agora não está disponível na literatura.

Palavras-chave: Cromatografia micelar de biopartição. Flavonóides. absorção intestinal. Farmacocinética. biodisponibilidade.

MARONEZZI, Anderson Marquini. **Intestinal absorption profile estimation of flavonoids by biopartitioning micellar chromatography**. 2013. 39 p. Dissertation (Master degree in Science Health) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Flavonoids are molecules that currently are receiving great interest in health area because of their pharmacological properties. However, few molecules of this class have pharmacokinetic data available in the literature. More information on the pharmacokinetic profile is needed to establish the rational use of drugs, but it means using a large number of experimental animals, which are counter-trends in ethics today. Allying the two requirements, increased information pharmacokinetics of flavonoids and need to reduce the number of experimental animals, we seek alternative techniques for screening pharmacokinetic behaviour. One such technique is biopartitioning micellar chromatography (BMC), which can predict the pharmacokinetic behaviour of drugs and phenolic compounds. The objective of this work was to develop a mathematical model to predict the intestinal absorption of a group of flavonoids using BMC. Medicines with chromatographic retention and absorption by BMC along with their known chemical molecular descriptors were analyzed by statistical method of partial least squares (PLS) and molecular descriptors that correlated significantly with the absorption data were selected to generate the predictive mathematical model obtained by multivariate regression. The equations generated by the model showed good agreement, which shows that the technique can be used for the initial screening of compounds. The model was applied to the flavonoids data and the intestinal absorption percentages (% A) were obtained. The results show low intestinal absorption for all analyzed molecules (33-58%), which is in agreement with the *in vivo* data described in the literature. By comparing the bioavailability data (BD) *in vivo* with the %A predicted by the BMC model, we proved the effectiveness of the model in predicting the intestinal absorption/BD of flavonoids whose information are not available in the literature.

Keywords: Biopartitioning micellar chromatography. Flavonoids. Absorption. Pharmacokinetic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
QSAR	Relação Quantitativa Estrutura-Atividade
QSRR	Relação Quantitativa Reatividade-Atividade
QRAR	Relação Quantitativa Retenção-Atividade
LogP	Coeficiente de partição
BMC	Cromatografia Micelar de Biopartição
MLC	Cromatografia Líquida Micelar
Brij35	Lauril éter (23) Polioxietileno
CACO-2	Células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
MΩ	Miliohm
MP	Ponto de Fusão
WS	Solubilidade em Água
MW	Peso Molecular
BP	Ponto de Ebulição
VP	Pressão de Vapor
LogK _{oa}	Logaritmo do Coeficiente de Partição Octanol-Ar
LogK _{ow}	Logaritmo do Coeficiente de Partição Octanol-Água
EPI	Interface de Programas de Estimacão
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
%A	Porcentagem absorvida
RMSEC	Raiz quadrada do quadrado médio do erro de calibração
RMSECV	Raiz quadrada do quadrado médio do erro da validação cruzada
F	Distribuição F de Fisher-Snedecor
R ²	Coeficiente de determinacão
BD	Biodisponibilidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de logKBMC pH 6,5; logKBMC pH 7,4; logKoa; logKow, BP, MP, WS, MW, VP, MV e BD (%) dos fármacos estudados	29
Tabela 2 -	Estrutura química, valores de logKBMC pH 6,5; logKBMC pH 7,4; logKoa; logKow, BP; %A6.5; %A7.4 e BD (%) dos flavonóides estudados	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	MATERIAL	16
3.1.1	Matérias-Primas e Reagentes	16
3.1.2	Equipamentos e Acessórios	17
3.2	MÉTODOS.....	18
3.2.1	Preparo de Amostras Para Análise em BMC	18
3.2.3	Condições e equipamentos para análise cromatográfica por BMC	18
3.2.4	Obtenção de dados em cromatografia com coluna monolítica	19
3.2.5	Obtenção dos fatores de retenção dos compostos por cromatografia micelar de biopartição (BMC)	19
3.2.6	Análise dos dados cromatográficos	20
3.2.7	Capacidade descritiva e preditiva dos modelos	20
4	ARTIGO NA VERSÃO EM PORTUGUÊS PARA SER SUBMETIDO À REVISTA JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY	22
5	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Os ensaios sobre os efeitos farmacológicos de uma planta ou seu extrato são temas recorrentes na literatura científica, mas as avaliações farmacocinéticas de produtos de origem vegetal ainda são muito insipientes quando comparada a quantidade de informações farmacodinâmicas de compostos isolados de plantas (CHEN *et al*, 2006).

Entre as diversas classes químicas dos produtos naturais, os compostos fenólicos recebem muita atenção devido ao grande potencial antioxidante que essas moléculas possuem (MURATAMI *et al*, 2008; WANG, STONER, 2008), bem como pela propriedade de quimiprevenção do câncer humano (WANG, STONER, 2008).

Poucos estudos presentes na literatura apresentam o perfil farmacocinético de compostos polifenólicos (CHEN *et al*, 2006) e a ampliação dessas informações é importante para o direcionamento racional de estudos a partir de novas moléculas. Em contraposição a essa idéia de ampliação de estudos que envolvem animais, a sociedade científica vem estimulando a obtenção de métodos alternativos ao uso de animais, principalmente em etapas iniciais de estudos de novos compostos (GULBBELS-VAN-HAL *et al*, 2005; WETERINGS & VAN ERP, 1987).

Nessa direção o Guia 34 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2008) propõe diretrizes para validação e aceitação internacional de métodos novos ou revisados para avaliação de risco. De acordo com o referido documento, um novo método pode ser considerado um método complementar, ou adjunto, que forneça dados que contribuam para o conjunto de informações que propiciem a ampliação de dados sobre a avaliação do risco de novos compostos (por exemplo, a farmacocinética de uma substância).

Sendo assim, a implementação de técnicas *in vitro* ou *in silico* para triagem de novas moléculas na fase de estudos farmacocinéticos preliminares estão em consonância com essas diretrizes. Para tal, estabelecer modelos matemáticos preditivos de comportamento biológico pode ser uma ferramenta alternativa ou complementar aos testes convencionais que podem reduzir o uso de animais em experimentos e os custos, além de otimizar o tempo despendido nas fases iniciais desses estudos.

Tendo como fundamento a ética unida ao desenvolvimento da medicina e na descoberta de tratamentos e/ou prevenção de doenças, procura-se utilizar meios para restringir o uso de animais em experimentação científica, estimulando-se técnicas alternativas, considerando que 90% de experimentos feitos em animais não surtem os mesmos efeitos nos seres humanos, e os 10% restantes não são totalmente aproveitados. Vale mencionar que há métodos de pesquisas que não utilizam animais, sendo estes substituídos por modelos computacionais como forma de simulação de um produto, comenta Bekoff (2012). Além da questão ética, há também questões sociais e legais que devem ser consideradas.

Dentre os métodos alternativos para estimar propriedades biológicas e farmacológicas de compostos sem o uso de animais ou voluntários, as relações (quantitativas) estrutura-atividade (QSAR) são as mais utilizadas (DINIZ *et al*, 2007).

O objetivo dos modelos de predição utilizando QSAR é relacionar quantitativamente as atividades biológicas dos compostos com as propriedades físico-químicas e/ou descritores estruturais dos mesmos. A partir desses estudos outras aplicações dessa estrutura de estudo foram sendo desenvolvidas, como o é caso do QSRR (*Quantitative Structure–Reactivity Relationships*), cujo objetivo é prever características, propriedades moleculares. Também os estudos QRAR (*Quantitative Retention-Activity Relationship*) utilizam a mesma metodologia, mas para prever dados físico-químicos (por exemplo, logP) utilizando dados de retenção cromatográfica (HÉBERGER, 2007). Além da previsão de parâmetros físico-químicos, a QRAR também tem sido usada como variável de predição de atividades biológicas, toxicidade e parâmetros farmacocinéticos de compostos (BERMÚDEZ-SALDAÑA *et al*, 2007; ESCUDER-GILABERT *et al*, 2004).

Os modelos QRAR utilizam descritores moleculares e os relacionam com resultados cromatográficos. Considerando que tanto processos cromatográficos como biológicos são dinâmicos e que as propriedades hidrofóbicas, eletrônicas e estéricas de moléculas são determinantes, tanto da atividade biológica quanto do grau de retenção cromatográfica, essa relação pode ser bastante coerente, pois ambos os processos não envolvem a ruptura ou a formação de novas ligações, exceptuando, os processos metabólicos (KALISZAN, 1999).

A utilização de QRAR aplicando a cromatografia micelar de biopartição (BMC) vem ganhando espaço e se baseia no estudo de cromatografia

Líquida micelar (MLC), técnica cromatográfica já bastante aplicada em análises quantitativas e preditivas de distintas classes de substâncias. A MLC pode empregar na fase móvel do sistema cromatográfico, distintos surfactantes em concentrações acima da concentração micelar crítica, fazendo com que a formação de micelas seja garantida. Essa técnica gerou a variante BMC, que utiliza especificamente o surfactante não iônico polioxietileno(23)lauril éter (Brij35) na geração das micelas da fase móvel. A BMC está sendo patenteado pela Universitat de València (número P200002045) e tem demonstrado capacidade de prever absorção de fármacos com excelente correlação com outras técnicas *in vitro*, tais como a cromatografia de afinidade e ensaios de absorção em monocamadas de células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano (CACO-2). Além da predição na absorção intestinal de fármacos (ESCUDEY-GILABERT *et al*, 2003; MOLERO-MONFORT *et al*, 2001; MOLERO-MONFORT *et al*, 2000), outros parâmetros puderam ser previstos por meio da BMC, a permeabilidade tópica (MARTINEZ-PLA *et al*, 2003) e ocular (MARTIN-BIOSCA *et al*, 2003) de xenobióticos. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram a potencialidade de utilização do método da BMC para previsão de permeabilidade de novos produtos por diferentes tecidos intestinal.

A necessidade de estudos de previsão de absorção intestinal em diferentes fases do desenvolvimento de novos medicamentos é a mesma para os medicamentos de origem vegetal. Portanto, ampliar o rol de informações sobre o comportamento farmacocinético e biológico de produtos de origem natural relacionado à sua diversidade estrutural possibilitará que pesquisa com novas moléculas naturais tenham maiores chances de sucesso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Prever o percentual da absorção intestinal de flavonóides por meio da cromatografia micelar de biopartição.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o perfil de retenção cromatográfica de 34 compostos e 14 flavonóides em sistema de cromatografia micelar de biopartição;
- b) Agrupar os descritores moleculares de cada composto e flavonóide estudados por meio de pesquisas em bases de dados;
- c) Elaborar um modelo matemático que relacione o comportamento cromatográfico com os descritores moleculares e sua capacidade de permeação intestinal dos compostos estudados utilizando análise multivariada;
- d) Aplicar o modelo matemático elaborado para determinar a permeabilidade intestinal dos 14 flavonóides estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matérias-Primas e Reagentes

Metanol (Sigma[®])
Polioxietileno-(23)-lauriléter (Brij35) (Acros Organic[®])
Fosfato de sódio dibásico dihidratado (Sigma-Aldrich[®])
Ácido acético (Fmaia[®])
Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich[®])
Azida sódica (Sigma-Aldrich[®])
Paroxetina (PAXTRAT[®], União Química)
Lidocaína (Sigma-Aldrich[®])
Diclofenaco (CATAFLAN[®], Novartis)
Cetoprofeno (PROFENID[®], Sanofi-Aventis)
Propranolol (INDERAL[®], Astra-Zeneca)
Atenolol (ABLOK[®], Biolab)
Cimetidina (Genérico Teuto[®])
Venlafaxina (VENLIFT OD[®], Torrent)
Fembufeno (Sigma-Aldrich[®])
Ácido salicílico (Biotec[®])
Clomipramina (CLO[®], EMS)
Sinvastatina (SINVALIP[®], EMS)
Aciclovir (ZOVIRAX[®], GlaxoSmithKline)
Corticosterona (Sigma-Aldrich[®])
Tiouréia (Sigma-Aldrich[®])
Naproxeno (NAPROX[®], Teuto)
Ibuprofeno (IBUPRIL[®], Teuto)
Cefalexina (Genérico, Antibióticos do Brasil[®] Ltda)
Famotidina (FAMOX[®], Ache)
Hidroclorotiazida (Genérico Germed[®])
Flurbiprofeno (OCUFEM[®], Allergan)
Terbutalina (BRICANYL[®], Astra-Zeneca)

Metoprolol (SeloZok[®], Astra-Zeneca)
Lansoprazol (LANZ[®], EMS)
Ciclobenzaprina (MUSCUPRINA[®], EMS)
Propiofenona (Sigma-Aldrich[®])
Acemetacina (Sigma-Aldrich[®])
Acetanilida (Sigma-Aldrich[®])
Amitriptilina (TRYPTANOL[®], Merck Sharp & Dohme)
Clonazepam (RIVOTRIL[®], Roche)
Diazepam (VALIUM[®], Roche)
Fenitoína (HIDANTAL[®], Sanofi-Aventis)
Fenobarbital (GARDENAL[®], Sanofi-Aventis)
Lorazepam (LORAZ[®], Wyeth)
Acacetina (CAS: 480-44-4, Sigma-Aldrich[®])
Apigenina (CAS: 520-36-5, Sigma-Aldrich[®])
Baicaleina (CAS: 491-67-8, Sigma-Aldrich[®])
Baicalina (CAS: 21967-41-9, Sigma-Aldrich[®])
Crisina (CAS: 480-40-0, Sigma-Aldrich[®])
Fisetina (CAS: 528-48-3, Sigma-Aldrich[®])
Galangina (CAS: 548-83-4, Sigma-Aldrich[®])
Luteolina (CAS: 491-70-3, Sigma-Aldrich[®])
Morina (CAS: 480-16-0, Sigma-Aldrich[®])
Naringenina (CAS: 67604-48-2, Sigma-Aldrich[®])
Quercetina (CAS: 6151-25-3, Sigma-Aldrich[®])
Rutina (CAS: 153-18-4, Sigma-Aldrich[®])
Tangeretina (CAS:481-53-8, Sigma-Aldrich[®])
Taxifolin (CAS: 480-18-2, Sigma-Aldrich[®])

3.1.2 Equipamentos e Acessórios

Unidade filtrante estéril descartável Millex HV 0,45µm (Millipore[®])
Equipamento de água ultrapura Millipore Milli-Q (Millipore GmbH[®])
Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu, composto por degasser DGU-14A; bomba FC-10ALvp, LC-10ATvp; controlador SCL-10Avp; forno CTO-10Avp, injetor manual com loop de 20µL de volume e detector UV-vis SPD-

10AVvp (Shimadzu[®], Japão)

Coluna cromatográfica Phenomenex Onyx Monolithic C18, tamanho 100 x 3 mm (Phenomenex[®], Estados Unidos)

Balança analítica (Mettler Toledo[®] XS 204)

Banho de ultrassom (Quimis[®] Q335D)

Aparelho medidor de pH (Tecnopon[®] MPA210)

Micropipetador monocanal volume variável (LABMATE[®] 0,1-2µl (LM2); 2-20µl (LM20); 10-100 µl (LM100); 20-200 µl (LM200); 100-1000 µl (LM1000))

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparo de Amostras Para Análise em BMC

Todos os fármacos e flavonóides analisados foram preparados por diluição em metanol, na concentração final de 1.000 ppm (10 mg de amostra em 10 mL de metanol) e esta solução estoque foi armazenada em frascos âmbar com tampa, sob refrigeração a 4°C até o momento da análise. No momento da análise os fármacos em soluções-estoque foram diluídos em fase móvel micelar Brij35 0,04M em solução tampão fosfato 0,05 M, de modo que a concentração final dos fármacos estivesse em torno de 100 ppm. As amostras foram filtradas por unidade filtrante estéril descartável Millex HV 0,45 µm (Millipore, Estados Unidos), e acondicionadas em microtubos, de onde se retirou a alíquota para análise no cromatógrafo.

3.2.3 Condições e equipamentos para análise cromatográfica por BMC

Os dados cromatográficos dos compostos foram obtidos usando a fase móvel micelar de polioxietileno (23) lauril éter (Brij35) 0,04 M com pH 6,5 e 7,4 ajustados com tampão fosfato 0,05 M, preparado pela dissolução do fosfato de sódio dibásico dihidratado em água grau HPLC (18 MΩ) obtida pelo sistema de purificação Millipore Milli-Q e o pH foi ajustado com auxílio de ácido acético. Para a reprodução da pressão osmótica dos fluídos biológicos, o NaCl foi adicionado na fase móvel micelar (9,2 g/l). Como fungicida, foi adicionada azida sódica (0,2 g/l).

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido de alta eficiência. A detecção foi realizada em detector UV-vis com um comprimento de

onda ideal definido para cada fármaco, sendo 207nm o menor λ e 325nm o maior. O fluxo de fase móvel foi fixado em 0,8 ml/min, e cada amostra foi injetada em triplicata, a cada duas amostras injetadas (6 corridas), eram injetados os compostos acetanilida e propiofenona, para fins de validação da metodologia. Todos os ensaios foram realizados a 36°C. As soluções de fase móvel foram desgaseificadas em banho de ultrassom. Nestes experimentos utilizou-se uma coluna cromatográfica monolítica tamanho 100 x 3 mm.

3.2.4 Obtenção de dados em cromatografia com coluna monolítica

Para a construção do modelo matemático de predição utilizando o sistema analítico monolítico, 34 compostos foram utilizados; sendo 32 fármacos utilizados efetivamente para a construção do modelo matemático, com uma ampla faixa de %DB (15-100%); e 2 substâncias (acetanilida e propiofenona) utilizadas para a obtenção dos fatores de retenção dos compostos restantes. Já para a previsão da porcentagem de absorção intestinal, foram utilizados padrões de 14 flavonóides.

3.2.5 Obtenção dos fatores de retenção dos compostos por cromatografia micelar de biopartição (BMC)

Os fatores de retenção dos compostos foram estimados de acordo com proposta descrita em literatura (Equação 1) (BERMÚDEZ-SALDAÑA *et al*, 2007);

$$k_{BMC} = \frac{k_2(t_R^g - t_{R1}^g) + k_1(t_{R2}^g - t_R^g)}{t_{R2}^g - t_{R1}^g} \quad (1)$$

onde k_{BMC} é uma estimativa de k (fator de retenção) para o composto em teste, o qual além de seu tempo de retenção (do inglês, *gross retention time*) t_R^g , utiliza os tempos de retenção dos compostos de referência R1 (acetanilida) e R2 (propiofenona) (t_{R1}^g e t_{R2}^g), injetados durante a sessão de trabalho. k_1 e k_2 são os fatores de retenção dos compostos de referência, anteriormente

estabelecido para as condições experimentais utilizadas (concentração de surfactante, pH e temperatura) e foram considerados constantes. O uso deste tipo de aproximação gera fatores de retenção mais estáveis ao longo do tempo quando comparado às estimativas clássicas baseadas na medida do tempo morto (do inglês, *the gross hold-up time*). Os fatores de retenção utilizados foram a média de três determinações.

3.2.6 Análise dos dados cromatográficos

O valores de propriedades físicas ponto de fusão (MP), solubilidade em água (WS), peso molecular (MW), ponto de ebulição (BP), volume molar (MV), pressão de vapor (VP), logaritmo do coeficiente de partição octanol-ar (LogK_{oa}) e o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água (logK_{ow}), foram obtidos do software EPI Suite software (v.4.1, ©2008, US Environmental Protection Agency).

O software Statgraphics (v.16.1.1, ©2010, Statgraphics Centurion) foi utilizado para efetuar as análises estatísticas.

3.2.7 Capacidade descritiva e preditiva dos modelos

Para a criação do modelo matemático de predição a seleção dos descritores moleculares foi feita usando o método multivariado dos mínimos quadrados parciais (PLS, *partial least squares*) com os dados autoescalados. A porcentagem absorvida (%A) foi escolhida como variável dependente (resposta) e as variáveis independentes os descritores moleculares. Os descritores de menores peso estatísticos na equação foram eliminados. A cada eliminação o modelo PLS era re-analisado de modo a verificar a significância da regressão. O processo foi concluído quando a eliminação de um próximo descritor não gerava melhora ou apresentava uma piora nos parâmetros descritivos da equação. Com os descritores selecionados pelo método PLS, a equação de previsão do modelo foi obtida usando a regressão múltipla linear (ESCUDER-GILABERT *et al*, 2004; MOLERO-MONFORT *et al*, 2001; MOLERO-MONFORT *et al*, 2000; MARTINEZ-PLA *et al*, 2003).

O uso quantitativo dos modelos implica na avaliação de sua habilidade preditiva. Para isso, a raiz quadrada do quadrado médio do erro de calibração (RMSEC, do inglês, *root-mean-squared error of calibration*) a raiz

quadrada do quadrado médio do erro da validação cruzada (RMSECV, do inglês, *rootmean-squared error of cross-validation*) foram obtidas. O valor RMSEC fornece o desvio quadrático médio do modelo a partir dos dados, onde \hat{y}_i é o valor previsto da variável dependente (%A) e (y) o seu valor encontrado em literatura, quando todas as n moléculas estão incluídas na construção do modelo (equação 2).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y)^2}{n}} \quad (2)$$

Por outro lado, o valor RMSECV é a medida da capacidade do modelo em prever a variável dependente de novos compostos. O RMSECV é definido na equação 3

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}'_i - y)^2}{n}} \quad (3)$$

sendo que, agora, os valores \hat{y}'_i são valores previstos para outros compostos não incluídos na formulação do modelo (por exemplo, omitindo aleatoriamente um número arbitrário de moléculas a partir do conjunto de calibração e, em seguida, prevendo o seu valor variável dependente no modelo construído com as moléculas restantes) e y' o seu valor encontrado em literatura. Este procedimento é repetido até que todas as moléculas têm sido excluídas do modelo.

Do ponto de vista qualitativo, quanto maior a diferença entre RMSEC e RMSECV, menor é a robustez dos modelos obtidos e, portanto, maior cuidado deve ser tomado para previsões futuras. Durante a pesquisa bibliográfica, não foram encontrados valores de referência para os parâmetros citados.

Após a comprovada capacidade preditiva do modelo, as equações geradas foram utilizadas para anteciparem a absorção intestinal dos flavonóides. Para a previsão de absorção intestinal, foi utilizada a média entre a porcentagem prevista em pH 6,5 e em pH 7,4 (MOLERO-MONFORT *et al*, 2001).

4 ARTIGO NA VERSÃO EM PORTUGÊS PARA SER SUBMETIDO À REVISTA JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

RESUMO

Os flavonóides são moléculas de grande interesse na área de saúde em função de suas propriedades farmacológicas. No entanto, poucas moléculas desta classe possuem dados farmacocinéticos disponíveis na literatura. Mais informações sobre o perfil farmacocinético são necessárias para o estabelecimento do uso racional de medicamentos contendo esses compostos, mas isso significaria o uso de um grande número de animais de experimentação, o que está na contracorrente das tendências éticas da atualidade, como os 3 Rs. Aliando-se as duas necessidades, de aumento de informações farmacocinéticas de flavonóides e necessidade de reduzir o número de animais de experimentação, busca-se técnicas alternativas para triagem de comportamento farmacocinético. Uma dessas técnicas é a cromatografia micelar biopartição (BMC), que pode prever parâmetros farmacocinéticos de fármacos e compostos fenólicos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um modelo matemático para prever a absorção intestinal de um grupo de flavonóides utilizando BMC. Medicamentos com absorção e retenção cromatográfica por BMC conhecidos juntamente com seus descritores moleculares químicos foram analisados pelo método estatístico dos mínimos quadrados parciais (PLS) e os descritores moleculares que mais se correlacionaram com os dados de absorção foram selecionados para gerar o modelo matemático preditivo, obtido por regressão multivariada. As equações geradas pelos modelos apresentaram um bom ajuste, o que demonstra que a técnica pode ser utilizado para a seleção inicial de compostos. O modelo gerado foi aplicado aos dados dos flavonóides e os percentuais absorvidos (%A) preditos foram obtidos. Os resultados indicaram baixa absorção intestinal para todas as moléculas analisadas (33-58%) o que está de acordo com os dados *in vivo* descritos na literatura. Comparando os dados de biodisponibilidade (BD) *in vivo* com %A previsto por BMC mostrou-se a eficácia do modelo em prever a absorção intestinal/BD dos flavonóides cuja informação até agora não está disponível na literatura.

Palavras-chave: Cromatografia micelar de biopartição, flavonóides, absorção intestinal, farmacocinética, biodisponibilidade.

INTRODUÇÃO

Os ensaios sobre os efeitos farmacológicos de uma planta ou seu extrato são temas recorrentes na literatura científica¹⁻³, mas as avaliações farmacocinéticas de produtos de origem vegetal ainda são muito insipientes quando comparada a quantidade de informações farmacodinâmicas de compostos isolados de plantas¹.

Entre as diversas classes químicas dos produtos naturais, os compostos fenólicos recebem muita atenção devido ao grande potencial antioxidante que essas moléculas possuem⁴⁻⁵, tanto quando administrado de forma tópica³ quanto sistêmica⁵, bem como pela propriedade de quimiprevenção do câncer humano⁵.

Poucos estudos presentes na literatura apresentam o perfil farmacocinético de compostos polifenólicos¹ e a ampliação dessas informações é importante para o direcionamento racional de estudos a partir de novas moléculas. Entretanto, estudos farmacocinéticos clássicos utilizam animais o que levaria ao aumento no uso de animais de experimentação. Em contraposição a idéia de ampliação de estudos que envolvem animais, a sociedade científica vem estimulando a adoção de métodos alternativos, principalmente em etapas iniciais de estudos de novos compostos, visando diminuir o número e o sofrimento dos animais utilizados^{6,7}.

Dentre os métodos alternativos ao uso de animais para estudos farmacocinéticos, os já descritos em literatura⁸⁻¹¹ podem ser divididos em: métodos *in vitro* (por exemplo, ensaios de absorção em monocamadas de células de adenocarcinoma epitelial colorretal humano (CACO-2) ou em membranas artificiais (PAMPA)); organismos inferiores (como fungos e bactérias); e modelos de predição, que se dividem em: relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR – do inglês, *Quantitative structure-activity relationship*); e relações quantitativas retenção-atividade (QRAR – do inglês, *Quantitative retention-activity relationship*).

Uma das metodologias desenvolvidas para estudos de QRAR é a Cromatografia Micelar de Biopartição (BMC) que utiliza um sistema cromatográfico de fase reversa contendo em sua fase móvel solução tampão com micelas formadas por um surfactante não iônico (Brij35[®]), capaz de mimetizar as membranas biológicas¹². Os dados obtidos por BMC mostraram correlação significativa com

outras técnicas de estudo *in vitro* como CACO-2, para a previsão de parâmetros de absorção¹²⁻¹⁴.

Estudos de QRAR utilizando BMC vêm sendo aplicados com sucesso para prever comportamentos farmacocinéticos de drogas pertencentes a diferentes classes terapêuticas^{15,16}, assim como a geração de modelos que descrevem a permeação de compostos em diferentes barreiras biológicas, como pele, barreira hemato-encefálica, parede intestinal e tecido ocular¹⁷⁻²¹. Mais recentemente, estudo publicado utilizou o método BMC para estimar parâmetros farmacocinéticos ainda inexistentes para os polifenóis estudados, porém, a correlação *in vivo* não foi demonstrada devido a falta de dados *in vivo* para tais compostos²². A exceção foi o flavonóide vicenina-2, que após estudo realizado em ratos demonstrou percentual de absorção intestinal *in vivo* muito próximo do percentual predito pelo modelo, cerca e 60%²².

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar flavonóides ainda não descritos na literatura, quanto ao seu comportamento farmacocinético de absorção intestinal predita, utilizando BMC.

MATERIAS E MÉTODOS

Instrumentos e medidas

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por desgaseificador DGU-14A; bomba FC-10ALvp, LC-10ATvp; controlador SCL-10Avp; forno CTO-10Avp, injetor manual com loop de 20µL de volume e detector UV-vis SPD-10AVvp com um comprimento de onda ideal definido para cada composto, sendo 207nm o menor λ e 325nm o maior. O fluxo de fase móvel foi fixado em 0,8 ml/min. Todos os ensaios foram realizados a 36,5°C. As soluções de fase móvel foram desgaseificadas em banho de ultrassom Quimis Q335D (Diadema, Brasil). Um pHmetro Tecnopon MPA210 (Piracicaba, Brasil) foi utilizado para medir o pH. Nestes experimentos utilizou-se a coluna cromatográfica Phenomenex® Onyx Monolithic C18, tamanho 100 x 3 mm.

Reagentes e padrões

Os dados cromatográficos dos compostos foram obtidos usando a fase móvel micelar de polioxietileno(23) lauril éter (Brij35) (Acros Organic, Bélgica) 0,04 M com pH 6,5 e 7,4 ajustados com tampão fosfato 0,05 M, preparado pela dissolução do fosfato de sódio dibásico dihidratado (grau reagente, Sigma-Aldrich, Alemanha) em água grau HPLC (18 M Ω) obtida pelo sistema de purificação Millipore Milli-Q (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemanha) e o pH foi ajustado com auxílio de ácido acético (para análise, Fmaia, São Paulo, Brasil). Para a reprodução da pressão osmótica dos fluídos biológicos, NaCl (Sigma-Aldrich, Dinamarca) foi adicionado na fase móvel micelar (9,2 g/l). Como fungicida, foi adicionada azida sódica (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (0,2 g/l).

Cada amostra foi injetada em triplicata; a cada duas amostras injetadas (6 corridas) eram injetados os compostos acetanilida e propiofenona, para fins de validação da metodologia

Para a construção do modelo matemático de predição utilizando o sistema analítico monolítico, 34 compostos foram utilizados sendo 32 fármacos utilizados efetivamente para a construção do modelo matemático, com uma ampla faixa de %DB (15-100%); e 2 substâncias (acetanilida e propiofenona) utilizadas para a obtenção dos fatores de retenção dos compostos restantes. São eles: paroxetina (PAXTRAT, União Química, São Paulo), lidocaína (Sigma-Aldrich, Taiwan), diclofenaco (CATAFLAN, Novartis, São Paulo, Brasil), cetoprofeno (PROFENID, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), propranolol (INDERAL, Astra-Zeneca, São Paulo, Brasil), atenolol (ABLOK, Biolab, São Paulo, Brasil), cimetidina (Genérico Teuto, São Paulo, Brasil), venlafaxina (VENLIFT OD, Torrent, São Paulo, Brasil), fembufeno (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), ácido salicílico (Biotec, Paraná, Brasil), clomipramina (CLO, EMS, São Paulo, Brasil), sinvastatina (SINVALIP, EMS, São Paulo, Brasil), aciclovir (ZOVIRAX, GlaxoSmithKline, Rio de Janeiro, Brasil), corticosterona (Sigma-Aldrich, China), tiouréia (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), naproxeno (NAPROX, Teuto, Goiás, Brasil), ibuprofeno (IBUPRIL, Teuto, São Paulo, Brasil), cefalexina (Genérico, Antibióticos do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), famotidina (FAMOX, Ache, São Paulo, Brasil), hidroclorotiazida (Genérico Germed, São Paulo, Brasil), flurbiprofeno (OCUFEM, Allergan, São Paulo, Brasil), terbutalina (BRICANYL, Astra-Zeneca, São Paulo, Brasil), metoprolol (SeloZok, Astra-Zeneca,

São Paulo, Brasil), lansoprazol (LANZ, EMS, São Paulo, Brasil), ciclobenzaprina (MUSCUPRINA, EMS, São Paulo, Brasil), propiofenona (Sigma-Aldrich, China), acemetacina (Sigma-Aldrich, China), acetanilida (Sigma-Aldrich, Alemanha), amitriptilina (TRYPTANOL, Merck Sharp & Dohme, São Paulo, Brasil), clonazepam (RIVOTRIL, Roche, Rio de Janeiro, Brasil), diazepam (VALIUM, Roche, São Paulo, Brasil), fenitoína (HIDANTAL, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), fenobarbital (GARDENAL, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), lorazepam (LORAZ, Wyeth, São Paulo, Brasil).

Já para a previsão da porcentagem de absorção intestinal, os padrões de flavonóides utilizados foram: acacetina (CAS: 480-44-4, Sigma-Aldrich, Alemanha), apigenina (CAS: 520-36-5, Sigma-Aldrich, Alemanha), baicaleína (CAS: 491-67-8, Sigma-Aldrich, Coréia da Sul), baicalina (CAS: 21967-41-9, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), crisina (CAS: 480-40-0, Sigma-Aldrich, Alemanha), fisetina (CAS: 528-48-3, Sigma-Aldrich, Alemanha); galangina (CAS: 548-83-4, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), luteolina (CAS: 491-70-3, Sigma-Aldrich, Alemanha), morina (CAS: 480-16-0, Sigma-Aldrich, Alemanha), naringenina (CAS: 67604-48-2, Sigma-Aldrich, Reino Unido), quercetina (CAS: 6151-25-3, Sigma-Aldrich, Alemanha), rutina (CAS: 153-18-4, Sigma-Aldrich, Alemanha), tangeretina (CAS:481-53-8, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), taxifolin (CAS: 480-18-2, Sigma-Aldrich, Rússia).

Todos os fármacos e flavonóides analisados foram preparados por diluição em metanol, na concentração final de 1000 ppm (10 mg de amostra em 10 mL de metanol) e esta solução estoque foi armazenada em frascos âmbar com tampa, sob refrigeração a 4°C até o momento da análise. No momento da análise os fármacos em soluções-estoque foram diluídos em fase móvel micelar contendo Brij35[®] 0,04 M em solução tampão fosfato 0,05 M, de modo que a concentração final dos fármacos estivesse em torno de 100 ppm. As amostras foram filtradas por unidade filtrante estéril descartável Millex HV 0,45µm e acondicionadas em microtubos do tipo Eppendorf, de onde se retirou a alíquota para análise no cromatógrafo.

Fatores de retenção em cromatografia micelar de biopartição

Os fatores de retenção dos compostos foram obtidos de acordo com metodologia descrita em literatura^{17,22}.

Programas e processamento de dados

O valores de propriedades físicas ponto de fusão (MP), solubilidade em água (WS), peso molecular (MW), ponto de ebulição (BP), pressão de vapor (VP), logaritmo do coeficiente de partição octanol-ar (LogK_{oa}), volume molar (MV) e o logaritmo do coeficiente de partição octanol-água (logK_{ow}), foram obtidos do software EPI Suite software (v.4.1, ©2008, US Environmental Protection Agency Version). Esse software estima propriedades físicas dos compostos e também contém uma base de dados experimentais de certas propriedades. O software Statgraphics (v.16.1.1, ©2010, Statgraphics Centurion) foi utilizado para efetuar as análises estatísticas.

Habilidade descritiva e preditiva dos modelos

Para a criação do modelo matemático de predição a seleção dos descritores moleculares foi feita usando o método multivariado dos mínimos quadrados parciais (PLS, *partial least squares*) com os dados autoescalados. A porcentagem absorvida (%A) foi escolhida como variável dependente (resposta) e as variáveis independentes os descritores moleculares. Os descritores de menores peso estatísticos na equação foram eliminados. A cada eliminação o modelo PLS era re-analisado de modo a verificar a significância da regressão. O processo foi concluído quando a eliminação de um próximo descritor não gerava melhora ou apresentava uma piora nos parâmetros descritivos da equação. Com os descritores selecionados pelo método PLS, a equação de previsão do modelo foi obtida usando a regressão múltipla linear^{12,13,18,19}.

A habilidade preditiva do modelo foi verificada calculando-se e comprando-se a raiz quadrada do quadrado médio do erro de calibração (RMSEC) a raiz quadrada do quadrado médio do erro da validação cruzada (RMSECV), de acordo com a literatura²².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a construção do modelo preditivo de absorção intestinal para flavonóides, 32 fármacos foram cromatografados utilizando cromatografia micelar de biopartição com fase móvel em pH 7,4 e 6,5¹⁰ (tabela 1). Foram gerados 2 modelos

preditivos utilizando os valores de LogK_{BMC} nos dois pHs estudados. O uso dos valores de LogK_{BMC} ao invés dos valores de K_{BMC} se deu devido aos dados logarítmicos apresentarem uma melhor significância estatística, conforme descrito em literatura^{12,13,18,19}.

A partir dos descritores moleculares levantados (tabela 1), alguns foram excluídos do modelo baseando-se na significância que cada um deles apresentava no modelo de previsão em análise PLS. A cada exclusão, nova análise PLS foi executada para a exclusão ou não de um próximo descritor. Os valores da distribuição F (F) e o coeficiente de determinação (R^2) foram observados a cada exclusão para garantir o poder de previsão. O uso de tal metodologia condiz com aquela descrita em literatura para o sistema de cromatografia micelar de biopartição^{12,13,18,19}.

Para o pH 7,4, os descritores descartados foram, em ordem: WS, MV, VP, MW e MP. No final, observou-se uma grande correlação matemática entre BP e LogK_{ow} , portanto, dois modelos separados foram gerados excluindo-se um deles para verificar qual detinha a maior capacidade de predição. Os modelos foram gerados um com os descritores logK_{BMC} , BP e LogK_{oa} e outro com LogK_{BMC} , LogK_{ow} e LogK_{oa} .

Baseando-se em elevados valores de resíduo e ponto de alavanca (*leverage*), os fármacos sinvastatina, acemetacina, fenobarbital, tiouréia, cefalexina, metoprolol e ciclobenzaprina foram excluídos do modelo. Após a exclusão, uma regressão linear múltipla foi efetuada, obtendo-se as equações preditivas do modelo. Baseado nos parâmetros descritivos das equações, o modelo gerado com os descritores LogK_{BMC} , LogK_{ow} e LogK_{oa} (equação 1) apresentou melhor poder preditivo que aquela gerada com os descritores logK_{BMC} , BP e LogK_{oa} (equação 2). Os gráficos de valores previstos *versus* valores observados e valores de resíduo estão demonstrados na figura 1.

$$\%A = (98 \pm 9,222) + (10,491 \pm 2,889)\text{LogK}_{\text{BMC}} - (2,599 \pm 0,586)\text{LogK}_{\text{oa}} + (6,681 \pm 1,0569)\text{LogK}_{\text{ow}} \quad (1)$$

$R^2=0,87$; S.E = 8,09; F= 49; N= 25; P<0,001; RMSEC= 7,41; RMSECV= 7,58

$$\%A = (158,165 \pm 16,278) + (15,3778 \pm 4,619)\text{LogK}_{\text{BMC}} - (0,0935 \pm 0,0441)\text{BP} - (3,0955 \pm 0,982)\text{LogK}_{\text{oa}} \quad (2)$$

$R^2=0,70$; S.E = 12,51; F= 16; N= 25; P<0,001; RMSEC= 11,47; RMSECV= 9,99

Tabela 1 - Valores de $\log K_{BMC}$ pH 6,5; $\log K_{BMC}$ pH 7,4; $\log K_{oa}$; $\log K_{ow}$, BP, MP, WS, MW, VP, MV e BD (%) dos fármacos estudados

N	composto	$\log K_{bmc}$ pH 6,5	$\log K_{bmc}$ pH 7,4	$\log K_{oa}^a$	$\log K_{ow}^a$	BP (°C) ^a	MP(°C) ^a	WS (mg/L 25°C) ^a	MW (g mol ⁻¹) ^a	VP (mmHg 25°C) ^a	MV (cm ³) ^a	B D (%) ^a	ref ^b
1	diclofenaco	0,69	0,54	14	4,02	423,77	174,6	4,518	296,15	6,14E-08	206,819	100	23
2	cetoprofeno	0,39	0,18	12,18	3	403,57	149,15	120	254,29	120	212,246	100	24
3	lidocaína	0,033	0,77	10,71	1,66	386,83	144,18	237,7	234,34	6,76E-06	228,374	90	17
4	fenitoína	0,77	0,77	11,85	2,16	511,82	218,12	179	252,27	1,36E-11	200,576	90	24
5	venlafaxina	0,089	0,808	12,36	3,28	363,8	118,8	266,7	277,41	2,46E-07	261,697	92	26
6	fembufeno ácido salicílico	0,48	0,28	12,72	3,18	424,65	161,99	102,9	254,29	4,32E-08	213,888	80	17
7	amitriptina	-0,098	-0,096	8,78	2,24	298,03	93,83	3810	138,12	3,19E-05	100,393	100	17
8	tioureia	0,32	0,34	10,47	4,95	381,64	134,41	0,8239	277,41	3,62E-07	257,794	98,5	17
9	aciclovir	-0,54	-0,47	6,01	-1,31	157,86	25,82	554000	76,12	0,585	57,385	100	27
10	acemetacina	-0,92	-0,68	18,32	-1,7	565,83	243,35	34000	225,21	5,38E-15	127,182	15	25
11	sinvastatina	0,53	0,504	17,8	4,13	563,88	242,44	1,79	415,83	3,29E-11	305,403	66	29
12	diazepam	0,76	0,65	12,62	5,19	517,59	206,76	0,765	418,58	4,23E-12	376,558	88	28
13	ibuprofeno	0,905	0,92	9,65	2,7	434,32	181,92	5,88	284,75	1,02E-07	225,88	100	17
14	corticosterona	-0,0077	0,44	9,18	3,79	323,11	94,22	41,1	206,29	1,86E-04	200,339	95	17
15	naproxeno	0,62	0,62	9,76	1,99	475,98	201,38	143	346,47	8,19E-12	284,251	100	17
16	lorazepam	0,48	0,16	11,038	3,1	379,7	137,93	145	230,27	1,27E-06	192,25	100	24
17	famotidina	0,73	0,75	10,17	2,41	510,4	217,46	83,9	321,16	3,09E-12	211,166	85	24
18	terbutalina	-0,14	0,089	21,013	-0,65	521,45	222,62	1270	337,43	2,95E-10	183,554	45	17
19	paroxetina	-0,47	-0,58	17,071	0,67	141,77	141,77	213000	225,29	1,00E-07	192,256	62	24
20	propranolol	0,69	1,12	14,088	3,95	174,57	174,57	35,3	329,37	4,79E-08	271,517	100	24
21	lansoprazol	0,49	1,12	13,97	2,6	132,76	132,76	228	259,35	9,44E-08	237,161	90	24
22	clonazepam	0,85	0,85	18,38	3,68	234,8	234,8	3,43	369,39	9,23E-12	245,863	85	24
23	atenolol	0,73	0,804	12,95	2,53	217,76	217,76	35,4	315,72	7,32E-11	209,927	98	17
24	clorimipramina	0,57	-0,62	16,4	-0,03	438,63	183,93	685	266,34	7,69E-10	236,659	50	24
25	cimetidina	1,0705	-1,207	11,705	5,65	400,74	151,83	0,294	314,86	1,51E-07	281,168	90	17
26	fenobarbital	0,781	0,59	13,808	0,57	480,81	194,2	10500	252,34	5,49E-09	198,241	64	24
27	cefalexina	0,616	0,65	13,64	1,33	568,79	244,73	1640	232,24	1,36E-11	188,2	100	24
28	metoprolol	-0,709	-0,74	15,6	0,4	636,05	326,81	1790	347,39	3,24E-15	231,348	100	30
29	ciclobenzaprina	-0,31	0,15	13,1	1,69	362,44	116,15	258,731	267,37	2,88E-07	4780	95	24
30	hidroclorotiazida	1,105	-0,68	10,73	4,79	379,99	129,37	258,088	275,4	2,29E-06	1,09	55	24
31	flurbiprofeno	0,46	0,46	9,68	-0,1	477,93	202,29	1290	297,73	1,78E-10	175,801	80	31
32		0,45	0,43	10,83	3,81	380,71	133,91	17,7	244,27	3,56E-06	203,626	96	17

^aDados retirados do software EPI Suite software (v.4.1,©2008, US Environmental Protection Agency Version) ^breferência relativa aos dados de biodisponibilidade

Para o pH 6,5, o procedimento de análise adotado foi o mesmo que para o pH 7,4. Nesse modelo, os descritores excluídos, em ordem, foram: WS, MW, VP, MV, MP, LogK_{ow} e LogK_{oa} .

Baseando-se em elevados valores de resíduo e ponto de alavanca (*leverage*), os fármacos atenolol, cimetidina, fenobarbital, clomipramina, cefalexina, metoprolol e ciclobenzaprina foram excluídos do modelo.

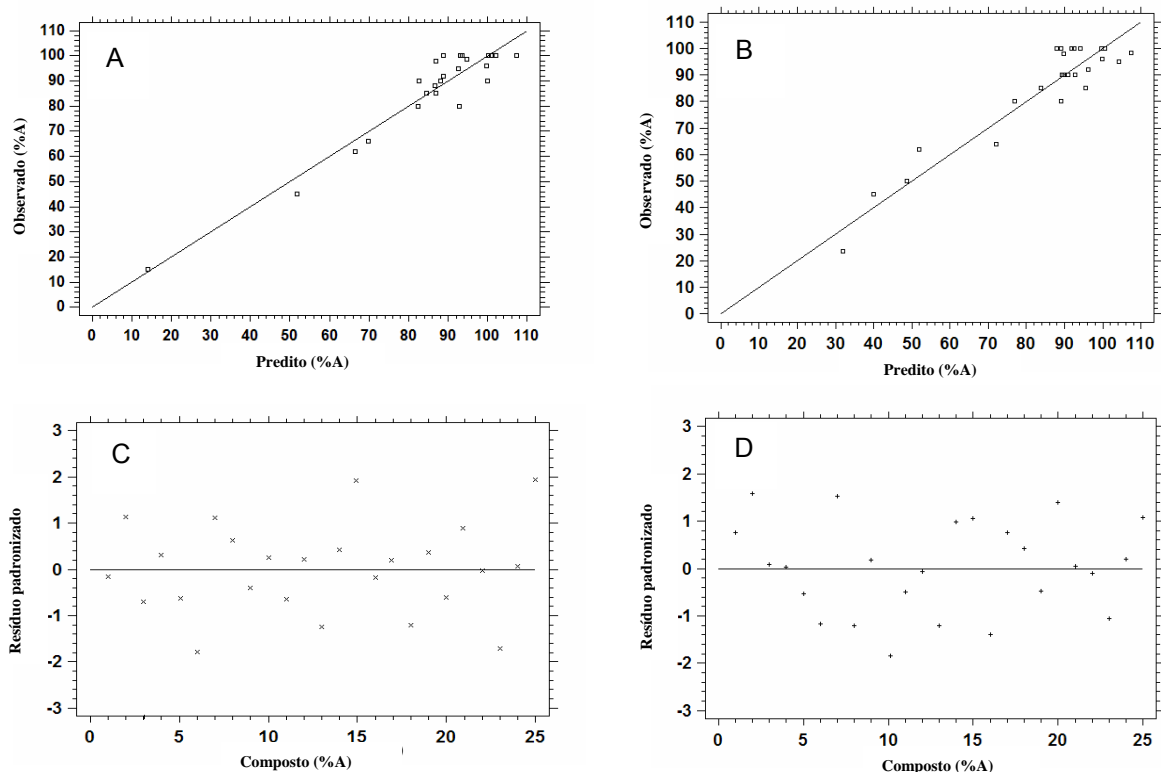
Por fim, o modelo gerado para a previsão de absorção intestinal em pH 6,5 está descrito na equação 3.

$$\%A = 151.005 \pm 6.123 + (38.0528 \pm 2.907)\text{LogK}_{ow} - (0.180 \pm 0.0146)BP \quad (3)$$

$$R^2=0,91; \text{S.E} = 6,24; F= 116,19; N= 25; P<0,001; \text{RMSEC}= 5,20; \text{RMSECV}= 5,12$$

De posse dos modelos para os dois pHs testados, os dados cromatográficos obtidos para os flavonóides juntamente com seus descritores moleculares foram utilizados para a estimativa dos percentuais absorvidos em ambos os pHs. Os valores estimados podem ser observados na tabela 2.

Figura 1 - Gráficos de correlação entre os valores preditos e observados de %A e análise de resíduos. A – Valores preditos vs observados no pH 6,5; B - Valores preditos vs observados no pH 7,4; C – Valores de resíduo no pH 6,5; D – Valores de resíduo no pH 7,4



A figura 1A e 1B mostram uma boa distribuição ao redor da linha teórica para ambos os pHs, demonstrando uma boa capacidade de predição. As figuras 1C e 1D mostram valores dos resíduos não maiores que 2 e uma boa dispersão, não apresentando tendência. Isso demonstra que o modelo de regressão linear múltipla é adequado à proposta.

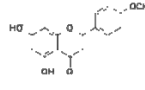
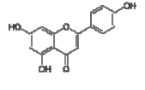
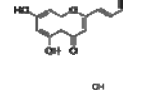
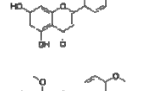
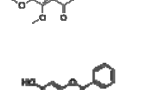
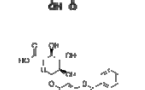

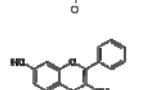
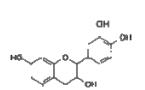
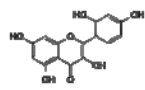

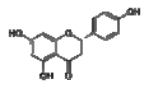
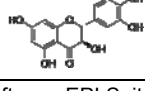

De acordo com o modelo proposto, todos os flavonóides apresentaram baixa biodisponibilidade estimada (<60%), independentemente das subclasses dos flavonóides, o que é condizente com a literatura²². Os dois heterosídeos testados, rutina e baicalina, embora sejam compostos de alta solubilidade, possuem as mais baixas biodisponibilidades (BD) estimadas. Não foram encontrados dados de BD *in vivo* desses heterosídeos na literatura consultada, mas estudo realizado em cultura de células CACO-2 verificou que a capacidade de permeação da rutina foi zero³⁵, dado esse que condiz com os obtidos nesse trabalho.

Quanto às agliconas, pode-se observar uma estreita faixa de absorção intestinal estimada, de 33 a 58%. Poucos dados sobre absorção intestinal *in vivo* ou biodisponibilidade são encontrados na literatura científica. Foram obtidas informações sobre a biodisponibilidade da apigenina (45%)¹, luteolina (38%)¹, baicaleína (23%)³², naringenina (64%)³³ e taxifolin (36%)³⁴.

Quando comparados esses dados *in vivo* com os estimados pelo modelo obtido por BMC verifica-se grande aproximação entre os valores, indicando a eficácia do modelo na predição da absorção intestinal/biodisponibilidade desses flavonóides.

Em trabalho realizado com células CACO-2³⁵, os autores verificaram que os flavonóides acacetina, crisina e tangeretina possuem os maiores valores dos índices da permeabilidade celular apical-basal em relação a permeabilidade celular basal-apical (P_{A-B}/P_{B-A}), respectivamente 1,86; 1,74 e 1,57. Esses dados sugerem que esses flavonóides têm maior capacidade de permeação intestinal, em relação aos outros compostos dessa classe. O percentual de absorção intestinal estimado pelo modelo aqui proposto também prevê os mais altos percentuais de absorção intestinal para os mesmos flavonóides (tabela 2), demonstrando proximidade entre os resultados obtidos pelas duas técnicas.

Tabela 2 - Estrutura química, valores de $\log K_{BMC}$ pH 6,5; $\log K_{BMC}$ pH 7,4; $\log K_{oa}$; $\log K_{ow}$, BP; %A6.5; %A7.4 e BD (%) dos flavonóides estudados.

n	flavonóide	estrutura	$\log K_{bmc}$ pH 6,5	$\log K_{bmc}$ pH 7,4	$\log K_{oa}^c$	$\log K_{ow}^c$	BP (°C)	% A _{6,5}	% A _{7,4}	% A média	BD
<i>Flavona</i>											
1	acacetina		0,8203	0,81	3,41	453,18	100,58±1,86 4	8,94±0,618	54,76±1,24 1217	-	
2	apigenina		0,67	0,65	17,7	2,84	464,36	92,71±1,253	7,78±0,3724	50,24±0,812842	45,2 ¹
3	crisina		0,86	0,84	14,21	3,32	429,52	106,35±2,326	±0,6835	57,78±1,505016	-
4	luteolina		0,61	0,6	21,19	2,36	499,19	84,49±0,5937	±0,1013	45,49±0,347584	37,9 ¹
5	tangeretina		0,88	0,88	15,15	3,18	478,12	98,42±1,676	±0,6258	53,66±1,151236	-
6	baicaleína		-0,39	-0,04	17,95	3,27	464,36	52,51±1,818	±0,2039	29,89±0,80698	23 ³²
7	baicalina		0,014	0,012	27,072	0,74	707,59	24,063±0,421	±0,58321	13,67±0,50198	-
<i>Flavonol</i>											
8	fisetina		0,54	0,53	18,87	1,18	515,35	78,75±0,141	±0,0936	42,49±0,117181	-
9	galangina		0,89	0,8	13,044	2,44	480,51	98,34±1,669	±0,6706	53,65±1,169636	-
10	quercetina		0,31	0,31	20,049	1,48	550,19	63,90±1,025	±0,00599	34,90±0,5156	-
11	morina		0,3±	0,24±	20,109	1,48	550,19	63,24±1,075	±0,03079	34,53±0,5531	-
12	rutina		0,14±	0,0094±	34,87	-2,02	916,03	0 ^d	0 ^d	0 ^d	-
<i>Flavano</i>											
13	naringenina		0,77±	0,75±	17,44	2,61	460,47	97,32±1,61	7,8±0,39290	52,56±1,000893	64 ³³
14	taxifolin		0,59±	0,54±	20,66	0,59	531,64	77,73±0,048	5,4±0,06926	41,57±0,01052	36 ³⁴

^cDados retirados do software EPI Suite software (v.4.1, ©2008, US Environmental Protection Agency Version) ^dnúmero negativo

Neste trabalho foi utilizada uma coluna cromatográfica monolítica ao invés de colunas C-18 padrão¹³ ou capilar²², relatadas em literatura. Essa substituição se mostrou vantajosa, visto que esse tipo de coluna conferiu boa resolução cromatográfica e um menor tempo de análise³⁶, o que resulta em menor utilização de recursos. Além disso, parece que a predição de percentual absorvido obtido com experimentos que utilizam a coluna monolítica parece ser mais exata em relação as outras colunas. Essa afirmativa pôde ser estabelecida pela observação dos dados preditivos de absorção do flavonóide apigenina. O valor obtido neste trabalho (50,24%) se mostrou mais próximo dos dados *in vivo* (45,2%)¹ quando comparado a resultados obtidos por modelos preditivos que utilizaram coluna capilar (95,1%)²². Isso indica que o uso da coluna monolítica pode gerar resultados mais fidedignos para a previsão de comportamento farmacocinético de absorção intestinal.

Concluindo, o estudo aqui apresentado mostrou que 13, dos 14 flavonóides estudados, possuem percentual de absorção intestinal que sugerem baixa biodisponibilidade (< 60%) e o flavonóide rutina não poderia ser absorvido na região intestinal. Sendo assim, quaisquer produtos que contenham como fármaco ativo esses flavonóides deveriam passar por formulações farmacêutica que visem aumento da capacidade de permeabilidade celular, tal como a nanoestruturação.

Agradecimentos: Agradecemos ao CNPq pelo financiamento do projeto, à Capes pela bolsa concedida e a Universidade Estadual de Maringá (COMCAP) pela disponibilidade do equipamento.

REFERÊNCIAS

1. Chen, T.; Li-Ping; Lu, X.; Jiang, H.; Zeng, S. Absorption and excretion of luteolin and apigenin in rats after oral administration of Chrysanthemum morifolium extract. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 55(2), 273-277.
2. Duran, K. F. Studies On Quality Control And Pharmacokinetics Of Traditional Chinese Medicine Verbena Officinalis L.- Globe Thesis. <http://www.globethesis.com/?t=2154360308974173> (05/20/2013).
3. Casagrende, R.; Martinez, R. M.; Zarpelon, A. C.; Zimmermann, V. V. M.; Georgetti, S. R.; Baracat, M. M.; Fonseca, M. J. V.; Vicentini, F. T. M. C.; Moreira, I. C.; Andrei, C. C.; Verri Jr, W. A. Tephrosia sinapou extract reduces inflammatory leukocyte recruitment in mice: effect on oxidative stress, nitric oxide and cytokine production. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, 22(3), 587-597.

4. Muratami, A.; Ashida, H.; Terao, J. Multitargeted câncer prevention by quercetin. *Cancer Lett.* **2008**, 269, 315-325.
5. Wang, L. S.; Stoner G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* **2008**, 269, 281-290.
6. Santana, M.B.; Marcos, G. M.; Cardoso, F. R.; Dichi, I.; Dichi, J. B.; Camargo, A. E. I.; Fabris, B. A.; Nixdorf, S. L.; Fatel, E. C. S.; Rodrigues, R. J.; Simão, A. N. C.; Cecchini, R.; Barbosa, D. S. Association between soy and green tea (*Camellia sinensis*) diminishes hypercholesterolemia and increases total plasma antioxidant potential in dyslipidemic subjects. *Nutrition*, **2008**, 24, 562-568.
7. Gulbbels-Van-Hal, W.M.L.G.; Blaauboer, B.J.; Barentsen. H.M.; Hoitink, M.A; Meerts, I.A T.M.; Van Der Hoeven, J.C.M. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* **2005**, 42, 284-295.
8. Weterings, P.J.J.M., Van Erp, Y.H.M. Alternative methods in toxicology. In: *Vitro toxicology— Approaches to Validation*, Liebert, New York, USA, 1987, Vol. V.
9. Corti, G.; Maestrelli, F.; Cirri, M.; Zerrouk, N.; Mura, P. Development and evaluation of an *in vitro* method for prediction of human drug absorption II. Demonstration of the method suitability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 27, 354-362.
10. Flaten, G.E.; Dhanikula, A.B.; Luthman, K.; Brandl, M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 27, 80-90.
11. Escuder-Gilabert, L. Estimación de la hidrofobicidad de compuestos orgânicos mediante cromatografía líquida micelar. Implicaciones en los procesos biológicos de reparto. Tesis. Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, 2005.
12. Molero-Monfort, M.; Matín-Biosca, Y.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R.M.; Medina-Hernandez, M.J. Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 870, 1 – 11.
13. Molero-Monfort, M.; Escuder-Gilabert, L.; Villanueva-Camañas, R.M.; Sagrado, S.; Medina-Hernandez, M.J. Biopartitioning micellar chromatography: an *in vitro* technique for predicting human drug absorption. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 753, 225 - 236.
14. Escuder-Gilabert, L.; Martínez-Pla, J.J.; Sagrado, S.; Vilanuevacamañas, R.M.; Medina-Hernandez, M.J. Bipartitioning micelar separation methods: medelling drug absorption. *J. Chromat. B*, **2003**, 797, 21 – 35.
15. Escuder-Gilabert, L. M.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Quantitative retention–structure and retention–activity relationship studies of local anesthetics by micellar liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 28–34.
16. Quiñones-Torrelo, C.; Martín-Biosca, Y.; Martínez-Plá, J. J.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. QRAR models for central nervous system drugs using biopartitioning micellar chromatography. *Mini ReV. Med. Chem.* **2002**, 2 (2), 145–161.
17. Molero-Monfort, M.; Escuder-Gilabert, L.; Villanueva-Camañas, R. M.; Sagrado, S.; Medina-Hernandez, M. J. Biopartitioning micellar chromatography: an *in vitro* technique for predicting human drug absorption. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 753, 225–236.

18. Escuder-Gilabert, L.; Molero-Monfort, M.; Villanueva-Camañas, R. M.; Sagrado, S.; Medina-Hernandez, M. J. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an *in vitro* technique for predicting drug penetration across the blood–brain barrier. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 807, 193–201.
19. Martinez-Pla, J. J.; Martin-Biosca, Y.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability. *Biomed. Chromatogr.* **2003**, 17, 530–537.
20. Martinez-Pla, J. J.; Martin-Biosca, Y.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability by biopartitioning micellar chromatography. *J. Chromatogr., A*, **2004**, 1047, 255–262.
21. Martin-Biosca, Y.; Molero-Monfort, M.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernandez, M. J. Rapid *in vitro* test to predict ocular tissue permeability based to biopartitioning micellar chromatography. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, 20, 209–216.
22. Diniz, A.; Escuder-Gilabert, L.; Lopes, N.P.; Gobbo-Neto, L.; Villanuevacamañas, R.M.; Sagrado, S.; Medina-Hernandez, M.J. Permeability Profile Estimation of Flavonoids and other Phenolic Compounds by Biopartitioning Micellar Capillary Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 8372-8379.
23. Diclofenac – Description and Clinical Pharmacology. http://www.druglib.com/druginfo/diclofenac/description_pharmacology 20/05/2013.
24. Sugano, K.; Kansy, M.; Artursson, P.; Avdeev, A.; Bendels, S.; Di, L.; Ecker, G. F.; Faller, B.; Fischer, H.; GErbtsoff, G.; Lennernaes, H.; Senner, F. Coexistence of passive and carrier-mediated process in drug transport. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2010**, 9, 597-614.
25. Laskin, O. L. Clinical pharmacokinetics of acyclovir. *Clinic. Pharmacok.*, **1983**, 8, 187-201.
26. Effexor (venlafaxine) – Description and Clinical Pharmacology. http://www.druglib.com/druginfo/effexor/description_pharmacology/ 20/05/2013
27. World Health Organization. Concise international chemical assessment document 49 – thiourea. <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad49.pdf> 20/05/2013.
28. Ding, M.J.; Yuan, L.H.; Li, Y.; Wang, S.; Wu, X.L.; Liu, J.; Ma, K. F.; Fan, H. W.; Lu, Z. Y.; Xu, H. J.; Zhou, X., M. Pharmacokinetics and Bioequivalence Study of Simvastatin Orally Disintegrating Tablets in Chinese Healthy Volunteers by LC-ESI-MS/MS. *J Bioequiv Availab*, **2011**, 3, 032-037.
29. Dell, H.D.; Doersing, M.; Fischer, W.; Jacobi, H.; Kamp, R.; Kohler, G.; Schollnhammer, G. Metabolism and pharmacokinetics of acemetacin in man. *Arzneimittelforschung*, **1980**, 30 (8A), 1391-1398.
30. Gower, P. E.; Dash, C. H. Cephalixin: human studies of absorption and excretion of a new cephalosporin antibiotic, *Br. J. Pharmac.* **1996**, 37, 738-747.
31. Beermann, B.; Groschinsky-Grind, M.; Rosén, A. Absorption, metabolism, and excretion of hydrochlorothiazide. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1976**, 19, 531-537
32. Tian, S.; He, G.; Song, J.; Wang, S.; Xin, W.; Zhang, D.; Du, G. Pharmacokinetic study of baicalein after oral administration in monkeys. *Fitoterapia*. **2012**, 83, 532-540.

33. Lui, M-H.; Zou, W.; Fan, L.-D.; Li, P.-B.; Su, W.-W. Comparative protein binding of naringin and its aglycone naringenin in rat, dog and human plasma. *Afr. J. Pharmac. Pharmacol.* **2012**, 6, 934-940.
34. Pozharitskaya, O. N.; Karlina, M.V.; Shikov, A. N.; Kosman, V.M.; Makarova, M. N.; Marakov, V. G. Determination and pharmacokinetic study of taxifolin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography. *Phytomedicine.* **2009**, 16, 244-251.
35. Tian, X. J.; Yang, X. W.; Yang, X.; Wang, K. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *Int. J. Pharmac.* **2009**, 367, 58-64.
36. Moliner-Martínez, Y.; Molins-Legua, C.; Verdú-Andrés, J.; Herráez-Hernandez, R; Campíns-Falcó, P. Advantages of monolithic over particulate columns for multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr., A.* **2011**, 1218, 6256-6262.

5 CONCLUSÃO

A adaptação do modelo de previsão utilizando BMC descrito em literatura se mostrou bem sucedida, visto que a troca da coluna cromatográfica gerou economia de recursos, tanto financeiros quanto de uso de equipamento, devido à redução dos tempos de análise.

A geração dos modelos matemáticos incluiu a seleção dos descritores moleculares pela técnica multivariada dos mínimos quadrados parciais, e a geração das equações preditivas pelo método da regressão múltipla linear. Sobre os modelos gerados, pode-se destacar que:

- As duas equações geradas, para os pHs 6,5 e 7,4 apresentaram boa capacidade preditiva, evidenciados pelos parâmetros da regressão.
- Os dados de percentuais absorvidos obtidos para os flavonóides mostraram que para todas as moléculas estudadas os valores preditos indicam baixa absorção intestinal.
- Os percentuais absorvidos intestinais preditos quando comparados com os dados *in vivo* disponíveis na literatura indicaram boa aproximação da predição.

O trabalho alcançou seu objetivo ao propor um modelo complementar aos estudos *in vivo*, visto que nenhum estudo *in vitro* substitui a complexidade de um organismo. Porém, com um modelo matemático de predição de absorção intestinal, a triagem de novas moléculas se torna, além de mais rápida, menos dispendiosa e complicada do que estudos utilizando animais. Assim, esse estudo vem ao encontro das novas diretrizes de práticas experimentais que visam utilizar animais de experimentação de forma mais eficiente e causando o mínimo de sofrimento, ou seja, seguir o princípio dos 3 Rs para animais de experimentação (*Replacement* – substituir; *Reduction* – reduzir e *Refinement* – melhorar o bem-estar)

REFERÊNCIAS

BEKOFF, Marc. Animais tem consciência: trate-os como iguais. **Superinteressante**, dez. 2012, p. 24.

BERMÚDEZ-SALDAÑA, J.M.; ESCUDER-GILABERT, Laura; MEDINA-HERNÁNDEZ, Maria José; VILLANUEVA-CAMANÃS, Rosa María; SAGRADO, Salvador. Chromatographic retention–activity relationships for prediction of the toxicity pH-dependence of phenols. **Chemosphere**. n. 69, p.108-117, agosto 2007.

CHEN, Ting; LI-PING; LU, Xin-Yan; JIANG, Hui-Di; ZENG, Su. Absorption and excretion of luteolin and apigenin in rats after oral administration of Chrysanthemum morifolium extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.2, n. 55, p. 273-277, dezembro 2006.

DAMY, Sueli Blanes. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental, **Revista Associação Médica Brasileira**, 2010; 56(1): 103-111. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v56n1/24.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

DINIZ, Andréa.; ESCUDER-GILABERT, Laura.; LOPES, Norberto P.; GOBBO-NETO, Leonardo.; VILLANUEVACAMAÑAS, Rosa María.; SAGRADO, Salvador; MEDINA-HERNANDEZ, Maria.José. Permeability Profile Estimation of Flavonoids and other Phenolic Compounds by Biopartitioning Micellar Capillary Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n.55, p. 8372-8379, outubro 2007.

ESCUDER-GILABERT, Laura; MARTINEZ-PLA, J. J.; SAGRADO, Salvador; VILLANUEVA-CAMAÑAS, Rosa María; MEDINA-HERNANDEZ, Maria José. Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. **Journal of Chromatography B**. n. 797, p. 21–35, novembro 2003

ESCUDER-GILABERT, Laura; MOLERO-MONFORT, M.; VILLANUEVA-CAMAÑAS, Rosa María; SAGRADO, Salvador; MEDINA-HERNANDEZ, Maria José. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an *in vitro* technique for predicting drug penetration across the blood–brain barrier. **Journal of Chromatogr. B**. n. 807, p. 193–201, agosto 2004.

GULBBELS-VAN- HAL, W.M.L.G.; BLAAUBOER, B.J.; BARENTSEN. H.M.; HOITINK, M.A; MEERTS, I.A T.M.; VAN DER HOEVEN, J.C.M. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**,v.3, n. 42, p. 284-295, agosto 2005.

HÉBERGER, Károli. Quantitative structure–(chromatographic) retention relationships. **Journal of Chromatograph A**. n.1158, p. 273-305, março 2007.

KALISZAN, Roman. Chromatography and capillary electrophoresis in modelling the basic processes of drug action. **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**. v. 6, n. 18, p. 400-410, junho 1999.

MARTIN-BIOSCA, Y.; MOLERO-MONFORT, M.; SAGRADO, Salvador; VILLANUEVA-CAMAÑAS, Rosa María; Medina-Hernandez, Maria José. Rapid *in vitro* test to predict ocular tissue permeability based to biopartitioning micellar chromatography. **European Journal of Pharmaceutical. Science**. n. 20, p. 209–216, outubro 2003.

MARTINEZ-PLA, J. J.; MARTIN-BIOSCA, Y.; SAGRADO, Salvador; VILLANUEVA-CAMAÑAS, Rosa María; MEDINA-HERNANDEZ, Maria José. Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability. **Biomedical Chromatograph**.n. 17, p. 530–537, dezembros 2003.

MOLERO-MONFORT, M.; ESCUDER-GILABERT, Laura; VILLANUEVA-CAMAÑAS, R. M.; SAGRADO, Salvador; MEDINA-HERNANDEZ, Maria José. Biopartitioning micellar chromatography: an *in vitro* technique for predicting human drug absorption. **Journal of Chromatography B**. n. 753, p. 225–236, abril 2001

MOLERO-MONFORT, M.; MATÍN-BIOSCA, Y.; SAGRADO, Salvador; VILLANUEVA-CAMAÑAS, Rosa María; MEDINA-HERNANDEZ, Maria José. Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport. **Journal of Chromatography A**. n. 870, p. 1 – 11, fevereiro 2000

MURATAMI, Akira; ASHIDA, Hitoshi.; TERAQ, Junji. Multi targeted cancer prevention by quercetin. **Cancer Letters**, v. 2, n. 269, p. 315-325, outubro 2008.

OCDE. **Handbook on Constructing Composite Indicators**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/std/clits/42495745.pdf>>. Acesso em 20 dez. 2012.

WANG, Li-Shu; STONER Gary. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, v. 2, n. 269, p. 281-290, outubro 2008.

WETERINGS, P.J.J.M., VAN ERP, Y.H.M. Alternative methods in toxicology. In: Goldberg,A.M. (Ed.), **Vitro toxicology— Approaches to Validation**, Vol. V. New York, USA : M.A. Liebert, 1987.