

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
ESTUDOS E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

IARA DÉVULA TISO TANA

**AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DA GOIAZENSOLIDA**

OURO PRETO, MG

2020

IARA DÉVULA TISO TANA

**AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DA GOIAZENSOLIDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

*Orientadora:* Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jacqueline de Souza

*Co-orientadora:* Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dênia Antunes Saúde Guimarães

*Colaboradora:* Dr<sup>ª</sup>. Tamires Guedes Caldeira

OURO PRETO, MG

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

T161a Tana, Iara Devula Tiso .  
Avaliação biofarmacêutica da goiazensolida. [manuscrito] / Iara  
Devula Tiso Tana. - 2020.  
118 f.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline de Souza.  
Coorientadora: Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro  
Preto. Escola de Farmácia. Programa de Ciências Farmacêuticas.  
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Absorção. 2. Solubilidade. 3. Plantas medicinais. I. Guimarães,  
Dênia Antunes Saúde. II. Souza, Jacqueline de. III. Universidade Federal  
de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.3

Bibliotecário(a) Responsável: SORAYA FERNANDA FERREIRA e SOUZA - SIAPE:1.763.787



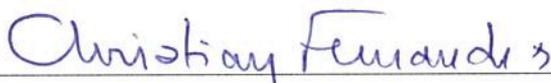
**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP  
**Escola de Farmácia**

---

**LISTA DE PRESENÇA**

Sessão de defesa da 162ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Iara Dévula Tiso Tana**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação Biofarmacêutica da Goiazensolida”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 04 de março de 2020.



---

Prof. Dr. Christian Fernandes  
UFMG



---

Profª. Dra. Neila Márcia Silva Barcellos  
UFOP



---

Profª. Dra. Jacqueline de Souza  
UFOP

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força.

À minha família, por ser o meu “porto seguro” e por compreender as minhas ausências. Aos meus pais, Sebastião e Denise. Dedico, majoritariamente, esta conquista a vocês. Obrigada pelo amor e apoio incondicionais, e por nunca medirem esforços para a realização dos meus sonhos. Aos meus queridos irmãos, Breno e Sarah, pela união, torcida e pelo carinho imensurável.

Ao Nathan, pelo companheirismo, ternura, paciência e amor. Obrigada por me confortar em todos os momentos de angústias e me incentivar sempre com suas palavras sábias e animadoras.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Jacqueline de Souza e Dr<sup>a</sup>. Dênia Antunes Saúde Guimarães, pela oportunidade, confiança, paciência e pelos significativos ensinamentos, e à Dr<sup>a</sup>. Tamires Guedes Caldeira, pela colaboração e por ser prestativa.

À equipe do LCQ, por estar sempre disposta a auxiliar e instruir. Obrigada pelas discussões científicas que enriqueceram este trabalho, e pelos momentos de descontração e amizade que tornaram esta jornada mais leve.

À equipe do Laboratório Multiusuário (CiPharma/UFOP), principalmente MSc. Patrícia Capelari de Oliveira e Dr<sup>a</sup>. Amanda de Vasconcelos Quaresma, pela intensa assistência, discussões e sugestões nos dias de experimentos, e amizade.

À equipe do LAPLAMED, por ser sempre solícita e pela amizade.

À professora Dr<sup>a</sup>. Neila Márcia Silva Barcellos e ao professor Dr. Christian Fernandes, pelas valiosas contribuições no Exame de Qualificação.

Aos doutores Wagner da Nova Mussel e Maria Betânia de Freitas Marques, por me receberem gentilmente no Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química/UFMG e pelo auxílio na realização e na discussão dos resultados das análises de Calorimetria Exploratória Diferencial e Termogravimetria.

Ao CiPharma e à UFOP, por proporcionarem o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, por fornecer as Substâncias Químicas de Referência utilizadas.

À Anvisa, CNPq e FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A avaliação biofarmacêutica permite estudar o comportamento de fármaco ou substância bioativa frente a soluções que mimetizam as condições do trato gastrointestinal (TGI) visando prever sua solubilidade e permeabilidade em condições fisiológicas. Os resultados são preditivos do comportamento *in vivo* de candidatos a fármaco. Assim, um candidato a fármaco precisa de, além da eficácia clínica comprovada e ausência de toxicidade, possuir características físico-químicas que permitam a sua absorção no TGI em velocidade e extensão apropriadas. A avaliação por meio de testes *in vitro* das substâncias bioativas, quanto à solubilidade, e de testes *in vivo* de permeabilidade, permite a alocação dentro de uma das 4 classes do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB). A goiazensolida, lactona sesquiterpênica presente em espécies do gênero *Lychnophora*, apresentou atividades farmacológicas variadas, o que torna necessário elucidar suas características biofarmacêuticas, visando o desenvolvimento farmacotécnico de um medicamento contendo essa substância. Estudos *in silico* demonstraram que a goiazensolida apresenta alta solubilidade e baixa permeabilidade. Um método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE), para sua quantificação nos estudos de solubilidade, foi desenvolvido e validado nos meios tamponados pH 1,2, pH 4,5 e pH 6,8. O método foi linear na concentração de 10,0 a 50,0 µg/mL, seletivo, preciso e exato. A solubilidade da goiazensolida, determinada pelo método da agitação orbital em frasco, foi de 0,57 mg/mL (pH 1,2), 0,51 mg/mL (pH 4,5) e 0,45 mg/mL (pH 6,8). A razão entre a maior dose terapêutica, por extrapolação alométrica, e a solubilidade em cada um dos meios avaliados resultou nos valores de 175,16 mL (pH 1,2), 194,99 mL (pH 4,5) e 222,07 mL (pH 6,8), que apontaram a alta solubilidade da goiazensolida, visto que são inferiores a 250,0 mL. Ela se mostrou estável nos três meios tamponados. A permeabilidade foi avaliada pelo ensaio em membrana artificial paralela (PAMPA). Foi necessário validar o método por CLAE para a quantificação da goiazensolida no estudo de permeabilidade, o qual se mostrou linear na concentração de 3,6 a 117,0 µg/mL, seletivo, preciso e exato para os meios pH 6,8 e pH 7,4. Foram utilizados como padrão de alta permeabilidade o cloridrato de propranolol e de baixa permeabilidade a furosemida. Para a goiazensolida foi encontrado o valor de permeabilidade efetiva de  $0,03 \times 10^{-6}$  cm/s, inferior ao da furosemida ( $1,03 \times 10^{-6}$  cm/s). Dessa forma, a avaliação biofarmacêutica permitiu prever a absorção no TGI da goiazensolida e direcionar os estudos pré-clínicos necessários ao desenvolvimento de um novo fármaco.

**Palavras-chave:** Solubilidade, Permeabilidade, Goiazensolida, Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

## ABSTRACT

The biopharmaceutical evaluation allows the study of the behavior of a drug or bioactive substance in solutions that mimic conditions of the gastrointestinal tract (GIT) in order to predict its solubility and permeability under conditions that resemble physiological environment. The results are of great relevance as predictive of the *in vivo* behavior of drug candidates. Thus, a drug candidate substance needs, besides the proven clinical efficacy and with no toxicity, possess physicochemical characteristics that allow its absorption in the GIT in appropriate speed and extension. The evaluation through *in vitro* tests of bioactive substances, as for solubility, and *in vivo* tests of permeability, allows the allocation within one of the 4 classes of the Biopharmaceutical Classification System (BCS). Goyazensolide, a sesquiterpene lactone present in species of the genus *Lychnophora*, presented varied pharmacological activities, which makes the importance of studying its biopharmaceutical characteristics, aiming at the pharmacotechnical development of a drug containing this substance. *In silico* in this work demonstrated that goyazensolide presents high solubility and low permeability. A high performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantification of goyazensolide in solubility studies was developed and validated in media pH 1.2, pH 4.5 and pH 6.8. The method was linear in the concentration of 10.0 to 50.0 µg/mL, selective, precise and accurate. The solubility of goyazensolide, assessed by the shake-flask, was 0.57 mg/mL (pH 1.2), 0.51 mg/mL (pH 4.5) and 0.45 mg/mL (pH 6.8). The ratio between the highest therapeutic dose by allometric extrapolation and the solubility in each of the media evaluated resulted in values of 175.16 mL (pH 1.2), 194.99 mL (pH 4.5) and 222.07 mL (pH 6.8), which pointed to the low solubility of goyazensolide, as they are less than 250 mL. It was stable in the three buffered media. Permeability evaluation was performed by the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA). It was necessary to validate the HPLC method for the quantification of goyazensolide in the permeability study, which was linear in the concentration of 3.6 to 117.0 µg/mL, selective, precise and accurate in media pH 6.8 and pH 7.4. The standard high permeability drug used was propranolol hydrochloride and the low permeability drug was furosemide. For goyazensolide an effective permeability value of  $0.03 \times 10^{-6}$  cm/s was found, lower result than furosemide ( $1.03 \times 10^{-6}$  cm/s). Thus, biopharmaceutical evaluation allowed predicting the absorption of goyazensolide in TGI and directing the preclinical studies necessary for the development of a new drug.

**Key-words:** Solubility, Permeability, Goyazensolide, Biopharmaceutical Classification System.

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> – Equações utilizadas para a extrapolação alométrica da dose da goiazensolida, baseadas na taxa metabólica basal (TBM) (FREITAS; CARREGARO, 2013).....	28
<b>Equação 2</b> - Equação para o cálculo da solubilidade de fármacos segundo o SCB..	32
<b>Equação 3</b> - Equação utilizada para o cálculo da Permeabilidade efetiva ( $P_{eff}$ ) obtida nos ensaios PAMPA.....	37
<b>Equação 4</b> - Equação para o cálculo da quantidade de substância que fica retida na membrana.....	37
<b>Equação 5</b> - Equação matemática usada para o cálculo do DPR para a avaliação da precisão do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	46
<b>Equação 6</b> – Equação matemática para o cálculo da exatidão do método cromatográfico.....	47
<b>Equação 7</b> – Equações matemáticas para o cálculo do LD e LQ.....	47
<b>Equação 8</b> – Equação de <i>Henderson-Hasselbalch</i> para compostos ácidos.....	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química da goiazensolida proposta por Vichnewski e colaboradores (1976).....	26
<b>Figura 2</b> – Estrutura química da goiazensolida proposta por Herz e Goedken (1982).....	26
<b>Figura 3</b> – Estrutura química da eremantolida C.....	27
<b>Figura 4</b> - Mecanismos de transporte de fármacos através da membrana intestinal.	34
<b>Figura 5</b> - Esquema do procedimento de avaliação da permeabilidade pelo método PAMPA.....	36
<b>Figura 6</b> - Comportamento térmico da goiazensolida. Curvas DSC (preto) e TG em atmosfera de N <sub>2</sub> (vermelho) e em atmosfera de O <sub>2</sub> (azul).....	60
<b>Figura 7</b> – Indicativo do número de ligações doadoras e aceptoras de hidrogênio na molécula da goiazensolida.....	64
<b>Figura 8</b> – Formas de apresentação da goiazensolida: não ionizada e ionizada.....	65
<b>Figura 9</b> – Espectro de absorção molecular na faixa de 200 a 400 nm da goiazensolida solubilizada em metanol.....	68
<b>Figura 10</b> – Cromatograma obtido de solução metanólica da goiazensolida na concentração de 100,0 µg/mL empregando fase móvel água:acetonitrila (70:30 v/v) e coluna Phenomenex Luna <sup>®</sup> (150 mm x 4,6 mm x 3 µm).....	68
<b>Figura 11</b> – Cromatograma obtido de solução metanólica da cumarina na concentração de 50,0 µg/mL empregando fase móvel água:acetonitrila (70:30 v/v) e coluna Phenomenex Luna <sup>®</sup> (150 mm x 4,6 mm x 3 µm).....	69
<b>Figura 12</b> – Cromatograma obtido de solução metanólica da goiazensolida na concentração de 100,0 µg/mL empregando fase móvel água:acetonitrila (50:50 v/v) e coluna Macherey-Nagel Nucleosil <sup>®</sup> 100-3 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm).....	70
<b>Figura 13</b> – Cromatograma obtido de solução metanólica da goiazensolida na concentração de 100,0 µg/mL empregando fase móvel água:acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent <sup>®</sup> Zorbax Eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) .....	71
<b>Figura 14</b> – Cromatograma obtido da goiazensolida em FGSSE (pH 1,2) na concentração de 40,0 µg/mL empregando fase móvel água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent <sup>®</sup> Zorbax Eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm x 5 µm).....	72

<b>Figura 15</b> – Cromatograma obtido da goiazensolida em TA (pH 4,5) na concentração de 40,0 µg/mL empregando fase móvel água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent® Zorbax Eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm x 5 µm).....	73
<b>Figura 16</b> – Cromatograma obtido da goiazensolida em FISSE (pH 6,8) na concentração de 40,0 µg/mL empregando fase móvel água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent® Zorbax Eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm x 5 µm).....	73
<b>Figura 17</b> – Curvas analíticas médias (n=3) com os desvios-padrões na faixa de concentração 10,0 µg/mL a 50,0 µg/mL para a avaliação da linearidade do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em: FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	76
<b>Figura 18</b> – Gráficos de resíduos da regressão linear do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em: FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) após tratamento de <i>outliers</i> .....	78
<b>Figura 19</b> – Piloto de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida em: FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) (n=3) pelo método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”).....	87
<b>Figura 20</b> – Avaliação da estabilidade da goiazensolida em: FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), por meio da variação na concentração média do analito (n=3). As linhas tracejadas indicam as variações de 5,0 % na concentração.....	91
<b>Figura 21</b> – Curvas analíticas médias (n=3) com os desvios-padrões na faixa de concentração 3,6 µg/mL a 117,0 µg/mL para a avaliação da linearidade do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em: FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	95
<b>Figura 22</b> – Gráficos de resíduos da regressão linear do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em: FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) após tratamento de <i>outliers</i> .....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Preparo das soluções diluídas da goiazensolida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) utilizadas nos estudos de solubilidade em equilíbrio.....	43
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros analíticos de variação para verificar a robustez do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	48
<b>Tabela 3</b> – Condições experimentais dos testes piloto de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida.....	49
<b>Tabela 4</b> – Condições experimentais do procedimento para determinação da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	50
<b>Tabela 5</b> – Preparo das soluções diluídas nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) utilizadas na avaliação da linearidade do método para quantificação do fármaco cloridrato de propranolol e para quantificação do fármaco furosemida.....	52
<b>Tabela 6</b> – Preparo das soluções diluídas nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) utilizadas na avaliação da linearidade do método para quantificação da goiazensolida.....	55
<b>Tabela 7</b> - Valores das propriedades físico-químicas preditas pelos programas computacionais MarvinSketch <sup>®</sup> , Molinspiration <sup>®</sup> e Osiris Property Explorer <sup>®</sup> para a goiazensolida.....	62
<b>Tabela 8</b> – Valor do ângulo de pureza, ângulo limite, assimetria e número de pratos teóricos para a goiazensolida na concentração de 40,0 µg/mL diluída em cada um dos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), empregando fase móvel água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent <sup>®</sup> Zorbax Eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm x 5 µm).....	74
<b>Tabela 9</b> – Condições cromatográficas empregadas para a quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	75

<b>Tabela 10</b> – Parâmetros avaliados na linearidade do método cromatográfico desenvolvido para quantificação da goiazensolida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	77
<b>Tabela 11</b> – Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão resultante da análise das curvas analíticas dos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	79
<b>Tabela 12</b> – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida no meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição ácida.....	80
<b>Tabela 13</b> – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida no meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição básica.....	81
<b>Tabela 14</b> – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida no meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição a temperatura de 55,0 °C ( $\pm$ 5,0 °C).....	81
<b>Tabela 15</b> – Precisão intracorrída e intercorrída do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio FGSSE (pH 1,2) (n=3).....	82
<b>Tabela 16</b> – Precisão intracorrída e intercorrída do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio TA (pH 4,5) (n=3).....	83
<b>Tabela 17</b> – Precisão intracorrída e intercorrída do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio FISSE (pH 6,8) (n=3).....	83
<b>Tabela 18</b> – Resultados da exatidão do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida nos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	84
<b>Tabela 19</b> – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).....	85
<b>Tabela 20</b> – Valores de concentração média (n=3), DPR (%) e exatidão (%) determinados para avaliar a robustez do método para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) para a concentração de 30,0 $\mu$ g/mL.....	86

<b>Tabela 21</b> – Dados da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”) nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) (n=3).....	89
<b>Tabela 22</b> – Razão dose/solubilidade (D/S) da goiazensolida encontrada para os meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), a partir da extrapolação alométrica da dose.....	90
<b>Tabela 23</b> - Avaliação do pH das soluções iniciais e finais do teste de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco.....	91
<b>Tabela 24</b> – Valores de ângulo de pureza e ângulo limite obtidos a partir do método cromatográfico desenvolvido para quantificação da goiazensolida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) durante o estudo de estabilidade (n=3).....	93
<b>Tabela 25</b> – Valores de concentração média (n=3), DPR (%) e exatidão (%) determinados para avaliar a robustez do método para quantificação da furosemida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TA (pH 7,4) para a concentração de 48,67 µg/mL.....	93
<b>Tabela 26</b> - Resultado de permeabilidade efetiva ( $P_{eff}$ ) para os fármacos cloridrato de propranolol e furosemida, utilizando o meio FISSE (pH 6,8) contendo soluções diluídas dos fármacos como compartimento doador, TF (pH 7,4) isento de fármacos como compartimento receptor, solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm, 5 horas de incubação à 37,0 °C.....	94
<b>Tabela 27</b> – Parâmetros avaliados na linearidade do método cromatográfico desenvolvido para quantificação da goiazensolida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	96
<b>Tabela 28</b> – Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão resultante da análise das curvas analíticas dos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	98
<b>Tabela 29</b> – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição ácida.....	99
<b>Tabela 30</b> – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição a temperatura de 55,0 °C (± 5,0 °C).....	99

<b>Tabela 31</b> – Precisão intracorrída do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio FISSE (pH 6,8) (n=3).....	100
<b>Tabela 32</b> – Precisão intracorrída do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio TF (pH 7,4) (n=3).....	100
<b>Tabela 33</b> – Resultados da exatidão do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	101
<b>Tabela 34</b> – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).....	101
<b>Tabela 35</b> - Resultado de permeabilidade efetiva ( $P_{eff}$ ) para a goiazensolida, utilizando o meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador, TF (pH 7,4) como compartimento receptor, solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm, 5 horas de incubação à 37,0 °C.....	102

## ABREVIATURAS E SIGLAS

A <sup>-</sup>	Concentração das espécies ionizadas
b	Média das inclinações da curva analítica
BE	Bioequivalência
CLAE	Cromatografia a líquido de alta eficiência
cLogP	Coefficiente de partição octanol/água calculado
cLogS	Logaritmo da solubilidade (mol/L) calculado
CMD	Concentração média determinada
CT	Concentração teórica
D/S	Razão dose/solubilidade
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
FFSOLI	Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata
FGSSE	Fluido gástrico simulado sem enzimas
FISSE	Fluido intestinal simulado sem enzimas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HA	Concentração das espécies não ionizadas
LAPLAMED	Laboratório de Plantas Medicinais
LD	Limite de detecção
LogD	Coefficiente de partição octanol/solvente tamponado
LogP	Coefficiente de partição octanol/água
LogS	Logaritmo da solubilidade (mol/L)
LQ	Limite de quantificação
MDCK	Células Mardin Darby de rim canino
MS	Ministério da Saúde
PAMPA	<i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>
P <sub>eff</sub>	Permeabilidade efetiva
PVDF	Polivinildifluorideno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rpm	Rotações por minuto
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SE	Solução estoque

TA	Tampão acetato
TF	Tampão fosfato
TBM	Taxa metabólica basal
TGI	Trato gastrointestinal

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	21
2 OBJETIVOS .....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	24
3.1 Goiazensolida.....	24
3.2 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) .....	29
3.3 Solubilidade .....	30
3.3.1 Método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”) para determinação da solubilidade.....	32
3.4 Permeabilidade.....	33
3.4.1 Ensaio em membrana artificial paralela (PAMPA) para determinação da permeabilidade.....	35
3.5 Métodos <i>in silico</i> para determinação da solubilidade e permeabilidade .....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Materiais .....	39
4.1.1 Substância biologicamente ativa .....	39
4.1.2 Substância Química de Referência (SQR).....	39
4.1.3 Equipamentos e utensílios .....	39
4.1.4 Reagentes e solventes .....	40
4.2 Métodos .....	41
4.2.1 Caracterização da substância biologicamente ativa .....	41
4.2.1.1 Análise do ponto de fusão.....	41
4.2.1.2 Análise térmica.....	41
4.2.2 Determinação da permeabilidade <i>in silico</i> e estimativa do pK <sub>a</sub> da goiazensolida .....	42
4.2.3 Determinação da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”) e sua estabilidade em fluido gástrico simulado sem enzimas .....	

- FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	42
4.2.3.1 Preparo da solução estoque da goiazensolida .....	42
4.2.3.2 Preparo das soluções diluídas.....	42
4.2.3.3 Preparo das soluções tampão .....	43
4.2.3.4 Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	44
4.2.3.5 Validação do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	44
4.2.3.5.1 Linearidade .....	44
4.2.3.5.2 Seletividade .....	45
4.2.3.5.3 Precisão .....	46
4.2.3.5.4 Exatidão.....	46
4.2.3.5.5 Limites de detecção e quantificação .....	47
4.2.3.5.6 Robustez .....	47
4.2.3.6 Estudo da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	48
4.2.3.7 Estabilidade da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	50
4.2.4 Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> da goiazensolida e dos fármacos padrão pelo ensaio em membrana artificial paralela (PAMPA) em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4) .....	51
4.2.4.1 Preparo das soluções tampão .....	51
4.2.4.2 Preparo da solução de fosfatidilcolina de ovo.....	51
4.2.4.3 Preparo das soluções estoques dos fármacos padrão de baixa permeabilidade (furosemida) e alta permeabilidade (cloridrato de propranolol).....	51

4.2.4.4	Preparo das soluções diluídas.....	52
4.2.4.5	Validação parcial do método cromatográfico para quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade (furosemida).....	52
4.2.4.5.1	Robustez.....	53
4.2.4.6	Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> dos fármacos padrão: furosemida e cloridrato de propranolol.....	53
4.2.4.7	Estudo da permeabilidade <i>in vitro</i> da goiazensolida pelo método PAMPA em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4) .....	54
4.2.4.7.1	Preparo da solução estoque da goiazensolida.....	54
4.2.4.7.2	Validação parcial do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4) .....	54
4.2.4.7.2.1	Linearidade.....	55
4.2.4.7.2.2	Seletividade .....	56
4.2.4.7.2.3	Precisão .....	56
4.2.4.7.2.4	Exatidão .....	57
4.2.4.7.5	Limites de detecção e quantificação .....	57
4.2.4.7.3	Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> da goiazensolida em fluido intestinal simulado sem enzimas – FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4) .....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1	Caracterização da substância biologicamente ativa .....	59
5.1.1	Análise do ponto de fusão.....	59
5.1.2	Análise térmica.....	59
5.2	Determinação da permeabilidade <i>in silico</i> e estimativa do pK <sub>a</sub> da goiazensolida.....	61
5.3	Determinação da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco (“ <i>shake-flask</i> ”) e sua estabilidade em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	66

5.3.1 Desenvolvimento do método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para quantificação da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	67
5.3.2 Validação do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	75
5.3.2.1 Linearidade.....	75
5.3.2.2 Seletividade.....	80
5.3.2.3 Precisão .....	82
5.3.2.4 Exatidão .....	84
5.3.2.5 Limites de detecção e quantificação.....	84
5.3.2.6 Robustez.....	85
5.3.3 Estudo de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8).....	87
5.3.4 Estabilidade da goiazensolida a 37,0 °C em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) .....	91
5.4 Validação parcial do método cromatográfico para quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade (furosemida).....	93
5.4.1 Robustez .....	93
5.5 Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> dos fármacos padrões furosemida e cloridrato de propranolol.....	94
5.6 Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> da goiazensolida pelo método PAMPA em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4) .....	95
5.6.1 Validação parcial do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4) .	95
5.6.1.1 Linearidade.....	95
5.5.1.2 Seletividade.....	98

5.5.1.3 Precisão .....	100
5.5.1.4 Exatidão .....	100
5.5.1.5 Limites de detecção e de quantificação .....	101
5.6.2 Avaliação da permeabilidade <i>in vitro</i> da goiazensolida em fluido intestinal simulado sem enzimas – FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4).....	101
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	103
REFERÊNCIAS .....	105
ANEXOS.....	115

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo biofarmacêutico representa a descrição das características físico-químicas de fármacos e substâncias bioativas, tais como a massa molecular,  $pK_a$ , lipofilia, polimorfismo, solubilidade e permeabilidade, as quais podem influenciar na velocidade e extensão da absorção destes a partir da forma farmacêutica. Essas características devem ser conhecidas com o intuito de se desenvolver uma formulação que possibilite máxima biodisponibilidade da substância farmacologicamente ativa no organismo humano e, conseqüente, ação terapêutica pretendida (STORPIRTIS; GAI, 2009). A determinação desses parâmetros é importante na pesquisa de novos fármacos e nas fases de desenvolvimento de formulações (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2008).

Diante disso, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), proposto por Amidon e colaboradores em 1995, classifica os fármacos em quatro categorias distintas tendo como critério as características determinantes ao processo de absorção, especialmente solubilidade e permeabilidade. A classificação pelo SCB é alcançada por meio de estudos de solubilidade que podem ser realizados *in vitro*, em condições que mimetizam as fisiológicas, sendo capazes de prever o comportamento do fármaco *in vivo* e de estudos de permeabilidade realizados *in vivo*. Portanto, o SCB possibilita a triagem de moléculas com potencial farmacológico e seleção de novos fármacos (AMIDON et al., 1995).

O método preconizado pelas agências regulatórias para a determinação da solubilidade em equilíbrio, segundo o SCB, é o da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”). Os dados de solubilidade obtidos por este método permitem a determinação da razão dose/solubilidade (D/S), a qual consiste em dividir a maior dose terapêutica prescrita no país pela solubilidade da substância ativa medida experimentalmente (FDA, 2017; LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004; EMA, 2010; BRASIL, 2011; BRASIL, 2019).

O ensaio em membrana artificial paralela (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay* - PAMPA) é um método *in vitro* para o estudo da permeabilidade. Este ensaio permite, de forma rápida, o cálculo da permeabilidade efetiva de fármacos e substâncias biologicamente ativas, que ocorre de forma passiva por via transcelular. Isto o torna um modelo pertinente para avaliação ou triagem prévia de grande número de substâncias (KANSY et al., 1998).

Nesse contexto do SCB como uma ferramenta para o desenvolvimento de fármacos encontram-se as substâncias bioativas provenientes das plantas com fins medicinais, as quais constituem uma alternativa para o provimento de fármacos. Dentre essas substâncias, destacam-se as espécies do gênero *Lychnophora*, as quais produzem compostos com promissoras

atividades terapêuticas (OLIVEIRA et al., 1996a; SAÚDE et al., 2002; GUZZO et al., 2008; CAPELARI-OLIVEIRA et al., 2011; DE SOUZA et al., 2012; FERRARI et al., 2013; UGOLINE et al., 2017). A goiazensolida é uma lactona sesquiterpênica presente em espécies do gênero *Lychnophora*, a qual exibiu, em estudos anteriores, significativas atividades, incluindo esquistossomicida, tripanossomicida (VICHNEWSKI et al., 1976; OLIVEIRA et al., 1996b; GRAEL et al., 2000; GRAEL; ALBUQUERQUE; LOPES, 2005; BORKOSKY et al., 2009; MILAGRE et al., 2019), antimicobacteriana, antiplasmódica (VONGVANICH et al., 2006), anti-inflamatória (KANASHIRO et al., 2006; UGOLINE et al., 2017), anti-hiperuricêmica (UGOLINE et al., 2017; BERNARDES et al., 2019), antiartrite gotosa (BERNARDES, 2018), além de efeitos citotóxicos (MANTOVANI; TAKAHASHI; VICHNEWSKI, 1993) e inibição *in vitro* da atividade da xantina oxidase (BERNARDES et al., 2019).

Devido às inúmeras atividades farmacológicas que já foram descritas para a goiazensolida, houve o interesse em avaliar as características biofarmacêuticas dessa substância, visando verificar a potencialidade para desenvolvimento futuro de um medicamento contendo esta substância.

Este trabalho descreverá as características biofarmacêuticas da goiazensolida por meio de análises *in silico*, a partir de suas características físico-químicas; da determinação de sua solubilidade em equilíbrio, pelo método da agitação orbital em frasco; e da avaliação de sua permeabilidade, pelo ensaio em membrana artificial paralela (PAMPA).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar a solubilidade em equilíbrio e a permeabilidade *in vitro* da goiazensolida a fim de prever a absorção deste potencial candidato a fármaco.

### 2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para quantificação da goiazensolida nos estudos de solubilidade e permeabilidade;
- Determinar a solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”) e sua estabilidade em meios tamponados;
- Prever a permeabilidade da goiazensolida *in silico* e estimar seu  $pK_a$ ;
- Empregar o modelo *in vitro* de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) para avaliar a permeabilidade transcelular da goiazensolida.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Goiazensolida

A utilização de produtos naturais, mais precisamente as plantas com fins medicinais, é uma das práticas mais remotas da humanidade. Usadas pelo homem desde o início de sua história, as plantas atuam como um recurso para o tratamento e prevenção de diversas enfermidades (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, concentrando aproximadamente 15 a 20 % do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém cerca de 24 % da biodiversidade. Atualmente, são reconhecidas 46715 espécies da flora brasileira (FLORA DO BRASIL, 2019), as quais podem gerar desenvolvimento de pesquisas com resultados voltados para tecnologias e opções terapêuticas.

Um estudo que relata o desenvolvimento de fármacos entre 1981 e 2014 mostra que os fármacos provenientes de produtos naturais e os que passaram por alguma modificação semissintética, mas ainda preservam sua origem natural, são responsáveis por 45,4 % do total de 326 insumos farmacêuticos ativos utilizados para o tratamento de doenças infecciosas, tais como aqueles das classes de antibacterianos, antivirais, antifúngicos e antiparasitários. No mesmo período, dos 174 fármacos descobertos, o número proveniente de fonte natural com atividades antitumorais foi de 114 (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Em 2006, o Ministério da Saúde (MS) apresentou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como finalidade principal estabelecer diretrizes e linhas prioritárias para garantir o acesso seguro e racional ao uso de plantas medicinais no país, uma vez que este é culturalmente aceito pela população. A Política procura amplificar as ações terapêuticas com plantas medicinais destinadas aos pacientes. Com isso, pretende garantir o acesso, a segurança, a qualidade e a eficácia da terapêutica por meio de atenção integral, que considera também, os conhecimentos populares (BRASIL, 2006).

A família Asteraceae possui cerca de 1535 gêneros e 23600 espécies, cujas pesquisas geraram mais de 4000 novas substâncias. Esta família representa 10 % da flora mundial e vem sendo bastante estudada principalmente quanto à sua química, citogenética e estrutura macromolecular (NAKAJIMA; SEMIR, 2001). As plantas do gênero *Lychnophora* pertencentes a esta família possuem espécies conhecidas na medicina popular como “arnica”, “falsa arnica”, “arnica da serra” ou “arnica brasileira”, por possuírem odor semelhante ao da espécie *Arnica montana* L., e são bastante utilizadas no tratamento da dor, inflamação,

contusão, reumatismo e picadas de insetos (CERQUEIRA et al., 1987; SAÚDE, 1994; SAÚDE et al., 1998).

Resumidamente, o perfil fitoquímico do gênero *Lychnophora* é basicamente identificado pela ocorrência de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e esteróides (BORELLA et al., 1998). Entre os terpenóides mais encontrados estão as lactonas sesquiterpênicas (CUNHA et al., 1995).

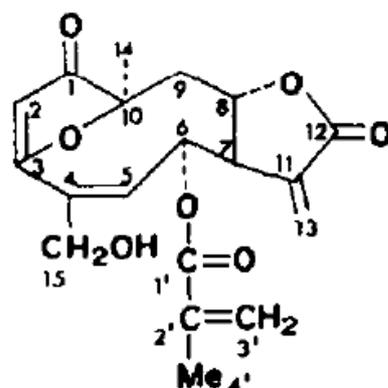
Diversos estudos evidenciaram o potencial farmacológico dos extratos e das substâncias ativas pertencentes às plantas do gênero *Lychnophora* (OLIVEIRA et al., 1996a; SAÚDE et al., 2002; FERRAZ-FILHA et al., 2006; GUZZO et al., 2008; CAPELARI-OLIVEIRA et al., 2011; DE SOUZA et al., 2012; FERRARI et al., 2013; UGOLINE et al., 2017; BERNARDES, 2018; BERNARDES et al., 2019; MÜLLER et al., 2019). A *Lychnophora passerina* (Mart. ex. DC) Gardn é uma espécie que pertence a este gênero, a qual possui distribuição por todo cerrado brasileiro, com maior número de espécies no estado de Minas Gerais, mas também é encontrada em Goiás e na Bahia, sendo comum em altitudes acima de 1000 metros do nível do mar e em regiões com alta incidência de luz solar e predomínio de períodos de seca (SEMIR, 1991).

Várias substâncias foram identificadas nessa espécie, a qual detém grande variedade metabólica (PERRY, 1994; CHICARO et al., 2001; CAPELARI-OLIVEIRA et al., 2011; UGOLINE et al., 2017). As lactonas sesquiterpênicas dos tipos goiazensolida, guaianolida e eremantolida são as predominantes no gênero *Lychnophora*, sendo a primeira considerada o principal marcador químico da espécie *L. passerina* (BORELLA et al., 1998).

A goiazensolida, substância biologicamente ativa alvo desse trabalho, foi isolada pela primeira vez da espécie *Eremanthus goyazensis* Sch.-Bip. (VICHNEWSKI et al., 1976), sendo posteriormente isolada de outras espécies como *E. molli* Sch.-Bip. (BOHLMANN et al., 1981), *Lychnophora passerina* (BOHLMANN et al., 1981), *Vanillosmopsis brasiliensis* (Gardn.) Sch.-Bip. (BOHLMANN et al., 1982), *V. pohlii* Baker (BOHLMANN et al., 1982) e *Piptocoma rufescens* (REN et al., 2012).

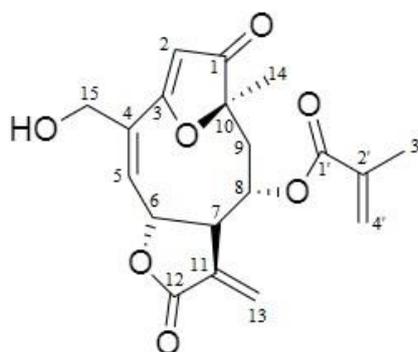
A estrutura química da goiazensolida proposta por Vichnewski e colaboradores (1976) (Figura 1) mostrou um grupo  $\gamma$ -lactona com um grupo metileno exocíclico conjugado nos carbonos 7 e 8, um grupo hidroxila em C-15 e um grupo éster metacrilato em C-6. Sua determinação foi realizada por meio dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , infravermelho, ultravioleta e massas.

**Figura 1** – Estrutura química da goiazensolida proposta por Vichnewski e colaboradores (1976)



Até 1982 a goiazensolida era apresentada desta maneira, até que Herz e Goedken, por meio de análise de raios-X, mostraram que o grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona era fechado em C-6 e o grupo éster metacrilato estava ligado ao C-8 (HERZ; GOEDKEN, 1982), como é apresentado na Figura 2.

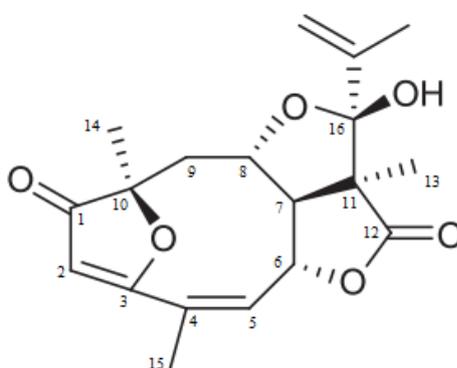
**Figura 2** – Estrutura química da goiazensolida proposta por Herz e Goedken (1982)



As lactonas sesquiterpênicas pertencem a classe dos sesquiterpenos por possuírem 15 carbonos no seu esqueleto básico (BRUNETON, 1999). Estão distribuídas em diversas subclassificações, todas originadas do esqueleto ciclodecadieno, podendo ser denominada de germacronolida, por possuir um anel central de 10 membros. Na ramificação das classes, as germacronolidas podem ser divididas em subgrupos com base na configuração das ligações duplas do ciclodecadieno. O subgrupo heliangolida apresenta um esqueleto 1(10)-*trans*,4-*cis*. Compostos deste subgrupo que possuem um átomo de oxigênio ligando C-3 e C-10 são denominados furanoeliangolida. A goiazensolida pertence a subclasse furanoeliangolida (ARAGÃO, 2007).

As atividades farmacológicas, como esquistossomicida, citotóxica e anti-inflamatória, dessas lactonas sesquiterpênicas são mediadas quimicamente pelas carbonilas  $\alpha,\beta$ -insaturadas em suas estruturas, como o grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, ciclopentenona  $\alpha,\beta$ -insaturada e ésteres conjugados (RÜNGELER et al., 1999). As eremantolidas, que não possuem em sua estrutura química o grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, podem apresentar o C-5 do sistema vinilfuranona conjugado como o centro eletrofílico responsável pela atividade farmacológica (MCDOUGAL; OH; VANDERVEER, 1989), como apresentado na Figura 3.

**Figura 3** – Estrutura química da eremantolida C



A goiazensolida mostrou atividade inibitória sobre o fator mediador central da resposta imune (NF- $\kappa$ B), devido à presença de centros reativos na molécula como o grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona (RÜNGELER et al., 1999); foi capaz de ativar a caspase-3 induzindo apoptose de células de leucemia (REN et al., 2018); apresentou atividade inibitória do crescimento de células tumorais de schwannoma e meningioma (SPEAR et al., 2013) e da supressão da ativação gênica induzida por c-myb, um novo mecanismo para a potencial atividade anticâncer, principalmente de mama e cólon (SCHOMBURG et al., 2013).

Dentre estas atividades farmacológicas, existem estudos mais aprofundados acerca da atividade anti-hiperuricêmica da goiazensolida (BERNARDES et al., 2019). A gota, uma artrite inflamatória causada pela deposição de ácido úrico nas articulações, está associada à hiperuricemia (SMITH et al., 2010).

Os mecanismos para o tratamento da gota e da hiperuricemia envolvem o uso de um inibidor da xantina oxidase para reduzir a produção de urato ou o uso de um agente uricosúrico para aumentar a excreção de ácido úrico. A longo prazo, a terapia compreende principalmente a redução dos níveis de urato no sangue (REESET et al., 2013).

Segundo Bernardes e colaboradores (2019) a goiazensolida apresenta atividade anti-hiperuricêmica nas doses de 5,0 e 10,0 mg/kg em camundongos Swiss (0,025 kg) e pode atuar por um ou ambos os mecanismos citados anteriormente, conforme a dose administrada (BERNARDES et al., 2019).

O alopurinol é o fármaco de escolha para o tratamento da hiperuricemia, o qual inibe a enzima xantina oxidase. Porém, o seu uso está associado a diversos efeitos adversos que incluem intolerância gastrointestinal, erupção cutânea, eosinofilia, febre, hepatite, insuficiência renal progressiva e cálculos renais (KIM et al., 2013; CRITTENDEN; PILLINGER, 2012).

Uma vez que a goiazensolida se encontra em avaliação dos parâmetros biofarmacêuticos e ainda não é um fármaco, não possui uma dose estabelecida para a administração oral em humanos. Quando a dose não é conhecida em uma espécie em particular, como em humanos, pode-se estimá-la baseando-se em informações obtidas de outras espécies (SHARMA; McNEIL, 2009).

Escalas alométricas interespecies são baseadas na hipótese de que existem similaridades anatômicas, fisiológicas e bioquímicas entre alguns animais, as quais podem ser descritas por modelos matemáticos (MAHMOOD, 2007).

Os cálculos da extrapolação alométrica da dose da goiazensolida, proposta para um humano, a partir daquela identificada como ativa em camundongos Swiss, seguem as equações descritas em Equação 1.

**Equação 1** – Equações utilizadas para a extrapolação alométrica da dose baseadas na taxa metabólica basal (TBM) (FREITAS; CARREGARO, 2013)

TBM do animal referência (TBM<sub>ref</sub>)

$$TBM_{ref} = K \times M^{0,75}$$

TBM do animal alvo (TBM<sub>alvo</sub>)

$$TBM_{alvo} = K \times M^{0,75}$$

$$Dose = \frac{Dose\ total\ do\ animal\ de\ referência\ (mg)}{TBM_{ref}} \times TBM_{alvo}$$

Onde: TBM é a taxa metabólica basal

K é a constante dos grandes grupos taxonômicos (mamíferos placentários = 70)

M é a massa corporal

Sendo assim, essa lactona sesquiterpênica é um promissor agente hipouricêmico para o tratamento da hiperuricemia e gota. Isto justifica sua avaliação biofarmacêutica, além do

estudo de sua estabilidade em meios tamponados que simulam os líquidos do TGI, para contribuir com os resultados necessários a avaliação do potencial para esta substância vir a se tornar um fármaco, visto que, estas são características determinantes da biodisponibilidade oral.

### 3.2 Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)

A biodisponibilidade oral de fármacos é influenciada por diversos fatores, dentre eles: a motilidade gastrointestinal, presença de alimentos, o fluxo sanguíneo na superfície de absorção, pH gastrointestinal e mecanismos de transporte através das membranas (MARTINEZ; AMIDON, 2002). Para as formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata (FFSOLI) a absorção do fármaco é controlada basicamente pela dissolução a partir da forma farmacêutica, solubilidade nos líquidos biológicos e permeabilidade nas células das membranas do trato gastrointestinal (AMIDON et al., 1995).

Os estudos *in vitro* que visam prever o comportamento *in vivo* dos medicamentos têm como um dos objetivos substituir os testes realizados em humanos, como os estudos de bioequivalência (BE) e/ou biodisponibilidade relativa *in vivo*. Os estudos de BE podem ser mais demorados, onerosos e levam em consideração as questões éticas por expor indivíduos sadios a ensaios clínicos (BRASIL, 2010a).

Assim, Amidon e colaboradores (1995) propuseram o SCB como forma de agrupar os fármacos em quatro classes diferentes com base nas propriedades de solubilidade e permeabilidade, já que essas estão diretamente relacionadas com a absorção. As classes são:

- Classe I: fármacos de alta solubilidade e permeabilidade;
- Classe II: fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade;
- Classe III: fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade;
- Classe IV: fármacos de baixa solubilidade e permeabilidade.

Cada uma das quatro classes apresenta fatores limitantes de absorção. Para a classe I, o fator limitante é a velocidade de dissolução ou de esvaziamento gástrico, caso a dissolução seja muito rápida. Para a classe II, o fator limitante é a dissolução *in vivo*. Para a classe III, a própria permeabilidade é fator limitante, devido ser baixa. Para a classe IV, a solubilidade e a permeabilidade são baixas e com isso os fármacos dessa classe apresentam problemas para serem absorvidos após administrados por via oral (AMIDON et al., 1995).

Desde que o SCB foi proposto, o sistema tem tido grande impacto na prática regulatória mundial, visto que serve como subsídio para as bioisenções de novos medicamentos sob a forma farmacêutica sólida de administração oral e velocidade de liberação imediata (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004).

Diversas agências regulatórias como *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e também a Organização Mundial da Saúde (OMS), aderiram ao processo de avaliação da possibilidade de bioisentar novos produtos baseando-se inicialmente na classificação do fármaco segundo o SCB (BRASIL, 2011; EMA, 2010; FDA, 2017; WHO, 2017).

Entretanto, o SCB não tem aplicações somente regulatórias. Muitas substâncias candidatas a fármaco são avaliadas por meio de triagem, onde os candidatos promissores passam por testes *in vitro* e, posteriormente, por testes *in vivo*. Os testes *in vivo* de permeabilidade e os testes *in vitro* de solubilidade requeridos para a alocação em uma classe do SCB proporcionam resultados correlacionáveis a biodisponibilidade *in vivo*, assim podem auxiliar nos processos de desenvolvimento de fármacos evitando tempo e custos com moléculas que, *in vivo*, não apresentarão absorção oral adequada ao objetivo terapêutico pretendido. Dessa forma, o estudo biofarmacêutico contribui nos processos preliminares de desenvolvimento de medicamentos, na medida em que prevê o comportamento *in vivo* por meio dos parâmetros solubilidade e permeabilidade (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; PEREIRA, 2011).

Por conseguinte, a avaliação biofarmacêutica adequada de novas substâncias pode resultar futuramente em fármacos com alta permeabilidade, solubilidade e velocidade de dissolução. Diante disto, o SCB pode ser tanto para fins regulatórios ao longo do tempo, quanto para auxiliar no registro de novos fármacos e medicamentos (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005).

### 3.3 Solubilidade

A definição de solubilidade é dada como a quantidade máxima de soluto dissolvida em uma solução saturada a uma dada temperatura, referindo-se em termos de proporção de soluto no solvente (IUPAC, 2014; FELTRE, 2004). Em termos qualitativos, a solubilidade pode ser definida como a interação espontânea de duas ou mais substâncias para formar uma dispersão molecular homogênea (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010).

Existem duas classificações para a solubilidade: solubilidade cinética, que é a concentração do composto no momento em que ocorre a primeira precipitação provocada na

solução; e solubilidade em equilíbrio, que é a concentração de um composto em uma solução saturada quando há excesso de sólido e há equilíbrio entre a solução e o sólido (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2008).

O conhecimento da solubilidade do fármaco nos líquidos do trato gastrointestinal é um parâmetro de grande importância para a previsão da sua concentração na circulação sistêmica, que por sua vez, comumente correlaciona-se com a resposta farmacológica desejada (VEMULA; LAGISHETTY; INGALA, 2010). Para fármacos pouco solúveis em água, muitas vezes são necessárias doses elevadas para se atingir a concentração plasmática terapêutica após administração oral. Esta baixa solubilidade em água é o principal problema encontrado durante o desenvolvimento de formulações, visto que, para o fármaco ser absorvido, este deve estar presente sob a forma de solução aquosa no local de absorção (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012).

Somente sob forma de solução aquosa o fármaco pode ser absorvido, seja por difusão passiva, transporte ativo, transporte facilitado ou transporte por par iônico (PANCHAGNULA; THOMAS, 2000).

A solubilidade aquosa do fármaco pode ser correlacionada com suas características moleculares, com as propriedades intermoleculares, dentre elas a capacidade em formar ligações de hidrogênio com a água. Geralmente, quanto maior a solubilidade, maior o número de ligações de hidrogênio que podem ser formadas com a água (MARTINEZ; AMIDON, 2002).

As propriedades físico-químicas do fármaco e/ou do solvente influenciam diretamente na solubilidade, que é variável de acordo com fatores como: temperatura, pH, tamanho de partícula e polimorfismo (BABU; AREEFULLA; MALLIKARJUN, 2010).

O método da agitação orbital em frasco, conhecido como *shake-flask*, é o mais indicado pelas agências regulatórias mundiais para realização dos estudos de solubilidade em equilíbrio. Outros métodos também são conhecidos, como a titulação ácido ou base, dissolução intrínseca e diagrama de fases, os quais podem ser utilizados bastando uma justificativa de que eles são capazes de prever a solubilidade de equilíbrio (FDA, 2017; EMA, 2010; BRASIL, 2011).

Segundo o SCB, um fármaco é considerado altamente solúvel quando a maior dose disponível no mercado apresenta razão dose/solubilidade inferior ou igual a 250,0 mL, em um intervalo de pH de 1,0 a 8,0 à temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C (MARTINEZ; AMIDON, 2002) e o cálculo é realizado de acordo com a Equação 2.

**Equação 2** – Equação para o cálculo da solubilidade de fármacos segundo o SCB

$$D/S = \frac{\text{Dose (mg)}}{\text{Solubilidade (mg/mL)}}$$

Onde: D/S é a razão dose/solubilidade

Dose (mg) é a maior dose disponível comercialmente no país ou maior dose administrada

Solubilidade (mg/mL) é a solubilidade determinada experimentalmente

De acordo com a FDA (FDA, 2017) e a EMA (EMA, 2010) a classificação da solubilidade de um fármaco é determinada em soluções tamponadas na extensão de pH 1,0 a pH 6,8, à temperatura de  $37,0 \pm 1,0$  °C. Para o cálculo da D/S, a FDA considera a maior dose disponível no mercado e por sua vez, a EMA considera a maior dose administrada de uma única vez.

Segundo descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (BRASIL, 2019), pela ANVISA (BRASIL, 2011) e pela OMS (WHO, 2017) a faixa de pH fisiológico determinada para o estudo de solubilidade varia de 1,2 a 6,8 também à temperatura de  $37,0 \pm 1,0$  °C. Ambas agências regulatórias adotam para o cálculo da D/S, assim como a EMA, a dose terapêutica mais elevada.

As agências recomendam número mínimo de três replicatas para a determinação da solubilidade em cada condição de pH a ser testado.

### **3.3.1 Método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”) para determinação da solubilidade**

Para a determinação da solubilidade em equilíbrio utilizando o método da agitação orbital em frasco, são indicadas soluções aquosas tamponadas com pH entre 1,2 e 6,8 (BRASIL, 2019). Na RDC nº 37, de 03 de agosto de 2011 são determinadas soluções aquosas com valores de pH de 1,2; 4,5 e 6,8 (BRASIL, 2011).

O ensaio é feito em triplicata onde quantidade em excesso da substância, normalmente 10 % acima do valor estimado de solubilidade, é adicionada em frascos contendo estes meios tamponados. A amostra em excesso resulta em solução saturada que é caracterizada pela presença de material excedente não dissolvido (MONTEIRO, 2014).

Os frascos contendo as soluções saturadas são então agitados a  $37,0 \pm 1,0$  °C durante tempo definido a velocidade constante, geralmente 100 rpm. São realizadas coletas sucessivas

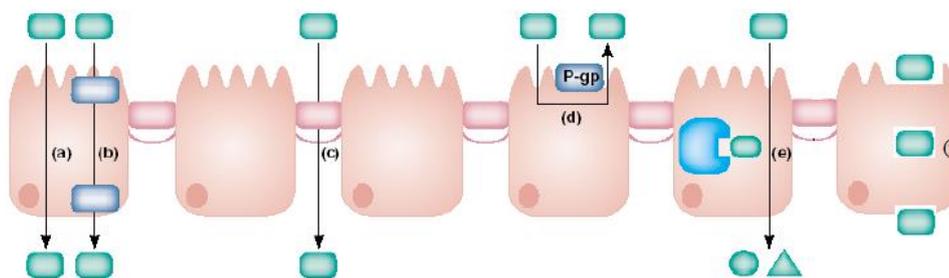
em tempos pré-determinados e o meio tamponado repostado a cada coleta. As alíquotas coletadas durante o experimento ao serem somadas não devem ultrapassar 10 % do volume total de solução, devido à possibilidade de diluição ao realizar a reposição do volume retirado. Esse procedimento é necessário para manter a hidrodinâmica do sistema e a quantidade de IFA acima do ponto de saturação. Após ser atingido o estado de equilíbrio da solução saturada, a solubilidade em equilíbrio pode ser determinada. Para confirmação da obtenção do equilíbrio entre as fases, a solubilidade deve ser constante em determinações realizadas em tempos consecutivos. A amostra coletada é filtrada e a concentração do composto no filtrado é quantificada utilizando método previamente validado. Os resultados têm a finalidade de determinar quando o equilíbrio foi atingido, ou seja, quando duas amostras sucessivas apresentam a mesma concentração (GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005; MONTEIRO, 2014, BRASIL, 2019).

### **3.4 Permeabilidade**

Além de possuir eficácia clínica comprovada, uma substância candidata a fármaco deve ser estável nos líquidos biológicos e se solubilizar nestes para poder ser absorvida após administrada por via oral. Uma vez solubilizada a molécula deve atravessar as membranas do trato gastrointestinal em velocidade e quantidade compatível com a dose terapêutica para que atinja a circulação sistêmica e conseqüentemente esteja disponível para ser distribuída e chegar em seu local de ação (SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

As células intestinais chamadas de enterócitos são as responsáveis pela maior parte da absorção de nutrientes e fármacos no duodeno, região esta responsável por 90 % de toda a absorção. Comumente, os mecanismos de transporte de fármacos se dão através dos enterócitos ou das junções intracelulares por difusão passiva, mecanismos denominados de transcelular e paracelular, respectivamente. Também existem mecanismos de permeação mediados por transportadores, tanto de influxo quanto de efluxo, bem como a endocitose que permite a internalização do fármaco por invaginação da membrana, como indicados na Figura 4 (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

**Figura 4** – Mecanismos de transporte de fármacos através da membrana intestinal



Onde (a) representa o transporte passivo transcelular do lado apical para o lado basolateral; (b) transporte mediado por carreadores de membrana; (c) transporte passivo paracelular; (d) transporte mediado por carreadores de efluxo; (e) enzimas metabolizadoras e (f) endocitose.

FONTE: Adaptado de REIS, 2013.

Diversos fatores afetam a permeabilidade e absorção de substâncias por via oral, tais como: 1) fisiológicos relacionados ao trato gastrointestinal (tempo de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal de várias formas farmacêuticas, presença de enzimas no lúmen); 2) características físico-químicas do fármaco ( $pK_a$ , caráter lipofílico, massa molecular e solubilidade); 3) influência da forma farmacêutica e seus excipientes (velocidade e extensão de desintegração e dissolução, além de excipientes que alteram a velocidade e/ou extensão de absorção) (ASHFORD, 2005; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007).

Os métodos para a determinação da permeabilidade são muitos, dentre eles os: métodos *in vivo* em seres humanos que são estudos de biodisponibilidade absoluta, estudos de balanço de massa e estudos de perfusão intestinal; métodos de perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ* em modelo animal; métodos *in vitro* utilizando seções de tecidos intestinais de origem humana ou animal ou modelos com cultura celular. Nestes últimos, normalmente são empregadas células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), células *Madin-Darby* de rim canino (MDCK) e células TC-7, que são subclones isolados das células Caco-2. Para a avaliação preliminar da permeabilidade podem ser utilizados também sistemas artificiais, como o ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela (PAMPA) e métodos *in silico*, que empregam programas computacionais para a previsão da permeabilidade de acordo com a estrutura química da substância (BUENO; RECH, 2009; SOUZA; FREITAS; STORPIRTIS, 2007; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Um fármaco é considerado de alta permeabilidade quando a extensão da sua absorção é igual ou superior a 85 % da dose administrada em humanos. As agências regulatórias

recomendam como métodos para determinação da permeabilidade a biodisponibilidade absoluta, o balanço de massas e a perfusão intestinal em seres humanos, assim como a perfusão intestinal em animais e a permeabilidade em modelos celulares (FDA, 2017; WHO, 2017; EMA, 2010; BRASIL, 2011, BRASIL, 2019).

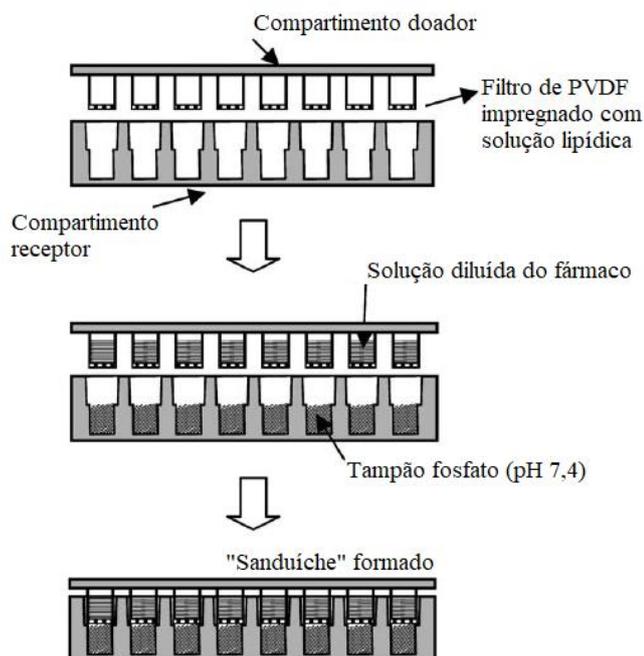
A permeabilidade é um parâmetro importante para a classificação segundo o SCB e pode ser um limitante da absorção de fármacos, principalmente quando é caracterizada como baixa, que é o caso dos fármacos das classes III e IV do SCB (FALLER, 2008).

### **3.4.1 Ensaio em membrana artificial paralela (PAMPA) para determinação da permeabilidade**

O ensaio de permeabilidade em membrana artificial paralela, PAMPA, foi proposto por Kansy, Senner e Gubernator (1998) e baseia-se em sistemas artificiais compostos por lipídeos.

O mecanismo em que ocorre a avaliação da permeabilidade de fármacos é o transcelular, dado que não há expressão de transportadores. O método consiste na formação de um “sanduíche” onde duas placas de 96 poços estão acopladas. Uma placa é chamada de compartimento doador, na qual a substância a ser avaliada está solubilizada em tampão, com pH variando de 3,0 a 10,0 mimetizando o lúmen intestinal e a outra placa é denominada compartimento receptor, a qual recebe apenas solução tampão, usualmente com tampão fosfato (pH 7,4) mimetizando a corrente sanguínea. Na base do compartimento doador existe um filtro, geralmente composto de polivinildifluorideno (PVDF), impregnado por lipídeo dissolvido em solvente orgânico, o qual gera uma membrana que mimetiza a mucosa intestinal. Durante a realização do ensaio, o fármaco em solução migra do compartimento doador para o compartimento receptor por difusão passiva (KANSY et al., 1998; REIS, 2013; AVDEEF, 2005) como mostrado na Figura 5.

**Figura 5** - Esquema do procedimento de avaliação da permeabilidade pelo método PAMPA



FONTE: Adaptado de CHEN et al., 2008.

Este ensaio *in vitro* se destaca por ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo, que pode prever a absorção *in vivo* de fármacos já existentes, de novas moléculas candidatas a fármaco e de substâncias bioativas. É normalmente empregado para prever a permeabilidade no trato gastrointestinal, na pele e barreira hematoencefálica. O PAMPA pode também gerar informações sobre o caráter lipofílico, o estado de carga em diferentes valores de pH e indiretamente a solubilidade do fármaco. Além disso, é uma técnica simples, que não faz o uso de animais e/ou culturas celulares e os resultados obtidos são, muitas vezes, correlacionáveis aos demais modelos (KANSY et al., 1998; BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

O PAMPA é considerado um modelo pertinente para avaliação da absorção durante o período exploratório e de triagem prévia de grande número de substâncias. Conhecendo a permeabilidade de uma substância por difusão passiva também é possível aperfeiçoar a permeabilidade através de modificações estruturais, o que é considerado mais simples do que o processo de otimização de afinidade pelo transportador, como acontece no transporte ativo (KERNS et al., 2004).

Para a análise dos resultados é realizado o cálculo de permeabilidade efetiva (Equação 3), que leva em consideração os seguintes parâmetros:  $V_D$  = volume do compartimento doador;  $A$  = área da membrana ( $0,3 \text{ cm}^2$ );  $t$  = tempo de incubação da placa em segundos;  $\tau_{ss}$  = tempo necessário para saturar a membrana ( $54.R_M+1$ ).60s;  $\epsilon_a$  = porosidade aparente do filtro de PVDF

(0,76) (NIELSEN e AVDEEF, 2004);  $r_v^{-1}$  = razão do volume dos compartimentos doador e receptor;  $C_A(t)$  e  $C_D(0)$  = concentrações em mol/mL das amostras presentes no compartimento receptor ao final do ensaio e no compartimento doador no tempo zero, respectivamente (AVDEEF, 2003; REIS, 2013).

**Equação 3** – Equação utilizada para o cálculo da Permeabilidade efetiva ( $P_{eff}$ ) obtida nos ensaios PAMPA

$$P_{eff} = -\frac{2,303 V_D}{A (t - \tau_{ss}) \varepsilon_a} \cdot \left( \frac{1}{1 + r_v} \right) \cdot \log_{10} \left[ 1 - \frac{1 + r_v^{-1}}{1 - R_M} \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right]$$

A Equação 4 permite a avaliação da possível retenção do fármaco nas membranas e se esta retenção irá interferir no resultado do cálculo de permeabilidade (AVDEEF, 2003).

**Equação 4** – Equação para o cálculo da quantidade de substância que fica retida na membrana

$$R_M = 1 - \left( \frac{m_{D(t)}}{m_{D(0)}} \right) - \left( \frac{m_{A(t)}}{m_{D(0)}} \right)$$

Onde:  $m_{D(t)}$  e  $m_{D(0)}$  são as concentrações em mol/mL das amostras presentes no compartimento doador ao final do ensaio e no tempo zero, respectivamente

$m_{A(t)}$  concentração em mol/mL das amostras presentes no compartimento receptor ao final do ensaio (AVDEEF, 2012).

A retenção dos fármacos nas membranas dos modelos *in vitro* torna-se um fator limitante para a predição da permeabilidade de substâncias. Portanto, não é esperado encontrar valores altos de  $R_M$  uma vez que nas condições *in vivo*, na região do intestino delgado, o sistema é dinâmico e não ocorre retenção. O cálculo da retenção de massa na membrana pode apresentar valores de 0 a 1 (AVDEEF, 2012).

Os valores calculados de permeabilidade efetiva são então comparados a valores obtidos de fármacos previamente estabelecidos como padrões de alta e baixa permeabilidade e, assim, pode-se concluir acerca da permeabilidade e processo de absorção da substância estudada.

### 3.5 Métodos *in silico* para determinação da solubilidade e permeabilidade

Os métodos *in silico* são baseados em programas computacionais que podem prever a absorção *in vivo* a partir dos resultados obtidos da análise das características de solubilidade e permeabilidade de substâncias com base no caráter lipofílico, no potencial de ligações de hidrogênio, no tamanho molecular e em propriedades quânticas (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

Os objetivos destes métodos abrangem auxiliar o processo de descoberta de fármacos evitando experimentos com milhares de compostos que não apresentam características de permeabilidade intestinal adequadas para obter boa biodisponibilidade oral, além de direcionar a síntese química de fármacos, uma vez que são capazes de minimizar o tempo gasto para tal (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000).

A “Regra dos Cinco”, proposta por Lipinski e colaboradores (2001), é um método *in silico* muito utilizado para avaliação inicial das características físico-químicas de novos candidatos a fármaco. Essa regra define alguns parâmetros que devem ser avaliados para determinar se uma substância apresenta absorção quando administrada pela via oral. Os parâmetros são: apresentar até cinco ligações doadoras de hidrogênio; até dez ligações aceptoras de hidrogênio; massa molecular inferior a 500,0 g/mol e cLogP inferior a 5,0. A exceção de dois ou mais desses limites significa que a substância em questão muito provavelmente não será promissora como fármaco (LIPINSKI et al., 2001).

A análise da permeabilidade por meio do método *in silico* não leva em consideração os transportadores de membrana e mecanismos que podem interferir na permeação por difusão passiva do fármaco (WATERNEEMD, GIFFORD, 2003). Assim, a técnica, apesar de vantajosa no processo de descoberta de novos fármacos, apresenta o mecanismo ativo de transporte como fator limitante na predição da absorção por programas computacionais.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Substância biologicamente ativa

A goiazensolida utilizada nesse trabalho foi previamente isolada do extrato clorofórmico das partes aéreas de *Lychnophora passerina* (Mart ex DC) Gardn como descrito por Ugoline e colaboradores (2017) e fornecida pela Profa. Dr<sup>a</sup>. Dênia Antunes Saúde Guimarães, do Laboratório de Plantas Mediciniais (LAPLAMED), CiPharma/Escola de Farmácia/UFOP.

A goiazensolida usada neste trabalho foi isolada do extrato clorofórmico de partes aéreas de *L. passerina* provenientes de uma única coleta.

#### 4.1.2 Substância Química de Referência (SQR)

Cloridrato de propranolol SQR, fornecido pelo INCQS, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 1005, teor de 100,1 %.

Furosemida SQR, fornecida pelo INCQS, proveniente da Farmacopeia Brasileira, lote 1002, teor de 100,0 %.

#### 4.1.3 Equipamentos e utensílios

Analisador térmico, DTG-60 - Shimadzu<sup>®</sup>

Aparelho de ponto de fusão, modelo M-560 - Büchi<sup>®</sup>

Balança analítica, modelo AUX 220, com precisão de 10,0 mg - Shimadzu<sup>®</sup>

Balança analítica, modelo AUX 220D, com precisão de 1,0 mg – Shimadzu<sup>®</sup>

Balões volumétricos

Bastão de vidro

Béqueres

Bomba de vácuo, modelo MA 057/12 - Marconi

Calorímetro de varredura diferencial, DSC-60 - Shimadzu<sup>®</sup>

Coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) Luna<sup>®</sup> - Phenomenex

Coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) Nucleosil® 100-3 - Macherey-Nagel  
Coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) Zorbax Eclipse XDB - Agilent®  
Coluna cromatográfica C18 (50 mm x 4,6 mm x 5 µm) – Varian®  
Coluna cromatográfica C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) Nucleosil® 100-5 - Macherey-Nagel  
Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Alliance® e2695, com detector de arranjo de diodos (DAD) 2996 - Waters, software Empower® versão 2  
Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Alliance® e2695, com detector UV/visível 2489 e Fluorescência 2475 - Waters, software Empower® versão 2  
Destilador - Cristófoli  
Eppendorfs®  
Erlenmeyers  
Estufa de secagem e esterilização, modelo 315 SE – Fanem  
Funil analítico  
Incubadora Shaker KS 4000 i control - IKA®  
Lavadora ultrassônica - Unique  
Membrana filtrante em nylon - 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro - Millipore  
pHmetro – Hanna  
Pipetas Gilson, volume ajustável de 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL e 1000 – 5000 µL, modelo Pipetman  
Pipetas Kasvi, volume ajustável de 10 - 100 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL  
Placa Multiscreen® IP, membrana imobilizada em PVDF 0,45 µm transparente não estéril com 96 poços - Millipore  
Placa Multiscreen® com 96 poços receptora de fármacos – Millipore  
Ponteiras plásticas  
Provetas  
Sistema de purificação de água, modelo Direct-Q3 e Q8 - Millipore  
Unidade filtrante Millex® GV com membrana de PVDF com poros de 0,45 µm - Millipore  
Vials de vidro âmbar de 2 mL com tampa de rosca e septo de borracha – Waters

#### **4.1.4 Reagentes e solventes**

Acetato de sódio triidratado - Vetec  
Acetonitrila grau cromatográfico – J.T. Baker  
Ácido acético glacial - Vetec

Ácido clorídrico - Próquimios

Água ultrapura

Cloreto de sódio - Neon

Dimetilsulfóxido (DMSO) – Próquimios

Dodecano - Sigma-Aldrich

Fosfatidilcolina de ovo (Lipoid E PC S<sup>®</sup>) – Lipoid 97,4 %

Fosfato de potássio monobásico - Vetec

Hidróxido de sódio - Vetec

Metanol grau cromatográfico – JTBaker

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Caracterização da substância biologicamente ativa**

#### **4.2.1.1 Análise do ponto de fusão**

A determinação do ponto de fusão foi realizada em aparelho manual modelo Melting point M-560 – Büchi<sup>®</sup> (LAPLAMED), CiPharma/UFOP. A goiazensolida foi introduzida em um capilar de vidro e levada ao equipamento para a determinação da faixa de fusão, a qual foi comparada aos valores encontrados na literatura (VICHNEWSKI et al., 1976; UGOLINE et al., 2017).

#### **4.2.1.2 Análise térmica**

As técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) foram empregadas para caracterizar a goiazensolida. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise Térmica do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais em colaboração com Prof. Dr. Wagner da Nova Mussel e Dr<sup>a</sup>. Maria Betânia de Freitas Marques.

A curva DSC foi obtida na célula DSC-60 da Shimadzu<sup>®</sup>, calibrada com Índio (fusão:  $T_{\text{onset}} = 156,63 \text{ } ^\circ\text{C}$ ;  $\Delta H_{\text{fus}} = 28,45 \text{ J/g}^{-1}$ ). A massa de amostra pesada foi exatamente cerca de 1,5 mg. A amostra foi acondicionada em cadinho de alumínio fechado sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de  $50,0 \text{ mL/min}^{-1}$ , razão de aquecimento de  $10,0 \text{ } ^\circ\text{C/min}^{-1}$ , com aquecimento de  $30,0$  a  $400,0 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

As curvas TG foram obtidas na termobalança DTG-60 da Shimadzu<sup>®</sup>. A massa de amostra pesada foi exatamente cerca de 2,5 mg. A amostra foi acondicionada em cadinhos de alumina com razão de aquecimento de 10,0 °C/min<sup>-1</sup> de 30,0 a 600,0 °C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50,0 mL/min<sup>-1</sup> e em atmosfera dinâmica de oxigênio com vazão de 50,0 mL/min<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2 Determinação da permeabilidade *in silico* e estimativa do pK<sub>a</sub> da goiazensolida

Para prever a permeabilidade *in silico* da goiazensolida e estimar o seu pK<sub>a</sub>, foi necessário a avaliação das características físico-químicas da molécula por meio de três programas computacionais: MarvinSketch<sup>®</sup> disponível em: <http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>, Molinspiration<sup>®</sup> disponível em: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> e Osiris Property Explorer<sup>®</sup> disponível em: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>.

A estrutura química da goiazensolida foi desenhada nos três programas computacionais. Dessa forma, os descritores moleculares transformaram as informações químicas fornecidas em dados numéricos, os quais foram relacionados com as características de absorção gastrointestinal.

#### 4.2.3 Determinação da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”) e sua estabilidade em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)

##### 4.2.3.1 Preparo da solução estoque da goiazensolida

Foram pesados exatamente 10,0 mg da goiazensolida e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume com metanol grau cromatográfico. Assim, uma solução com concentração de 1000,0 µg/mL da goiazensolida foi obtida e utilizada.

##### 4.2.3.2 Preparo das soluções diluídas

Para o preparo das soluções diluídas, foram pipetadas alíquotas da solução estoque, e o volume foi completado com o respectivo meio tamponado: fluido gástrico simulado sem

enzimas - FGSSE (pH 1,2), tampão acetato - TA (pH 4,5) ou fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8), como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Preparo das soluções diluídas da goiazensolida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) utilizadas nos estudos de solubilidade em equilíbrio

Alíquota da SE (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração (µg/mL)
0,100	10,0	10,0
0,200		20,0
0,300		30,0
0,400		40,0
0,500		50,0

Em seguida, as soluções foram filtradas em unidades filtrantes Millex<sup>®</sup> de 0,45 µm de poro e incluídas diretamente no recipiente a ser levado ao cromatógrafo para quantificação (*vial*).

#### 4.2.3.3 Preparo das soluções tampão

Os meios tamponados foram preparados conforme descritos nas Farmacopeias Americana 37<sup>a</sup> Edição e Brasileira 6<sup>a</sup> Edição (UNITED STATES, 2014, BRASIL, 2019). O pH das soluções foi medido ao final do preparo e corrigido, se necessário, com soluções de HCl 1,0 mol/L ou NaOH 1,0 mol/L.

O fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2) foi preparado adicionando 2,0 g de cloreto de sódio e 7,0 mL de ácido clorídrico em um balão volumétrico de 1,0 L e foi completado o volume com água ultra purificada. O tampão acetato - TA (pH 4,5) foi preparado adicionando 2,9 g de acetato de sódio triidratado e 14,0 mL de ácido acético 2,0 mol/L em um balão volumétrico de 1,0 L e foi completado o volume com água ultra purificada. E o fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) foi preparado adicionando 250,0 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 mol/L e 112,0 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,2 M em um balão volumétrico de 1,0 L e foi completado o volume com água ultra purificada.

#### **4.2.3.4 Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)**

O método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) foi proposto a partir do método desenvolvido e validado por Ugoline e colaboradores (2017). Para tal, foi utilizado o cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters Alliance<sup>®</sup> e2695, com detector de arranjo de diodos (DAD) e software Empower<sup>®</sup> versão 2.

Durante o desenvolvimento do método analítico, diferentes colunas cromatográficas foram testadas, alterando também as composições e proporções de fases móveis.

Os parâmetros de adequação do sistema, tais como: número de pratos teóricos por coluna, assimetria de pico e tempo de retenção foram utilizados para a escolha das condições cromatográficas consideradas apropriadas à aplicação do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida.

#### **4.2.3.5 Validação do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)**

O método cromatográfico para quantificação da goiazensolida foi validado seguindo a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017).

Os parâmetros linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, e robustez foram analisados por meio de cálculos e tratamentos estatísticos nos programas *Microsoft Excel*<sup>®</sup> 2019 e *GraphPad Prism*<sup>®</sup> 5.01.

Para cada dia da validação três soluções estoques foram preparadas de forma independente e cada solução estoque (SE) resultou em uma curva analítica.

##### **4.2.3.5.1 Linearidade**

A linearidade do método cromatográfico foi avaliada a partir da construção de curvas analíticas com cinco concentrações diferentes da goiazensolida que variaram na faixa de 10,0 µg/mL a 50,0 µg/mL em cada um dos três meios tamponados: FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).

A proporção de solvente orgânico empregado não foi superior a 10,0 % do volume total de solução, o que é apresentado na Tabela 1.

A linearidade do método foi determinada a partir da análise dos coeficientes de determinação e correlação ( $r^2$  e  $r$ ), dos resíduos da regressão e da equação da reta estimada pelo método dos mínimos quadrados. Foram avaliadas também a significância do coeficiente angular ( $b$ ) e as premissas relativas à regressão (BRASIL, 2017).

#### **4.2.3.5.2 Seletividade**

A avaliação da seletividade do método cromatográfico foi realizada a partir da exposição de soluções da goiazensolida a condições de degradação ácida, básica e térmica.

Na degradação ácida, foram adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico 0,5 mol/L em 1,0 mL de soluções a 300,0  $\mu\text{g/mL}$  da goiazensolida. As soluções foram armazenadas protegidas da luz e em temperatura ambiente por um período de 24 horas (h). Após esse tempo, foram adicionados 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,5 mol/L para neutralização. Dessa solução resultante, foram pipetados 400,0  $\mu\text{L}$  e diluídos em 2,0 mL de cada um dos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8). Em seguida, as soluções foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro e incluídas diretamente no *vial* para quantificação por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado.

Na degradação básica, foram adicionados 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,1 mol/L em 1,0 mL de soluções a 300,0  $\mu\text{g/mL}$  da goiazensolida. As soluções foram armazenadas protegidas da luz e em temperatura ambiente por um período de 24 h. Após esse tempo, foram adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L para neutralização. Dessa solução resultante, foram pipetados 400,0  $\mu\text{L}$  e diluídos em 2,0 mL de cada um dos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8). Em seguida, as soluções foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro e incluídas diretamente no *vial* para quantificação por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado.

Por fim, na degradação térmica, foram pipetados 200,0  $\mu\text{L}$  da SE e diluídos em 10,0 mL de cada um dos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8). As soluções foram armazenadas em estufa a 55,0  $^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5,0$   $^{\circ}\text{C}$ ) por 24 h. Logo após esse período, as soluções foram colocadas a temperatura ambiente e 1,0 mL de cada solução foi pipetado, filtrado em unidades filtrantes de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro e incluído diretamente no *vial* para quantificação por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado.

As soluções diluídas, em cada exposição de degradação, tiveram como concentração final 20,0 µg/mL.

A pureza de pico foi avaliada para atestar a ausência de co-eluição de outras substâncias interferentes junto ao sinal cromatográfico da goiazensolida.

As áreas dos picos referentes a goiazensolida após a degradação ácida, básica e térmica foram comparadas com amostras que não foram submetidas aos respectivos tratamentos.

#### **4.2.3.5.3 Precisão**

A precisão do método cromatográfico foi analisada para os meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) por meio da repetibilidade (precisão intracorrída) nos níveis de concentração: baixa (10,0 µg/mL), média (30,0 µg/mL) e alta (50,0 µg/mL), em triplicata e da precisão intermediária (precisão intercorrída) a qual foi realizada da mesma maneira que a repetibilidade, porém em dois dias consecutivos.

A repetibilidade resultou em 9 determinações e a precisão intermediária, em 18 determinações. O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para cada uma das concentrações empregadas utilizando a equação matemática apresentada a seguir (Equação 5), e não foram aceitos valores superiores a 5,0 % (TAVENIERS; LOOSE; BOCKTAELE, 2004).

**Equação 5** – Equação matemática usada para o cálculo do DPR para a avaliação da precisão do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)

$$\text{DPR} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

#### **4.2.3.5.4 Exatidão**

Da mesma forma que a precisão, a exatidão deve ser calculada para os meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) a partir de determinações em três níveis de concentração: baixa (10,0 µg/mL), média (30,0 µg/mL) e alta (50,0 µg/mL), em triplicata.

A exatidão foi calculada para cada uma das concentrações empregadas utilizando a equação matemática apresentada a seguir (Equação 6).

Os valores obtidos devem estar dentro da faixa de 95,0 a 105,0 % (KUMAR et al., 2012).

**Equação 6** – Equação matemática para o cálculo da exatidão do método cromatográfico

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média determinada} \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

#### 4.2.3.5.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados utilizando dados das curvas analíticas obtidas para a quantificação da goiazensolida nos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).

Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o LD e LQ podem ser calculados pelas equações a seguir (Equação 7). Estes valores calculados devem ser iguais ou inferiores à menor concentração do intervalo linear. Os coeficientes angulares e lineares foram calculados a partir de dados das três curvas analíticas.

**Equação 7** – Equações matemáticas para o cálculo do LD e LQ

$$\text{LD} = \frac{\text{DPa}}{b} \times 3,3 \qquad \text{LQ} = \frac{\text{DPa}}{b} \times 10$$

Onde: DPa é o desvio padrão dos coeficientes lineares da curva analítica e b é a inclinação da curva analítica

#### 4.2.3.5.6 Robustez

A robustez do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida foi analisada segundo os critérios de exatidão e precisão (DPR) (TAVENIERS; LOOSE; BOCKTAELE, 2004; KUMAR et al., 2012).

Os parâmetros submetidos à variação foram: proporção da fase móvel (v/v), temperatura do forno de coluna (°C) e fluxo da fase móvel (mL/min), conforme apresentado na

Tabela 2. A avaliação da robustez foi realizada observando a variação da concentração de 30,0 µg/mL, que corresponde ao nível médio do intervalo linear, determinado em triplicata.

**Tabela 2** - Parâmetros analíticos de variação para verificar a robustez do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)

<b>Parâmetro analítico</b>	<b>Nível -1</b>	<b>Nível nominal*</b>	<b>Nível +1</b>
Proporção da fase móvel (v/v)	59:41	60:40	61:39
Temperatura (°C)	29,0	30,0	31,0
Fluxo (mL/min)	0,9	1,0	1,1

\*Condição do método cromatográfico desenvolvido

#### **4.2.3.6 Estudo da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)**

Para a determinação do excesso, foram adicionadas alíquotas de 1,0 mg da goiazensolida em 10,0 mL dos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), até a observação de partículas insolúveis nos meios, indicando saturação. Após a determinação do excesso, foi realizado um teste piloto de solubilidade, em triplicata, pelo método da agitação orbital em frasco (*“shake-flask”*), a fim de determinar as condições experimentais que proporcionaram resultados mais adequados no que tange à variabilidade (DPR) dos resultados, confiabilidade, tempo de equilíbrio e duração do teste, para a realização do estudo final de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida.

Para a realização dos testes piloto, foi utilizada a incubadora tipo shaker IKA® KS 4000 i control. As massas representativas dos excessos foram pesadas e adicionadas a 10,0 mL dos meios tamponados. As condições utilizadas nos testes piloto de solubilidade estão apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3** – Condições experimentais dos testes piloto de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida

Parâmetros	Condições
Quantidade da goiazensolida em excesso	5,0 mg
Volume de meio	10,0 mL
Temperatura	37,0 °C
Agitação	100 rpm
Volume coletado e repostado	100,0 µL
Tempos de coleta	0, 3, 12, 16, 20 e 24 h

Os erlenmeyers foram posicionados na incubadora tipo shaker por 24 h. A saturação do meio foi monitorada durante todo teste piloto de solubilidade. As alíquotas foram coletadas nos tempos descritos e filtradas em unidades filtrantes de 0,45 µm de poro diretamente em um eppendorf®. A seguir, 50,0 µL das amostras foram coletadas do eppendorf® e diluídas em 600,0 µL de cada um dos três meios tamponados. Finalmente, as amostras foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45 µm de poro diretamente para os *vials* para quantificação por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado.

Posteriormente, foi realizado um novo teste piloto de solubilidade para o meio TA (pH 4,5) uma vez que neste meio tamponado no tempo de 24 h a goiazensolida não alcançou a solubilidade em equilíbrio. Assim, os tempos de coleta determinados para a realização do teste piloto de solubilidade no meio TA (pH 4,5) foram de 0, 3, 10, 20, 24, 28, 32, 36 e 48 h.

Após o estudo piloto, o procedimento para determinar a solubilidade em equilíbrio da goiazensolida foi realizado com um único ponto de coleta. As alíquotas foram coletadas no tempo de equilíbrio, determinado para os diferentes meios tamponados no estudo piloto, sendo cuidadosamente retiradas do sobrenadante da solução saturada.

O procedimento de coleta e filtração foi feito da mesma maneira relatada para os testes piloto de solubilidade. As condições utilizadas para o estudo final de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) estão descritas na Tabela 4.

Curvas analíticas foram preparadas para cada meio tamponado, na faixa de concentração proposta nesse trabalho. Houve avaliação do pH dos meios tamponados no início e no final do experimento.

**Tabela 4** – Condições experimentais do procedimento para determinação da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Quantidade da goiazensolida em excesso	5,0 mg
Volume de meio	10,0 mL
Temperatura	37,0 °C
Agitação	100 rpm
Volume coletado	100,0 µL
Tempos de coleta	20 h (pH 1,2 e pH 6,8) e 28 h (pH 4,5)

**4.2.3.7 Estabilidade da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)**

Para a determinação da solubilidade de forma segura, faz-se necessário a avaliação da estabilidade do fármaco em solução nas mesmas condições do estudo de solubilidade em equilíbrio (EMA, 2010; BRASIL 2011; FDA, 2017). Dessa forma, a estabilidade das soluções durante o estudo de solubilidade em equilíbrio foi avaliada a  $37,0 \pm 1,0$  °C, 100 rpm e em triplicata na incubadora tipo shaker IKA® KS 4000 i control.

Para isso, 25 mL de soluções diluídas na concentração de 30,0 µg/mL em cada um dos três meios tamponados, FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), foram preparados em triplicata e utilizados.

As soluções foram adicionadas a erlenmeyers, os quais foram posicionados na incubadora tipo shaker e foram submetidas às condições do teste de solubilidade em equilíbrio, realizando coletas de 2000,0 µL no início do teste (tempo zero) e após 10, 20, 24, 28 e 30 h não realizando reposição do meio tamponado. As condições do teste de solubilidade estão descritas na seção 4.2.3.6 e a estabilidade foi avaliada quanto a variação da concentração em função do tempo, em triplicata. Curvas analíticas foram preparadas para cada meio tamponado, na faixa de concentração proposta nesse trabalho.

A substância é considerada estável quando o decaimento da concentração em comparação ao determinado no início do experimento ou tempo zero não é superior a 5,0 % (FDA, 2017).

Foi realizada também a pureza de pico cromatográfico referente a goiazensolida para certificar a ausência de co-eluição de outras substâncias interferentes, como produtos de degradação, junto ao sinal cromatográfico da goiazensolida.

#### **4.2.4 Avaliação da permeabilidade *in vitro* da goiazensolida e dos fármacos padrão pelo ensaio em membrana artificial paralela (PAMPA) em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4)**

##### **4.2.4.1 Preparo das soluções tampão**

Os meios tamponados foram preparados conforme descritos nas Farmacopeias Americana 37ª Edição e Brasileira 6ª Edição (UNITED STATES, 2014; BRASIL, 2019). As correções de pH necessárias foram realizadas com soluções de HCl 1,0 mol/L ou NaOH 1,0 mol/L.

A solução tampão FISSE (pH 6,8) foi preparada conforme descrito na sessão 4.2.3.3 e a solução TF (pH 7,4) foi preparada adicionando 250,0 mL da solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 mol/L e 195,5 mL da solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L em balão volumétrico de 1000,0 mL, completando o volume com água ultrapura.

##### **4.2.4.2 Preparo da solução de fosfatidilcolina de ovo**

Foram pesados exatamente 100,0 mg de fosfatidilcolina de ovo e transferidos para balão volumétrico de 2,0 mL, completando-se o volume com dodecano. Foi obtida solução lipídica com concentração de 5,0 % (p/v).

##### **4.2.4.3 Preparo das soluções estoques dos fármacos padrão de baixa permeabilidade (furosemida) e alta permeabilidade (cloridrato de propranolol)**

Para a calibração do procedimento PAMPA foram utilizados os fármacos controle cloridrato de propranolol e furosemida, sendo o primeiro o fármaco padrão de alta permeabilidade e o último, o fármaco padrão de baixa permeabilidade.

Foram pesados exatamente 25,9 mg e 33,0 mg das substâncias químicas de referência (SQR) dos fármacos cloridrato de propranolol e furosemida, respectivamente, e transferidos

para balões volumétricos de 10,0 mL distintos. Completou-se o volume com DMSO, resultando em solução estoque do fármaco cloridrato de propranolol na concentração de 2950,0 µg/mL e solução estoque do fármaco furosemida na concentração de 3300,00 µg/mL.

#### 4.2.4.4 Preparo das soluções diluídas

Para o preparo das soluções diluídas, foram pipetadas alíquotas da solução estoque dos fármacos padrão de alta e baixa permeabilidade: cloridrato de propranolol e furosemida, e o volume foi completado com os meios tamponados fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4), como mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5** – Preparo das soluções diluídas nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) utilizadas na avaliação da linearidade do método para quantificação do fármaco cloridrato de propranolol e para quantificação do fármaco furosemida

<b>Alíquota da SE (mL)</b>	<b>Volume final da solução (mL)</b>	<b>Concentração do cloridrato de propranolol (µg/mL)</b>	<b>Concentração da furosemida (µg/mL)</b>
0,025	25,0	2,95	3,30
0,050	10,0	14,75	16,50
0,095	10,0	28,00	31,35
0,125	10,0	36,87	41,25
0,165	10,0	48,67	54,45
0,195	10,0	57,52	64,35
0,230	10,0	67,85	75,90
0,270	10,0	79,65	89,10
0,325	10,0	95,87	107,25

#### 4.2.4.5 Validação parcial do método cromatográfico para quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade (furosemida)

Pesquisadores do nosso grupo desenvolveram e validaram métodos cromatográficos para quantificação dos fármacos utilizados como padrões no ensaio PAMPA: cloridrato de propranolol e furosemida (CALDEIRA, 2015; REIS, 2014; MONTEIRO, 2014).

As condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do cloridrato de propranolol nos meios tamponados envolveram o uso do cromatógrafo a líquido de alta eficiência Alliance<sup>®</sup> e2695, com detector fluorescência (excitação: 290 nm/emissão: 358 nm) e software Empower<sup>®</sup> versão 2. A coluna cromatográfica utilizada foi Varian<sup>®</sup> C18 (50 mm x 4,6 mm x 5 µm), com temperatura de 25,0 °C, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 8,0 µL e fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato 40 mmol/L (28:72) pH 3,5.

Já as condições cromatográficas utilizadas para a quantificação da furosemida nos meios tamponados compreendem o uso do cromatógrafo a líquido de alta eficiência Alliance<sup>®</sup> e2695, com detector UV (280 nm) e software Empower<sup>®</sup> versão 2. A coluna cromatográfica utilizada foi Symmetry<sup>®</sup> Waters C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm), com temperatura de 25,0 °C, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20,0 µL e fase móvel composta por acetonitrila, água e ácido acético concentrado a 1 % (40:60:1).

Porém, a coluna Symmetry<sup>®</sup> Waters apresentava desgaste, que inviabilizou o uso desta neste trabalho, visto que os picos dos analitos nos cromatogramas se apresentavam largos e não eram reprodutíveis. Desse modo, houve a necessidade da troca da coluna cromatográfica utilizada para quantificação do fármaco furosemida. Foi utilizada uma coluna Macherey-Nagel Nucleosil<sup>®</sup> 100-5 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm).

#### **4.2.4.5.1 Robustez**

A robustez do método cromatográfico já desenvolvido para quantificação da furosemida foi realizada, uma vez que, segundo a RDC nº 166, o uso de colunas de diferentes fabricantes é uma condição para a qual este parâmetro deve ser calculado.

Três curvas analíticas foram preparadas de forma independente nos meios fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4) de forma que foi avaliada a variação da concentração 48,67 µg/mL que corresponde ao nível médio do intervalo linear, segundo os critérios de exatidão e precisão (DPR) (TAVENIERS; LOOSE; BOCKTAELE, 2004; KUMAR et al., 2012).

#### **4.2.4.6 Avaliação da permeabilidade *in vitro* dos fármacos padrão: furosemida e cloridrato de propranolol**

Soluções estoques das SQR, furosemida e cloridrato de propranolol, foram preparadas em DMSO na concentração de 3300,00 e 2950,00 µg/mL, respectivamente. Com a finalidade

de obter-se soluções diluídas dos fármacos no meio FISSE (pH 6,8), na concentração de 250,0 µmol/L, alíquotas de 250,0 µL das soluções estoques foram transferidas para balões volumétricos distintos de 10,0 mL e completados com o meio FISSE (pH 6,8).

As placas de 96 poços usadas como compartimento receptor receberam 300,0 µL de meio TF (pH 7,4) isento de fármacos em cada poço, com o intuito de mimetizar o pH sanguíneo. Como compartimento doador, as placas de 96 poços receberam 300,0 µL de solução contendo os fármacos diluídos no meio FISSE (pH 6,8) na concentração de 250,0 µmol/L, em cada poço.

No compartimento doador, os poços apresentavam em sua base um filtro hidrofóbico composto de PVDF com 125,0 µm de espessura e tamanho de poro de 0,45 µm, no qual a membrana foi obtida mediante impregnação lipídica de 5,0 µL, por poço, da solução de fosfatidilcolina a 5,0% (p/v).

Após a formação do “sanduíche” foi colocado um papel de filtro umedecido com água ultrapura em cima da placa doadora, sob a tampa, para evitar a evaporação dos meios e as placas foram colocadas na incubadora shaker IKA® KS 4000 i control. A temperatura de incubação foi de 37,0 °C e a agitação foi de 50 rpm, durante o período de 5 horas.

Depois do período de incubação, alíquotas de 150,0 µL foram coletadas de cada poço em ambos os compartimentos, filtradas utilizando unidades filtrantes de 0,45 µm para *vials*, e levadas para a quantificação, por métodos cromatográficos previamente desenvolvidos e validados.

#### **4.2.4.7 Estudo da permeabilidade *in vitro* da goiazensolida pelo método PAMPA em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4)**

##### ***4.2.4.7.1 Preparo da solução estoque da goiazensolida***

Foram pesados exatamente 18,0 mg da goiazensolida e transferidos para balão volumétrico de 5,0 mL. Completou-se o volume com DMSO, resultando em solução estoque na concentração de 3600,00 µg/mL.

##### ***4.2.4.7.2 Validação parcial do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)***

Para os estudos de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida empregando o método da agitação orbital em frasco, a faixa de trabalho validada no método cromatográfico foi de

10,0 µg/mL a 50,0 µg/mL. Esta faixa de concentração é inadequada para a quantificação da goiazensolida no estudo de permeabilidade.

Diante disso, foi realizada a validação parcial do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), de acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da Anvisa (BRASIL, 2017) contemplando a faixa de concentração usualmente utilizada nos ensaios PAMPA (REIS, 2013).

Os parâmetros linearidade, seletividade, precisão intracorrída, exatidão, limites de detecção e quantificação foram analisados por meio de cálculos e tratamentos estatísticos nos programas *Microsoft Excel*® 2019 e *GraphPad Prism*® 5.01.

Três soluções estoques foram preparadas de forma independente e cada solução estoque (SE) resultou em uma curva analítica.

#### 4.2.4.7.2.1 Linearidade

A análise da linearidade do método cromatográfico foi conduzida a partir da construção de curvas analíticas com nove concentrações diferentes da goiazensolida que variaram na faixa de 3,6 µg/mL a 117,0 µg/mL em cada um dos dois meios tamponados: FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), como é mostrado na Tabela 6.

**Tabela 6** – Preparo das soluções diluídas nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) utilizadas na avaliação da linearidade do método para quantificação da goiazensolida

Alíquota da SE (mL)	Volume final da solução (mL)	Concentração (µg/mL)
0,025	25,0	3,60
0,050	10,0	18,00
0,095	10,0	34,20
0,125	10,0	45,00
0,165	10,0	59,40
0,195	10,0	70,20
0,230	10,0	82,80
0,270	10,0	97,20
0,325	10,0	117,00

A linearidade do método foi determinada a partir da análise dos coeficientes de determinação e correlação ( $r^2$  e  $r$ ), dos resíduos da regressão e da equação da reta estimada pelo

método dos mínimos quadrados. Foram avaliadas também a significância do coeficiente angular (b) e as premissas relativas à regressão (BRASIL, 2017).

#### 4.2.4.7.2.2 Seletividade

A avaliação da seletividade do método cromatográfico foi realizada a partir da exposição de soluções da goiazensolida a condições de degradação ácida e térmica.

Na degradação ácida, foram adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico 0,5 mol/L em 1,0 mL de soluções a 3600,00 µg/mL da goiazensolida. As soluções foram armazenadas protegidas da luz e em temperatura ambiente por um período de 24 h. Após esse período, foram adicionados 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,5 mol/L para neutralização. Dessa solução resultante, foram pipetados 1000,0 µL e diluídos em 25,0 mL de cada um dos dois meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4). Em seguida, as soluções foram filtradas em unidades filtrantes de 0,45 µm de poro e incluídas diretamente no *vial* para quantificação por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado. A solução diluída teve como concentração final 48,0 µg/mL.

Na degradação térmica, soluções da goiazensolida na concentração de 59,4 µg/mL em cada um dos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) foram armazenadas em estufa a 55,0 °C ( $\pm 5,0$  °C) por 24 h. Logo após esse período, as soluções foram colocadas a temperatura ambiente e 1000,0 µL de cada solução foi pipetado, filtrado em unidades filtrantes de 0,45 µm de poro e incluído diretamente no *vial* para quantificação por método cromatográfico previamente desenvolvido e validado.

A pureza de pico foi avaliada para atestar a ausência de co-eluição de outras substâncias interferentes junto ao sinal cromatográfico da goiazensolida.

As áreas dos picos referentes a goiazensolida após a degradação ácida e térmica foram comparadas com amostras que não foram submetidas aos respectivos tratamentos.

#### 4.2.4.7.2.3 Precisão

A precisão do método cromatográfico foi analisada para os meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) por meio da repetibilidade (precisão intracorrída) nos níveis de concentração: baixa (3,6 µg/mL), média (59,4 µg/mL) e alta (117,0 µg/mL), em triplicata, resultando em 9 determinações.

O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para cada uma das concentrações empregadas utilizando a Equação 5, e não foram aceitos valores superiores a 5,0 % (TAVENIERS; LOOSE; BOCKTAELE, 2004).

#### 4.2.4.7.2.4 Exatidão

A avaliação da exatidão segue o mesmo protocolo para verificar a precisão do método, sendo os níveis de concentração: baixa (3,6 µg/mL), média (59,4 µg/mL) e alta (117,0 µg/mL), em triplicata.

A exatidão foi calculada para cada uma das concentrações empregadas utilizando a Equação 6.

Os valores obtidos devem estar dentro da faixa de 95,0 a 105,0 % (KUMAR et al., 2012).

#### 4.2.4.7.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados utilizando dados das curvas analíticas obtidas para a quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o LD e LQ podem ser calculados pela Equação 7, os quais devem ser iguais ou inferiores a menor concentração do intervalo linear. Os coeficientes angulares e lineares foram calculados a partir de dados das três curvas analíticas.

#### 4.2.4.7.3 Avaliação da permeabilidade *in vitro* da goiazensolida em fluido intestinal simulado sem enzimas – FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4)

Uma solução diluída da goiazensolida em FISSE (pH 6,8) na concentração de 250,0 µmol/L foi preparada a partir da transferência de alíquotas de 250,0 µL da solução estoque da goiazensolida a 3600,00 µg/mL em DMSO para um balão de 10,0 mL.

As placas de 96 poços usadas como compartimento receptor receberam 300,0 µL de meio TF (pH 7,4) isento da substância ativa em cada poço, com o intuito de mimetizar o pH sanguíneo. Como compartimento doador, as placas de 96 poços receberam 300,0 µL de solução

diluída da goiazensolida no meio FISSE (pH 6,8) na concentração de 250,0  $\mu\text{mol/L}$ , em cada poço.

O ensaio foi conduzido da mesma maneira descrita na sessão 4.2.4.6.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da substância biologicamente ativa

#### 5.1.1 Análise do ponto de fusão

Essa técnica foi realizada com a finalidade de identificação e avaliação da pureza da goiazensolida. A faixa de fusão para a goiazensolida, precipitada em clorofórmio, foi de 167,2 °C a 168,0 °C, indicando o grau de pureza satisfatório, uma vez que mostrou estreita faixa de fusão. Este valor está de acordo com dados relatados na literatura: 175,0 °C a 177,0 °C (VICHNEWSKI et al., 1976) e 168,7 °C a 169,5 °C (UGOLINE et al., 2017).

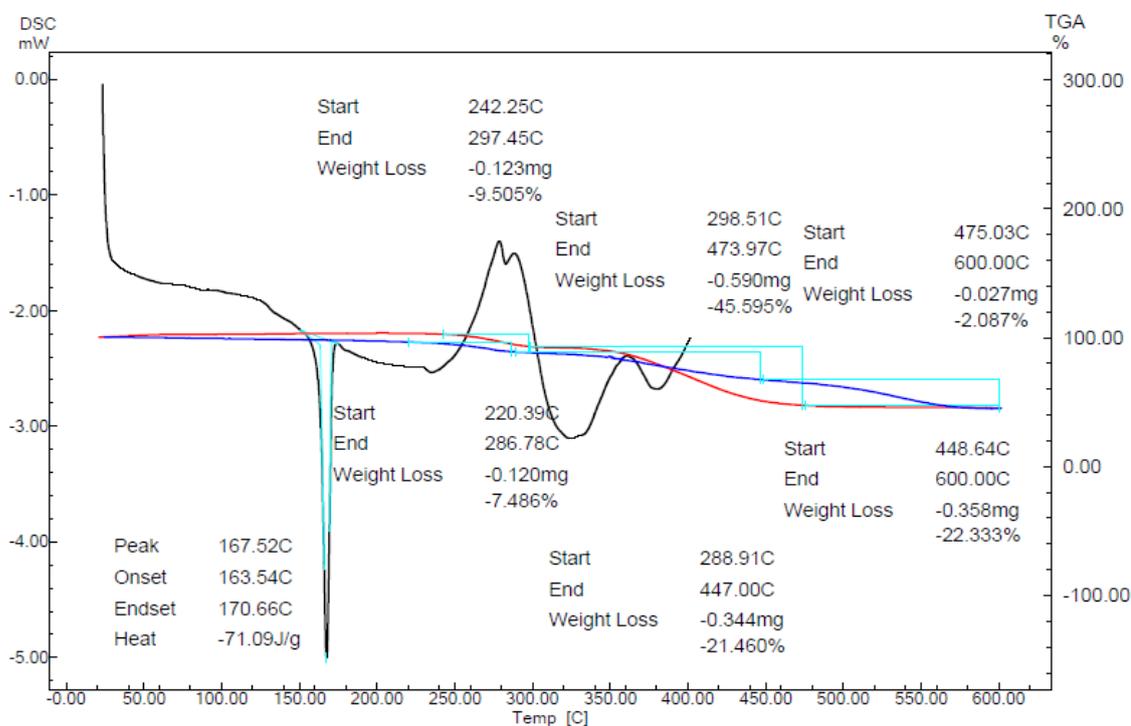
O solvente de precipitação utilizado por Ugoline e colaboradores (2017) para o isolamento da goiazensolida do extrato de *Lychnophora passerina* (Mart ex DC) Gardn foi o clorofórmio. Já Vichnewski e colaboradores (1976) utilizaram o benzeno como solvente de cristalização da goiazensolida isolada do extrato clorofórmico de *Eremanthus goyazensis* Sch.-Bip. Assim, os diferentes solventes utilizados pelos autores podem ter ocasionado diferenças nos valores da análise do ponto de fusão.

A faixa de fusão observada para a goiazensolida nessa análise foi mais próxima àquela encontrada por Ugoline e colaboradores (2017). Além disso, o intervalo entre início e término do processo de fusão observado foi o mesmo obtido por este autor: 0,8 °C. O que era esperado, visto que o solvente usado no isolamento foi também o clorofórmio, em virtude de ambos serem trabalhos do mesmo grupo de pesquisa.

#### 5.1.2 Análise térmica

A curva DSC e os dados de temperaturas inicial, final e perda de massa (mg e %) de cada etapa das curvas TG estão representados na Figura 6, superior – em atmosfera de N<sub>2</sub> e inferior – em atmosfera de O<sub>2</sub>.

**Figura 6** – Comportamento térmico da goiazensolida. Curvas DSC (preto) e TG em atmosfera de N<sub>2</sub> (vermelho) e em atmosfera de O<sub>2</sub> (azul)



A DSC é utilizada para medir a diferença de fluxo de calor entre uma substância e um material de referência em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. A técnica fornece informações quantitativas e qualitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos endotérmicos ou exotérmicos das substâncias, sendo assim, esta permite a determinação da pureza, do ponto e da faixa de fusão bem como a identificação de polimorfos e suas entalpias (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

A curva DSC da goiazensolida (Figura 6, preto), apresentou um único pico estreito endotérmico em 163,54 °C ( $T_{\text{onset}}$ ),  $\Delta H$  71,09 J/g, sem perda de massa como pode ser visto na curva TG obtida em atmosfera de N<sub>2</sub> (Figura 6, vermelho). Este evento endotérmico corresponde ao fenômeno da fusão da amostra. A faixa de fusão obtida foi de 163,54 °C a 170,66 °C estando próxima àquela encontrada na análise em aparelho manual, como descrito na seção 5.1.1, e mais próxima do valor relatado por Ugoline e colaboradores (2017). Após 240,0 °C a flutuação de entalpia observada na curva DSC é característica do processo de decomposição do material.

A duplicidade de pontos de fusão e aparecimento de eventos de transição cristalina na curva de DSC são características da presença de polimorfismo, uma vez que transições polimórficas resultam na liberação ou absorção de energia (OLIVEIRA et al., 2010). A

goiazensolida apresentou um único pico endotérmico, portanto, não apresenta forma polimórfica.

A TG é utilizada para medir a variação de massa em função da temperatura ou do tempo em uma atmosfera controlada sob um programa de aquecimento. As curvas geradas apresentaram diferenças de níveis que correspondem as variações de massa da amostra. A técnica é usada para caracterização, determinação de pureza e de umidade, identificação de pseudopolimorfismo, na avaliação da estabilidade de candidatos a fármacos e medicamentos e em estudos de cinética de degradação (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

Os resultados obtidos em atmosfera de N<sub>2</sub> (Figura 6, vermelho) mostraram que a goiazensolida apresenta estabilidade térmica próxima a 242,0 °C com total de ~56 % de perda de massa em três etapas até a faixa analisada (600 °C). Na primeira etapa de decomposição há perda de ~9% de massa, correspondendo provavelmente à saída do grupo HOCH<sub>2</sub>-. A saída desse grupo leva à abertura dos anéis centrais da cadeia e fragmentação da molécula correspondendo à segunda etapa de decomposição com ~45% de perda de massa (~158,0 g/mol). Na terceira etapa de decomposição ocorre perda de ~2% do resíduo.

Em atmosfera de O<sub>2</sub> (Figura 6, azul), o processo de decomposição térmica se inicia em 220,0 °C, inferior àquela observada em atmosfera inerte (N<sub>2</sub>). Essa redução na estabilidade térmica deve-se à atmosfera oxidante que facilita o processo de decomposição. Nessa condição a goiazensolida exhibe ~50% de perda de massa em três etapas até a faixa analisada (600,0 °C), mas com diferenças significativas de perda em cada etapa, ~7%, ~21% e ~22%, sugerindo que o O<sub>2</sub> reaja com a amostra alterando a quebra. Em temperaturas maiores (> 400,0 °C, terceira etapa de decomposição) a fragmentação da molécula é facilitada.

## **5.2 Determinação da permeabilidade *in silico* e estimativa do pK<sub>a</sub> da goiazensolida**

Na Tabela 7 estão descritas as principais propriedades físico-químicas que são fatores determinantes durante a absorção oral de um fármaco, encontradas para a goiazensolida após estudo *in silico*.

**Tabela 7** - Valores das propriedades físico-químicas preditas pelos programas computacionais MarvinSketch<sup>®</sup>, Molinspiration<sup>®</sup> e Osiris Property Explorer<sup>®</sup> para a goiazensolida

Propriedade	MarvinSketch <sup>®</sup>	Molinspiration <sup>®</sup>	Osiris Property Explorer <sup>®</sup>
Área superficial polar	99,13 Å <sup>2</sup>	99,14 Å <sup>2</sup>	99,13 Å <sup>2</sup>
cLog D	1,40*	-	-
cLog P	1,43	0,84	1,31
cLogS em água	-3,60**	-	-2,56
Massa molecular	360,36 g/mol	360,36 g/mol	360,00 g/mol
pK <sub>a</sub>	15,02	-	-

\*Valor de cLogD para a faixa de pH de 1,0-12,0

\*\*Valor de cLogS para a faixa de pH de 1,0-14,0

A alta biodisponibilidade oral de um fármaco é um fator importante para o desenvolvimento de moléculas bioativas como agentes terapêuticos. A absorção passiva intestinal, flexibilidade molecular reduzida (medida pelo número de ligações rotativas), baixa área de superfície polar ou contagem total de ligações de hidrogênio (soma de ligações doadoras eceptoras de hidrogênio), são importantes preditores da biodisponibilidade oral (VEBER et al., 2002; REFSGAARD et al., 2005).

A área superficial polar pode ser definida como a área em que os heteroátomos contribuem para a polaridade da molécula, de modo que apenas átomos de nitrogênio, oxigênio e secundariamente, enxofre e fósforo, e os átomos de hidrogênio ligados a eles, são capazes de formar ligações de hidrogênio. Isto contribui para aumentar a polaridade e conseqüentemente dificultar o transporte passivo de substâncias (BARRET, 2018).

A área superficial polar muito baixa (< 75,0 Å<sup>2</sup>) pode levar a aumento de riscos tóxicos, particularmente se a lipofilia for alta (LogP > 4). Para estes compostos, a completa absorção é prevista por possuírem a capacidade de atravessar membranas biológicas e se distribuírem amplamente nos compartimentos dos tecidos (HUGHES et al., 2008). Por outro lado, fármacos com área superficial polar alta (> 140,0 Å<sup>2</sup>) são absorvidos menos de 10,0 % (STENBERG et al., 1999).

A goiazensolida obteve área superficial polar calculada de 99,13 Å<sup>2</sup> e 99,14 Å<sup>2</sup>, o que indica que esta substância possui potencial de absorção moderado, menor que 140,0 Å<sup>2</sup> e maior que 75,0 Å<sup>2</sup>.

A lipofilia é definida como o logaritmo decimal de P (LogP). O coeficiente de partição P é definido como a razão entre as concentrações de um composto numa mistura de octanol e água. A membrana é modelada por um sistema de dois solventes. A parte lipofílica é modelada por um solvente apolar: o octanol e o segundo solvente, mimetizando a parte hidrofílica da membrana, é simplesmente água. O coeficiente de partição P é então a razão entre as concentrações nesses dois solventes (BARRET, 2018). Já a capacidade que o composto tem de se particionar entre o solvente orgânico e um meio aquoso tamponado é denominado como LogD (ASHFORD, 2005).

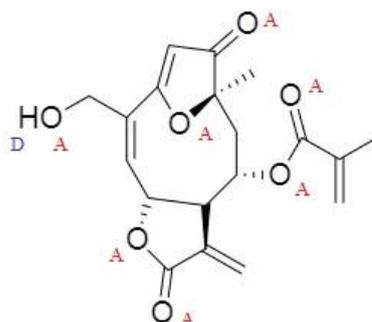
Segundo Barret (2018) a absorção intestinal é favorecida por LogP de 1,0 a 3,0 em razão da presença de microvilosidades na membrana plasmática. Para uma substância administrada via sublingual, o LogP deveria ser de aproximadamente 4,0 a 5,0 devido a área superficial para ocorrer a absorção ser pequena. Para uma substância projetada para administração transcutânea, o LogP ótimo seria em torno de 3,0 a 4,0 em virtude da área superficial para ocorrer a absorção ser maior. Uma substância com LogP baixo, ou seja, hidrofílico deve ser usado por via parenteral (LogP próximo de 0) por razões de maior solubilidade em água. Substâncias com LogP acima de 5,0, altamente lipofílicas, são substâncias geralmente tóxicas por terem tendência a se concentrarem nas gorduras e, portanto, podem levar muito tempo para serem eliminadas (BARRET, 2018).

A permeabilidade *in silico* pode ser avaliada por meio da comparação com o valor de cLogP do metoprolol. O metoprolol é um fármaco considerado padrão de alta permeabilidade, o qual apresenta cLogP de 1,80. Fármacos com valor de cLogP igual ou superior a 1,80 possuem alta permeabilidade (CRISTOFOLETTI et al., 2013).

A goiazensolida apresentou valores de cLogP de 1,43, 0,84 e 1,31 e valor de cLogD de 1,40, portanto, a goiazensolida pode ser considerada como de baixa permeabilidade por apresentar valores menores que o calculado para o metoprolol. Porém, como mencionado anteriormente, a absorção intestinal é favorecida por valores de LogP entre 1,0 e 3,0. Assim, a goiazensolida pode apresentar baixa permeabilidade intestinal, no entanto se encontra dentro da faixa adequada para ocorrer a absorção nesta região.

A goiazensolida também obedece a “regra dos cinco” como pode ser observado na Figura 7 e na Tabela 7, visto que o valor de LogP foi inferior a 5, a massa molecular foi inferior a 500 g/mol, o número de ligações doadoras de hidrogênio foi inferior a 5 e o número de ligações aceptoras de hidrogênio foi inferior a 10. Segundo estes critérios, a goiazensolida seria considerada uma substância que apresenta bom grau de absorção quando administrada pela via oral. (LIPINSKI et al., 2001).

**Figura 7** – Indicativo do número de ligações doadoras e aceptoras de hidrogênio na molécula da goiazensolida



Onde: **A** representa as ligações aceptoras de hidrogênio

**D** representa as ligações doadoras de hidrogênio

É amplamente conhecido que a solubilidade da molécula nos líquidos biológicos é fundamental para que haja permeação e conseqüente absorção. Esse parâmetro geralmente é expresso por  $\text{LogS}$ , onde  $S$  é a concentração da substância em mol/L de uma solução aquosa saturada em equilíbrio. A maioria dos fármacos têm valores de  $\text{LogS}$  entre -1 e -5, em decorrência disto possuem a polaridade necessária para a solubilidade aquosa e o caráter lipofílico correto para posterior permeação através da membrana (JORGENSEN; DUFFY, 2002).

A goiazensolida apresentou valores de  $\text{cLogS}$  de -3,60 e -2,56, sendo o primeiro valor encontrado para soluções com pH 1,2; 4,5 e 6,8, o que representa potencial de absorção oral de acordo com a solubilidade. Por meio do cálculo de conversão de  $\text{cLogS}$ , a goiazensolida pode apresentar valores para a solubilidade em equilíbrio, utilizando o método da agitação orbital em frasco, próximos a 0,09 mg/mL de acordo com o programa MarvinSketch<sup>®</sup> e 0,99 mg/mL de acordo com o programa Osiris Property Explorer<sup>®</sup>. Esses valores podem ser relacionados com fármacos que possuem alta solubilidade de acordo com o SCB: furoato de diloxanida (0,1 mg/mL), cloridrato de ciprofloxacino (0,1 mg/mL) e citrato de clomifeno (1,0 mg/mL) (KASIM et al., 2004).

Em relação aos dados disponíveis na literatura, não há relatos acerca da solubilidade e permeabilidade da goiazensolida. Os estudos publicados sobre essa substância estão relacionados sobretudo às suas atividades farmacológicas.

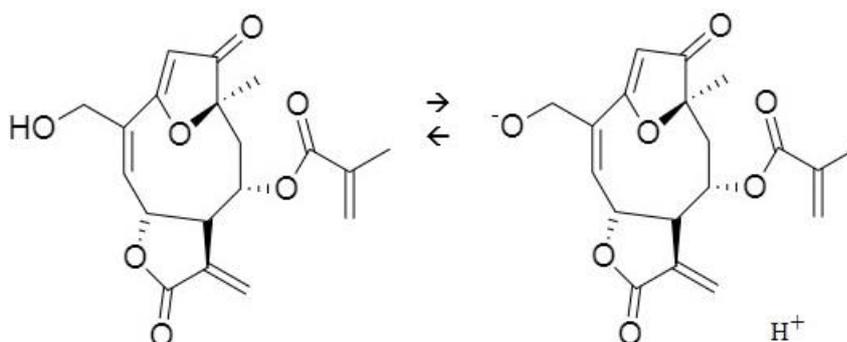
A utilização do método *in silico* para predição da solubilidade e permeabilidade apresenta como desvantagem o fato de não haver base de dados suficientemente ampla com

informações confiáveis para comparações. Além disso, não é tão preciso quanto dados experimentais para prever as características de permeabilidade e absorção de substâncias (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000). No entanto, como as informações sobre a goiazensolida relatadas na literatura sobre os aspectos físico-químicos são poucas, torna-se válida a estimativa de seu  $pK_a$  por este método.

O  $pK_a$  relaciona-se ao pH do meio, visto que a ionização das substâncias varia e elas podem se apresentar na forma ionizada e não ionizada. A maioria dos fármacos se apresenta de 60 a 90 % na forma ionizada nos valores de pH do trato gastrointestinal. A forma ionizada melhora a solubilidade, visto que a presença de cargas na molécula determina a interação com o meio aquoso e conseqüente solubilidade do composto. Porém, a formação de cargas na molécula dificulta a sua passagem pelas membranas intestinais, uma vez que o epitélio gastrointestinal atua como uma barreira lipídica para fármacos absorvidos por meio de difusão passiva. Logo, a forma não ionizada das substâncias, geralmente lipofílica, passará pelos epitélios e a absorção do composto será favorecida (BARRET, 2018; ASHFORD, 2005).

A goiazensolida obteve um valor de  $pK_a$  predito de 15,02 e, de acordo com sua estrutura química pode se apresentar na forma não ionizada e ionizada (Figura 8).

**Figura 8** – Formas de apresentação da goiazensolida: não ionizada e ionizada



Quando o pH da solução e o  $pK_a$  da substância forem conhecidos, pode-se calcular o grau de ionização de compostos ácidos em solução pela equação de *Henderson-Hasselbalch* (Equação 8).

**Equação 8** – Equação de *Henderson-Hasselbalch* para compostos ácidos

$$pK_a = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Onde: [HA] representa a concentração das espécies na forma não ionizadas

[A<sup>-</sup>] representa a concentração das espécies na forma ionizadas

O pK<sub>a</sub> estimado da goiazensolida foi superior à faixa de pH determinada para os estudos de solubilidade (1,2-6,8) e também ao pH plasmático (7,4). Com isso, é esperado que a goiazensolida esteja praticamente 100 % na forma não ionizada em qualquer valor de pH a ser testado neste trabalho. Como a passagem através da membrana intestinal se dá por substâncias na sua forma não ionizada após a solubilização, pressupõe-se que a goiazensolida não sofrerá interferência na extensão de sua absorção no trato gastrointestinal devido ao seu baixo grau de ionização.

De acordo com os valores encontrados das propriedades físico-químicas aplicando os programas computacionais MarvinSketch<sup>®</sup>, Molinspiration<sup>®</sup> e Osiris Property Explorer<sup>®</sup>, a goiazensolida apresentaria alta solubilidade, pela conversão dos valores de cLogS comparado a fármacos altamente solúveis, e baixa permeabilidade, quando o valor de cLogP é comparado com o do metoprolol.

Porém, a absorção intestinal da goiazensolida é favorecida, visto que os valores encontrados de LogP entre 1,0 e 3,0 estão dentro da faixa adequada para absorção nesta região, e por seguir a “regra dos cinco” de Lipinski, a qual prediz o bom grau de absorção de uma substância quando administrada por via oral (BARRET, 2018; LIPINSKI et al., 2001).

Espera-se comprovar a solubilidade por meio do método da agitação orbital em frasco e prever a permeabilidade pelo ensaio utilizando o método PAMPA.

**5.3 Determinação da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco (“shake-flask”) e sua estabilidade em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)**

### **5.3.1 Desenvolvimento do método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) para quantificação da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)**

O método para quantificação da goiazensolida adotado por Ugoline e colaboradores (2017) foi utilizado como ponto de partida para o desenvolvimento do método analítico apresentado neste trabalho.

Ugoline e colaboradores (2017) utilizaram coluna Waters XTerra<sup>®</sup> MS C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm), solvente A: ácido acético aquoso 0,01 % (v/v) e solvente B: acetonitrila com ácido acético 0,01 % (v/v) como fase móvel, com fluxo de 1,0 mL/min: eluição 0-10 min, 10,0 a 25,0 % de solvente B (gradiente linear), 10-30 min, 25,0-30,0 % de solvente B (gradiente linear), 30-40 min, 30,0-60,0 % de solvente B (gradiente linear), 40-45 min, 60,0-80,0 % de solvente B (gradiente linear), 45-50 min, 80,0-10,0 % de solvente B (gradiente linear), 50-55 min, 10,0 % de solvente B (isocrática), detecção a 270 nm, volume de injeção de 20,0 µL e temperatura de 30,0 °C.

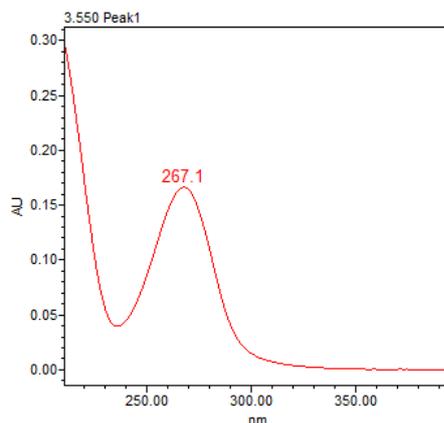
Nestas condições do método cromatográfico, a goiazensolida apresentou tempo de retenção de 19,92 minutos, onde a proporção de fase móvel era 25,0-30,0 % de solvente B (gradiente linear). O longo tempo de análise e o uso da eluição gradiente foram necessários uma vez que se tratava de um extrato clorofórmico, onde outras substâncias presentes no extrato também eluíam durante a corrida cromatográfica.

Para o presente trabalho, a goiazensolida foi previamente isolada do extrato clorofórmico de *Lychnophora passerina* (Mart ex DC) Gardn e a eluição isocrática foi escolhida por ser mais simples e possuir melhor repetitividade. Além disso, trata-se de matriz menos complexa e com menos interferentes quando comparada ao extrato vegetal, possibilitando assim o uso da eluição isocrática para este método de quantificação. Foi adotado, então, iniciar o desenvolvimento do método analítico para quantificação da goiazensolida com fase móvel composta de 30,0 % de acetonitrila e 70,0 % de água.

De maneira semelhante ao método para quantificação citado anteriormente, os seguintes parâmetros: fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de 30,0 °C e volume de injeção de 20,0 µL foram mantidos constantes neste trabalho. O comprimento de onda usado foi de 267 nm, pois foi observado em análise de varredura empregando o cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters Alliance<sup>®</sup> 2695, acoplado ao detector DAD, que a goiazensolida apresentou

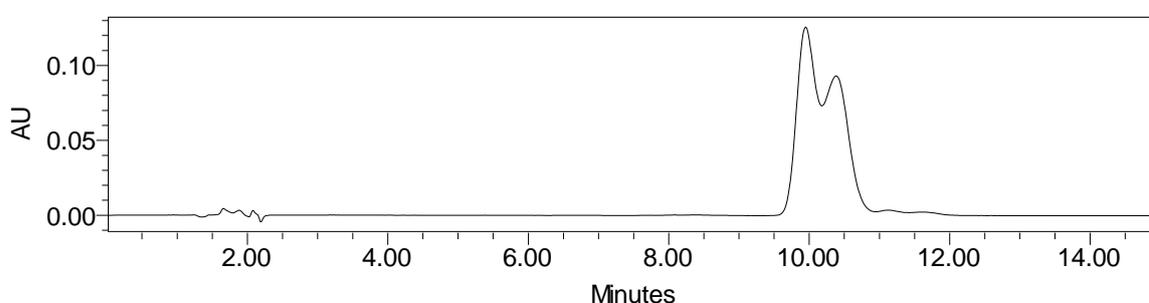
absorção máxima neste comprimento de onda na região do ultravioleta (UV), como mostrado na Figura 9.

**Figura 9** – Espectro de absorção molecular na faixa de 200 a 400 nm da goiazensolida solubilizada em metanol



A princípio, foram testadas diversas colunas cromatográficas a fim de verificar a fase estacionária que possibilita maior intensidade, simetria e menor tempo de retenção para o sinal cromatográfico destinado a quantificação da goiazensolida, variando a composição e a proporção de fases móveis. A primeira coluna testada foi uma coluna Phenomenex Luna<sup>®</sup> C18 (150 mm x 4,6 mm x 3  $\mu$ m), utilizando como fase móvel água:acetonitrila (70:30 v/v). O cromatograma obtido está apresentado na Figura 10.

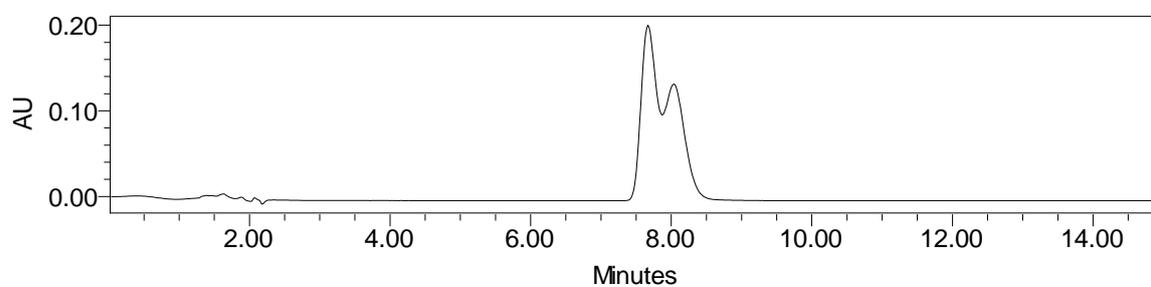
**Figura 10** – Cromatograma obtido de solução metanólica da goiazensolida na concentração de 100,0  $\mu$ g/mL empregando fase móvel água:acetonitrila (70:30 v/v) e coluna Phenomenex Luna<sup>®</sup> (150 mm x 4,6 mm x 3  $\mu$ m)



Como pode ser observado na Figura 10, o tempo de retenção para a goiazensolida foi de 9,9 minutos. Também pode ser observado que houve alargamento do pico da goiazensolida.

A aparência de picos com este formato não é ideal para quantificação em CLAE, visto que estas distorções levam a separação inadequada dos constituintes da amostra e a tempos de eluição menos reprodutíveis (SKOOG et al., 2006). Foi injetado no cromatógrafo, nas mesmas condições, a substância cumarina, utilizada por Ugoline e colaboradores (2017) como padrão interno, para verificar se o alargamento do pico era proveniente de uma ineficiência da coluna cromatográfica ou de outras fontes, como por exemplo, impurezas presentes no material vegetal isolado da goiazensolida. O cromatograma obtido para a cumarina está mostrado na Figura 11.

**Figura 11** – Cromatograma obtido de solução metanólica da cumarina na concentração de 50,0 µg/mL empregando fase móvel água:acetonitrila (70:30 v/v) e coluna Phenomenex Luna® (150 mm x 4,6 mm x 3 µm)



O alargamento e o formato do pico se mantiveram no cromatograma obtido para a cumarina, mostrando que o aspecto do cromatograma nestas condições é indesejável para a quantificação, independente da substância injetada.

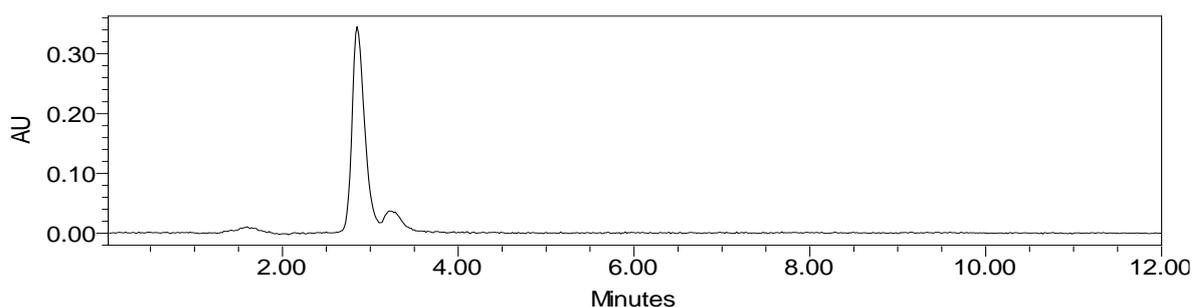
Além disso, foi analisada a pureza do sinal cromatográfico para certificar que não haviam outras substâncias eluindo no mesmo tempo de retenção da substância de interesse. Para isto, fez-se necessário a utilização de um detector DAD para que uma varredura entre 200 e 400 nm fosse realizada em cada ponto do sinal cromatográfico.

A pureza cromatográfica foi avaliada por meio dos resultados de ângulo de pureza e ângulo limite. O ângulo de pureza foi de 0,090 e o ângulo limite foi de 0,278. Quando o ângulo de pureza é inferior ao ângulo limite significa que o pico está puro, ou seja, somente a substância de interesse está eluindo naquele tempo de retenção. Os resultados de pureza de pico mostraram que o pico da goiazensolida estava puro, logo, a coluna Phenomenex Luna® não estava em condições satisfatórias para a quantificação da goiazensolida devido a aparência do sinal cromatográfico que se reproduziu em várias outras tentativas e também na injeção nas mesmas condições com a substância cumarina.

A segunda coluna testada foi Macherey-Nagel Nucleosil<sup>®</sup> 100-3 C18 (150 mm x 4,6 mm x 3  $\mu$ m), que possui as mesmas dimensões, mesmo tamanho de partícula e mesmo tamanho de poro da coluna anterior. Porém, a coluna Macherey-Nagel Nucleosil<sup>®</sup> apresentava desgaste menor que a coluna Phenomenex Luna<sup>®</sup>.

Foi observado na primeira coluna testada que o tempo de retenção para a goiazensolida foi próximo de 10,0 minutos. Com isso, foram necessários ajustes com o intuito de otimizar a resolução do pico e diminuir a retenção do analito, minimizando assim o tempo de corrida e consumo de solventes. Para isto, a composição da fase móvel utilizada foi a mesma água:acetonitrila, porém a proporção foi alterada (50:50 v/v). O cromatograma obtido está apresentado na Figura 12.

**Figura 12** – Cromatograma obtido de solução metanólica da goiazensolida na concentração de 100,0  $\mu$ g/mL empregando fase móvel água:acetonitrila (50:50 v/v) e coluna Macherey-Nagel Nucleosil<sup>®</sup> 100-3 (150 mm x 4,6 mm x 3  $\mu$ m)



De acordo com o cromatograma obtido, foi possível perceber que o tempo de retenção para a goiazensolida foi de 2,8 minutos. Com o aumento na proporção do solvente orgânico acetonitrila (50,0 %) na fase móvel, houve aumento da força da fase móvel por se referir a um método de CLAE em fase reversa. A força da fase móvel (FM) mede a sua capacidade de interagir com os constituintes da amostra e é determinada pela polaridade dos solventes. A retenção dos analitos é controlada por essa força dos solventes, uma vez que com os solventes fortes (polaridade semelhante à fase estacionária) a retenção diminui (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Assim, a goiazensolida passou a ter maior interação com a fase móvel do que com a fase estacionária (coluna octadecilsilano) e eluiu mais rapidamente através da coluna. Com isso, foi obtido menor retenção da substância na coluna cromatográfica, o qual implicou em menor tempo de corrida.

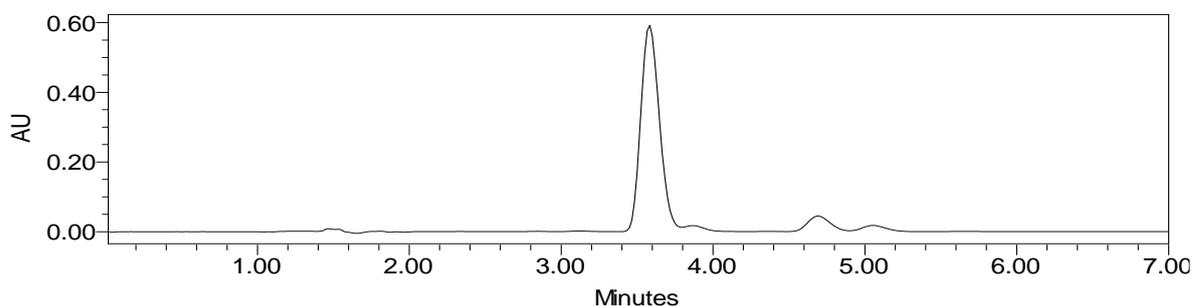
Porém, pôde ser notado que o tempo de eluição da substância de interesse estava próximo ao tempo morto, o que não é adequado, visto o risco de comprometimento da separação da goiazensolida na presença de outras substâncias, por exemplo, produtos de degradação (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Por este motivo, foi necessário diminuir a proporção de solvente orgânico para ajustar o tempo de retenção da goiazensolida. Entretanto, durante as tentativas, a pressão do sistema aumentou acima do limite máximo aceitável. Desse modo, foi necessário reiniciar o desenvolvimento do método analítico com outra coluna cromatográfica.

A terceira coluna testada foi Agilent® Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm). Essa coluna cromatográfica possui as mesmas dimensões das outras colunas testadas, porém o tamanho da partícula é diferente, 5 µm. A coluna Agilent® Zorbax Eclipse apresenta tecnologia XDB (eXtra-Dense Bonding) Agilent®, que é um recurso dos ligantes organosilanos e duplo recapeamento, de maneira a cobrir os resíduos silanois ativos e omitir interações com solutos polares, produzindo maior eficiência e reprodutibilidade do perfil cromatográfico (AGILENT TECHNOLOGIES).

A FM utilizada foi água:acetonitrila na proporção 60:40 v/v, com objetivo de aumentar a retenção da substância na coluna cromatográfica, porém, ainda com tempo de corrida mais curto. O cromatograma obtido está mostrado na Figura 13.

**Figura 13** – Cromatograma obtido de solução metanólica da goiazensolida na concentração de 100,0 µg/mL empregando fase móvel água:acetonitrila (60:40 v/v) e fase estacionária coluna Agilent® Zorbax Eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)



Como mostrado no cromatograma obtido, nota-se que o tempo de retenção para a goiazensolida foi de 3,6 minutos. Os parâmetros de adequação do sistema calculados foram: número de pratos teóricos por coluna: 2617,05 e assimetria: 1,28. Estes resultados estão satisfatórios, uma vez que estão de acordo com limites determinados em algumas monografias da Farmacopeia Brasileira 5ª edição, a qual define 2500 pratos teóricos e fator de cauda menor

que 2,0 para o cloridrato de fexofenadina e 550 pratos teóricos e fator de cauda inferior a 1,5 para comprimidos de amoxicilina e clavulanato de potássio (BRASIL, 2010b).

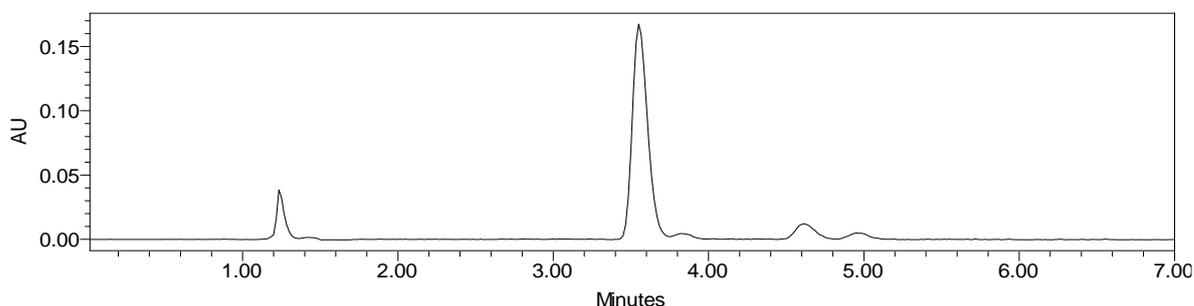
A pureza de pico foi realizada e o valor obtido para o ângulo de pureza foi de 0,279 e para o ângulo limite foi de 0,397 o que confirma a pureza de pico da goiazensolida.

Porém, com o objetivo de diminuir ainda mais a assimetria de pico, foi testada outra alternativa de composição de fase móvel para a mesma fase estacionária: água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v). A acidificação da fase móvel tem intuito de otimizar os parâmetros de adequação do sistema, conseqüentemente o pico da substância de interesse fica mais simétrico, ou seja, com menor alargamento possível.

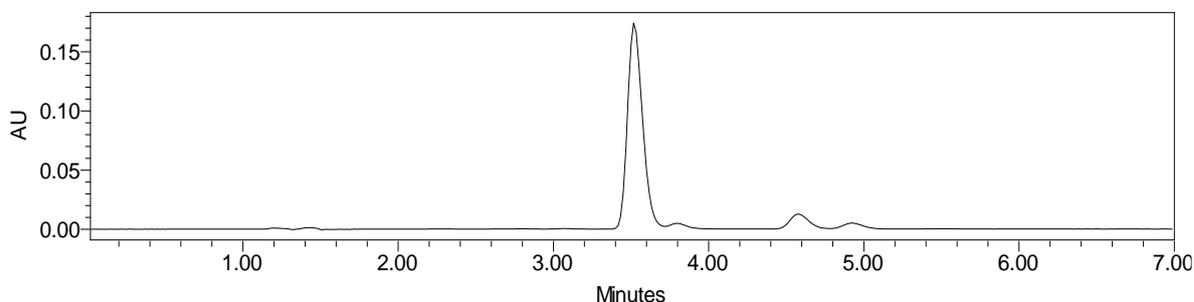
A acidificação foi realizada com ácido acético devido a este ser mais facilmente removido da coluna, garantindo a manutenção de sua vida útil. Além disso, a acidificação pode recobrir silanóis livres protonando-os e tornando-os menos reativos, conseqüentemente o alargamento do pico se torna menos acentuado.

A seguir, nas Figuras 14, 15 e 16 são mostrados os cromatogramas obtidos para a goiazensolida diluída nos meios tamponados: fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2), tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8), respectivamente.

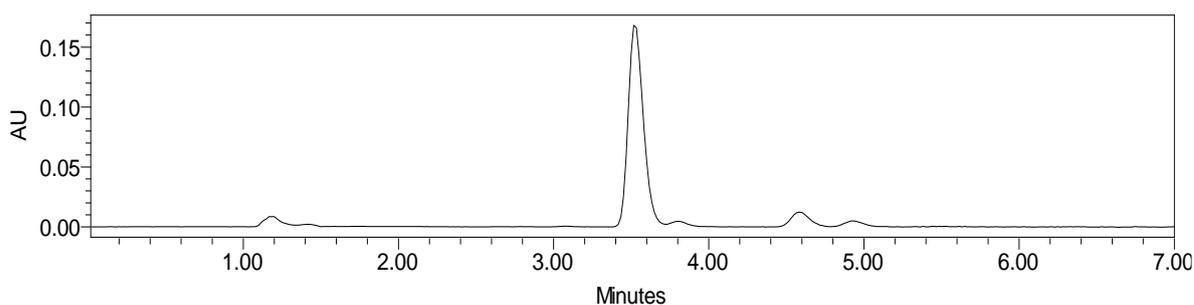
**Figura 14** – Cromatograma obtido da goiazensolida em FGSSE (pH 1,2) na concentração de 40,0 µg/mL empregando fase móvel água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent® Zorbax Eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)



**Figura 15** – Cromatograma obtido da goiazensolida em TA (pH 4,5) na concentração de 40,0  $\mu\text{g/mL}$  empregando fase móvel água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent® Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ )



**Figura 16** – Cromatograma obtido da goiazensolida em FISSE (pH 6,8) na concentração de 40,0  $\mu\text{g/mL}$  empregando fase móvel água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent® Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ )



Como pode ser observado nas Figuras 14, 15 e 16, o tempo de retenção para a goiazensolida nos três meios tamponados foi de 3,5 minutos.

Foram realizados os cálculos dos parâmetros de adequação do sistema para esta condição cromatográfica e também determinada a pureza de pico para a goiazensolida diluída em todos os meios tamponados, como mostrado na Tabela 8.

**Tabela 8** – Valor do ângulo de pureza, ângulo limite, assimetria e número de pratos teóricos para a goiazensolida na concentração de 40,0 µg/mL diluída em cada um dos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), empregando fase móvel água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):acetonitrila (60:40 v/v) e coluna Agilent® Zorbax Eclipse XDB (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)

<b>Meio tamponado</b>	<b>Ângulo de pureza</b>	<b>Ângulo limite</b>	<b>Assimetria</b>	<b>Número de pratos teóricos por coluna</b>
<b>FGSSE</b>	0,248	0,445	1,0	5052,36
<b>TA</b>	0,144	0,373	1,0	4958,97
<b>FISSE</b>	0,215	0,473	1,14	4970,25

Com base nos valores da Tabela 8 e nas Figuras 14, 15 e 16, pode-se inferir que essas condições do método cromatográfico possibilitaram adequada resolução do sinal cromatográfico referente a goiazensolida, uma vez que permitiram a quantificação da substância com picos puros e mais simétricos. O tempo de retenção de 3,5 minutos é considerado adequado para separação e quantificação, pois o surgimento do sinal cromatográfico do analito no tempo morto ou próximo ao tempo morto da coluna significa que o analito não interagiu com a fase estacionária e também pode não se separar na presença de outras substâncias, como produtos de degradação. Tempos de retenção elevados implicam em maiores tempos de corrida com conseqüente consumo exagerado de solventes e desgaste da coluna cromatográfica.

Os valores calculados de número de pratos teóricos para essa coluna também foram maiores, mostrando maior eficiência da coluna cromatográfica nessas condições. Dessa maneira, as condições satisfatórias para a quantificação da goiazensolida nos meios tamponados estão apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9** – Condições cromatográficas empregadas para a quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)

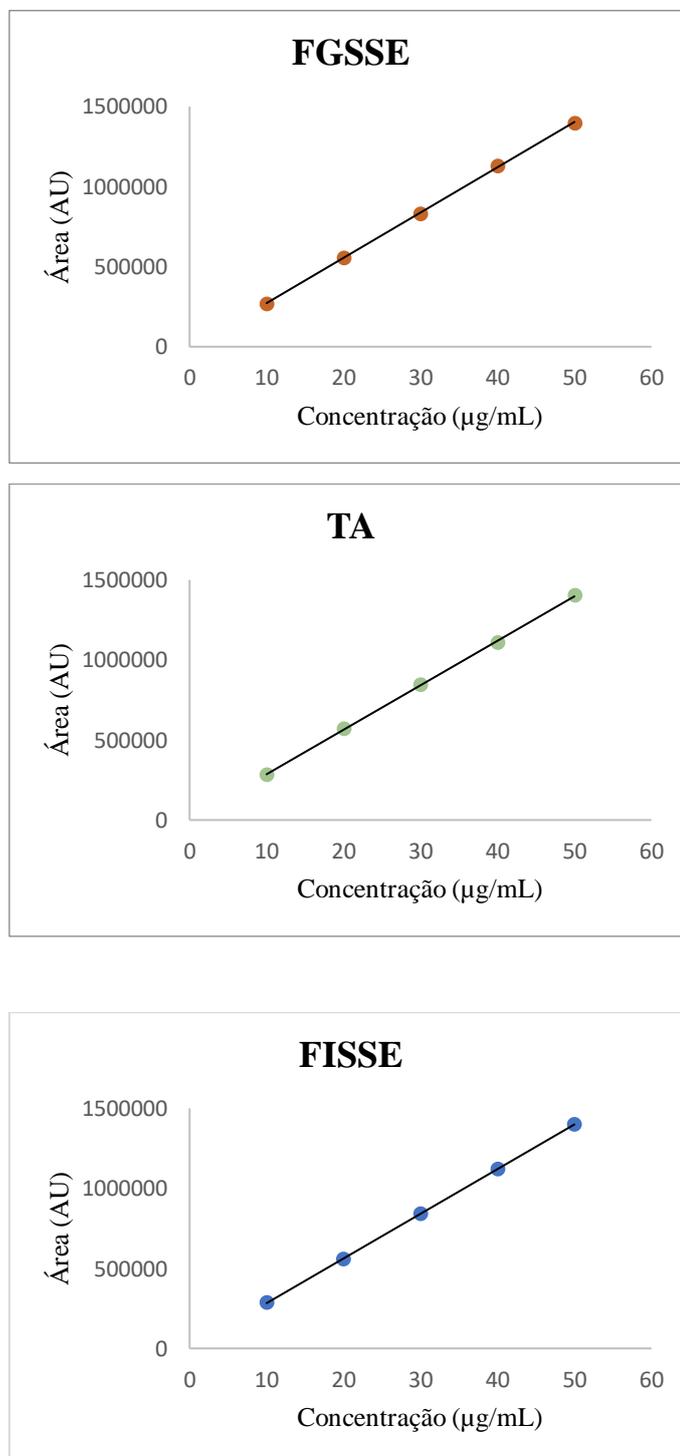
<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Coluna	Agilent® Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Detector	DAD – 267 nm
Fase móvel	Água acidificada com ácido acético a 0,01 % (v/v):Acetonitrila (60:40)
Fluxo	1,0 mL/min
Temperatura	30,0 °C
Volume de injeção	20,0 µL
Tempo de corrida	7,0 min

**5.3.2 Validação do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)**

**5.3.2.1 Linearidade**

Na Figura 17 estão apresentadas as curvas analíticas obtidas por meio do método cromatográfico desenvolvido para quantificação da goiazensolida nos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).

**Figura 17** – Curvas analíticas médias (n=3) com os desvios-padrões na faixa de concentração 10,0 µg/mL a 50,0 µg/mL para a avaliação da linearidade do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em: FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)



A partir das representações gráficas de resposta *versus* concentração, os parâmetros avaliados na linearidade do método cromatográfico desenvolvido estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** – Parâmetros avaliados na linearidade do método cromatográfico desenvolvido para quantificação da goiazensolida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)

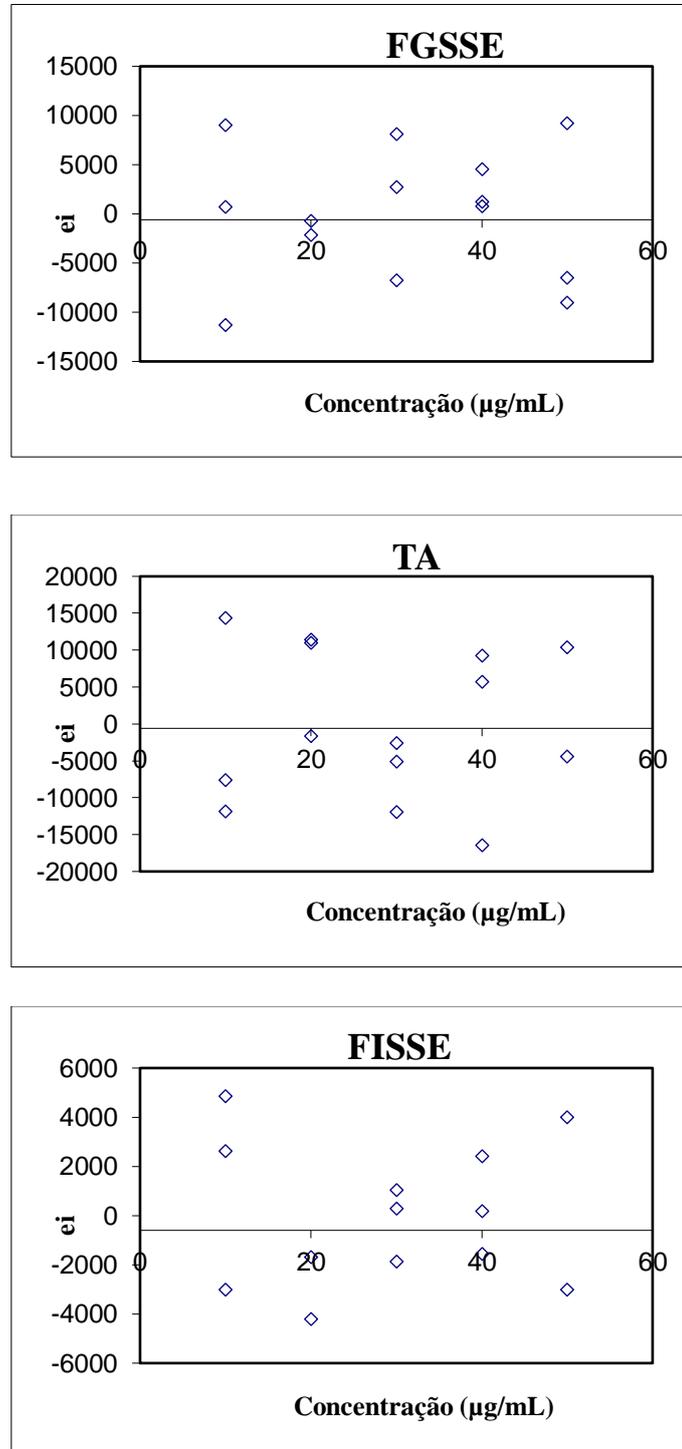
Parâmetros	Meios tamponados		
	FGSSE	TA	FISSE
Equação da reta	$y = 28287x - 10572$	$y = 27784x + 8122,8$	$y = 27912x + 3537,2$
Coefficiente de correlação linear (r)	0,9996	0,9995	0,9999
Coefficiente de determinação (r <sup>2</sup> )	0,9998	0,9998	1,0000
Valor de <i>p</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

O método analítico apresentou coeficientes de determinação (r<sup>2</sup>) e correlação (r) superiores a 0,99 e isto significa que os dados estão ajustados à curva, pertencendo a uma relação linear (RIBEIRO et al., 2008). Os coeficientes angulares são significativamente diferentes de zero com  $p < 0,0001$ .

Além disso, foi feita análise dos resíduos da regressão linear conforme o teste padronizado de *Jacknife*. Foi detectado um valor disperso (*outliers*) para os meios FGSSE (pH 1,2) e TA (pH 4,5) e dois para o meio FISSE (pH 6,8). A exclusão de *outliers* poderia ser de no máximo 22,2 % do total de dados originais (SOUZA et al., 2007).

Os gráficos de resíduos gerados após a exclusão dos *outliers* está mostrado na Figura 18.

**Figura 18** – Gráficos de resíduos da regressão linear do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em: FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) após tratamento de *outliers*



É possível observar por meio dos gráficos de resíduos da Figura 18 que os pontos estão distribuídos aleatoriamente ao longo do eixo 0 (indicado pela linha tracejada) e não apresentam tendências.

Durante a avaliação dos resíduos da regressão linear, as premissas relativas à regressão devem ser analisadas, bem como testes para verificar a adequação do ajuste ao modelo linear por meio da significância da regressão e do desvio da linearidade pela Análise de variância (ANOVA).

As premissas analisadas foram: normalidade - onde os resíduos apresentam uma distribuição normal, verificada pelo teste de *Ryan-Joiner*; homocedasticidade – onde a variância apresentada pelos resíduos é constante, verificada pelo teste de *Brown-Forsythe*; independência – onde os resíduos devem ser independentes entre si, não havendo autocorrelação entre eles, verificada pelo teste de *Durbin-Watson*.

Os resultados obtidos para os três meios tamponados estão mostrados na Tabela 11.

**Tabela 11** – Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão resultante da análise das curvas analíticas dos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)

<b>Avaliação</b>	<b>FGSSE</b>	<b>TA</b>	<b>FISSE</b>
<b>Normalidade</b>			
Valor encontrado	0,9822	0,9706	0,9841
Valor de referência	Maior que 0,9351	Maior que 0,9351	Maior que 0,9315
<b>Homoscedasticidade</b>			
Valor encontrado	0,101	0,0345	0,2900
Valor de referência	Menor que 2,1790	Menor que 2,1790	Menor que 2,2010
<b>Independência</b>			
Valor encontrado	2,0238	1,4474	2,2003
Valor de referência	Entre 1,3493 e 2,6506	Entre 1,3493 e 2,6506	Entre 1,3394 e 2,6605
<b>Desvio da linearidade</b>			
Valor encontrado	0,2150	0,8580	0,914
Valor de referência	Menor que 3,8625	Menor que 3,8625	Menor que 4,0661
<b>Significância da regressão</b>			
Valor encontrado	55382,56	22364,14	215913,23
Valor de referência	Maior que 4,7472	Maior que 4,7470	Maior que 4,8443

Os resultados mostraram que: 1) os resíduos seguem a distribuição Normal, 2) que não há autocorrelação entre os resíduos, ou seja, há independência, 3) que as variâncias dos desvios não são diferentes, então há homoscedasticidade e 4) que a regressão é significativa não havendo desvio da linearidade, nos três meios tamponados.

Portanto, o método cromatográfico para quantificação da goiazensolida foi linear dentro do intervalo de 10,0 µg/mL a 50,0 µg/mL, visto que cumpriu com todas exigências necessárias.

### 5.3.2.2 Seletividade

O método cromatográfico para quantificação da goiazensolida foi seletivo nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), uma vez que os valores de ângulo de pureza foram inferiores aos valores de ângulo limite. Nas Tabelas 12, 13 e 14 são apresentados os resultados, mostrando que o método analítico foi capaz de diferenciar a goiazensolida de outras substâncias, bem como dos seus produtos de degradação.

**Tabela 12** – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida no meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição ácida

Meio tamponado	Tempos Seletividade	% Redução da área	Ângulo de Pureza	Ângulo Limite
FGSSE	T0	61,47	0,327	0,726
	T24		0,900	1,209
TA	T0	62,90	0,194	0,327
	T24		0,688	0,879
FISSE	T0	9,77	0,858	1,135
	T24		0,870	1,144

**Tabela 13** – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida no meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição básica

<b>Meio tamponado</b>	<b>Tempos Seletividade</b>	<b>% Redução da área</b>	<b>Ângulo de Pureza</b>	<b>Ângulo Limite</b>
<b>FGSSE</b>	T0	100,00	0,383	0,678
	T24		NQ*	NQ
<b>TA</b>	T0	100,00	0,717	2,152
	T24		NQ	NQ
<b>FISSE</b>	T0	100,00	0,509	1,013
	T24		NQ	NQ

\*NQ – Não quantificável

**Tabela 14** – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida no meio FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição a temperatura de 55,0 °C ( $\pm$  5,0 °C)

<b>Meio tamponado</b>	<b>Tempos Seletividade</b>	<b>% Redução da área</b>	<b>Ângulo de Pureza</b>	<b>Ângulo Limite</b>
<b>FGSSE</b>	T0	6,78	0,185	0,376
	T24		0,301	0,704
<b>TA</b>	T0	6,92	0,420	0,672
	T24		0,444	1,114
<b>FISSE</b>	T0	39,65	0,361	0,579
	T24		1,108	3,342

Após todas as exposições de degradação forçada (ácida, básica e térmica) foi verificada redução significativa da área do pico da goiazensolida em todos os meios tamponados, porém com ausência de sinais cromatográficos referentes aos possíveis produtos de degradação. Embora seja desejável a visualização do sinal relativo a esses produtos, essas condições permitiram confirmar que os mesmos não interferem na aplicação do método, visto que os ângulos de pureza determinados foram inferiores aos ângulos limite. Assim, a pureza de pico da goiazensolida foi verificada, ou seja, não houve co-eluição de interferentes conjuntamente

ao seu sinal cromatográfico, mostrando assim que o método desenvolvido é adequado para ser aplicado para a função desejada sem interferência de possíveis produtos de degradação.

Os resultados da degradação básica indicaram que pode ter ocorrido abertura do anel lactônico da goiazensolida não sendo possível a sua quantificação neste meio. O anel lactônico da molécula é susceptível à hidrólise espontânea, formando a sua correspondente forma carboxilada, processo onde o equilíbrio é governado pelo pH do meio. Assim a forma lactônica predomina em pH ácido e a presença da espécie carboxilada (anel aberto) é favorecida em meio alcalino (SCHRÖDER, 1991; BRUNETON, 1995).

### 5.3.2.3 Precisão

Os resultados da precisão intracorrída e intercorrída nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) estão apresentados nas Tabelas 15, 16 e 17, respectivamente.

**Tabela 15** – Precisão intracorrída e intercorrída do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio FGSSE (pH 1,2) (n=3)

<b>Dia de análise</b>	<b>CT (µg/mL)</b>	<b>CMD (n=3) (µg/mL)</b>	<b>DPR (%) Intracorrída</b>
<b>1°</b>	10	10,05	3,37
	30	30,08	0,83
	50	49,93	0,65
<b>2°</b>	10	9,93	0,29
	30	29,87	0,11
	50	49,78	0,35
			<b>DPR (%) Intercorrída</b>
<b>1° versus 2°</b>	10		2,93
	30		0,69
	50		0,62

Onde CT é a Concentração Teórica e CMD é a concentração média determinada

**Tabela 16** – Precisão intracorrida e intercorrida do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio TA (pH 4,5) (n=3)

<b>Dia de análise</b>	<b>CT (µg/mL)</b>	<b>CMD (n=3) (µg/mL)</b>	<b>DPR (%) Intracorrida</b>
<b>1°</b>	10	9,87	4,58
	30	29,85	0,51
	50	49,93	1,32
<b>2°</b>	10	9,89	1,44
	30	30,09	0,26
	50	50,19	0,32
		<b>DPR (%) Intercorrida</b>	
<b>1° versus 2°</b>	10		3,03
	30		0,58
	50		0,90

**Tabela 17** – Precisão intracorrida e intercorrida do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio FISSE (pH 6,8) (n=3)

<b>Dia de análise</b>	<b>CT (µg/mL)</b>	<b>CMD (n=3) (µg/mL)</b>	<b>DPR (%) Intracorrida</b>
<b>1°</b>	10	9,65	0,81
	30	30,01	0,50
	50	49,00	0,28
<b>2°</b>	10	10,11	1,43
	30	29,99	0,18
	50	50,05	0,43
		<b>DPR (%) Intercorrida</b>	
<b>1° versus 2°</b>	10		2,76
	30		0,34
	50		1,20

Os resultados obtidos para a precisão intracorrida e intercorrida mostraram que o método cromatográfico para quantificação da goiazensolida é preciso, dado que apresentou valores de DPR inferiores a 5,0 %, como sugerem os autores Taveniers, Loose e Bocktaele

(2004). Dessa forma, o método atende aos critérios de finalidade e desempenho para a precisão, assegurando repetibilidade e resultados precisos.

#### 5.3.2.4 Exatidão

Na Tabela 18 estão apresentados os valores encontrados para a exatidão do método nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8).

**Tabela 18** – Resultados da exatidão do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida nos três meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)

Meio tamponado	CT (µg/mL)	CMD (n=3) (µg/mL)	Exatidão (%)
FGSSE	10	9,93	99,33
	30	29,87	99,56
	50	49,78	99,57
TA	10	9,89	98,92
	30	30,09	100,33
	50	50,19	100,38
FISSE	10	10,11	101,12
	30	29,99	99,96
	50	50,05	100,11

O método cromatográfico possibilitou a obtenção de resultados de exatidão de acordo com o preconizado segundo os parâmetros, visto que os resultados encontrados estavam dentro da faixa de exatidão entre 95,0 a 105,0 % proposta por Kumar e colaboradores quando se usa meios tamponados que simulam o pH do TGI (KUMAR et al. 2012).

#### 5.3.2.5 Limites de detecção e quantificação

Os resultados do cálculo do LD e LQ estão apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19** – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8)

<b>Meio tamponado</b>	<b>LD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>LQ (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>FGSSE</b>	1,29	3,90
<b>TA</b>	0,43	1,31
<b>FISSE</b>	0,54	1,62

Os valores encontrados para LD e LQ, mostraram que a menor concentração da faixa de trabalho é passível de detecção e quantificação, visto que este ponto (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ) é superior ao limite que o método é capaz de quantificar.

#### **5.3.2.6 Robustez**

Em relação a variação das condições analíticas, considerou-se a condição estabelecida do método desenvolvido como a condição nominal e foram propostas alterações de -1 e +1, conforme descrito na Tabela 2.

Na Tabela 20 são apresentados os valores de concentração média, DPR e exatidão obtidos em triplicata para as condições variadas. Esses valores permitem a avaliação da robustez para a quantificação da goiazensolida nos meios tamponados estudados.

**Tabela 20** – Valores de concentração média (n=3), DPR (%) e exatidão (%) determinados para avaliar a robustez do método para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) para a concentração de 30,0 µg/mL

Meio tamponado	Parâmetro analítico	Condição	CMD (n=3) (µg/mL)	DPR (%)	Exatidão (%)	
FGSSE (pH 1,2)	Proporção da fase móvel	-1	30,44	0,92	100,66	
		Nominal	30,25	0,59	100,86	
		+1	30,23	0,79	100,79	
	Temperatura	-1	30,14	0,77	100,46	
		Nominal	30,25	0,59	100,86	
		+1	30,15	0,93	100,52	
	Fluxo	-1	33,42	0,70	111,40	
		Nominal	30,25	0,59	100,86	
		+1	27,47	1,13	91,57	
		Composição da fase móvel	-1	29,65	1,27	98,84
			Nominal	29,71	1,03	99,05
			+1	29,68	0,96	98,93
TA (pH 4,5)	Temperatura	-1	29,66	0,82	98,87	
		Nominal	29,71	1,03	99,05	
		+1	29,66	1,27	98,87	
	Fluxo	-1	33,03	1,33	110,10	
		Nominal	29,71	1,03	99,05	
		+1	26,90	0,84	89,67	
	Composição da fase móvel	-1	30,68	1,12	102,29	
		Nominal	30,53	1,31	101,79	
		+1	30,78	0,87	102,60	
		Temperatura	-1	30,76	0,82	102,56
			Nominal	30,53	1,31	101,79
			+1	30,79	0,73	102,64
FISSE (pH 6,8)	Fluxo	-1	34,17	0,89	113,91	
		Nominal	30,53	1,31	101,79	
		+1	28,09	0,78	93,63	

Em vermelho, valores que estão fora do preconizado

De acordo com os resultados obtidos, todas as variáveis apresentaram precisão. Entretanto, uma diminuição ou um aumento no fluxo da fase móvel implica diretamente na exatidão do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em todos os três meios tamponados. Assim, o método para quantificação da goiazensolida mostrou-se robusto em relação a pequenas variações na temperatura do forno de coluna e proporção da fase móvel nos três meios tamponados de acordo com os critérios de precisão (máximo de 5,0 %) e exatidão

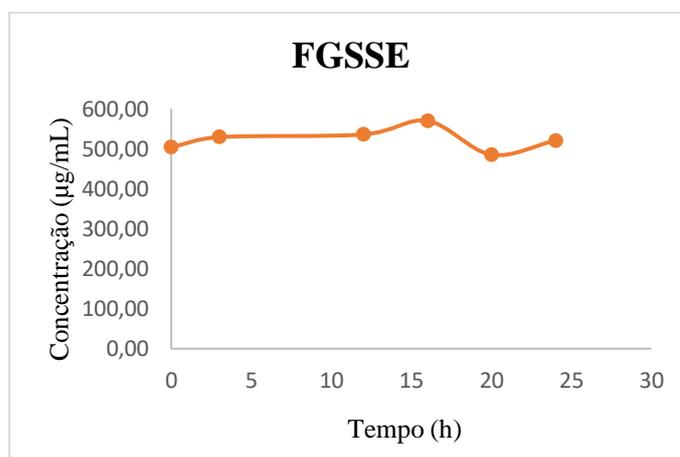
(95,0 % a 105,0 %) aplicados nesse trabalho (TAVENIERS; LOOSE; BOCKTAELE, 2004; KUMAR et al, 2012).

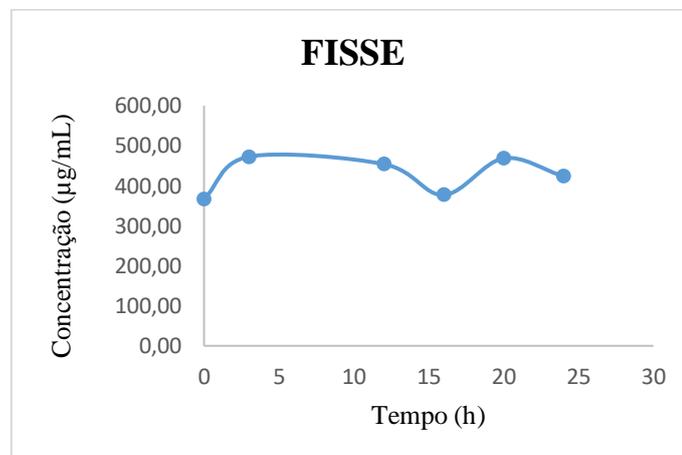
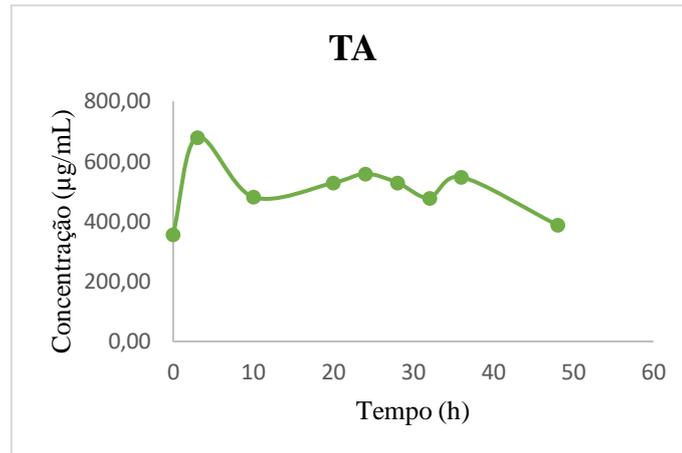
Porém, os resultados encontrados perante à variação do fluxo da fase móvel não impossibilitaram a validação e utilização do método. A oscilação do fluxo da fase móvel não é usual durante a análise e é monitorada pelo equipamento. Portanto, torna-se necessária a manutenção preventiva dos cromatógrafos para garantir a geração de dados confiáveis e reprodutíveis.

### 5.3.3 Estudo de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)

Os resultados encontrados para o piloto de solubilidade da goiazensolida estão apresentados na Figura 19.

**Figura 19** – Piloto de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida em: FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) (n=3) pelo método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”)





Pode ser observado que o equilíbrio foi alcançado em 20 h para os meios FGSSE (pH 1,2) e FISSE (pH 6,8) e em 28 h para o meio TA (pH 4,5). Esses tempos foram definidos para a coleta de um único ponto no estudo final de solubilidade em equilíbrio.

Foram observadas variações no perfil de solubilidade para os três meios tamponados. No meio FISSE (pH 6,8) a goiazensolida apresentou menor valor de solubilidade em equilíbrio e o maior valor de solubilidade em equilíbrio foi observado no meio FGSSE (pH 1,2), conforme dados demonstrados na Tabela 21. Esses resultados sugerem que comportamento da goiazensolida ao longo do trato gastrointestinal pode ser dependente do pH, uma vez que possui maior valor de solubilidade em equilíbrio no meio FGSSE (pH 1,2) e menor valor de solubilidade em equilíbrio no meio FISSE (pH 6,8).

**Tabela 21** – Dados da solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco (“*shake-flask*”) nos meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) (n=3)

<b>Meio tamponado</b>	<b>Concentração diluída (µg/mL)</b>	<b>Concentração real (µg/mL)</b>	<b>Concentração real (mg/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>FGSSE</b>	43,91	570,90	0,57	1,91
<b>TA</b>	39,44	512,83	0,51	4,18
<b>FISSE</b>	34,63	450,30	0,45	1,43

Conforme os ensaios realizados, a solubilidade em equilíbrio de goiazensolida foi de 0,57 mg/mL no meio FGSSE (pH 1,2), 0,51 mg/mL no meio TA (pH 4,5) e 0,45 mg/mL no meio FISSE (pH 6,8). Os resultados obtidos foram superiores àquele encontrado na predição *in silico* de acordo com as características físico-químicas da molécula de goiazensolida (0,09 mg/mL), porém ambos apontam a alta solubilidade da goiazensolida.

De acordo com a análise da solubilidade segundo as diretrizes do SCB, por meio do cálculo da razão dose/solubilidade (D/S), a extrapolação alométrica da dose da goiazensolida foi necessária, uma vez que a goiazensolida ainda não possui uma dose definida para a administração oral em humanos.

O cálculo da extrapolação alométrica proposta para um humano de 70,0 kg utiliza como base as doses de 5,0 e 10,0 mg/kg de goiazensolida administrada em camundongos Swiss (0,025 kg), seguindo as equações descritas em Equação 1.

A partir dos resultados dos cálculos da extrapolação alométrica, as doses da goiazensolida extrapoladas para um humano de 70,0 kg, considerando como animal de referência o camundongo Swiss (0,025 kg), seriam de 48,0 e 100,0 mg, administrada por via oral, para o tratamento da hiperuricemia.

Para o cálculo da razão dose/solubilidade (D/S) (Equação 2) foi utilizada a maior dose encontrada para a administração oral da goiazensolida em humanos, 100,0 mg. Os resultados estão mostrados na Tabela 22.

**Tabela 22** – Razão dose/solubilidade (D/S) da goiazensolida encontrada para os meios tamponados FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), a partir da extrapolação alométrica da dose

Meio tamponado	D/S (mL)
<b>FGSSE</b>	175,16
<b>TA</b>	194,99
<b>FISSE</b>	222,07

Os valores da razão dose/solubilidade confirmam a alta solubilidade da goiazensolida, uma vez que os resultados da razão D/S foram inferiores ao valor preconizado de 250,0 mL. Diante disso, a alta solubilidade da goiazensolida confirmada experimentalmente pelo método da agitação orbital em frasco corrobora com o resultado de cLogS encontrado pelo método *in silico*.

O  $pK_a$  da molécula da goiazensolida estimado foi de 15,02. Como foi discutido anteriormente, era esperado que a goiazensolida estivesse praticamente 100 % na forma não ionizada na faixa de pH testado, o que poderia conferir baixa solubilidade da molécula nos líquidos biológicos. No entanto, o estudo de solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frasco determinou a alta solubilidade da goiazensolida. A estimativa do  $pK_a$  pelo método *in silico* é utilizada para prever a solubilidade e permeabilidade de candidatos a fármaco, principalmente daqueles que contêm poucas informações a respeito disponíveis na literatura. Porém, possui desvantagens de prever as propriedades biofarmacêuticas apenas de acordo com a estrutura química da molécula, o que pode gerar dados imprecisos. Já o método *in vitro* preconizado pelas agências regulatórias gera resultados mais fidedignos, visto que há interação com diferentes valores de pH.

Foi realizada a determinação do pH dos meios tamponados no início e no fim do experimento com intuito de identificar a formação de possíveis produtos de degradação que podem alterar o valor de pH do meio. Na Tabela 23 estão apresentados os valores de pH que foram medidos.

**Tabela 23** - Avaliação do pH das soluções iniciais e finais do teste de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida pelo método da agitação orbital em frasco

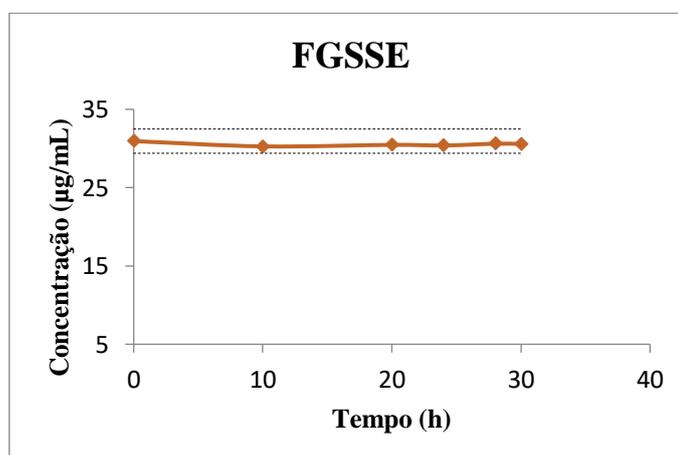
Meio tamponado	pH inicial	pH final
<b>FGSSE</b>	1,20	1,18
<b>TA</b>	4,50	4,54
<b>FISSE</b>	6,80	6,83

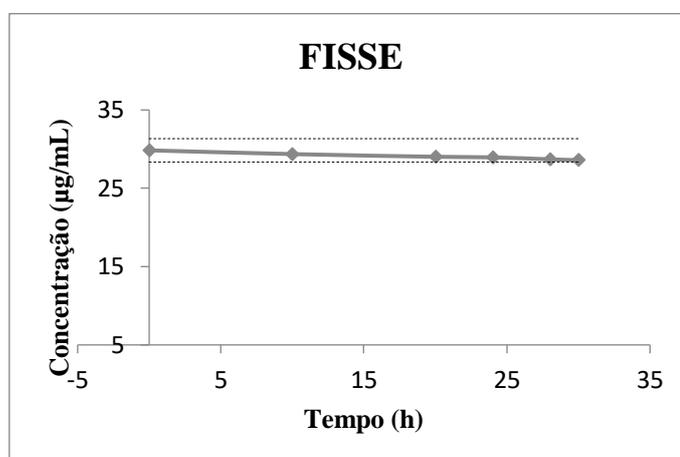
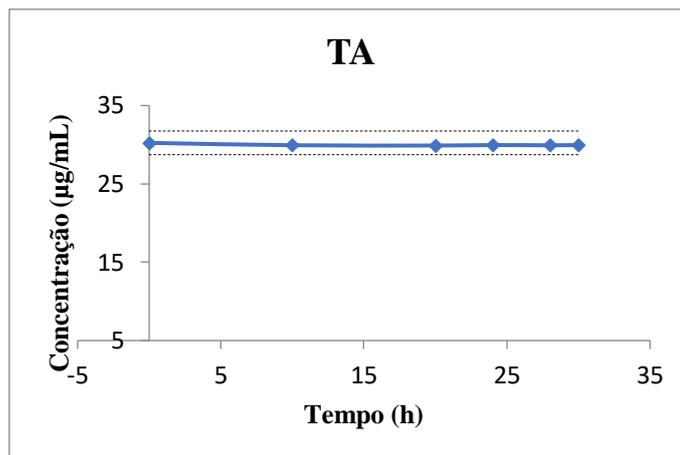
Foi observada pequena alteração de pH nos meios, o que sugere que no tempo do estudo de solubilidade em equilíbrio não houve indicação de formação de produtos de degradação.

#### 5.3.4 Estabilidade da goiazensolida a 37,0 °C em fluido gástrico simulado sem enzimas - FGSSE (pH 1,2); tampão acetato - TA (pH 4,5) e fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8)

Uma substância é considerada estável quando sua degradação nos meios tamponados a 37,0 °C é inferior a 5,0 % (FDA, 2017). Dessa forma, a estabilidade da goiazensolida nos três meios tamponados foi avaliada e está apresentada na Figura 20. A estabilidade foi calculada utilizando a variação das concentrações em função do tempo, o que permite calcular a porcentagem de degradação da substância.

**Figura 20** – Avaliação da estabilidade da goiazensolida em: FGSSE (pH 1,2); TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8), por meio da variação na concentração média do analito (n=3). As linhas tracejadas indicam as variações de 5,0 % na concentração





Durante as 30 h de experimento, observou-se que a goiagensolida foi estável nos três meios tamponados, visto que a porcentagem de degradação não foi superior a 5,0 %. Cabe ressaltar que em FISSE foi o meio cujo pH interferiu mais na estabilidade da molécula, chegando ao limite de 5,0 % de degradação no tempo de 30 h.

Os resultados para a pureza de pico estão apresentados na Tabela 24, certificando que durante o experimento não foram observados produtos de degradação.

**Tabela 24** – Valores de ângulo de pureza e ângulo limite obtidos a partir do método cromatográfico desenvolvido para quantificação da goiazensolida nos meios FGSSE (pH 1,2), TA (pH 4,5) e FISSE (pH 6,8) durante o estudo de estabilidade (n=3)

<b>Meio tamponado</b>	<b>Ângulo de pureza</b>	<b>Ângulo limite</b>
<b>FGSSE</b>	0,163	0,338
<b>TA</b>	0,181	0,414
<b>FISSE</b>	0,201	0,475

#### **5.4 Validação parcial do método cromatográfico para quantificação do fármaco padrão de baixa permeabilidade (furosemida)**

##### **5.4.1 Robustez**

A Tabela 25 apresenta os valores de concentração média, DPR e exatidão obtidos em triplicata para a condição do método desenvolvido e validado por Caldeira (2015) para quantificação da furosemida utilizando outra coluna cromatográfica: (Macherey-Nagel Nucleosil® 100-5 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm).

Esses valores permitem a avaliação da robustez para a quantificação da furosemida nos meios tamponados estudados.

**Tabela 25** – Valores de concentração média (n=3), DPR (%) e exatidão (%) determinados para avaliar a robustez do método para quantificação da furosemida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TA (pH 7,4) para a concentração de 48,67 µg/mL

<b>Meio tamponado</b>	<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>FISSE</b>	48,31	0,29	99,27
<b>TF</b>	48,45	0,63	99,54

Os resultados obtidos mostraram que o método cromatográfico para quantificação da furosemida é preciso e exato quando há a realização da troca da coluna cromatográfica por outro fabricante, dado que apresentou valores de DPR % inferiores a 5,0 % e resultados dentro da faixa de exatidão entre 95,0 a 105,0 % (TAVENIERS; LOOSE; BOCKTAELE, 2004; KUMAR

et al. 2012). Dessa forma, o método atende aos critérios de finalidade e desempenho para a precisão e exatidão.

### 5.5 Avaliação da permeabilidade *in vitro* dos fármacos padrões furosemida e cloridrato de propranolol

Os resultados de permeabilidade efetiva ( $P_{\text{eff}}$ ) encontrados para os fármacos cloridrato de propranolol e furosemida estão apresentados na Tabela 26.

**Tabela 26** - Resultado de permeabilidade efetiva ( $P_{\text{eff}}$ ) para os fármacos cloridrato de propranolol e furosemida, utilizando o meio FISSE (pH 6,8) contendo soluções diluídas dos fármacos como compartimento doador, TF (pH 7,4) isento de fármacos como compartimento receptor, solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm, 5 horas de incubação a 37,0 °C

Fármaco padrão	$P_{\text{eff}}$ (cm/s) (n=3)	DPR (%)
Cloridrato de propranolol	$16,14 \times 10^{-6}$	1,18
Furosemida	$1,03 \times 10^{-6}$	96,11

Como os fármacos cloridrato de propranolol e furosemida apresentam classificações diferentes de acordo com o SCB (cloridrato de propranolol: classe I e furosemida: classe IV) e possuem métodos para sua quantificação em meios tamponados já desenvolvidos, usualmente são usados nos estudos de permeabilidade, nos quais a furosemida assume como fármaco padrão de baixa permeabilidade e o cloridrato de propranolol como fármaco padrão de alta permeabilidade (REIS, 2013; CALDEIRA, 2015).

Comumente em ensaios PAMPA os valores encontrados de DPR são altos, como mostra o estudo de Chen e colaboradores (2008). Neste estudo, os valores de DPR encontrados foram de até 100,0 % para os ensaios PAMPA da terbutalina (CHEN et al., 2008). Não existe um limite preconizado para o DPR no PAMPA. Porém, isto não inviabiliza a realização do ensaio e não compromete os resultados quando os fármacos, mesmo com a variação, permanecem dentro da sua classificação biofarmacêutica.

De posse dos valores de  $P_{\text{eff}}$  dos fármacos padrão de alta e baixa permeabilidade, é possível analisar a permeabilidade da goiazensolida, onde o valor encontrado da sua  $P_{\text{eff}}$  será comparado com os valores da furosemida e do cloridrato de propranolol.

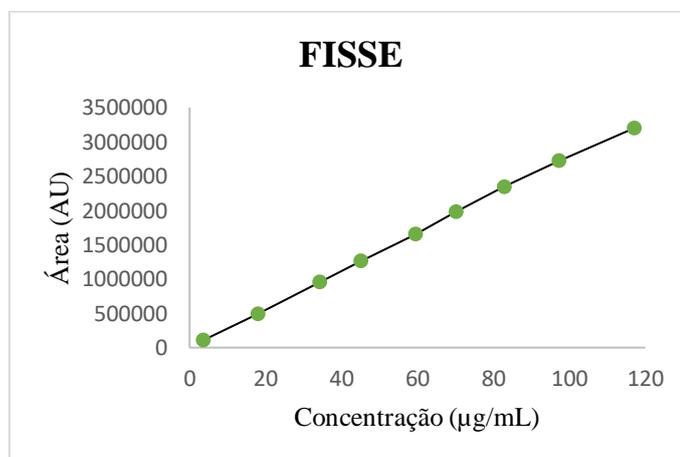
## 5.6 Avaliação da permeabilidade *in vitro* da goiazensolida pelo método PAMPA em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

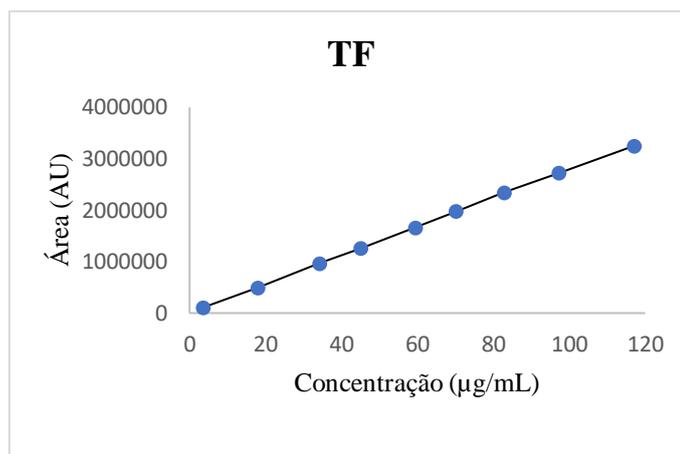
### 5.6.1 Validação parcial do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em fluido intestinal simulado sem enzimas - FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato - TF (pH 7,4)

#### 5.6.1.1 Linearidade

Na Figura 21 estão apresentadas as curvas analíticas obtidas por meio do método cromatográfico desenvolvido para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

**Figura 21** – Curvas analíticas médias (n=3) com os desvios-padrões na faixa de concentração 3,6 µg/mL a 117,0 µg/mL para a avaliação da linearidade do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em: FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)





A partir das representações gráficas de resposta *versus* concentração, os parâmetros avaliados na linearidade do método cromatográfico desenvolvido estão apresentados na Tabela 27.

**Tabela 27** – Parâmetros avaliados na linearidade do método cromatográfico desenvolvido para quantificação da goiazensolida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)

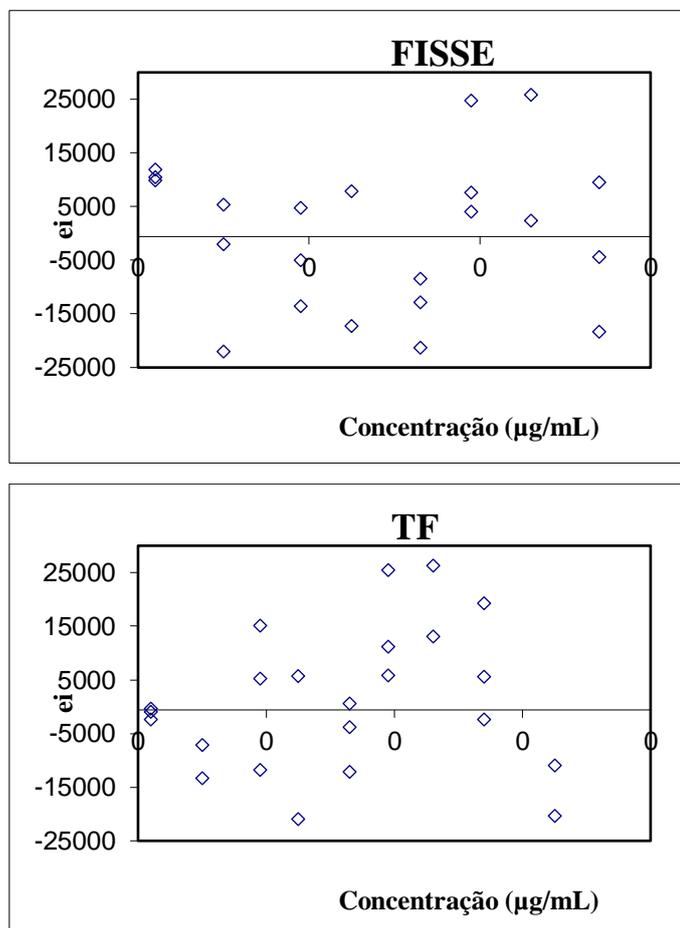
Parâmetros	Meios tamponados	
	FISSE	TF
Equação da reta	$27688x + 10449$	$27902x + 7434,2$
Coefficiente de correlação linear (r)	0,9996	0,9998
Coefficiente de determinação (r <sup>2</sup> )	0,9993	0,9998
Valor de <i>p</i>	< 0,0001	< 0,0001

O método analítico apresentou coeficientes de determinação (r<sup>2</sup>) e correlação (r) superiores a 0,99 e isto significa que os dados estão ajustados à curva, pertencendo a uma relação linear (RIBEIRO et al., 2008). Os coeficientes angulares são significativamente diferentes de zero com  $p < 0,0001$ .

Além disso, foi feita análise dos resíduos da regressão linear conforme o teste padronizado de *Jackknife*. Foram detectados cinco valores dispersos (*outliers*) para o meio FISSE (pH 6,8) e três para o meio TF (pH 7,4). A exclusão de *outliers* poderia ser de no máximo 22,2 % do total de dados originais (SOUZA et al., 2007).

Os gráficos de resíduos gerados após a exclusão dos *outliers* está mostrado na Figura 22.

**Figura 22** – Gráficos de resíduos da regressão linear do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida em: (A) FISSE (pH 6,8) e (B) TF (pH 7,4) após tratamento de *outliers*



É possível observar por meio dos gráficos de resíduos da Figura 22 que os pontos estão distribuídos aleatoriamente ao longo do eixo 0 (indicado pela linha tracejada) e não apresentam tendências.

Durante a avaliação dos resíduos da regressão linear, as premissas relativas à regressão devem ser analisadas, bem como testes para verificar a adequação do ajuste ao modelo linear por meio da significância da regressão e do desvio da linearidade pela Análise de variância (ANOVA).

As premissas analisadas foram: normalidade, verificada pelo teste de *Ryan-Joiner*; homocedasticidade, verificada pelo teste de *Brown-Forsythe* e independência, verificada pelo teste de *Durbin-Watson*.

Os resultados obtidos para os três meios tamponados estão mostrados na Tabela 28.

**Tabela 28** – Valores encontrados para as premissas dos resíduos da regressão linear, desvio da linearidade e significância da regressão resultante da análise das curvas analíticas dos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)

<b>Avaliação</b>	<b>FISSE</b>	<b>TF</b>
<b>Normalidade</b>		
Valor encontrado	0,9813	0,9929
Valor de referência	Maior que 0,9538	Maior que 0,9569
<b>Homoscedasticidade</b>		
Valor encontrado	0,0353	1,5688
Valor de referência	Menor que 2,0860	Menor que 2,0740
<b>Independência</b>		
Valor encontrado	1,4564	1,4632
Valor de referência	Entre 1,4287 e 2,5712	Entre 1,4458 e 2,5541
<b>Desvio da Linearidade</b>		
Valor encontrado	2,0500	0,2250
Valor de referência	Menor que 2,8320	Menor que 2,7066
<b>Significância da regressão</b>		
Valor encontrado	82444,34	115570,86
Valor de referência	Maior que 4,3512	Maior que 4,3009

Os resultados mostraram que nos três meios tamponados: 1) os resíduos seguem a distribuição Normal, 2) que não há autocorrelação entre os resíduos, ou seja, há independência, 3) que as variâncias dos desvios não são diferentes, então há homoscedasticidade e 4) que a regressão é significativa não havendo desvio da linearidade.

Portanto, o método cromatográfico para quantificação da goiazensolida foi linear dentro do intervalo de 3,6 µg/mL a 117,0 µg/mL, visto que cumpriu com todos requisitos necessários.

### 5.5.1.2 Seletividade

O método cromatográfico para quantificação da goiazensolida foi seletivo nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), uma vez que os valores de ângulo de pureza foram inferiores aos valores de ângulo limite. Nas Tabelas 29 e 30 são apresentados os resultados,

atestando que o método analítico foi capaz de diferenciar a goiazensolida de outras substâncias, bem como dos seus possíveis produtos de degradação.

**Tabela 29** – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição ácida

Meio tamponado	Tempos Seletividade	% Redução da área	Ângulo de Pureza	Ângulo Limite
FISSE	T0	8,85	0,317	0,332
	T24		0,282	0,343
TF	T0	27,40	0,193	0,303
	T24		0,177	0,292

**Tabela 30** – Estudo de seletividade do método analítico para quantificação da goiazensolida nos meios FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4), nos tempos zero (T0) e vinte e quatro horas (T24) após exposição a temperatura de 55,0 °C ( $\pm 5,0$  °C)

Meio tamponado	Tempos Seletividade	% Redução da área	Ângulo de Pureza	Ângulo Limite
FISSE	T0	54,24	1,138	1,986
	T24		2,124	3,630
TF	T0	87,46	2,566	4,159
	T24		4,987	8,851

Após todas as exposições de degradação forçada (ácida e térmica) foi verificada redução significativa da área do pico da goiazensolida em todos os meios tamponados, porém com ausência de sinais cromatográficos referentes aos possíveis produtos de degradação. A pureza de pico da goiazensolida foi verificada, afirmando que não houve co-eluição de interferentes conjuntamente ao seu sinal cromatográfico, mostrando assim que o método desenvolvido é adequado para ser aplicado para a função desejada sem interferência de possíveis produtos de degradação.

### 5.5.1.3 Precisão

Os resultados da precisão intracorrida e intercorrida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4) estão apresentados nas Tabelas 31 e 32, respectivamente.

**Tabela 31** – Precisão intracorrida e intercorrida do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio FISSE (pH 6,8) (n=3)

CT ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMD (n=3) ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%) Intracorrida
3,6	3,523	1,06
59,4	59,210	0,40
117,0	117,088	0,41

Onde CT é a Concentração Teórica e CMD é a concentração média determinada

**Tabela 32** – Precisão intracorrida e intercorrida do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida no meio TF (pH 7,4) (n=3)

CT ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMD (n=3) ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPR (%) Intracorrida
3,6	3,687	1,01
59,4	59,223	0,40
117,0	116,195	0,30

Os resultados obtidos para a precisão intracorrida mostraram que o método cromatográfico para quantificação da goiazensolida é preciso, dado que apresentou valores de DPR inferiores a 5,0 % (TAVENIERS; LOOSE; BOCKTAELE, 2004). Dessa forma, o método atende aos critérios de finalidade e desempenho para a precisão, assegurando resultados precisos.

### 5.5.1.4 Exatidão

Na Tabela 33 estão apresentados os valores encontrados para a exatidão do método nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4).

**Tabela 33** – Resultados da exatidão do método cromatográfico para quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)

Meio tamponado	CT (µg/mL)	CMD (n=3) (µg/mL)	Exatidão (%)
<b>FISSE</b>	3,6	3,523	97,86
	59,4	59,210	99,68
	117,0	117,088	98,36
<b>TF</b>	3,6	3,687	102,43
	59,4	59,223	99,70
	117,0	116,195	99,31

Os resultados encontrados estavam dentro da faixa de exatidão entre 95,0 a 105,0 % proposta por Kumar e colaboradores quando se usa meios tamponados que simulam o pH do TGI (KUMAR et al. 2012). Dessa forma, o método cromatográfico pode ser considerado exato.

#### 5.5.1.5 Limites de detecção e de quantificação

Os resultados do cálculo do LD e LQ estão apresentados na Tabela 34.

**Tabela 34** – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para o método de quantificação da goiazensolida nos meios tamponados FISSE (pH 6,8) e TF (pH 7,4)

Meio tamponado	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
<b>FISSE</b>	0,813	2,712
<b>TF</b>	0,804	2,681

Os valores encontrados para LD e LQ, mostraram que a menor concentração da faixa de trabalho é passível de detecção e quantificação, visto que este ponto (3,6 µg/mL) é superior ao limite que o método é capaz de quantificar.

#### 5.6.2 Avaliação da permeabilidade *in vitro* da goiazensolida em fluido intestinal simulado sem enzimas – FISSE (pH 6,8) e tampão fosfato – TF (pH 7,4)

Na Tabela 35 estão apresentados os resultados encontrados para a permeabilidade efetiva ( $P_{\text{eff}}$ ) da goiazensolida para a avaliação da permeabilidade *in vitro* utilizando o ensaio PAMPA.

**Tabela 35** - Resultado de permeabilidade efetiva ( $P_{\text{eff}}$ ) para a goiazensolida, utilizando o meio FISSE (pH 6,8) como compartimento doador, TF (pH 7,4) como compartimento receptor, solução lipídica a 5,0%, agitação de 50 rpm, 5 horas de incubação a 37,0 °C

$P_{\text{eff}}$ (cm/s) (n=3)	DPR (%)
$0,03 \times 10^{-6}$	56,36

Como observado, a  $P_{\text{eff}}$  da goiazensolida foi inferior à encontrada para o fármaco padrão de baixa permeabilidade, furosemida, que apresentou  $P_{\text{eff}}$  igual a  $1,03 \times 10^{-6}$  cm/s. Isto sugere que a goiazensolida seja de baixa permeabilidade, o que corrobora com os resultados de cLogP encontrados *in silico*, quando comparados ao do metoprolol.

Uma vez determinada a alta solubilidade da goiazensolida e sua possível baixa permeabilidade, esta substância pode, provavelmente, ser classificada como classe III do SCB, sendo necessária a realização de estudos de permeabilidade *in vivo* para confirmação.

O ensaio PAMPA compreende, principalmente, o estudo da absorção passiva transcelular. Entretanto sabe-se que a absorção de fármacos pode ocorrer por mecanismos de transporte passivo paracelular ou ser substrato de transportadores, tanto de influxo quanto de efluxo (BALIMANE; CHONG; MORRISON, 2000). Desse modo, a goiazensolida apesar de possuir baixa permeabilidade por transporte passivo transcelular para permeação através das membranas, pode, presumivelmente, difundir-se por outros mecanismos de absorção que não são mensurados no PAMPA e apresentar maior biodisponibilidade.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados encontrados *in silico* para a goiazensolida permitiram deduzir que esta substância possui características de alta solubilidade, pelos valores de cLogS equiparáveis a fármacos altamente solúveis, e de baixa permeabilidade, em comparação com o valor de cLogP do metoprolol. Porém, exibe absorção intestinal favorecida quando administrada por via oral por apresentar valores de LogP entre 1,0 e 3,0 e por seguir a “regra dos cinco” de Lipinski (BARRET, 2018; LIPINSKI et al., 2001).

O estudo de solubilidade em equilíbrio da goiazensolida, utilizando o método da agitação orbital em frascos, permitiu a classificação dessa substância como de alta solubilidade segundo SCB, dado que os valores de razão D/S foram inferiores a 250 mL, confirmando os dados obtidos *in silico*. Além disso, a goiazensolida se mostrou estável nos três meios tamponados durante a realização do estudo de solubilidade em equilíbrio.

A baixa permeabilidade encontrada *in silico* para a goiazensolida foi corroborada por meio da avaliação da permeabilidade *in vitro* utilizando o ensaio PAMPA, apresentando  $P_{eff}$  igual a  $0,03 \times 10^{-6}$  cm/s inferior ao fármaco padrão de baixa permeabilidade, furosemida ( $P_{eff}$  igual a  $1,03 \times 10^{-6}$  cm/s).

A avaliação biofarmacêutica da goiazensolida apontou a alta solubilidade e a provável baixa permeabilidade desta substância, sugerindo colocá-la na classe III do SCB, sendo importante a realização do estudo de permeabilidade *in vivo* com intuito de confirmar esta afirmativa.

Vários fármacos da classe III do SCB estão disponíveis no mercado: ácido acetilsalicílico que possui cLogP de 1,02, captopril que possui cLogP de 0,89 e cloranfenicol que possui cLogP de 1,28 (KASIM et al., 2004). Sendo assim, a goiazensolida é comparável a vários fármacos presentes no mercado atualmente.

A goiazensolida, apresenta alta solubilidade em meios tamponados e apesar de apresentar baixa permeabilidade, ainda terá absorção intestinal. Este fato é verificado uma vez que foram comprovadas várias atividades farmacológicas desta substância *in vitro* e *in vivo* em animais, como mostrado por trabalhos do grupo de pesquisa (BERNARDES et al., 2019). Portanto, a baixa permeabilidade da goiazensolida não impede a sua biodisponibilidade oral.

Embora não se saiba se a goiazensolida atravessa a membrana plasmática por meio de outros mecanismos de transporte, o valor encontrado para o transporte transcelular passivo já é considerado expressivo para classificar essa lactona sesquiterpênica como potencial candidato à fármaco.

A goiazensolida pode vir a se tornar um fármaco com ação na inflamação, hiperuricemia e gota, a ser administrado por via oral. Outros estudos devem ser realizados a fim de proporcionar uma formulação adequada que possibilite máxima biodisponibilidade da substância no organismo humano.

## REFERÊNCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. Small Molecule Separation Zorbax Eclipse XDB. Disponível em: <https://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/lc-columns/small-molecule-separations/zorbax-eclipse-xdb>. Acesso em: 07 de julho de 2019.
- AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. 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.
- ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.
- ARAGÃO, V. **Síntese da estrutura macrocíclica dos furanoeliangolidos**. Tese de doutorado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- ASHFORD, M. Biodisponibilidade – fatores físico-químicos e relacionados à forma farmacêutica. *In*: AUTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. Artmed, 2005, p. 245-263.
- AVDEEF, A. Permeability. *In*: AVDEEF, A. **Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state**. First Edition. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003, p. 116-246.
- AVDEEF, A. Permeability – PAMPA. *In*: AVDEEF, A. **Absorption and drug development: solubility, permeability and charge state**. Second Edition. New Jersey: Wiley-Interscience, 2012, p. 319-498.
- AVDEEF, A.; ARTURSSON, P.; NEUHOFF, S.; LAZOROVA, L.; GRASJO, J.; TAVELIN, S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKa(flux) method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 24, n. 4, p. 333-349, 2005.
- BABU, V.R.; AREEFULLA, S.H.; MALLIKARJUN, V. Solubility and dissolution enhancement: an overview. **Journal of Pharmacy Research**. v. 3, n. 1, p. 141-145, 2010.
- BAKA, E.; COMER, J.E.A.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.46, p. 335-341, 2008.
- BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v. 44, p. 301-312, 2000.
- BARRET, R. Importance and Evaluation of Lipophilicity. *In*: BARRET, R. **Medicinal Chemistry**. First Edition. Amsterdam: Elsevier, 2018, p. 53-78.
- BARRET, R. Importance and Evaluation of the Polar Surface Area (PSA and TPSA). *In*: BARRET, R. **Medicinal Chemistry**. First Edition. Amsterdam: Elsevier, 2018, p. 89-95.

BERNARDES, A.C.F.P.F. **Avaliação das atividades anti-hiperuricêmica e antiartrite gotosa de lactonas sesquiterpênicas**. Dissertação de mestrado – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

BERNARDES, A.C.F.P.F.; COELHO, G.B.; ARAÚJO, M.C.P.M.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. *In vivo* anti-hyperuricemic activity of sesquiterpene lactones from *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 29, p. 241-245, 2019.

BOHLMANN, F.; MOLLER, L.; KING, R.M.; ROBINSON, H. A guaianolide and other constituents from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**. v. 20, n. 5, p. 1149-1151, 1981.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R.M. Germacranolides from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**. v. 21, n. 5, p. 1087-1091, 1982.

BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W.R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 26, p. 671-676, 1998.

BORKOSKY, S.; PONCE DE LEON, S.; JUAREZ, G.; SIERRA, M.G.; BARDON, A. Molluscicidal sesquiterpene lactones from species of the tribe Vernonieae (Compositae). **Chemistry & Biodiversity**. v. 6, n. 409; p. 513–519, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010a. **“Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo”**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 de agosto de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Farmacopeia Brasileira 5ª Edição. Brasília: Anvisa, 2010b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 8 de junho de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Farmacopeia Brasileira 6ª Edição. Brasília: Anvisa, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/Volume+I+Pronto.pdf/4ff0dfe8-8a1d-46b9-84f7-7fa9673e1ee1>. Acesso em: 20 de janeiro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 37, de 3 de agosto de 2011. **“Dispõe sobre o Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência e dá outras providências”**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 3 de agosto de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **“Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências”**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de julho de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 190p., 2006.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. New York: Intercept, 1995, 499 p.

BUENO, M.M.; RECH, N. Insumos Farmacêuticos – Aspectos Técnicos, Científicos e Regulatórios. *In*: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAL, M.N. **Ciências Farmacêuticas. Biofarmacotécnica**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p. 12-20.

CALDEIRA, T. G. **Avaliação da solubilidade em equilíbrio e da permeabilidade *in vitro* da eremantolida C**. Dissertação de mestrado – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.

CAPELARI-OLIVEIRA, P.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; CAMPOS, F.T.; GRABE-GUIMARÃES, A.; LOMBARDI, J.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian “Arnica”). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 135, n. 2, p. 393-398, 2011.

CASTAGNARO, D.; BECKER-ALGERI, T.A.; FURLONG, E.B.; DRUNKLER, D.A. Influência da Acidificação da Fase Móvel Na Qualidade da Detecção e Separação Simultânea de Aflatoxinas M1 e B1 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Blucher Food Science Proceedings**. v. 1, n. 1, p. 163-164, 2014.

CERQUEIRA, M.B.S.; SOUZA, J.T.; AMADO JÚNIOR, R.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). **Ciência e Cultura**. v. 39, n. 5/6, p. 551-553, 1987.

CHEN, X.; MURAWSKI, A.; PATEL, K.; CRESPI, C.L.; BALIMANE, P.V. A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. **Pharmaceutical Research**. v. 25, n. 7, p. 1511-1520, 2008.

CHICARO, P. **Estudo fitoquímico dos metabólitos secundários das folhas de *Lychnophora passerina* (Mart. ex. DC) Gardn.** Dissertação de mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

COLLINS, C.H; BRAGA G. L; BONATO P.S. **Fundamentos de cromatografia**, Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

CRISTOFOLETTI, R.; CHIANN, C.; DRESSMAN, J.B.; STORPIRTIS, S. A comparative analysis of biopharmaceutics classification system and biopharmaceutics drug disposition classification system: a cross-sectional survey with 500 bioequivalence studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 102, n. 9, p. 3136-3144, 2013.

CRITTENDEN, D.B.; PILLINGER, M.H. The year in gout: 2011–2012. **Bulletin of the NYU Hospital Joint Diseases**. v. 70, n. 3, p. 145–151, 2012.

CUNHA, W.R.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; DÍAZ, J.G.; HERZ, W. Eremantholides and a guaianolide from *Lychnophora rupestris*. **Phytochemistry**. v. 39, n. 2, p. 387-389, 1995.

DE SOUZA, M.R.; DE PAULA, C.A.; PEREIRA DE REZENDE, M.L.; GRABE-GUIMARÃES, A.; DE SOUZA FILHO, J.D., SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-

inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 142, n. 3, p. 845-850, 2012.

DEZANI, A. B. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na permeabilidade de fármacos antirretrovirais por meio dos modelos *ex vivo* (células de Franz) e *in vitro* (PAMPA)**. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

EMA. **Guideline on the investigation of bioequivalence**. Committee for medicinal products for human use (CHMP), European Medicines Agency. London, 2010. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf). Acesso em: 10 de julho de 2018.

FALLER, B. Artificial membrane assays to assess permeability. **Current Drug Metabolism**. v. 9, n. 9, p. 886-892, 2008.

FDA. **Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System**. U.S. Department of Health and Human Service, Food and Drugs Administration, Center for Drug Evaluation Research (CDER), 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf>. Acesso em: 10 de julho de 2018.

FELTRE, R. **Química geral**. 1 v. 6 ed. São Paulo: Moderna, 2004.

FERRARI, F.C.; FERREIRA, L.C.; SOUZA, M.R.; GRABE-GUIMARÃES, A.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpha* Spreng. (Brazilian Arnica). **Phytotherapy Research**. v. 27, n. 3, p. 384-389, 2013.

FERRAZ-FILHA, Z.S.; VITOLO, I.F.; FIETTO, L.G.; LOMBARDI, J.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (“Arnica”). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 79-82, 2006.

FLORA DO BRASIL. **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 12 de janeiro de 2020.

FREITAS, G.C.; CARREGARO, A.B.; Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**. v. 43, n. 2, p. 297-304, 2013.

GLOMME, A.; MÄRZ, J.; DRESSMAN, J.B. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 33, n. 1, p. 1-16, 2005.

GRAEL, C.F.F.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, J.L.C.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, W.R. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. **Phytotherapy Research**. v. 14, n. 3, p. 203-206, 2000.

GRAEL, C.F.F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**. v. 76, n. 1, p. 73-82, 2005.

GUZZO, L.S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; SILVA, A.C.; LOMBARDI, J.A.; GUIMARÃES, H.N.; GRABE-GUIMARÃES A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, n. 1, p. 120-124, 2008.

HERZ, W.; GOEDKEN, V.L. Structure of Goyazensolide and Its Congeners. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 47, n. 14, p. 2798-2800, 1982.

HUGHES, J.D.; BLAGG, J.; PRICE, D.A.; BAILEY, S.; DECRESCENZO, G.A.; DEVRAJ, R.V.; ELLSWORTH, E.; FOBIAN, Y.M.; GIBBS, M.E.; GILLES, R.W.; GREENE, N.; HUANG, E.; KRIEGER-BURKE, T.; LOESEL, J.; WAGER, T.; WHITELEY, L.; ZHANG, Y. Physico-chemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 4872-4875, 2008.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Compendium of Chemical Terminology Gold Book**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2014, 1622p. Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/index.html>. Acesso em: 10 de junho de 2019.

JORGENSEN, W.L.; DUFFY, E.M. Prediction of drug solubility from structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 54, p. 355-366, 2002.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; GRAEL, C.F.F.; JORDÃO, C.O.; AZZOLINI, A.E.; LOPES, J.L.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora pohlii*: neutrophil chemiluminescence inhibition and free radical scavenger activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 58, n. 6, p. 853-858, 2006.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41, n. 7, p. 1007-1010, 1998.

KASIM, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**. v. 1, n. 1, p. 85-96, 2004.

KIM, S.C.; NEWCOMB, C.; MARGOLIS, D.; ROY, J.; HENNESSY, S. Severe cutaneous reactions requiring hospitalization in allopurinol initiators: a population-based cohort study. **Arthritis Care & Research**. v. 65, n. 4, p. 578-584, 2013.

KERNS, E.H.; DI, L.; PETUSKY, S.; FARRIS, M.; LEY, R.; JUPP, P. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 93, n. 6, p. 1440-1453, 2004.

KUMAR, N.; SANGEETHA, D.; REDDY, P.S.; REDDY, A.M. Development and validation of a dissolution test for delayed release capsule formulation of duloxetine hydrochloride. **Current Pharmaceutical Analysis**. v. 8, n. 3, p. 236-246, 2012.

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

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J.B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 58, p. 265-278, 2004.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 46, p. 3-26, 2001.

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

NAKAJIMA, J.N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 24, n. 24, p. 471-478, 2001.

MAHMOOD, I. Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.59, n.11, p.1177-1192, 2007.

MANTOVANI, M.S.; TAKAHASHI, C.S.; VICHNEWSKI, W. Evaluation of the genotoxic activity of the sesquiterpene lactone goyazensolide in mammalian systems in vitro and in vivo. **Revista Brasileira de Genética**. v. 16, n. 4, p. 967-975, 1993.

MARTINEZ, M.N.; AMIDON, G.L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**. n. 42, p. 620-643, 2002.

MARVIN SKETCH PROGRAM®. Disponível em: <http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2019.

MILAGRE, M.M.; BRANQUINHO, R.T.; GONÇALVES, M.F.; ASSIS, G.M.P.; OLIVEIRA, M.T.; REIS, L.E.S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; LANA, M. Activity of the sesquiterpene lactone goyazensolide against *Trypanosoma cruzi* in vitro and in vivo. **Parasitology**. p.1-12, 2019.

MCDUGAL, P.G.; OH, Y.; VANDERVEER, D.J. Synthesis of the furanoheliangolide ring skeleton. **The Journal of Organic Chemistry**. v. 54, n. 1, 1989.

MOLINSPIRATION CHEMINFORMATICS®. Disponível em: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

MONTEIRO, P. F. **Solubilidade em equilíbrio pelo método da agitação orbital em frascos: padronização e definição dos fármacos controle**. Dissertação de mestrado – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

MÜLLER, C.M.S.; COELHO, G.B.; ARAÚJO, M.C.P.M.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. *Lychnophora pinaster* ethanolic extract and its chemical constituents ameliorate hyperuricemia and related inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 242, 112040, 2019.

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

NIELSEN, P.E.; AVDEEF, A. PAMPA – a drug absorption *in vitro* model 8. Apparent filter porosity and the unstirredwater layer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 22, p. 33-41, 2004.

OLIVEIRA, A.B.; CHIARI, E.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; GRANDI, T.S.M.; STEHMANN, J.R.; ANJOS, M.G. In vitro screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytoterapy Research**. v. 10, n. 7, p. 636-638, 1996a.

OLIVEIRA, A.B.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; CHIARI, E. Trypanocidal Sesquiterpenes from *Lychnophora* Species. **Phytoterapy Research**. v. 10, n. 4, p. 292-295, 1996b.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**. v. 34, n. 7, p.1224-1230, 2011.

OLIVEIRA, M.A.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L.; MUSSEL, W.N.; VIANNA-SOARES, C.D.; PIANETTI, G.A. Análise térmica aplicada à caracterização da sinvastatina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**. v. 33, n. 8, p. 1653-1657, 2010.

OSIRIS PROPERTY EXPLORER®. Disponível em: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. Acesso em: 17 de julho de 2019.

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

PEREIRA, T.M. **Avaliação da solubilidade e da permeabilidade intestinal de fármacos antirretrovirais**. Aplicações na Classificação Biofarmacêutica. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

PERRY, K.S.P. **Estudo químico, bio-monitorado, das partes aéreas de *Lychnophora passerina* (Mart. ex. DC) Gardn.** Dissertação de mestrado – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164 -171, 2008.

REES, F.; JENKINS, W.; DOHERTY, M. Patients with gout adhere to curative treatment if informed appropriately: proof-of-concept observational study. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 72, n. 6, p. 826–830, 2013.

REFSGAARD, H.H.F.; JENSEN, B.F.; BROCKHOFF, P.B.; PADKJAER, S.B.; GULDBRANDT, M.; CHRISTENSEN, M.S. In silico prediction of membrane permeability from calculated molecular parameters. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 48, n. 3, p. 805–811, 2005.

REIS, J. M. **Utilização de PAMPA como ferramenta para predizer a fração de absorção in vivo de fármacos e sua correlação com a taxa de metabolização in vitro**. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

REIS, A.C.C. **Desenvolvimento e validação de método analítico adequado a estudos biofarmacêuticos relativos à furosemida**. Dissertação de Mestrado – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

REN, Y.; ACUÑA, U.M.; JIMÉNEZ, F.; GARCÍA, R.; MEJÍA, M.; CHAI, H.; GALLUCCI, J.C.; FARNSWORTH, N.R.; SOEJARTO, D.D.; CARCACHE DE BLANCO, E.J.; KINGHORN, A.D. Cytotoxic and NF- $\kappa$ B inhibitory sesquiterpene lactones from *Piptocoma rufescens*. **Tetrahedron**, v. 68, n. 12, p. 2671–2678, 2012.

REN, Y.; GALLUCCI, J.C.; LI, X.; CHEN, L.; YU, J.; KINGHORN, A.D. Crystal structures and human leukemia cell apoptosis inducible activities of parthenolide analogues isolated from *Piptocoma rufescens*. **Journal of Natural Products**. v. 81, p. 554–561, 2018.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: A proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 7, n. 11, p. 2343–2352, 1999.

SAÚDE, D.A. **Estudo químico e atividade tripanossomicida de *Lychnophora trichocarpha* Spreng**. Dissertação de mestrado – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1994.

SAÚDE, D.A.; BARRERO, A.F.; OLTRA, J.F.; JUSTICIA, J.; RASLAN, D.S.; SILVA, E.A. Atividade antibacteriana de furanoelíngólidos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 12, n. 1, p. 7–10, 2002.

SAÚDE, D.A.; RASLAN, D.S.; DE SOUZA FILHO, J.D.; DE OLIVEIRA, A.B. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpha*. **Fitoterapia**. v. 69, p. 90–91, 1998.

SAVJANI, K.T.; GAJJAR, A.K.; SAVJANI, J.K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **International Scholarly Research Network Pharmaceutics**. v. 2012, 2012.

SCHOMBURG, C.; SCHUEHLY, W.; DA COSTA, F.B.; KLEMPNAUER, K.H.; SCHMIDT, T.J. Natural sesquiterpene lactones as inhibitors of Myb-dependent gene expression: Structure-activity relationships. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 63, p. 313–320, 2013.

SCHRÖDER, D.; GOLDBERG, N.; ZUMMACK, W.; SCHWARZ, H.; POUTSMA, J.C.; SQUIRES, R.R. Generation of  $\alpha$ -acetolactone and acetoxyl diradical  $\bullet\text{CH}_2\text{COO}\bullet$  in the gas phase. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Process.** v. 165-166, p. 71-82, 1991.

SEMIR, J. **Revisão Taxonômica de *Lychnophora Mart. (Vernoniae: Compositae)***. Tese de doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

SHARMA, V.; McNEILL, J.H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. **British Journal of Pharmacology.** v.157, n.6, p.907-921, 2009.

SMITH, E.U.R.; DIAZ-TORNE, C.; PEREZ-RUIZ, F.; MARCH, L.M. Epidemiology of gout: an update. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology.** v. 24, n. 6, p. 811–827, 2010.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development.** 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOUZA, J.; FREITAS, Z.M.F.; STORPIRTIS, S. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 43, n. 4, p. 515-527, 2007.

SOUZA, S.V.C.; LIMA, J.A.; TEODORO, J.C.; JUNQUEIRA, R.G. Validação intralaboratorial de método quantitativo para determinação múltipla de resíduos de avermectinas em leite bovino por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 27, n. 4, p. 823-836, 2007.

SPEAR, S.A.; BURNS, S.S.; OBLINGER, J.L.; REN, Y.; PAN, L.; KINGHORN, A.D.; WELLING, D.B.; CHANG, L.S. Natural compounds as potential treatments of NF2-deficient schwannoma and meningioma: Cucurbitacin D and Goyazensolide. **National Institute of Health.** v. 34, n. 8, p. 1519-1527, 2013.

STENBERG, P.; LUTHMAN, K.; ELLENS, H.; LEE, C.P.; SMITH, P.L.; LAGO, A.; ELLIOT, J.D.; ARTURSSON, P. Prediction of the intestinal absorption of endothelin receptor antagonists using three theoretical methods of increasing complexity. **Pharmaceutical Research.** v. 16, n. 10, p. 1520-1526, 1999.

STORPIRTIS, S.; GAI, M.N. Biofarmacotécnica: Princípios de Biodisponibilidade, Bioequivalência, Equivalência Farmacêutica, Equivalência Terapêutica e Intercambialidade de Medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAL, M.N. **Ciências Farmacêuticas. Biofarmacotécnica.** 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p. 3-11.

TAVENIERS, I.; LOOSE, M.D.; BOCKSTAELE, E.V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Analytical Chemistry.** v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

UGOLINE, B.C.A.; DE SOUZA, J.; FERRARI, F.C.; FERRAZ-FILHA, Z.N.; COELHO, G.B.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. The influence of seasonality on the content of goyazensolide and on antiinflammatory and anti-hyperuricemic effects of the ethanolic extract of *Lychnophora passerina* (Brazilian arnica). **Journal of Ethnopharmacology.** v. 198, p. 444-450, 2017.

VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.Y.; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VEMULA, V.R.; LAGISHETTY, V.; INGALA S. Solubility enhancement techniques. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**. Review and Research, v. 5, n. 1, p. 41–51, 2010.

VICHNEWSKI, W.; SARTI, S.J.; GILBERT, B.; HERZ, W. Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*. **Phytochemistry**. v. 15, n. 1, p. 191-193, 1976.

VONGVANICH, N.; KITTAKOOP, P.; CHAROENCHAI, P.; INTAMAS, S.; SRIKLUNG, K.; THEBTARANONTH, Y. Antiplasmodial, antimycobacterial and cytotoxic principles from *Camchaya calcarea*. **Planta Medica**. v. 72, n. 15, p. 1427-1430, 2006.

WHO. **Annex 6 – Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability**. World Health Organization, Technical Report Series, n° 1003, 2017. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js23245en>. Acesso em: 15 de junho de 2019.

## ANEXOS

## ANEXO A



## Certificado

Certificamos que **IARA DEVULA TISO TANA** apresentou o trabalho intitulado **ENSAIO DE PERMEABILIDADE EM MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA) PARA A AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO PASSIVA DE FÁRMACOS** do(s) autor(es) **TANA, I.D.T.; CALDEIRA, T.G.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; SOUZA, J.** na modalidade de **pôster** durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR**.

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.

**Lucas Antônio Miranda Ferreira**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Faculdade de Farmácia – UFMG

**Saulo Fehelberg Pinto Braga**  
Membro da Comissão Organizadora  
III SINCIFAR

UFMG



## CAPÍTULO 19

### PREDIÇÃO DA ABSORÇÃO PASSIVA DE FÁRMACOS POR MEIO DA PERMEABILIDADE DETERMINADA IN VITRO UTILIZANDO O ENSAIO EM MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA (PAMPA)

**Iara Dêvula Tiso Tana**

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia  
Ouro Preto – Minas Gerais

**Tamires Guedes Caldeira**

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia  
Ouro Preto – Minas Gerais

**Renata Rodrigues Lima**

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia  
Ouro Preto – Minas Gerais

**Dênia Antunes Saúde Guimarães**

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia  
Ouro Preto – Minas Gerais

**Jacqueline de Souza**

Universidade Federal de Ouro Preto, Escola de Farmácia  
Ouro Preto – Minas Gerais

**RESUMO:** A biodisponibilidade de fármacos veiculados em formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata está relacionada com as propriedades de solubilidade e permeabilidade do fármaco ao longo do trato gastrointestinal (TGI). Diversos modelos *in vitro* têm sido empregados na determinação e caracterização da permeabilidade, como o ensaio de Permeabilidade em Membrana

Artificial Paralela (PAMPA) que estima a absorção passiva transcelular de moléculas a partir de suas características físico-químicas. O presente capítulo tem o objetivo de descrever a determinação da permeabilidade de fármacos pelo modelo *in vitro* PAMPA, bem como expor as variações da técnica, suas características e dificuldades, apresentando também exemplos de experimentos realizados com fármacos. Para isso, foi realizada busca bibliográfica em banco de dados como Science Direct e PeriódicosCapes, selecionando artigos entre 1998 a 2018. Vinte e sete artigos que descreveram a técnica foram encontrados. Estes mostraram as variações de diversos parâmetros durante o ensaio de predição da permeabilidade no TGI, na pele e na barreira hematoencefálica e apresentaram os cuidados e as limitações do ensaio. O PAMPA é uma técnica rápida, simples, considerada capaz de prever a absorção de fármacos em várias regiões do organismo por meio do ajuste de variáveis inerentes ao estudo e, principalmente, de proporcionar resultados correlacionáveis aos demais modelos. O PAMPA também possui cuidados que devem ser levados em consideração como forma de evitar fontes de erro.

**PALAVRAS-CHAVE:** ensaio PAMPA, permeabilidade, PAMPA permeabilidade.

## ANEXO C



República Federativa do Brasil  
Ministério da Educação  
Universidade Federal de Ouro Preto  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Pró-reitoria de Graduação  
Pró-reitoria de Extensão

**CERTIFICADO**

Certificamos que IARA DEVULA TISO TANA participou da IV Mostra de Pós-Graduação da UFOP – ENCONTRO DE SABERES, realizado de 05 a 07 de novembro de 2019, na qualidade de Apresentador(a), na categoria pôster, do trabalho: Predição das características físico-químicas e análise térmica do potencial candidato a fármaco goiazensolida, de autoria de: IARA DEVULA TISO TANA, DENIA ANTUNES SAUDE GUIMARAES, TAMIRES GUEDES CALDEIRA, MARIA BETÂNIA DE FREITAS MARQUES, WAGNER DA NOVA MUSSEL, JACQUELINE DE SOUZA.



Autenticidade

Ouro Preto, 07 de novembro de 2019

Código: 15729871635dc1e11b53ed4

*Marcos Eduardo Calvetti G. Krupp*  
Prof. Marcos Eduardo Calvetti G. Krupp  
Pró-Reitor de Extensão

*Tânia Rosal Garbin*  
Prof. Dr.ª Tânia Rosal Garbin  
Pró-Reitora de Graduação

*Ranata Gasara de Sá Cruz*  
Ranata Gasara de Sá Cruz  
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa e Pós-Graduação

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em [www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados](http://www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados)

## ANEXO D



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso  
 Cadastro nº AD96C72

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: AD96C72  
 Usuário: UFOP  
 CPF/CNPJ: 23.070.869/0001-10  
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético  
 Finalidade do Acesso: Pesquisa

**Espécie**

*Lyohnophora passerina*

Título da Atividade: AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DA GOIAZENSOLIDA

**Equipe**

Dénia Antunes Saúde Guimarães	UFOP
Jacqueline de Souza	Universidade Federal de Ouro Preto
Tamires Guedes Caldeira	Universidade Federal de Ouro Preto
Iara Dévula Tico Tana	Universidade Federal de Ouro Preto

Data do Cadastro: 08/11/2018 21:41:55  
 Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 21:42 de 08/11/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - SISGEN