

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA – UFSM
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PPGCF

Paula Bianchetti

**MODELO PAMPA PARA ESTUDO COMPARATIVO DA PERMEABILIDADE DE
COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS E A PARTIR DE EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS**

TESE DE DOUTORADO

Santa Maria, RS

2018

Paula Bianchetti

**MODELO PAMPA PARA ESTUDO COMPARATIVO DA PERMEABILIDADE DE
COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS E A PARTIR DE EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS**

**Tese apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

**Santa Maria, RS
2018**

Bianchetti, Paula
Modelo PAMPA para estudo comparativo da
permeabilidade de compostos fenólicos isolados e a partir
de extratos de plantas medicinais / Paula Bianchetti.-
2018.
162 p.; 30 cm

Orientador: Leandro Machado de Carvalho
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

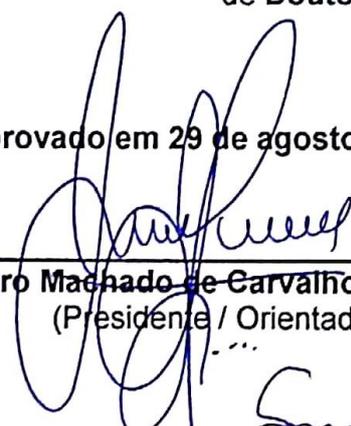
1. Compostos Fenólicos 2. Cromatografia 3. Modelo
PAMPA 4. Permeação I. Machado de Carvalho, Leandro II.
Título.

Paula Bianchetti

**MODELO PAMPA PARA ESTUDO COMPARATIVO DA PERMEABILIDADE
DE COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS E A PARTIR DE ESTRATOS DE
PLANTAS MEDICINAIS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
do Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para a obtenção do título
de **Doutor em Ciências Farmacêuticas.**

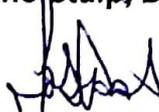
Aprovado em 29 de agosto de 2018



Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)
(Presidente / Orientador)



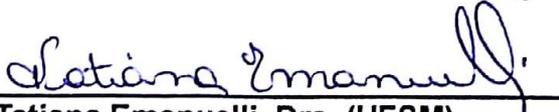
Simone Stülp, Dra. (Univates)



José Maria Monserrat, Dr. (FURG)



Leticia Cruz, Dra. (UFSM)



Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS.

2018

DEDICATÓRIA

“Dedico esse trabalho a todas aquelas pessoas que acreditam em um futuro melhor a partir da educação, a todos estudantes que tive o prazer de encontrar e ainda encontrarei”.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Leandro Machado de Carvalho por aceitar a orientação e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Um agradecimento especial a Professora Simone Stülp, que sempre me incentivou e acreditou em mim, fez aumentar minha afeição pela pesquisa, e nunca desistiu da fisioterapeuta na físico-química, obrigada por sempre me incentivar a alçar novos voos e buscar sempre mais, se hoje tenho a possibilidade de encerrar mais essa fase, com certeza ela se deve em muito a professora Simone.

Aos meus familiares, especialmente meus pais, que me apoiaram e estiveram comigo em todos os momentos tanto nos mais tranquilos, quanto nos mais difíceis. A minha mãe, pelas horas dispostas e viagens realizadas junto comigo a Santa Maria, que não foram poucas, mas sua companhia as fez serem mais tranquilas. Obrigada por, nos momentos mais difíceis, vocês terem as palavras certas para que eu pudesse me manter focada.

Ao Cristiano, que me encontrou no meio desta jornada, obrigado por embarcar comigo nesta trajetória, incentivar meu caminho, ouvir meus lamentos e aguentar os momentos de euforia.

Um agradecimento especial a Martha Horn, pela enorme ajuda que me prestou na execução desta pesquisa, pela paciência, boas conversas e por se tornar uma amiga tão querida, foste essencial para a realização deste trabalho.

Ao professor Eduardo Ethur, por me socorrer nos momentos de desespero e me auxiliar na química orgânica, além da amizade.

As minhas colegas do LACHEM, em especial a Géssica Domingos, Diana Tomazzi Muratt, Gabriela Zemolin, por me auxiliaram e me ensinarem a utilizar os equipamentos que eu não dominava, grata por toda a ajuda.

Aos meus colegas de trabalho, tanto da Univates quanto da Unisc por terem me incentivado e por terem paciência ao longo desses anos.

Aos professores Simone Stülp, José Maria Monserrat, Letícia Cruz e Tatiana Emanuelli, desde já obrigada pelas contribuições e pela disponibilidade em avaliar esse trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria juntamente com o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

MODELO PAMPA PARA ESTUDO COMPARATIVO DA PERMEABILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS E A PARTIR DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS

AUTORA: Paula Bianchetti

ORIENTADOR: Leandro Machado de Carvalho

O uso de compostos naturais oriundos de plantas da flora nacional disponibiliza à população em geral o acesso ao tratamento de diversas disfunções e o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos. Logo, é importante que testes de permeação desses compostos sejam realizados para que se tenha completa eficácia terapêutica. Para isso, modelos de permeação são utilizados. Alguns desses modelos são denominados *PAMPA* (do inglês *Parallel Artificial Membrane Permeability Assays*) e mimetizam diferentes tipos de membranas celulares e a capacidade de permeação destes tecidos, como a via gastrointestinal, via transepidermica e via hematoencefálica. O objetivo deste estudo foi avaliar a permeação de compostos fenólicos em diferentes modelos de permeação (cutânea, gastrointestinal e barreira hematoencefálica) empregando membranas modificadas do tipo *PAMPA*. Para isso foi realizada a modificação de membranas de polivinildifluoreto (PVDF) em três modelos de absorção: gastrointestinal, cutânea e hematoencefálica. Os antioxidantes presentes nessas plantas já foram avaliados através de espectroscopia de massas (LC-MS/MS), a partir desse estudo foram avaliados 8 antioxidantes que apresentaram maior quantidade disponível. As avaliações dos componentes permeados foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodo (HPLC-DAD) e amperométrico (HPLC-PAD). Para uma adequada utilização das membranas, as mesmas foram caracterizadas com avaliação da superfície por microscopia eletrônica de varredura e teste de difusão de íons. Foi possível verificar que as membranas modificadas – *PAMPA_{PELE}*, *PAMPA_{TGI}* e *PAMPA_{BHE}* – apresentam um bom modelo para mimetização da permeação cutânea, do trato gastrointestinal e da barreira hematoencefálica. Observa-se através dos estudos realizados que o ácido clorogênico apresenta melhor perfil de permeação nas três membranas, tanto no ativo individual como na mistura. Enquanto que na avaliação do coeficiente efetivo de permeação dos extratos brutos a 10% nas membranas *PAMPA_{PELE}* e *PAMPA_{TGI}*, observou-se valores de permeação muito semelhantes em ambas membranas, com destaque de permeação para o ácido clorogênico. Além disso, na avaliação dos compostos misturados e nos extratos foi possível inferir a ação sinérgica. Observa-se nos extratos que conforme a composição química de cada planta há o favorecimento da passagem, e conseqüente minimização, da ação de outros. Na permeação da mistura as interações intermoleculares são evidentes, quando comparado a permeação individual dos compostos e aos próprios extratos.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos Fenólicos. Cromatografia. Modelo *PAMPA*. Permeação.

ABSTRACT

PAMPA MODEL FOR COMPARATIVE STUDY OF THE PERMEABILITY OF ISOLATED PHENOLIC COMPOUNDS AND FROM EXTRACTS OF MEDICINAL PLANTS

AUTHOR: Paula Bianchetti

ADVISOR: Leandro Machado de Carvalho

The use of natural compounds from the Brazilian national flora provides the population access to treatment of various disorders and the development of new therapeutic products. Therefore, it is important that permeation tests of these compounds are performed in order to have complete therapeutic efficacy. To this end, permeation models are used. Some of these models are called PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assays) and mimic different types of cell membranes and the permeability of these tissues, such as the gastrointestinal tract, transepidermal route, and blood/brain pathway. The objective of this study is to evaluate the permeation of phenolic compounds in different permeation models (cutaneous, gastrointestinal and blood-brain barrier) using modified membranes of PAMPA type. For this purpose, polyvinyl difluoride (PVDF) membranes were modified in three absorption models: gastrointestinal, cutaneous and hematoencephalic. The antioxidants present in these plants were already evaluated through mass spectrometry (LC-MS / MS) and from this study eight antioxidants were evaluated, which presented the highest amount available. The evaluations of the permeated components were performed using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Arrangement Detector (HPLC-DAD) and amperometric (HPLC-PAD). For an adequate use of the membranes, they were characterized with surface evaluation by scanning electron microscopy and ion diffusion test. It was possible to verify that the modified membranes – PAMPAPELE, PAMPATGI e PAMPABHE – present a good model for mimicking cutaneous permeation, gastrointestinal tract, and blood-brain barrier. It was observed from the studies carried out that the chlorogenic acid has a better permeation profile in the three membranes, both in the individual active and in the mixture. In the evaluation of the effective coefficient permeation of crude extracts at 10%, in the membrane PAMPAPELE and PAMPATGI very similar permeation values were observed in both membranes, with permeation prominence for chlorogenic acid. In addition, in the evaluation of the mixed compounds and in the extracts, it was possible to infer the synergistic action. It is observed in the extracts that according to the chemical composition of each plant, there is a favoring of the passage and consequent minimization of action of others. In the permeation of the mixture, the intermolecular interaction are evident, when compared to the individual permeation of the compounds and to the extracts themselves.

KEYWORDS: Phenolic Compounds. Chromatography. PAMPA model. Permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura básica dos flavonoides.....	21
Figura 2	Estrutura química dos ácidos benzoicos.....	22
Figura 3	Estrutura química dos ácidos cinâmicos.....	23
Figura 4	Estrutura química dos padrões antioxidantes selecionados a partir do estudo de quantificação por LC–MS/MS.....	24
Figura 5	Esquema simplificado do ensaio <i>PAMPA</i> (adaptado de CHEN et al, 2008).....	28
Figura 6	Fosfolipídio que compõem as membranas celulares	29
Figura 7	Representação esquemática das camadas da pele e dos anexos cutâneos. Fonte: Azulay e Azulay (2008).....	33
Figura 8	Representação esquemática do intestino delgado, apresentando as vilosidades e sua conformidade celular. Fonte: modificado de Silverthorn (2010).....	35
Figura 9	Representação esquemática da barreira hematoencefálica, apresentando os astrócitos sobre o capilar sanguíneo cerebral. Fonte: modificado de Oller-salvia et al (2016). No detalhe, comparação da estrutura de um capilar cerebral com barreira hematoencefálica (a) e um capilar sem a barreira (b). Em que: 1 – junções de oclusão 2 – célula endotelial 3 – pericito, 4 – astrócito pericapilar 5 – lâmina basal subendotelial 6 – espaço interendotelial 7 – fenestração intraendotelial Fonte: Pascual-Garvi e colaboradores (2004).....	38
Figura 10	Placa de análise do modelo <i>PAMPA</i> , no detalhe, aproximação dos filtros.....	46
Figura 11	Modelo de célula de Franz utilizado neste estudo.....	47
Figura 12	Cromatograma dos 9 compostos fenólicos (30 mg L ⁻¹) nos respectivos tempos de retenção: (1) ácido gálico – 5,3 minutos (2) catequina – 6,6 minutos (3) rutina – 7,5 min (4) ácido vanílico – 9 min (5) Quercitrina – 12,9 min (6) ácido clorogênico – 6 min (7) ácido cafeico – 8,3 min (8) ácido p-Cumárico 12,4 min (9) ácido ferúlico – 13,5 min. Estão sobrepostos os comprimentos de onda avaliados, sendo: linha azul correspondente ao comprimento de onda de 210 nm e linha preta corresponde ao comprimento de onda de 320 nm.....	51
Figura 13	Microscopia eletrônica de varredura da modificação do filtro de PVDF. (A) membrana PVDF aumento de 4000 x, (B) membrana <i>PAMPA</i> _{PELE} aumento de 4000 x.....	54

Figura 14	<i>Resultados do teste de difusão de íons, nos tempos de 1 h, 2 h, 3 h e 4 h, na figura: ■ corresponde a membrana sem alteração e ♦ a membrana com alteração (PAMPA_{PELE})</i>	56
Figura 15	Microscopia eletrônica de varredura da modificação do filtro de PVDF. (A) membrana PVDF aumento de 4000 x, (B) membrana PAMPA _{TGI} aumento de 4000 x.....	58
Figura 16	Microscopia eletrônica de varredura da modificação do filtro de PVDF. (A) membrana PVDF aumento de 4000 x, (B) membrana PAMPA _{BHE} aumento de 4000 x.....	59
Figura 17	Microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais das diferentes membranas de PVDF modificadas. A - Sem modificação; B - PAMPA _{PELE} ; C - PAMPA _{TGI} ; D - PAMPA _{BHE} , sendo na imagem 1= aumento de 500 vezes e na imagem; 2= aumento de 4000 vezes dos cortes transversais.....	61
Figura 18	Permeação dos diferentes compostos antioxidantes em mmol L ⁻¹ em membrana do tipo PAMPA _{TGI} em HPLC-DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido <i>p</i> -Cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h e cinza = 3 h. Anova seguido de Tukey para p<0,05; sendo ***p<0,001.....	67
Figura 19	Permeação da mistura dos antioxidantes em mmol L ⁻¹ em membrana do tipo PAMPA _{TGI} em HPLC-DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) catequina (6) rutina (7) ácido vanílico; branco= 1 h, verde= 2 h e cinza= 3 h. Anova seguido de Tukey para p<0,05; sendo ***p<0,001.....	68
Figura 20	Permeação dos diferentes compostos antioxidantes em mmol L ⁻¹ em membrana do tipo PAMPA _{PELE} em HPLC-DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido <i>p</i> -Cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h e cinza = 3 h. Anova seguido de Tukey para p<0,05, sendo ****p<0,001.....	71
Figura 21	Permeação da mistura dos antioxidantes em mmol L ⁻¹ em membrana do tipo PAMPA _{PELE} em HPLC - DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) catequina (6) rutina (7) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h e cinza = 3 h. Anova seguido de Tukey para p<0,05, sendo ****p<0,001.....	72

- Figura 22 Valores percentuais de permeação dos compostos ácido ferúlico e ácido clorogênico, nos tempos de 1h, 2h e 3h, através da membrana $PAMPA_{PELE}$. Linha preta= compostos permeados de forma individual; linha tracejada= compostos permeados na mistura..... 74
- Figura 23 Permeação dos diferentes compostos antioxidantes em $mmol L^{-1}$ em membrana do tipo $PAMPA_{BHE}$ em HPLC–DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido ρ -Cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h, cinza = 3 h, rosa= 4 h. Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$, sendo **** $p < 0,001$... 75
- Figura 24 Permeação dos compostos antioxidantes misturados em $mmol L^{-1}$ em membrana do tipo $PAMPA_{BHE}$ em HPLC–DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido ρ -Cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h, cinza= 3 h, rosa= 4 h. Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$, sendo *** $p < 0,001$ 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade em $\mu\text{g/g}$ dos compostos presentes nos extratos brutos, avaliação realizada por LC-MS.....	41
Tabela 2	Equação da reta, coeficiente de correlação, LD e LQ dos 9 compostos antioxidantes em HPLC – DAD.....	52
Tabela 3	Valores de $\log Pe$ para os compostos Verapamil e Prednisona, permeação em membrana modificada do tipo <i>PAMPA</i> _{BHE} , concentração inicial do composto de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$	60
Tabela 4	Avaliação da permeação (mmol L^{-1}) dos antioxidantes com avaliação por HPLC-DAD e HPLC-PAD, nas membranas <i>PAMPA</i> _{PELE} e <i>PAMPA</i> _{TGI} . Teste T Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	64
Tabela 5	Percentual de permeação através da membrana <i>PAMPA</i> _{TGI} , valores comparados da solução inicial (1mM) com o conteúdo do compartimento receptor.....	69
Tabela 6	Percentual de permeação através da membrana <i>PAMPA</i> _{PELE} , valores comparados da solução inicial (1mM) com o conteúdo do compartimento receptor.....	73
Tabela 7	Percentual de permeação através da membrana <i>PAMPA</i> _{BHE} , valores comparados da solução inicial (0,1mM) com o conteúdo do compartimento receptor.....	77
Tabela 8	Permeação dos extratos brutos 10% nas membranas modificadas do tipo <i>PAMPA</i> _{PELE} , nos diferentes tempos de permeação 1 h, 2 h e 3 h; valores de concentração permeada em mmol L^{-1}	79
Tabela 9	Permeação dos extratos brutos 10% nas membranas modificadas do tipo <i>PAMPA</i> _{TGI} nos diferentes tempos de permeação 1 h, 2 h e 3 h; valores de concentração permeada em mmol L^{-1}	82
Tabela 10	Resultados do log do Coeficiente efetivo de permeação ($\log Pe$) no tempo máximo de permeação (3 h), com membrana <i>PAMPA</i> _{TGI} e <i>PAMPA</i> _{PELE} , na permeação individual, da mistura e dos extratos das plantas.....	85

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	32
Equação 2.....	48
Equação 3.....	48
Equação 4.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASP - Área de Superfície Polar

BHE - Barreira Hematoencefálica

DMSO – Dimetilsulfóxido

FDA - Food and Drug Administration

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC – DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de rearranjos de diodo

HPLC – PAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector eletroquímico

log P_e - Constante de lipofilicidade

PAMPA - Parallel Artificial Membrane Permeability Assays

*PAMPA*_{BHE} - Modelo de permeação da barreira hematoencefálica

*PAMPA*_{PELE} - Modelo de permeação cutânea

*PAMPA*_{TGI} - Modelo de permeação gastrointestinal

PBL - Porcine Polar Brain Lipid

PBS - Tampão fosfato-salino

PVDF – Polivinildifluoreto

SNC - Sistema Nervoso Central

TGI - Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Plantas medicinais.....	19
2.1.1 Compostos Antioxidantes.....	20
2.2 Testes de permeação.....	26
2.2.1 Modelo <i>PAMPA</i>	27
2.3 Ensaio de difusão vertical.....	28
2.4 Barreiras biológicas.....	31
2.4.1 Permeação do trato transdérmica	31
2.4.2 Permeação do trato gastrointestinal	34
2.4.3 Permeação da barreira hematoencefálica.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 Materiais, reagentes e soluções.....	40
3.2 Amostras.....	41
3.3 Instrumentação.....	42
3.4 Procedimentos experimentais.....	43
3.4.1 Avaliação da permeação celular dos antioxidantes estudados	43
3.4.2 Modificação da membrana.....	44
3.4.3 Caracterização das membranas <i>PAMPA</i>	44
3.4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
3.4.3.2 Difusão de íons.....	45
3.4.4 Ensaios de permeação.....	45
3.5 Análise dos compostos permeados.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
4.1 Estudo preliminar de permeação <i>PAMPA</i> por HPLC–DAD	49
4.2 Co-validação de método cromatográfico para avaliação de antioxidantes por HPLC–DAD.....	50
4.3 Modificação das membranas sintéticas de PVDF	53
4.3.1 Caracterização da membrana <i>PAMPA_{PELE}</i>	54
4.3.2 Caracterização da membrana <i>PAMPA_{TGI}</i>	57
4.3.3 Caracterização da membrana <i>PAMPA_{BHE}</i>	59
4.4 Estudos de permeação empregando Cromatografia Líquida com detector eletroquímico (HPLC – PAD) e detector de arranjo de diodos (HPLC–DAD).....	63
4.5 Estudos de permeação empregando Cromatografia Líquida com detector de arranjo de diodos (HPLC–DAD).....	66
4.5.1 Permeação com membrana modificada do tipo <i>PAMPA_{TGI}</i>	66
4.5.2 Permeação com membrana modificada do tipo <i>PAMPA_{PELE}</i>	70
4.5.3 Permeação com membrana modificada do tipo <i>PAMPA_{BHE}</i>	74
4.6 Estudos de permeação de compostos bioativos de plantas medicinais com o uso de Cromatografia Líquida com detector de rearranjos de diodo (HPLC – DAD)	78

5 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXO 1 – Artigo submetido à revista Biopharmaceutics & Drug Disposition.....	103
ANEXO 2 – Artigo submetido à revista Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas	133

1 INTRODUÇÃO

A utilização de compostos naturais é ampla, sendo que estes possuem uma variabilidade química e vias metabólicas secundárias complexas, capazes de criar uma grande diversidade de compostos. O Brasil é um dos países que apresenta maior biodiversidade, tanto pelo número de exemplares, como pela complexidade de seus biomas. A expansão econômica por muitas vezes negligencia esse potencial natural, promovendo o uso de compostos sintéticos (PIMENTEL et al; 2015).

O estudo de plantas e ativos com potencial terapêutico envolve a avaliação de diversos metabolismos complexos, o que dificulta e limita a progressão de estudos com plantas medicinais; por serem pesquisas que demandam tempo e alto investimento. O potencial terapêutico da flora deve ser explorado para facilitar o acesso de diversas comunidades à resolução; ou prevenção de estados patológicos (AGRA et al; 2008).

O tratamento de doenças agudas, realizado por instituições públicas de saúde, atinge quase metade da população, enquanto que em instituições privadas esse número atinge em torno de 68 % (WHO, 2015). Assim, a utilização de plantas que apresentem propriedades medicinais pode favorecer os processos de saúde-doença da população.

Atualmente, a indústria de fitoterápicos, suplementos alimentares e outros produtos derivados de compostos naturais, movimentam o mercado mundial em cerca de 44 bilhões de dólares ao ano (WHO, 2015). Segundo a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, não existem dados nacionais, mas estima-se que o mercado varie entre 350 e 550 milhões de dólares/ano. Apesar de uma rica biodiversidade, há o registro na Anvisa de poucos compostos fitoterápicos obtidos de espécies nativas (MIOTO, 2010). Paradoxalmente a isso, a indústria farmacêutica brasileira apresenta o décimo maior mercado mundial, sendo que praticamente toda a matéria-prima utilizada na produção é importada (ADAME; JACCOUD; COBRA, 2005).

Os estudos das plantas nativas da flora brasileira são importantes, da mesma forma são interessantes os estudos que viabilizem maior eficácia e resposta terapêutica, com o objetivo de avaliar diferentes vias de administração de

medicamentos. Neste contexto, as membranas *PAMPA* são modelos sintéticos que viabilizam os estudos de diferentes vias de administração, conforme a modificação de membrana realizada (SCHIMDT; LYNCH, 2003). É importante ressaltar, que a permeação em diferentes tecidos do organismo é dificultada pelas barreiras orgânicas e por agentes químicos que permitem a proteção dos sistemas. No entanto, a permeação de alguns compostos poderia facilitar e/ou auxiliar na melhora de processos normais ou patológicos que ocorrem no organismo humano. Para isso os estudos que envolvam a permeação de substâncias através de diferentes tecidos são importantes, pois a possibilidade de quantificar e identificar a passagem de diferentes compostos por diversas vias permite um melhor entendimento da utilização dos ativos disponíveis na natureza.

Cada via de permeação possui suas peculiaridades, como formas de liberação e metabolização das substâncias, que apresentam maior ou menor frequência e adesão ao uso. Algumas vias são mais comumente utilizadas, como é o caso da administração de fármacos por via oral, por sua facilidade de uso e sucessiva permeação através do trato gastrointestinal. No entanto, vias alternativas e facilitadores de permeação têm sido estudadas com a possibilidade de otimizar os resultados e reduzir a presença de efeitos adversos. É o caso da permeação transdérmica; que possibilita a redução de sintomas associados à administração, bem como a permeação na BHE, que promove o uso de substâncias específicas contra doenças do sistema nervoso central (SNC) (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Sendo assim, o estudo de compostos bioativos em extratos vegetais deve envolver além da atividade antirradicalar, a capacidade em atravessar membranas biológicas. Do contrário, compostos que possuem capacidade de sequestrar radicais livres, mas que não apresentam permeabilidade em biomembranas não podem ser considerados compostos na linha de frente em termos de ação biológica.

Neste contexto, esta tese visa a obtenção de respostas em relação à capacidade de compostos fenólicos de extratos de plantas em atravessar membranas que mimetizam as barreiras gastrointestinal, transdérmica e hematoencefálica. Tendo como objetivo avaliar comparativamente a permeação de compostos fenólicos em extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais, com o uso de modelos de permeação

em membranas *PAMPA* (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assays*). Assim como verificar a adequação do uso de membranas sintéticas do tipo PAMPA para testes de permeação que simulem a barreira hematoencefálica, permeação transdérmica e permeação pelo trato gastrintestinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais

Em decorrência da ampla utilização de plantas com fins medicinais, diversas pesquisas são realizadas a fim de avaliar as suas propriedades químicas e biológicas. No entanto, este ainda é um campo que apresenta deficiência de estudos, considerando que a diversidade molecular encontrada em plantas é em torno de 40% maior do que em fontes sintéticas (YUNES; CALIXTO, 2001).

Cerca de 25% dos fármacos empregados em países industrializados advém direta ou indiretamente de produtos naturais. Nos últimos 20 anos a maioria destes fármacos de origem natural resultaram de estudos científicos; realizados principalmente em países asiáticos e, em proporção menor, nos países ocidentais (BALME, 2000). Alguns produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, apresentam 60% de substâncias derivadas de plantas (WHO, 2015).

A ação terapêutica das plantas ocorre principalmente pela formação dos metabólitos secundários pelo metabolismo da planta. Esses são formados a partir das diferentes agressões ambientais (biológicas e químicas) que a planta é submetida. Fatores que podem ser citados como interferentes e facilitadores na formação dos metabólitos secundários, são: exposição a diferentes temperaturas, radiação UV, disponibilidade de água, composição atmosférica, sazonalidade, ritmo circadiano, nutrientes presentes no solo, ataque de insetos e micro-organismos (RAMAKRISHNA, RAVISHANKA, 2011).

As reações que formam esses compostos secundários ocorrem através de rotas metabólicas; em que há o aproveitamento de nutrientes celulares, assim como a ação de enzimas específicas (NELSON, COX, 2011). Os metabólitos secundários possuem estrutura molecular complexa e funções importantes tanto no metabolismo vegetal; como em outros organismos (utilização terapêutica), e ocorrem em pequenas concentrações nas plantas (BERG et al, 2004).

Inúmeras são as espécies que despertam interesse por parte de consórcios de pesquisa, uma vez que aspectos farmacológicos e conseqüentemente clínicos podem

ser amplamente estudados de forma interdisciplinar. Dentre as inúmeras possibilidades de plantas medicinais a serem estudadas, neste projeto foram selecionados inicialmente dois gêneros: *Cecropia* e *Bauhinia*, estas apresentam ampla ação farmacológica e extenso uso na medicina popular latinoamericana.

As plantas *Cecropia obtusa* e *Cecropia palmata* apresentam em sua composição a catequinas, esteróides, proteínas, aminoácidos, saponinas, taninos, triterpenos, açúcares redutores, alcalóides, cumarinas, flavanóides e glicosídeos, sendo que popularmente são utilizadas como adstringente, analgésica, antidiabética, antisséptica, antitussígena, cardiotônica, cicatrizante, descongestionante, diurética, expectorante, hipotensora e sedativa (PAN; WALLACE, 1974; SPOSITO et al., 2001; LUENGAS-CAICEDO, 2005; ROCHA et al., 2007; NICOSAI-TORRES et al., 2012).

A planta *Bauhinia variegata* (pata – de – vaca), apresenta em sua composição química ácidos orgânicos, alcalóides, cumarinas, esteróis, flavonoides, guanidina, heterosídeos saponínicos, minerais, pigmentos, ramnose, taninos e triterpenos, sendo utilizada popularmente como: antidiarréica, diurética, hipocolesterolemiantes, antidiabética, laxante, tônica renal, vermífuga, afecções renais e urinárias, calmante, constipação intestinal e insuficiência urinária (REDDY et al., 2003; SHINDE et al., 2012; SARAVANAMUTTU; SUDARSANAM, 2012).

A *Mansoa alliacea* é uma planta que possui em sua composição Alcalóides, açúcares redutores, esteróides, proteínas, aminoácidos, saponinas, taninos, triterpenóides, naftoquinonas, lignanas, flavonoides e flavonas; que conferem a planta ações como antifúngica, analgésica, antirreumática, antiartrítica, antipirética, antitussígena, antimalárica em pessoas com reinfecções frequentes (CARLINI, 1983; ELISABRSKY, 1987; BERG, 1991; VIEIRA, 1992; MATOS, 2000; TIWARI et al., 2012),

2.1.1 Compostos antioxidantes

Os flavonoides são uma importante classe de metabólitos secundários e já foram identificadas mais de 8.000 substâncias pertencentes a este grupo. Como demonstrado na Figura 1, apresentam um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono, formado por dois anéis aromáticos ligados entre si por uma cadeia de três átomos de carbono (C6-C3-C6) (ROBBERS et al; 1997).

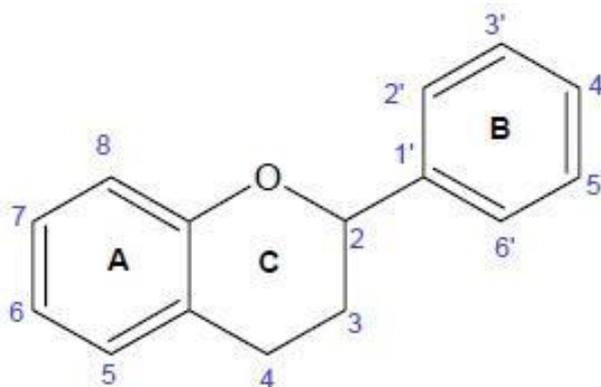


Figura 1 - Estrutura básica dos flavonoides

A variabilidade deste grupo ocorre por variação da oxidação da cadeia heterocíclica do pirano; em que diversas classes de flavonoides podem ocorrer, como: antocianinas, flavonois, flavonas, isoflavonas, flavononas e flavanas (ARAUJO, 2008; YUNES; CALIXTO, 2001).

Os compostos diferem pelo número e pela posição dos grupos substituintes nos anéis A, B, C; além da presença ou não da dupla ligação da carbonila do anel C. Podem ser encontrados derivados glicosados, metilados, acetilados, fenilados ou sulfatados (SIMOES et al., 2002). Esses compostos apresentam variação da ação biológica, dentre elas: anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, antitrombótica, antiviral e atividade anticarcinogênica (GARCIA-LAFUENTE et al; 2009).

A catequina é um grupo que ocorre da variação do anel C da molécula dos flavonoides. Essas alterações podem ocorrer por oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação ou sulfação (HOLLMAN; CATAN, 1999).

A rutina é um flavonol glicosídico que apresenta um dissacarídeo (raminose e glicose), ligado na posição três do anel (PEDRIALI, 2005). Apresenta açúcares associados a sua molécula, logo, é de difícil absorção pelo intestino delgado e demonstra reduzida afinidade pelas membranas das células epiteliais do intestino grosso, com importante papel na absorção de compostos lipofílicos (MUROTA; TERAU, 2003). No processo de absorção, a rutina sofre hidrólise enzimática no meio entérico, formando quercetina 3-glicosídica e quercetina. Após a hidrólise a molécula passa a apresentar maior afinidade e assim é melhor absorvida (MANACH et al.,

1997).

Manach e colaboradores (1997) demonstraram que a rutina e a quercetina apresentam metabólitos similares após 24 h da ingestão dos compostos, na proporção de 0,4 e 0,2 % respectivamente.

Os ácidos fenólicos apresentam importante função. Estes são divididos em dois grupos, sendo o primeiro composto pelos ácidos benzoicos (Figura 2), que possuem 7 carbonos (C6-C1). São os ácidos mais simples formados na natureza. O segundo é composto pelos ácidos cinâmicos (Figura 3), possuindo 9 átomos de carbono (C6-C3).

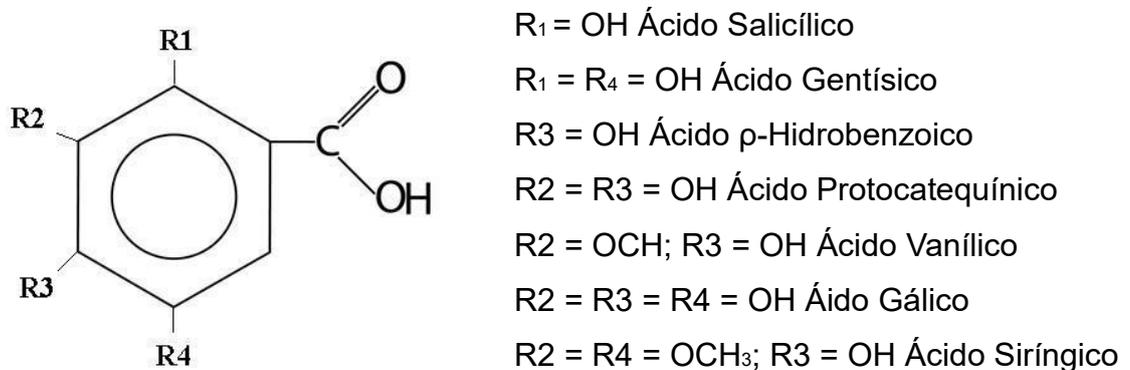
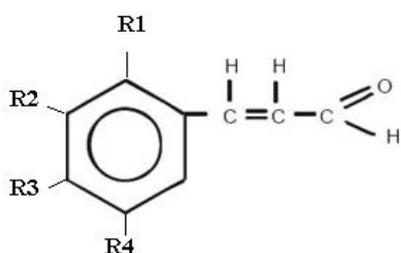


Figura 2 – Estrutura química dos ácidos benzoicos

O ácido gálico é um derivado da hidrólise dos taninos e apresenta várias ações como antioxidante, anti-inflamatório, antifúngico e propriedades anticarcinogênicas. Apresenta diversas variações de substituintes, e estas permitem a obtenção de diversos ésteres com funções diversificadas (ESLAMI et al; 2010; DENESHFAR, GHAZIASKAR, HOMAYOUN; 2008).

Os ácidos cinâmicos (Figura 3) são encontrados em diversos alimentos de origem vegetal como: café, erva-mate, maçã, ameixa, cereais, entre outros (CLIFFORD, 1999).



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$ Ácido Cinâmico

$R_1 = OH$ Ácido o-Cumárico

$R_2 = OH$ Ácido m-Cumárico

$R_3 = OH$ Ácido p-Cumárico

$R_2 = R_3 = OH$ Ácido Cafeico

$R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$ Ácido Ferúlico

$R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH$ Ácido Sináptico

Figura 3 – Estrutura química dos ácidos cinâmicos

Os Ácidos ferúlico e p-cumárico são antioxidantes muito ativos. Essa ação ocorre pela dupla ligação presente nas moléculas dos derivados do Ácido cinâmico, que auxiliam na estabilização da molécula dos derivados; participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado (WANASUNDARA; AMAROWICZ, 1994).

Estudo em ratos, demonstrou que a concentração máxima de ácido ferúlico no plasma e de metabólitos é atingida após 30 minutos da ingestão, sendo que em torno de 40 % foi excretado via urinária. A melhor absorção deste composto ocorre na parte proximal do intestino (OLIVEIRA, BASTOS, 2011).

O ácido clorogênico é um composto fenólico com função ácida. Foi isolado em 1907, em forma cristalina, denominado clorogenato de cafeína, e a partir desse preparou-se o ácido puro. É um composto presente no café, sendo esta uma das principais fontes de aquisição por ingestão (DE MARIA, MOREIRA, 2004).

O ácido cafeico é derivado da clivagem dos ácidos cafeoilquínicos, que geralmente são encontrados de forma conjugada de glicuridados, sulfatados, ácido ferúlico e isoferúlico, resultantes da metilação do ácido cafeico. Estudo realizado em ratos verificou que após administração de dose única (700 $\mu\text{mol/kg}$), detectou-se ácido cafeico, ferúlico e metabólitos sulfatados e glicuronados no plasma dos animais após 30 min de ingestão, sendo que a concentração máxima foi verificada 2 h após a ingestão (OLIVEIRA, BASTOS, 2011).

Os diversos compostos antioxidantes disponíveis na flora, propiciam a prevenção e cura das mais diversas disfunções. A sua capacidade de evitar a oxidação de tecidos se apresenta em maior ou menor grau de acordo com a molécula da substância, como é o caso da metoxila adjacente a hidroxila do ácido cafeico. Esta, permite ao composto uma maior ação antioxidante do que o ácido vanílico, que possui a metoxila associada à hidroxila (SOARES, 2002). Assim os metabólitos secundários presentes nas plantas são uma importante classe de bioprodutos, apresentando em geral, ações de proteção ao organismo humano (LARCHER, 2000).

Na figura 4 estão representadas as estruturas químicas dos compostos que foram selecionados para o estudo de permeabilidade por membranas em modelo *PAMPA*.

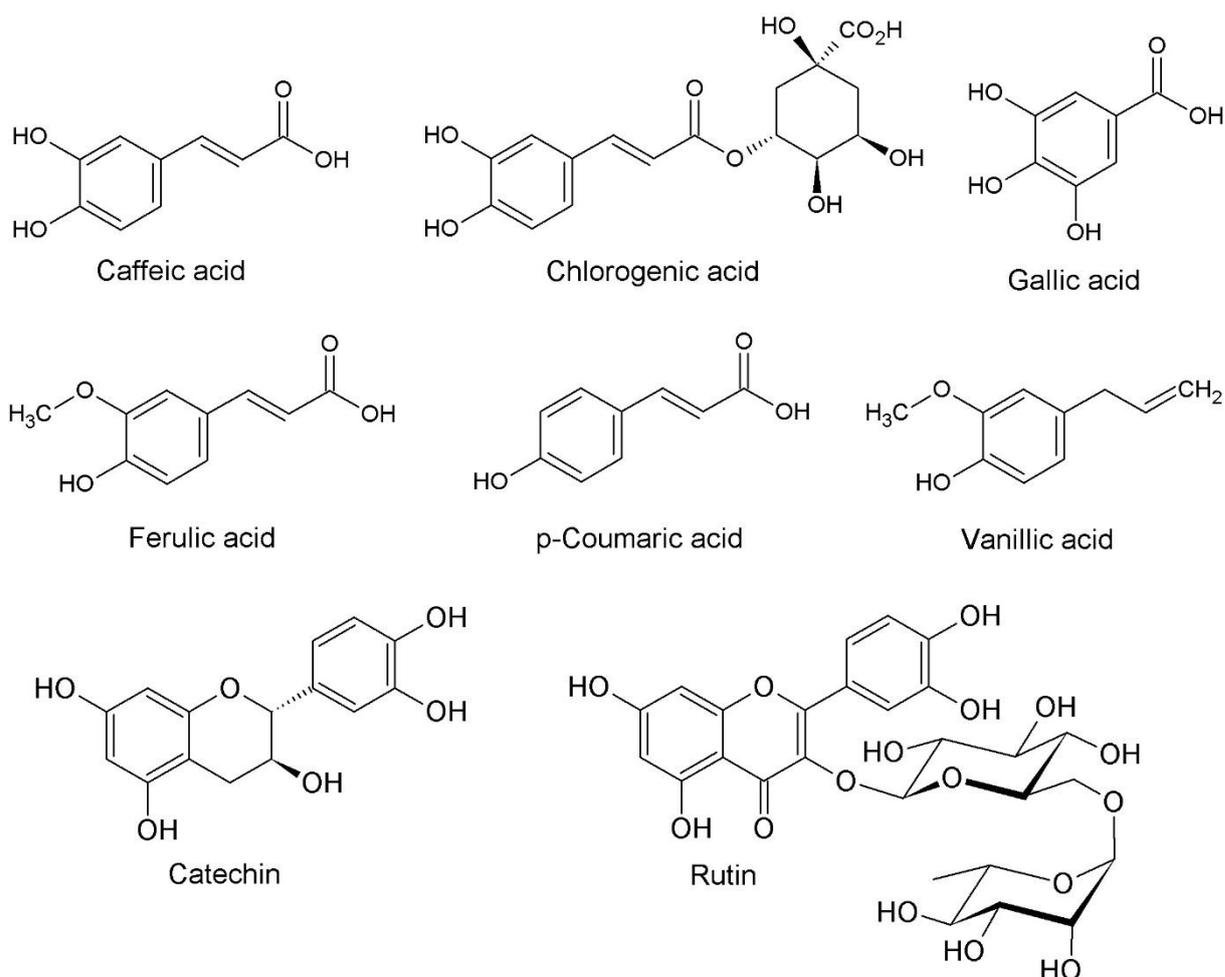


Figura 4 – Estrutura química dos padrões antioxidantes selecionados a partir do estudo de quantificação por LC-MS/MS.

Todos os compostos estudados apresentam importantes ações no organismo,

que auxiliam na manutenção das funções normais e promoção da ação terapêutica quando desequilíbrios orgânicos acontecem.

A catequina possui importante ação antioxidante e anti-inflamatória, assim como a capacidade de inibir a metilação da L-DOPA nos compartimentos periféricos e no córtex estriado de ratos, bem como reduzir a ação citotóxica oxidativa do glutamato induzida via inativação do sinalizador NF- κ B, prevenindo a neurodegeneração hipocampal (GUPTA, 2016).

Já a rutina apresenta a capacidade terapêutica de melhorar os sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos, associados a alterações hemorrágicas ou hipertensivas, sendo ainda capaz de normalizar a resistência e a permeabilidade dos vasos; logo, auxiliando na redução da fragilidade capilar, melhorando alterações do campo visual (PATHAK et al., 1991).

Wagner e colaboradores (2006) demonstraram que a quercetrina tem a capacidade de reduzir a degradação da desoxirribose pelo peróxido de hidrogênio, assim como apresentou resultados positivos na inibição do ácido quinolítico no cérebro, agente este que apresenta ação pró-oxidante.

O ácido clorogênico apresenta ação sobre a pressão arterial, sendo que em estudo realizado por Watanabe e colaboradores (2006), voluntários receberam 140 mg/dia de ácidos clorogênicos e placebo. O grupo que recebeu os ácidos clorogênicos apresentou redução significativa da pressão arterial durante o período de ingestão, sem efeitos colaterais.

Estudo realizado por Scheerer e colaboradores (2003) demonstrou que administração de 200 mL de café permitem uma grande liberação de ácido clorogênico no plasma sanguíneo em humanos. Em 20 min após o consumo, observou-se um aumento maior que 300 % dos valores basais, sendo que o consumo cumulativo de 6 copos por dia pode prevenir efeitos de tolerância à glicose, evitando o diabetes. O ácido cafeico e suas formas conjugadas apresentam atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiglicação, assim como podem inibir a formação de leucotrienos, estes sintetizados pelo metabolismo do ácido araquidônico, por redução da expressão da enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) (GUGLIUCCI et al., 2009).

Estudos têm demonstrado diversas ações biológicas do ácido gálico, como

antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica e anticarcinogênica (MONTENEGRO et al., 2013). O ácido gálico pode induzir apoptose de células específicas por vias extrínsecas, com ativação do receptor de morte FAS. Os efeitos antitumorais podem ainda estar relacionados com a capacidade de formação de reações oxidativas e aumento do Ca^+ intracelular, através da ativação das caspases e do citocromo c, que chega ao citoplasma através de poros de transição da mitocôndria (LOCATELLI; FILIPPIN-MONTEIRO; CRECZYNSKI-PASA, 2013).

O ácido ferúlico apresenta grande biodisponibilidade em diversos alimentos, como laranja, cenoura, tomate. Entre as ações biológicas estão: antioxidante, anti-inflamatória, neutralizando radicais livre formados pela estreptozocina, reduzindo assim sua toxicidade. Em dermatologia apresenta ação fotoprotetora, evitando o fotoenvelhecimento e câncer de pele, assim como dermatites de contato (JUNG et al., 2015; CHAIPRASONGSUK et al., 2016).

O ácido p-Cumárico apresenta ação anti-inflamatória em células intestinais. Ele pode atenuar mediadores próinflamatórios, como: PGE2, IL – 6, NO, COX – 2 e TN – α , por aumentar a fosforilação de I κ B α *in vitro* (KIM et al., 2015).

O ácido vanílico reduz as transaminases e os níveis de citocinas inflamatórias, auxiliando nas desordens hepáticas. Ainda, o composto foi capaz de inibir a geração do radical triclorometil (citotóxico) no fígado (ITHO et al., 2010).

As diferentes ações apresentadas por esses componentes no organismo podem interferir e facilitar processos biológicos, favorecendo e/ou auxiliando em processos de cura ou retardo de doenças. No entanto, é preciso avaliar quais são os componentes que apresentam maior facilidade de transpor as diferentes barreiras de absorção do organismo.

2.2 Testes de permeação

Existem diversos tipos de ensaios que podem ser utilizados para a avaliação da permeabilidade de ativos, como: físico-químicos, modelos computacionais, *in vitro*, perfusão *in situ* e modelos *ex vivo*. Sendo que o sucesso e eleição de uso de cada um dos métodos varia de acordo com o quanto ele pode mimetizar as características dos tecidos humanos (AVDEEF et al., 2005; BALIMANE, HAN, CHONG; 2006).

Os ensaios que são mais utilizados para este tipo de testes são avaliações com

células Caco-2 e o não celular *PAMPA*. O modelo *PAMPA* utiliza membranas poliméricas revestidas (REIS, SINKO, SERRA, 2010). Já o modelo Caco-2 utiliza linhagens celulares do tipo de tecido a ser testado, para avaliar a permeação de compostos em nível celular. Sendo que o ensaio *in vitro*, mais frequentemente utilizado, é o ensaio *PAMPA*, pois os dados obtidos podem ser correlacionados com a absorção animal, apresentando assim uma avaliação do processo de permeação (KERNS; DI, 2008).

2.2.1 Modelo *PAMPA*

Os estudos com modelo *PAMPA* tiveram início na década de 60, quando Muller e colaboradores utilizaram 2 % de fosfolipídios dissolvidos em n-alcano sobre uma folha de Teflon, formando um filme com excesso de lipídios. No centro este tornava-se preto, formando assim uma bicamada lipídica, tornando a membrana conhecida como “Black Lipid Membrane”. Mas apenas em 1998, foi possível relacionar as medidas dos valores de fluxo da absorção obtidos nos ensaios com os valores correspondentes em tecidos humanos (KANSY et al; 1998).

O ensaio *PAMPA* é uma importante ferramenta para avaliação da permeação em estágios iniciais. Pode ser realizado em larga escala, sendo útil para avaliação da permeação em barreiras biológicas do trato gastrointestinal (TGI), cutânea (Pele) e barreira hematoencefálica (BHE). Diversas metodologias podem ser identificadas, de acordo com a variável a ser estudada, sendo que estas variáveis têm interferência pelo tipo de filtro, do pH dos compartimentos e do tempo de incubação.

As membranas *PAMPA* apresentam grande vantagem de utilização em função da facilidade de avaliação do composto, assim como a possibilidade de alteração de parâmetros físico-químicos que podem alterar a permeação dos ativos, além do baixo custo quando relacionados aos ensaios celulares, cerca de 5 % do valor do outro tipo de ensaio (KERNS, DI; 2008).

Um dos maiores problemas apresentados por esse tipo de avaliação é a retenção de compostos lipofílicos do ativo na membrana. Liu e colaboradores (2003) sugerem calcular ao fim do estudo, a diferença de massa entre o compartimento

doador e receptor, sendo possível então verificar a quantidade retida na membrana.

Outro fator importante é a formação de uma camada aquosa na membrana (em ambos compartimentos), esta membrana pode afetar a permeação dos componentes altamente lipofílicos, sendo que no lúmen intestinal estima-se que esta camada seja de 30 a 100 μm ; em um sistema sem agitação essa camada pode chegar entre 1900 e 3800 μm . Logo a agitação mecânica, reduz a espessura da UWL (do inglês *unstirred water layer*), aumentando a passagem de agentes lipofílicos e propiciando um estudo mais similar aos tecidos biológicos (AVDEEF et al, 2001; WOHNSLAND; FALLER, 2001).

2.3 Ensaio de difusão vertical

O ensaio de difusão vertical com célula do tipo Franz ou com a utilização de placas de 96 poços ocorrem com a utilização de dois compartimentos (doador e receptor), sendo que entre eles permanece a membrana a ser utilizada (Figura 5).

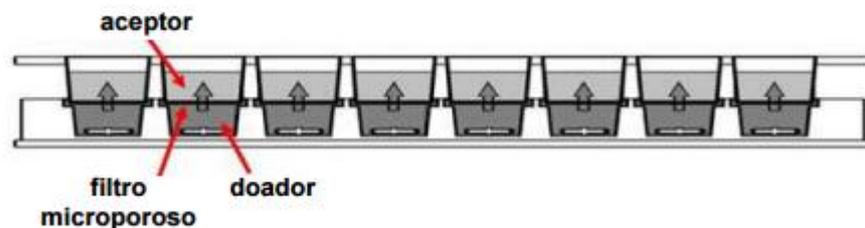


Figura 5 – Esquema simplificado do ensaio *PAMPA* (adaptado de CHEN et al, 2008).

Para o teste de permeação em TGI, várias composições para a solução de modificação foram realizadas, com intuito de encontrar a composição mais adequada. As membranas celulares possuem uma composição bilipídica, em que há a presença de um grupo fosfato ligado a duas cadeias lipídicas (Figura 6).

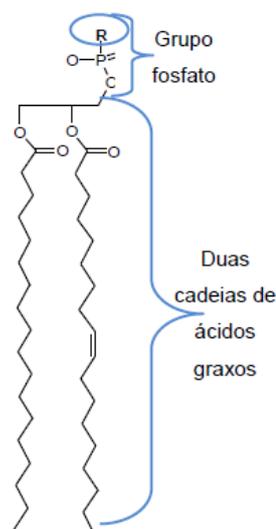


Figura 6 – Fosfolípido que compõem as membranas celulares.

Kansy e colaboradores (1998) utilizaram uma mistura de 20 % de lecitina de ovo dissolvida em n-dodecano em um filtro hidrofóbico, com solução doadora de pH 6,5 e solução receptora com pH de 7,4, este foi o primeiro modelo utilizado, denominado Roche. Com o objetivo de otimizar o ensaio $PAMPA_{TGI}$, Zhu e colaboradores (2002), realizaram uma modificação no filtro, utiliza filtro hidrofílico, sendo que a substância sobre o filtro possuía apenas 1 % de lecitina de ovo. Os estudos demonstraram que o novo filtro facilitava a passagem de compostos e reduziu consideravelmente o tempo experimental de 15 h para em torno de 2 h.

Outra variação importante da modificação de membrana foi realizada por Avdeef (2003); em que foi utilizada uma mistura de 20 % de fosfolípidos da lecitina de soja dissolvida em n-dodecano, sendo que em pH 7,4 a lecitina de soja possui carga negativa em torno de 4 vezes maior que na lecitina do ovo. Assim, no novo estudo, condições sink (que conferem estabilidade a permeação) foram adicionadas, a diferença de pH entre os compartimentos doador (pH 5; 6,2 e 7,4) e receptor (pH 7,4) o que pode facilitar a passagem de compostos com pKa baixo.

A adição de surfactantes e/ou proteínas no compartimento receptor torna a passagem dos compostos lipofílicos unidirecional. Essas alterações propiciam menor retenção de componentes lipídicos na membrana e maior correlação entre os coeficientes de permeabilidade. Esta modificação permitiu uma melhor avaliação dos

fármacos de baixa e alta permeabilidade (AVDEEF et al; 2005; BERMEJO et al; 2004).

Modelos de permeação *in vitro* da pele (*PAMPA_{PELE}*) fazem a utilização de um filtro hidrofóbico (PVDF), sendo a membrana modificada com 70% de óleo de silicone e 30% de miristato de isopropila. Esta composição é capaz de mimetizar as principais propriedades do estrato córneo humano, pode ser utilizada para avaliar coeficientes de permeabilidade de substâncias e uso tópico, já que demonstrou similaridade com estudos realizados em pele humana (OTTAVIANI et al; 2006).

A permeação da BHE na maioria dos casos ocorre por difusão passiva, sendo que alguns compostos possuem elevada absorção cerebral enquanto outros apresentam baixa permeação, isto ocorre devido a forte ligação entre as células da camada e a limitação das vias de transporte (DI et al; 2003).

Deve ser levado em consideração para os testes de avaliação de permeabilidade; a concentração da amostra no compartimento doador, o volume da amostra nos compartimentos, o tempo de incubação, condições do tampão, a formação de precipitado do soluto do compartimento doador, a geometria dos compartimentos, a velocidade de agitação, a espessura e porosidade do filtro, e o tamanho dos poros (AVDEEF, 2003).

Avdeef e colaboradores (2007), descrevem um guia para ensaios *PAMPA* que pode auxiliar na seleção dos principais aspectos experimentais como:

- *pontos de amostragem*: o conteúdo de cada cavidade é geralmente medido em um único ponto de amostra, sem que seja necessário adicionar tampão a cavidade receptora, agilizando o processo experimental;
- *tempo do experimento*: em que os compostos lipofílicos ($\log P > 2$) necessitam de um menor tempo de incubação (30 min à 4 h); no entanto, deve ser aplicada agitação vigorosa e um gradiente de pH ao sistema, enquanto que para substâncias hidrofílicas, o tempo de incubação recomendado é de 15 h e não é necessário aplicar agitação ao sistema, visto que a UWL formada não interfere na permeabilidade de fármacos hidrofílicos. Tempos maiores que 20h, podem levar o sistema a atingir um estado de equilíbrio, inviabilizando o teste.
- *porosidade do filtro de PVDF*: quando a quantidade de lipídios depositados sobre o filtro for superior, há uma diferença entre a porosidade aparente e a porosidade nominal, pois a deposição da camada altera a espessura do filtro utilizado, afetando

os valores de permeação obtidos (NIELSEN, AVDEEF, 2004).

- *adição de co-solventes no tampão*: a baixa solubilidade de substâncias é uma condição que altera a possibilidade de transporte através da membrana, assim a ação de co-solventes no tampão é uma prática possível, como DMSO a 5 % no tampão aquoso (AVDEEF et al; 2005).

2.4 Barreiras biológicas

A administração de substâncias por diferentes vias é dependente, não só da estrutura histo-fisiológica do tecido a ser transposto (membrana), mas também das características físico-químicas dos componentes e dos processos bioquímicos aos quais o ativo está exposto; sendo que outros fatores como pH do meio, enzimas metabolizantes e proteínas da membrana são barreiras biológicas (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

A permeação de ativos no organismo pode ocorrer por diferentes mecanismos, como a difusão passiva, em que há o movimento da substância através da bicamada lipídica. Esse tipo de difusão depende de alguns fatores físico-químicos, como a lipofilicidade do produto (OOSTENDORP et al; 2009).

2.4.1 Permeação transdérmica

Na década de 50 foi introduzido um novo sistema de liberação de fármacos no mercado, por via transdérmica. No entanto, apenas em 1979 estes sistemas foram liberados pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo que os primeiros medicamentos disponíveis apresentavam ação contra náuseas, vômitos e angina (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013; WAGNER, 1971).

Os sistemas de permeação transdérmica permitem a passagem de ativos em doses terapêuticas através da pele, logo, assim que este entrar em contato com a circulação sanguínea apresentará efeito sistêmico. Todavia, nem todas as substâncias apresentam características adequadas para a permeação, pois as características físico-químicas como: massa molecular, solubilidade, coeficiente de partição e

constante de dissociação podem interferir no processo (SINKO, GONZALES-ORTEGA, 2008; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

O fluxo de permeação do composto através do extrato córneo é expresso através da lei de Fick (equação 1), em que: J é o fluxo, D_M corresponde ao coeficiente de difusão do ativo pela membrana, $C_{s.m}$ respectivo a solubilidade do fármaco pela membrana, C_v é a concentração do fármaco dissolvido no veículo e $C_{s.v}$ representa a concentração do fármaco dissolvido no veículo (BACH et al., 1998).

$$J = \frac{D_M \cdot C_{s.m}}{L} \times \frac{C_v}{C_{s.m}} \quad \text{Equação 1}$$

O sistema de permeação transdérmico apresenta algumas vantagens:

- evitar alterações causadas pelo pH gastrointestinal, atividade enzimática, interações medicamentosas,
- substituir a administração por via oral quando esta é imprópria (vômitos, náuseas ou incapacidade de deglutição),
- evitar efeito de primeira passagem,
- proporcionar o uso de várias doses durante o dia com uma única aplicação, aumentando adesão ao tratamento,
- ampliar ação do ativo que possui meia vida curta,
- permitir a rápida parada da administração do fármaco caso seja necessário.

A pele é o revestimento do corpo que tem a função de proteção e termorregulação. Cada indivíduo apresenta particularidades e distinções na conformação da camada, conforme sua etnia e carga genética. Corresponde a 15 % do peso corporal e é o maior e mais extenso órgão do corpo humano. Atua como barreira de proteção e mantém o balanço entre a proliferação e a descamação célula; entre outras funções, como a regulação da temperatura corporal, o metabolismo de substâncias essenciais ao organismo e a comunicação com o meio externo através de suas funções sensoriais (SAMPAIO; RIVITTI, 2008).

O sistema tegumentar (Figura 7) apresenta-se disposto em três camadas: a mais superficial epiderme, que é subjacente a derme e a hipoderme. A primeira apresenta 5 camadas distintas e estruturas celulares específicos - células de

languerhans, melanócitos, células de merkel - e é avascular (BERARDESCA, ELSEEN, WILHELM; 1995).

A segunda camada (derme) apresenta componentes que conferem força e elasticidade a pele, sendo esta vascularizada; e a terceira camada é composta por tecido adiposo e vascularização (sanguínea e linfática). Sendo ainda presentes os anexos cutâneos pêlos, unhas e glândulas (AZULAY; AZULAY, 2008)

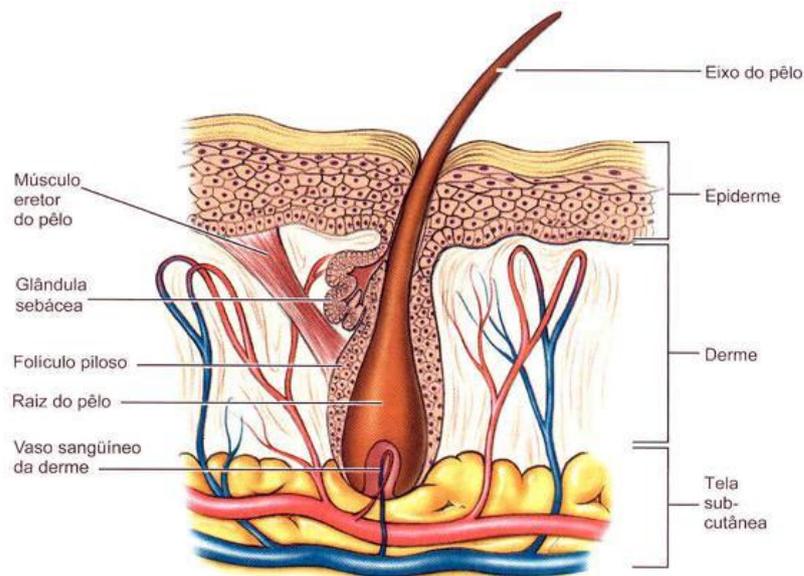


Figura 7 – Representação esquemática das camadas da pele e dos anexos cutâneos. Fonte: Azulay e Azulay (2008).

A epiderme é subdividida em 5 camadas, sendo a mais profunda a camada basal, que é responsável pela proliferação de queratinócitos; seguida pela camada espinhosa, na qual começa o processo de achatamento das células; granulosa, a célula não apresenta mais organelas citoplasmáticas íntegras e sim grânulos de querato-hialina, que posteriormente auxiliarão na composição das camadas, lúcida (presente apenas em sola de pé e palma de mão) e córnea que são camadas formadas por queratinócitos justapostos unidos por proteínas e pontes de hidrogênio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Além de queratinócitos, estão presentes nessa camada melanócitos, que são células responsáveis pela pigmentação da pele, células de languerhans, que participam dos processos imunológicos, e células de merkel que são responsáveis

pelas respostas mecânicas do tecido (BERARDESCA, ELSNER, WILHELM; 1995).

A nutrição da epiderme ocorre através da junção dermo-epidérmica que une esta camada com a derme. Camada essa que se situa inferior a epiderme; composta de tecido conjuntivo frouxo, com a presença de elementos fibrilares (elastina e colágeno) entre outros elementos como glicosaminoglicanas, proteínas estruturais e capilares sanguíneos e linfáticos (BAUMANN, 2007).

Esta camada é subdividida em duas: papilar, mais superficial, composta por tecido conjuntivo frouxo e reticular. A mais profunda é composta por tecido conjuntivo denso não modelado, com predominância de fibras de colágeno (em torno de 85 % do tecido) (BAUMANN, SAGHARI, WEISBERG; 2009).

A hipoderme é o tecido que armazena triacilgliceróis (lipídios). Suas células, os adipócitos, possuem um pequeno citoplasma periférico e um grande espaço para armazenamento de gordura. Sua função é proteção contra choques, manutenção da temperatura corpórea e ainda, possui ação hormonal com a formação e regulação do hormônio leptina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

Para sistemas de liberação transdérmica, a epiderme é a principal camada, sendo o estrato córneo uma das principais barreiras à penetração de fármacos. Os lipídios desta camada se organizam em estruturas multilamelares, intercalando os domínios lipofílicos e hidrofílicos, o que pode facilitar ou dificultar a permeação de ativos (SINKO, GONZALES-ORTEGA, 2008).

2.4.2 Permeação do trato gastrointestinal

A via mais comumente utilizada para a administração de fármacos, é a via oral, por sua fácil adesão e conveniência de tratamento. No entanto, para que ocorra eficácia é necessária uma determinada concentração de ativo (concentração alvo/efetiva) disponível no trato gastrointestinal (TGI), assim como adequado pH do meio gástrico, para não causar danos a estrutura dos compostos e o valor de pKa de cada fármaco (DI et al; 2003).

São variadas as possibilidades de rotas de permeação, sendo que a difusão passiva é a que ocorre com mais frequência e facilidade no processo de permeação no TGI. Esta ocorre através dos enterócitos, por via transcelular ou por rota paracelular

(via junções oclusivas), a Figura 8 apresenta a anatomia do intestino delgado, onde ocorrem os processos de permeação. A primeira ocorre em todo o TGI e a segunda está disponível apenas no intestino delgado (apresenta tamanho de poro no jejuno humano de 6 a 8 ângstrons (SCHNEIDER, BARINGHAUS, 2008).

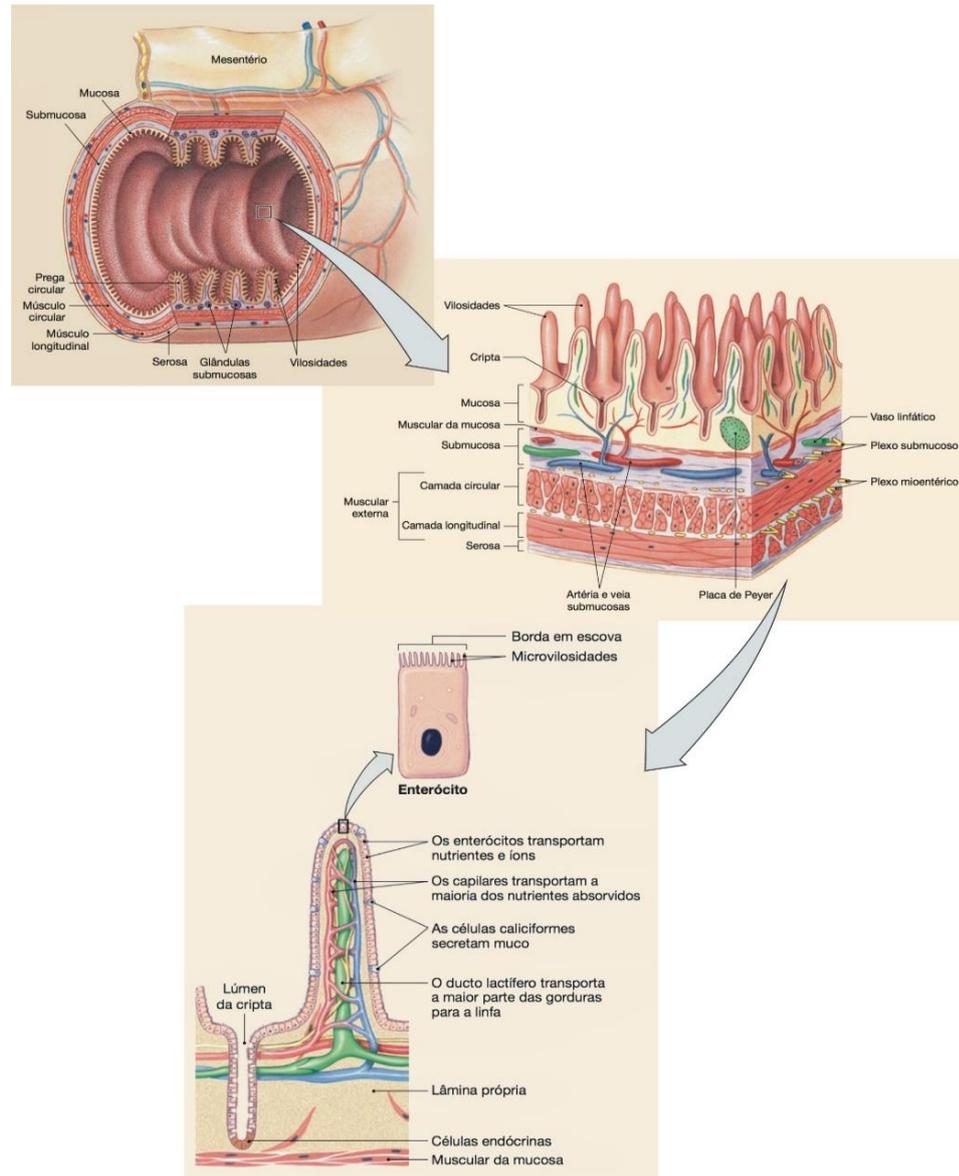


Figura 8 – Representação esquemática do intestino delgado, apresentando as vilosidades e sua conformidade celular. Fonte: modificado de Silverthorn (2010).

A absorção mediada por carreadores ocorre via transporte ativo ou por difusão facilitada. Vários transportadores estão dispostos na porção apical celular e podem limitar a absorção intestinal, assim como enzimas que estão envolvidas no

processamento de metabólitos ativos e a endocitose que é mediada por receptores (PRESS et al; 2008).

Em testes *in vitro*, a diferença entre transporte ativo e por efluxo pode ser verificado através de testes com células Caco-2 e ensaio *PAMPA* (KERNS et al; 2004). *In vivo*, o processo de absorção pelo TGI é dependente de eventos relacionados a aspectos fisiológicos, fatores físico-químicos inerentes a substância, como: logP (constante de lipofilicidade), solubilidade, pKa, quantidade de hidrogênios doadores e aceptores, PM (Peso Molecular) e ASP (Área de Superfície Polar) (DEFERME et al; 2008).

A absorção gastrointestinal é o processo final da digestão de alimentos. Neste processo, através de processos físicos (mastigação), químicos (enzimas) e físico-químicos (emulsificação) há a quebra ou modificação dos alimentos, levando a transformação em componentes mais simples passíveis de absorção (DOUGLAS, 2011).

A maior parte da digestão ocorre no intestino delgado, através das células epiteliais, partir de mecanismos diferenciados, como difusão passiva ou facilitada; as frações reduzidas (ou mais simplificadas) passam às camadas do intestino sendo absorvidas até chegarem ao sistema circulatório e linfático. O duodeno é considerado o centro do processo digestivo, pois nele são disponibilizadas as secreções biliares e pancreáticas (que é liberada através do conduto de Wirsung) e acontece o início da absorção intestinal (10 a 15 %), prosseguindo no jejuno e íleo (DOUGLAS, 2011).

Os mecanismos de absorção acontecem por transferência passiva por difusão simples. A hidrofília é diretamente proporcional ao gradiente de concentração, sendo que quanto mais hidrofóbico for o composto e maior o gradiente de concentração, maior é a difusão. A transferência por difusão facilitada, é mediada por carreadores dependentes de sódio (Na⁺) e necessita de energia metabólica, sendo mediada por co-transporte. Assim, é possível o bombeamento de substâncias contra o gradiente. Essa ação ocorre por gradiente eletroquímico, em que as substâncias são carregadas principalmente junto ao Na⁺ (FRENHANI; BURINI, 1999).

2.4.3 Permeação da barreira hematoencefálica

Esta membrana possui a capacidade de avaliar a permeação de ativos que

apresentam elevada permeação cerebral (BHE+) e os que possuem baixa permeação (BHE-). Para que o fármaco seja ativo no SNC, é essencial que ele passe a BHE e essa passagem ocorre por difusão passiva transcelular (DI et al; 2003).

Em testes que avaliam modelos *in vitro* BHE, há a utilização de uma solução polar lipídica cerebral, constituída pela mistura de fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilcolina, ácido fosfátídico e fosfatidilinositol, dissolvida em *n*-dodecano, disposta em um filtro hidrofóbico de polivinildifluoreto (PVDF), sendo que este modelo apresenta alta reprodutibilidade e baixo custo (DI et al; 2003).

Para que substâncias com efeito terapêutico cheguem ao SNC, é preciso que este consiga ultrapassar a BHE (Figura 9). Esta é uma barreira estrutural, bioquímica e de transporte, formada por células endoteliais com atividade pinocítica muito baixa, unidas por junções oclusivas e circundadas por astrócitos (LOCH-NECKEL, 2013). Além disso, as células endoteliais apresentam uma camada superficial negativa, o que repele compostos carregados negativamente.

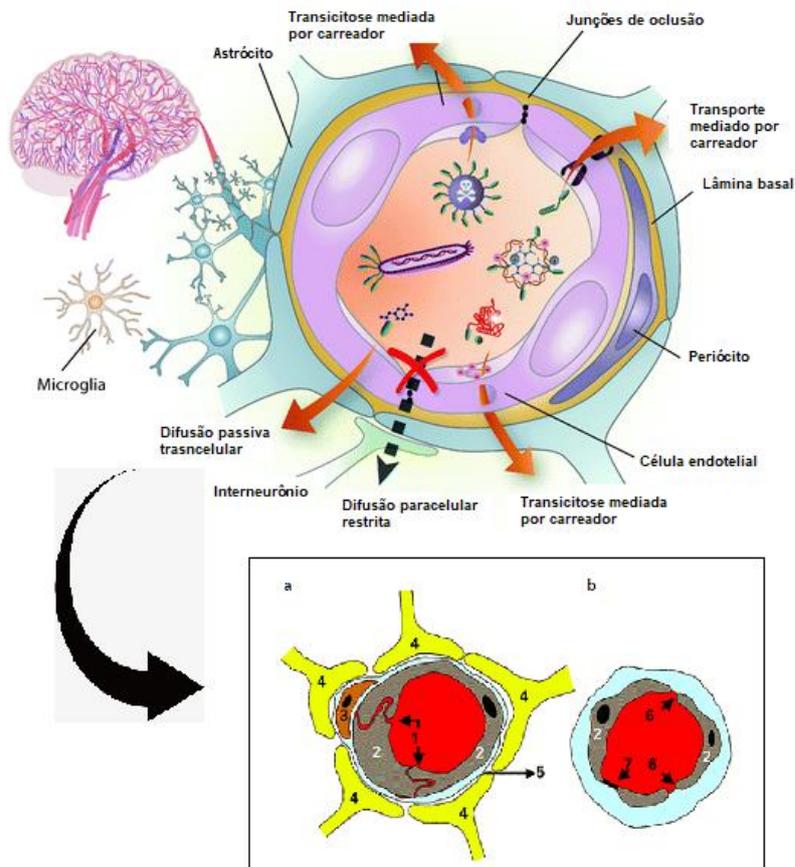


Figura 9 – Representação esquemática da barreira hematoencefálica, apresentando os astrócitos sobre

o capilar sanguíneo cerebral. Fonte: modificado de Oller-salvia et al (2016). No detalhe, comparação da estrutura de um capilar cerebral com barreira hematoencefálica (a) e um capilar sem a barreira (b). Em que: 1 – junções de oclusão 2 – célula endotelial 3 – pericito, 4 – astrócito pericapilar 5 – lâmina basal subendotelial 6 – espaço interendotelial 7 – fenestração intraendotelial Fonte: Pascual-Garvi e colaboradores (2004).

As células endoteliais são conectadas entre si por um complexo apical, formado por diversas proteínas que se projetam para fora da membrana e se ligam a um citoesqueleto, formado por actina, selando as estruturas entre as células endoteliais (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2001).

Assim, a BHE apresenta-se como uma barreira funcional que impede a troca de íons e matéria orgânica do plasma para o tecido nervoso, sendo que apenas água, gases como O₂ e CO₂ e determinadas moléculas lipofílicas com peso molecular menor que 400 a 600 Da, conseguem atravessar livremente a membrana (PASCUAL-GARVI et al., 2004).

Há uma série de características morfológicas e funcionais que diferenciam os endotélios da BHE dos demais endotélios dos vasos. Células epiteliais mais unidas, evitando a comunicação entre os espaços extracelulares; a presença de estruturas diafragmáticas que permitem a regulação das moléculas que atravessam ou não a membrana, por polaridade e tamanho; ausência de vesículas de endocitose intraendoteliais, sendo que a partir destas vesículas há a permeação de várias moléculas em outros tecidos; elevado número de mitocôndrias por célula endotelial, havendo assim, maior atividade metabólica local, relacionando com um maior número de transporte transmembrana ativo e a existência de uma camada basal simples (PASCUAL-GARVI et al., 2004).

Muitos recursos terapêuticos que apresentam eficácia em transtornos sistêmicos, não conseguem apresentar adequada ação sobre o SNC por não apresentarem a capacidade de ultrapassar a BHE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O crescente uso de compostos bioativos para o tratamento de diferentes afecções, sejam estas sistêmicas ou locais, faz com que seja necessário o estudo de permeação de diferentes compostos, por diferentes vias. As plantas apresentam metabolismo complexo que pode interferir através de ação sinérgica dos compostos na permeação dos mesmos.

A partir disso a pesquisa realizada, previu avaliar a permeação de 8 compostos bioativos sintéticos, separadamente, em conjunto, bem como em extrato hidroetanólico de 4 plantas diferentes, em 3 membranas sintéticas diferentes (*PAMPA_{TGI}*, *PAMPA_{PELE}* e *PAMPA_{BHE}*). Essas membranas simulam diferentes barreiras, as quais os compostos são expostos para evidenciar ações terapêuticas no organismo humano.

3.1 Materiais, reagentes e soluções

Para a realização do estudo foram utilizados os padrões: ácido gálico, (+)-catequina, rutina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido *p*-Cumárico, ácido clorogênico (todos da Sigma-Aldrich).

Todos os padrões de grau analítico, com pureza mínima de 95%. Estes padrões foram selecionados a partir de estudos prévios realizados com as plantas utilizadas em espectroscopia de massas, sendo estes os que apresentaram maior biodisponibilidade ou bioatividade, favorecendo assim a sua utilização neste estudo. Deve-se levar em consideração que a quantidade disponível dos subprodutos no extrato é uma informação relevante, pois após ultrapassar a barreira, estes ainda devem apresentar concentrações terapêuticas para que possibilitem as ações favoráveis no organismo.

Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q UV Synergy (Millipore 13 SA, Molsheim, França). Os solventes, em grau HPLC, metanol e acetonitrila foram obtidos de Tedia Company (EUA).

Os reagentes utilizados foram: fosfato mono e dibásico (Vetec), hidróxido de

sódio (NaOH) (Synth), fosfato de potássio monobásico (Química Moderna), β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich), ácido fosfórico P.A. (FMaia)

As soluções estoque dos padrões (1000 mg L^{-1}) serão preparadas dissolvendo-se quantidade apropriada das substâncias em metanol (grau HPLC) e após serão armazenadas em tubos Falcon a $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ até a análise.

3.2 Amostras

Para a realização da pesquisa foram selecionados os padrões de antioxidantes que apresentaram maior quantidade disponível nas plantas a serem estudadas (Tabela 1). Essa avaliação foi realizada previamente por HPLC com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS) (FACCIN et al, 2016).

Tabela 1 – Quantidade em $\mu\text{g/g}$ dos compostos presentes nos extratos brutos, avaliação realizada por LC-MS.

Composto	$(\mu\text{g/g extrato bruto})$			
	<i>Bauhinia variegata</i>	<i>Cecropia palmata</i>	<i>Connarus perrotteti</i>	<i>Mansoa alliacea</i>
Catequina	171,3	30,7	3.976,9	-
Rutina	9.746,7	-	-	50,0
Ácido cafeico	267,8	164,9	5,2	25,9
Ácido vanílico	45,0	64,0	224,0	64,6
Ácido ρ -Cumárico	100,6	24,3	94,5	57,4
Ácido ferúlico	80,3	23,4	23,4	149,0
Ácido gálico	-	-	681,5	-
Ácido clorogênico	1.171,1	1.408,8	10,6	215,5

A avaliação da permeação através das membranas do tipo *PAMPA* foi realizada primeiramente em 8 padrões antioxidantes, sendo eles: ácido gálico, (+)- catequina, rutina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido ρ -Cumárico, ácido clorogênico, para verificar qual a capacidade individual de transposição dos compostos. As análises de permeação das soluções padrão dos antioxidantes foram

realizadas com soluções de 1 mmol L^{-1} de concentração para as membranas $PAMPA_{TGI}$ e $PAMPA_{PELE}$ e de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ para $PAMPA_{BHE}$, a mesma concentração utilizada para avaliar a ação conjunta dos antioxidantes. A avaliação do extrato hidroalcolólico de plantas com fins medicinais, foi realizada com os extratos na concentração de 10%. Estas plantas foram obtidas do Horto Florestal da Embrapa Amazônia Oriental: embaúba-vermelha (*Cecropia palmata* Willd. – registro IAN 185556), pata-de-vaca branca (*Bauhinia variegata* – registro 18 IAN 185932), cipó-d’alho (*Mansoa alliaceae* – registro IAN 184394), barbatimão (*Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk. – registro IAN 184393).

As plantas foram recebidas secas, prontas para a elaboração dos extratos, utilizou-se as plantas da mesma safra (3ª safra, que corresponde a coletas do mês de setembro, estação chuvosa no norte do Brasil). O preparo dos extratos foi realizado a partir da casca da planta *Connarus perrottetii* e das folhas das demais plantas.

3.3 Instrumentação

Para avaliação das permeações dos extratos foram utilizados dois tipos de separação cromatográfica: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por amperometria pulsada (HPLC–PAD) e com detecção por arranjo de diodos (HPLC–DAD).

As separações em HPLC–PAD foram realizadas conforme metodologia descrita por Silveira e colaboradores (2015), em equipamento de cromatografia líquida com sistema de separação isocrática (Metrohm, 882 Compacto IC Plus), com detector amperométrico de pulso (Metrohm, 871 Advanced Bioscan e 771 IC Compact Interface). O detector eletroquímico (Metrohm, Vario Cell Bioscan) contém um disco de ouro (8 mm de diâmetro) como o eletrodo de trabalho equipado com spacer washer (50 μm) (Metrohm, Vario Cell), contraeletrodo de platina (Metrohm) e eletrodo de referência em hidrogênio em fase sólida (Metrohm). As separações foram realizadas em coluna C18 (Thermo Scientific) com dimensões de 4,6 mm x 150 mm x 5 mm.

A fase móvel utilizada foi composta por fosfato de sódio (50 mmol L^{-1}), β -ciclodextrina (1 mmol L^{-1}) em metanol 30 % (v:v), com pH 2,0 ajustado com ácido

fosfórico. A fase móvel foi filtrada com membranas de filtração de 0,45 µm (Sartorius) e sonificado por 1 h antes do uso, sendo que o fluxo de vasão foi de 1 mL min⁻¹.

As separações cromatográficas em HPLC–DAD foram realizadas em um sistema HPLC Shimadzu, com bomba LC – 20AT e detector SPD – N20A, equipado com software LC - Solutions (Shimadzu). As corridas cromatográficas foram realizadas na temperatura de 25 °C (± 2 °C), utilizou-se uma coluna do tipo C18, de dimensões 4,6 mm × 250 mm, tamanho de partícula de 5 µm (VertSep – GES, Vertical Chromatography). O injetor de amostras (SIL – 20AHT) é dotado de uma alça de amostragem com volume de 20 µL.

Para a separação cromatográfica dos compostos foi utilizado como eluente ácido fosfórico pH 3,0 e acetonitrila. Os compostos avaliados foram adicionados em meio tampão fosfato pH 7,4 e pH 6,4, conforme avaliação (membrana) realizada.

Os compostos foram separados em equipamento HPLC com detector de arranjos de diodo (Shimadzu) com eluição isocrática de ácido fosfórico pH 3,0 (80%) e acetonitrila (20%) de com fluxo de 0,6 mL min⁻¹, em coluna C18 (VertSep – GES, Vertical Chromatography), temperatura ambiente para a separação, volume de injeção de amostra de 20 µL e tempo de corrida de 20 minutos. Os comprimentos de onda avaliados serão 210 e 320 nm.

3.4 Procedimentos experimentais

3.4.1 Avaliação da permeabilidade celular dos antioxidantes estudados

A avaliação da permeação dos extratos vegetais em diferentes tipos de membrana no modelo *PAMPA*, foi realizada através de célula de difusão vertical tipo Franz e com ensaio em placa de 96 poços (protocolo Milipore ® - nº PC040EN00). A primeira é utilizada quando a análise da amostra exige maior quantidade de amostra, enquanto que a placa de 96 poços é utilizada para menor volume, sendo que ambos os aparatos apresentam a mesma ação, pois os dois dispõem de compartimentos doador e receptor, que é separado pela membrana modificada.

As membranas utilizadas sofrem a modificação através de diferentes soluções impregnadas na membrana de PVDF, permitindo assim a mimetização de permeação

gastrointestinal, transdérmica e da barreira hematoencefálica.

3.4.2 Modificação da membrana

A modificação da membrana é realizada de acordo com a via de administração de substâncias que foi testada, ou em relação ao tecido alvo de ação dos ativos, assim três modificações foram realizadas:

1 – *PAMPA_{TGI}* (permeação do trato gastrointestinal): a modificação desta membrana é realizada com a utilização da solução de L-a-fosfatidilcolina 2 % em dodecano (m/v) (SCHIMDT; LYNCH, 2003).

2 - *PAMPA_{PELE}* (permeação transcutânea): modificação realizada com a solução de 70 % de óleo de silicone + 30 % de miristato de isopropila (v:v) (OTTAVIANNI; MARTEL; CARUPT, 2006).

3 – *PAMPA_{BHE}* (permeação da barreira hematoencefálica): deposição de uma solução composta por 16 mg de Porcine Polar Brain Lipid (PBL) e 8 mg de colesterol dissolvido em 600 µL de n-dodecano (KÖNCZÖL et al., 2013).

Sobre a membrana foi disposta quantidade suficiente da respectiva solução utilizada para a modificação da membrana de acordo com a área. No experimento que utiliza a placa de 96 poços, foram utilizados 5 µL e no ensaio com a célula de Franz foi aplicado em torno de 180 µL.

3.4.3 Caracterização das membranas *PAMPA*

3.4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização das membranas *PAMPA* foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss, modelo LS-10, detector utilizado foi SE e a tensão de 20 kV. Na microscopia eletrônica de varredura há emissão de um feixe de elétrons, sendo que estes podem ser focalizados por campos eletromagnéticos ou eletrostáticos, formando assim imagens com aumentos de até 100.000 vezes (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

Para a realização do estudo das membranas, foi aplicado sobre a membrana de PVDF o composto referente a respectiva modificação desejada ($PAMPA_{TGI}$, $PAMPA_{Pele}$ ou $PAMPA_{BHE}$), a membrana foi disposta sobre o *stub* com fita de carbono e metalizada com uma camada de ouro (*Sputtering* – Quorum, modelo Q 150R ES), para que fosse possível a visualização da imagem no microscópio. As imagens foram capturadas em aumentos de até 4000 vezes.

Para a avaliação da porosidade superficial as imagens obtidas em 1000 x de aumento foram divididas em quadrantes, de cada um foram selecionados 20 poros, e deste total foram realizadas médias e desvio padrão para identificar o tamanho médio dos poros superficiais, através do software Corel Draw®.

3.4.3.2 Difusão de íons

Para a validação das membranas $PAMPA_{TGI}$ e $PAMPA_{PELE}$, foi realizada a avaliação da difusão de íons foi realizada de acordo com Thürmer e colaboradores (2010), sendo que para o ensaio será utilizada uma célula de difusão vertical de dois compartimentos (doador e receptor), separados por uma membrana de PVDF modificada, tendo como compartimento receptor água deionizada e como compartimento doador uma solução de KCl ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). As alíquotas da célula de difusão foram retiradas em tempos de 1, 2, 3 e 4 horas e analisadas pela medida de condutividade elétrica. Para o controle da difusão de KCl através da membrana, foi construída uma curva de calibração pela medida da condutividade de várias concentrações de KCl.

3.4.4 Ensaio de permeação

No ensaio realizado com a placa de 96 poços, foram utilizadas duas placas, sendo que uma serve como câmara receptora e outra placa igual com microfiltros hidrofílicos (Immobilion-P de membrana de $0,45 \mu\text{m}$) acoplados (MultiScreen IP, Millipore) é disposta sobre a primeira placa, que é utilizada como compartimento doador, conforme Figura 10.

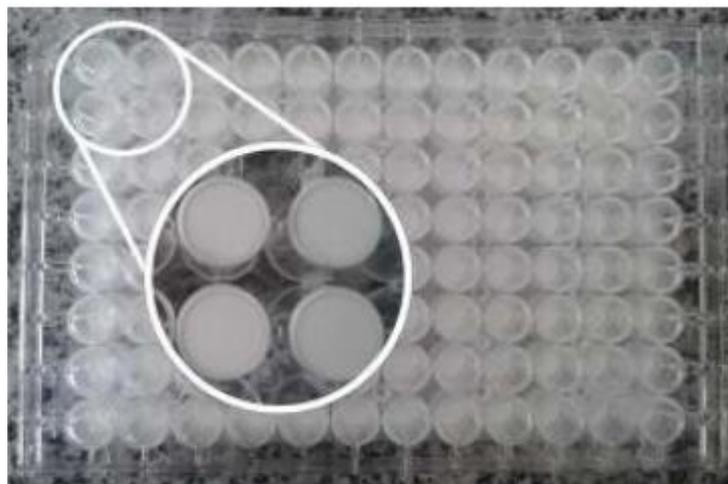


Figura 10 – Placa de análise do modelo *PAMPA*, no detalhe, aproximação dos filtros.

Outro modelo utilizado foi a célula de Franz (Figura 11), onde há a presença de um compartimento doador, e um compartimento receptor, sendo que entre os compartimentos há a presença de uma membrana de PVDF (hidrofóbica) com poro de 0,45 μm . Esta célula é composta por uma camisa de aquecimento que é acoplada um banho termostaticado (MA-083, Marconi) permitindo que a solução interna ao compartimento receptor permaneça em 37 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$) para *PAMPA*_{TGI} e *PAMPA*_{BHE}; e 32 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,5$ $^{\circ}\text{C}$) para *PAMPA*_{PELE}, simulando assim a temperatura corpórea. Para que seja mantida a homogeneidade da amostra, um agitador magnético é disposto no compartimento, permanecendo em agitação durante todo o período de teste. Em ambos os modelos não foi utilizado gradiente de pH entre os reservatórios aceitador e doador.

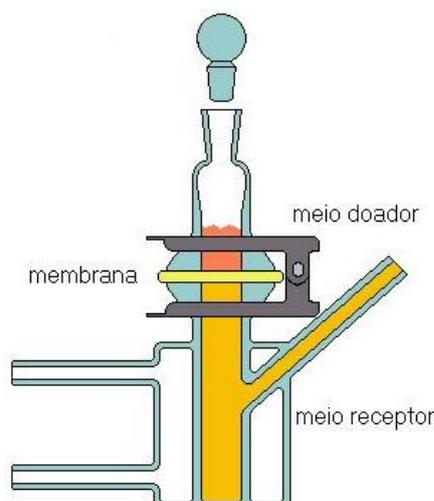


Figura 11 – Modelo de célula de Franz utilizado neste estudo.

A solução utilizada nos compartimentos (doador e receptor) foi tampão fosfato pH 7,4 (*PAMPA_{TGI}* e *PAMPA_{BHE}*) e pH 6,4 (*PAMPA_{PELE}*), compostos por fosfato de potássio e hidróxido de sódio. Estes pH simulam o fisiológico, sendo que no compartimento doador foi adicionado 1 mmol L⁻¹ (*PAMPA_{TGI}* e *PAMPA_{PELE}*) e 0,1 mmol L⁻¹ (*PAMPA_{BHE}*) dos padrões testados e os extratos vegetais em concentração de 10%, todos os compostos avaliados, seja na individual, na mistura ou nos extratos foram diluídos em solução tampão fosfato com o pH de cada meio avaliado. Após os tempos de 1, 2, 3 e 4 horas foram retiradas as alíquotas dos compartimentos receptores e posteriormente avaliadas em HPLC–DAD e HPLC–PAD, sendo determinados o comportamento cinético e permeação no tempo máximo de incubação do ensaio: 3 horas para *PAMPA_{TGI}* e *PAMPA_{PELE}* (RANG; DALE; MAUREN, 2012; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013) e 4 horas para *PAMPA_{BHE}* (KÖNCZÖL et al., 2013).

Para isso foram avaliados os padrões antioxidantes utilizados (individualmente e misturados) quanto a permeação, mantendo a concentração de 1 mmol L⁻¹. As avaliações foram realizadas em triplicata, sendo que a quantificação no HPLC–PAD foi realizada com adição de padrão (curva interna) e no HPLC–DAD foi utilizada curva externa, pois a identificação dos picos ocorre, também, pela avaliação dos espectros específicos de cada composto.

A determinação dos valores de fluxo e permeabilidade dos compostos estudados foram determinados a partir dos cálculos a seguir (CHEN et al., 2008):

Fluxo (J)

$$J = \frac{C}{A \cdot T} \quad \text{Equação 2}$$

Onde, C = concentração; A = área; T = tempo

Coefficiente de Permeabilidade (Pe)

$$Pe = \frac{-\ln[1 - C_A(t)/C_{equilibrium}]}{A \cdot (1/V_D + 1/V_A) \cdot t} \quad \text{Equação 3}$$

O cálculo de $C_{equilibrium}$ foi realizado a partir de:

$$C_{equilibrium} = [C_D(t) \cdot V_D + C_A(t) \cdot V_A] / (V_D + V_A) \quad \text{Equação 4}$$

Em que, A= área efetiva do filtro; V_D = volume do compartimento doador; V_A = volume do compartimento receptor; t= tempo de incubação (em segundos), $C_A(t)$ = concentração do composto do compartimento receptor para o tempo; $C_D(t)$ = concentração do composto do compartimento doador para o tempo.

3.5 Análise dos compostos permeados

A avaliação quantitativa dos compostos permeados foi realizada através de HPLC-PAD e HPLC-DAD, para comparação dos resultados obtidos em termos de quantidade permeada em mmol L⁻¹. A tabulação e análises dos resultados obtidos foram realizadas através do software Microsoft Excel, as análises estatísticas serão realizadas pelo *software* Prism 5.0. Os testes estatísticos utilizados foram, Anova seguido de Tukey e teste T Student, sendo utilizado $p < 0,001^{***}$, $p < 0,001^{**}$ e $p < 0,05^*$ em ambas análises estatísticas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Extratos brutos de plantas obtidos por maceração em misturas hidroalcoólicas contêm diversos compostos majoritários e minoritários que proporcionam diferentes ações nos organismos. Logo, o estudo da ação individual propicia o melhor conhecimento quanto à potencial eficácia terapêutica de cada composto. O estudo da combinação dos compostos e dos extratos das plantas, permitem inferir sobre a ação conjunta e a possibilidade de sinergismos entre os diferentes ativos. Para tanto, neste estudo foram realizadas avaliações quantitativas para verificar quais são os componentes que apresentam viabilidade para permear os diferentes tipos de membranas sintéticas modificadas.

Previamente a este estudo, foi realizada no grupo de pesquisa a caracterização dos extratos que foram utilizados neste trabalho. Esta avaliação foi realizada por HPLC com detecção por espectrometria de massa (LC-MS/MS), identificando quais os compostos mais abundantes presentes nas plantas estudadas (FACCIN et al., 2016). Assim, a partir destes resultados optou-se pelos que apresentavam maior quantidade disponível, pois a passagem por barreiras biológicas é dificultada pela especificidade de cada membrana, pelas características físico-químicas da molécula do composto, solubilidade, pKa, quantidade de hidrogênios doadores e aceptores.

4.1 Estudo preliminar de permeação PAMPA por HPLC–DAD

A avaliação da absorção por diferentes membranas pode ser adequadamente avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência. Assim, como estudo preliminar foi realizada a avaliação da permeação dos antioxidantes resveratrol, catequina, ácido cafeico, quercetina, quercitrina e crisina em modelo de permeação *PAMPA_{TGI}*. Neste estudo, os resultados de permeação foram avaliados comparativamente com os resultados de atividade antirradicalar, a partir de testes *in vitro* e *ex vivo*, conforme artigo submetido para publicação em anexo (ANEXO 1).

Este estudo prévio serviu de base para os estudos propostos nesta tese, uma vez que 6 compostos fenólicos foram estudados em membranas de PVDF modificadas em modelo *PAMPA_{TGI}*. Foi possível correlacionar uma alta atividade antirradicalar para a quercitrina com sua maior permeabilidade na membrana. Assim como a quercitrina, o ácido cafeico também apresentou maior permeabilidade em

membrana tipo *PAMPA_{TGI}*.

Através deste estudo, foi possível comparar a passagem do antioxidante com sua ação no tecido. Estes compostos possuem a capacidade de transpor a membrana facilitando a captação de radicais livres em nível celular. No entanto, alguns compostos não apresentam a habilidade de transpor a membrana, como a crisina e a quercetina, que não apresentaram permeação através da membrana *PAMPA_{TGI}* nos tempos estudados. Provavelmente o tamanho molecular dificultou a transposição, assim como o número de hidrogênios da molécula.

A literatura apresenta diferentes resultados sobre a permeação da quercetina e da quercitrina. Estudos realizados por Chen e colaboradores (2014) e Dagenais e colaboradores (2009) inferem que os compostos apresentam dificuldade de permeação no organismo; enquanto que Behling e colaboradores (2004) sugerem que a absorção da quercetina ocorre mais rapidamente do que a absorção da quercitrina, sendo que essa diferença pode ter sido influenciada pelas condições experimentais.

O estudo da permeação de ativos através de membranas do tipo *PAMPA*, possibilita identificar se a permeação de compostos por diferentes vias de administração é efetiva e se após essa permeação ainda é possível detectar quantidades terapêuticas dos produtos utilizados em diferentes tipos de formulações. A quantidade de compostos permeados através das membranas podem ser adequadamente avaliadas através de HPLC.

4.2 Co-validação de método cromatográfico para avaliação de antioxidantes por HPLC – DAD

O método cromatográfico utilizado foi adaptado de Lima (2013), para os 8 compostos de interesse na tese: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-Cumárico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido clorogênico, catequina e rutina.

A Figura 12 demonstra os cromatogramas nos comprimentos de onda descritos, evidenciando assim, qual o comprimento de onda mais adequado para a avaliação de cada composto, sendo que os compostos: ácido gálico, catequina, rutina, ácido vanílico e quercitrina são melhores visualizados no comprimento de onda de

210 nm, e os demais: ácido clorogênico, ácido ρ -Cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico apresentam melhor definição dos picos no comprimento de onda de 320 nm. O estudo demonstra a separação de 9 compostos a partir de metodologia otimizada na Central Instrumental do Tecnovates (UNIVATES, Lajeado/RS).

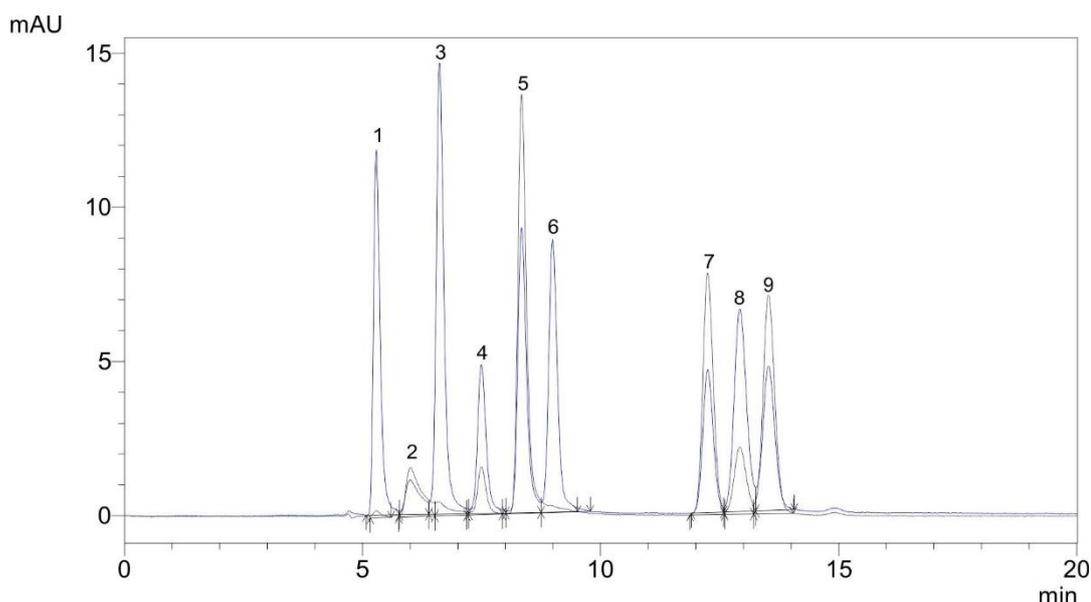


Figura 12 – Cromatograma dos 9 compostos fenólicos (30 mg L^{-1}) nos respectivos tempos de retenção: (1) ácido gálico – 5,3 minutos (2) catequina – 6,6 minutos (3) rutina – 7,5 min (4) ácido vanílico – 9 min (5) Quercitrina – 12,9 min (6) ácido clorogênico – 6 min (7) ácido cafeico – 8,3 min (8) ácido ρ -Cumárico 12,4 min (9) ácido ferúlico – 13,5 min. Estão sobrepostos os comprimentos de onda avaliados, sendo: linha azul correspondente ao comprimento de onda de 210 nm e linha preta corresponde ao comprimento de onda de 320 nm.

O perfil cromatográfico para a separação dos 9 compostos foi encontrado (Figura 12), a partir destes foram realizadas as curvas de calibração para a determinação da linearidade do método a ser utilizado. Para a realização das curvas de calibração (Tabela 1) foram utilizadas diferentes concentrações dos compostos $0,01 \text{ mg L}^{-1}$; $0,5 \text{ mg L}^{-1}$; 1 mg L^{-1} ; 5 mg L^{-1} ; 10 mg L^{-1} e 30 mg L^{-1} , de cada composto. Foram avaliados também os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) (Tabela 2).

Tabela 2 – Equação da reta, coeficiente de correlação, LD e LQ dos 9 compostos antioxidantes em HPLC – DAD.

Composto	Equação da reta	Coeficiente de correlação (r)	Limite de quantificação (LQ) (mg L⁻¹)	Limite de Detecção (LD) (mg L⁻¹)
Catequina	$f(x) = 298365,895x + 120406,879$	0,998	0,012	0,003
Rutina	$f(x) = 118864,710x + 71594,746$	0,993	0,159	0,052
Ácido Cafeico	$f(x) = 213957,365x + 33128,128$	0,999	0,011	0,003
Ácido Vanílico	$f(x) = 302713,520x - 82910,006$	0,997	0,015	0,005
Ácido ρ-Cumárico	$f(x) = 385750,031x - 59954,244$	0,998	0,007	0,002
Quercitrina	$f(x) = 250418,166x - 102068,093$	0,995	0,022	0,007
Ácido Ferúlico	$f(x) = 265035,826x - 80145,418$	0,996	0,012	0,004
Ácido Gálico	$f(x) = 227615,990x - 150365,029$	0,995	0,027	0,008
Ácido Clorogênico	$f(x) = 67713,798x - 61441,835$	0,991	0,062	0,020

Os valores de coeficiente de correlação (r) obtidos estão de acordo com a legislação vigente recomendada pela ANVISA (2003) com coeficiente de correlação (r) igual a 0,99 e para o INMETRO (2003) valores acima de 0,9.

O método cromatográfico apresentou adequada separação dos picos, e linearidade da curva de calibração, considerando assim adequada a separação para a realização dos testes de liberação e permeação.

Os testes de permeação foram realizados em diferentes tipos de modificação de membrana, todas do tipo *PAMPA*, mas que simulam diferentes vias de administração. Foi avaliada a permeação: do trato gastrointestinal, da barreira cutânea e da barreira hematoencefálica.

O uso de modelos *PAMPA* para a avaliação da permeação de fármacos apresenta adequação metodológica, sendo que diferentes parâmetros podem influenciar na passagem dos ativos através das membranas, como a composição da membrana, ou as características do próprio composto e/ou do veículo utilizado.

Os estudos realizados nesta tese visam ampliar o conhecimento dos compostos que conseguem transpor os modelos de membrana *PAMPA_{TGI}*, Pele e BHE, com seus respectivos coeficientes de permeabilidade. Assim como, verificar qual o perfil de permeação dos diferentes extratos hidroalcoólicos de diferentes plantas, considerando que estudos disponíveis na literatura com estes tipos de membranas são apenas com o uso de compostos isolados (KARADZOVSKA; RIVIERE, 2013; VIZSERÁLEK et al., 2015; SINKÓ et al., 2009) e não com amostras complexas como as que serão utilizadas.

4.3 Modificação das membranas sintéticas de PVDF

Para que as membranas apresentem adequação ao estudo, elas foram impregnadas por diferentes compostos que mimetizam as características de cada tecido. Para tanto, foi preciso avaliar a adequada modificação realizada sobre o filtro de PVDF. Essa avaliação é realizada através de MEV e pelo teste de difusão de íons, para as membranas *PAMPA_{TGI}* e *PAMPA_{PELE}* e com a avaliação do log P_e dos compostos Verapamil e Prednisona na membrana *PAMPA_{BHE}*.

4.3.1 Caracterização da membrana *PAMPA_{PELE}*

A Figura 13 permite avaliar através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a composição física da membrana *PAMPA_{PELE}*, após a adição de óleo de silicone (70 %) e miristato de isopropila (30 %). Na imagem A é verificada a membrana sem modificação (PVDF), no aumento de 4000 vezes, na imagem B, observa-se a membrana sintética com a adição da solução de miristato de isopropila + silicone com aumento de 4000 vezes.

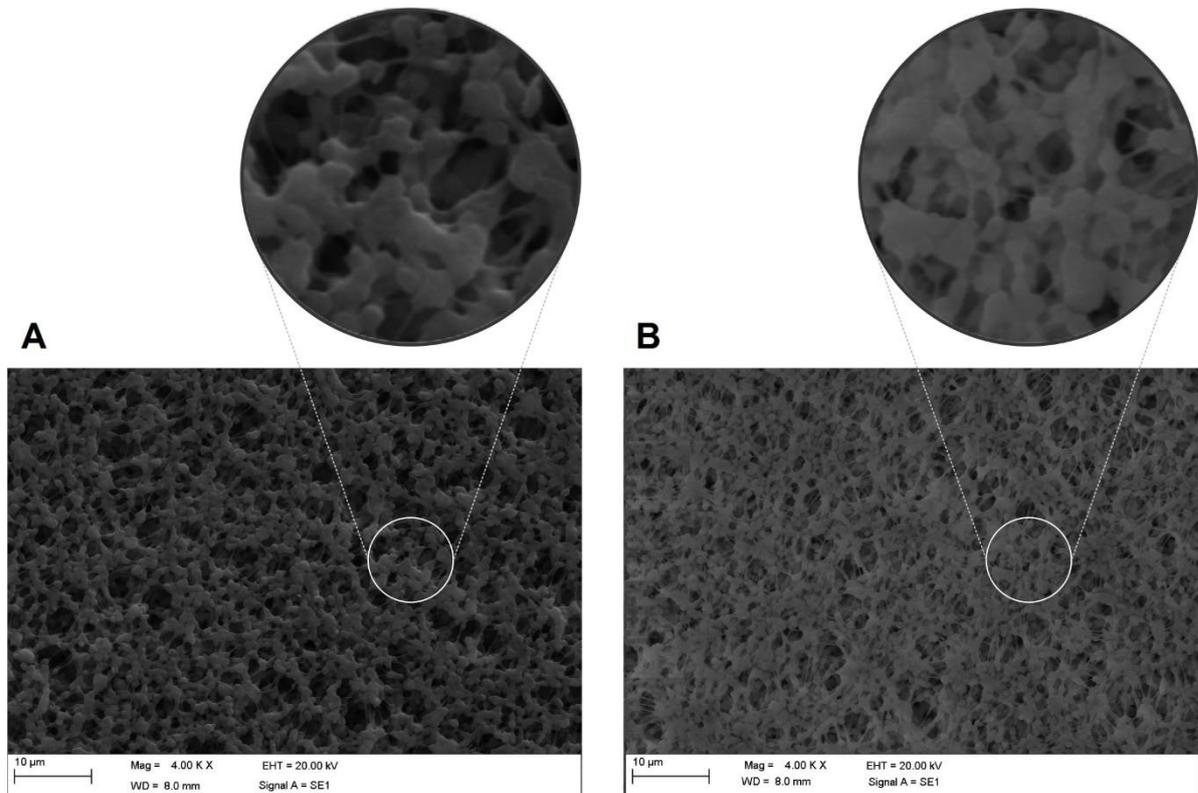


Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura da modificação do filtro de PVDF. (A) membrana PVDF aumento de 4000 x, (B) membrana *PAMPA_{PELE}* aumento de 4000 x.

A modificação da membrana (Figura 13 – B) apresenta maior homogeneidade, em comparação a não modificada (Figura 13 – A), assim como é possível verificar a formação de camadas e uma trama mais fechada, o que torna a membrana similar ao estrato córneo humano.

A partir das imagens obtidas pelo MEV, no aumento de 1000 vezes foi possível

avaliar o tamanho dos poros com e sem a modificação. Para tanto, as imagens foram divididas em 4 quadrantes e de cada um foram selecionados 20 locais, calculadas as suas áreas e realizadas as médias, obtendo-se assim um tamanho médio de poros.

Observa-se que a membrana com modificação apresenta maior homogeneidade no tamanho dos poros, sendo que a membrana de PVDF sem modificação apresentou tamanho de poro médio de $8,25 \mu\text{m}$ ($\pm 8,52 \mu\text{m}$) e a membrana com a modificação demonstra poros com tamanho médio de $5,14 \mu\text{m}$ ($\pm 2,70 \mu\text{m}$). É possível avaliar que a membrana modificada apresenta maior estabilidade nos poros após a deposição do miristato de isopropila + glicerina, assim como sutil redução dos mesmos, pois observa-se grande disparidade do tamanho dos poros quando não há modificação, evidenciados através do desvio padrão.

Observa-se a adequação da modificação quando compara-se a porosidade da pele humana, que apresenta porosidade aproximada de 5 a $10 \mu\text{m}$ de diâmetro, quando avaliados os poros das glândulas sudoríparas ecrinas, ao avaliar a porosidade dos folículos pilosos, observa-se porosidade maior, entre 40 e $80 \mu\text{m}$ (PLEWIG E KLIEGMANN, 2000). As diferenças de porosidade podem ser influenciadas por diversos aspectos, ambientais e hereditários, estas podem ser observadas em estudo realizado por Flament et al (2015) em que estudou a superfície da pele pessoas de diferentes etnias em diferentes idades e verificou que os chineses apresentam o menor tamanho de poro ($> 0,05 \text{ mm}^2$) não apresentando significativas alterações ao longo da vida e os indianos apresentaram os maiores tamanhos de poros, variando entre 0,12 a $0,22 \text{ mm}^2$ com idades que variaram de 18 a mais de 70 anos.

No teste de difusão de íons (Figura 14) foi avaliado o coeficiente de permeação para solução de KCl ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), sendo avaliadas estas soluções em sistema de difusão vertical com célula do tipo Franz nos tempos de 1 h, 2 h, 3 h e 4 h. Essa avaliação permitiu inferir que não ocorre alteração da difusão de íons com a modificação da membrana com o silicone + miristato de isopropila, quando comparada a membrana de PVDF sem modificação. Para a avaliação foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações de KCl, tendo como equação da reta $y = 5798,92903x + 18,47975$ e $r = 0,997$.

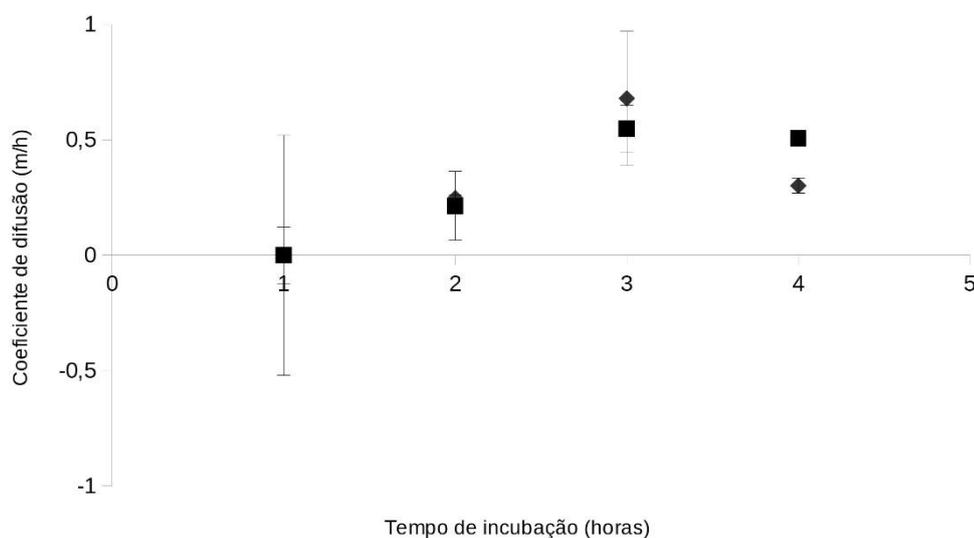


Figura 14 – Resultados do teste de difusão de íons, nos tempos de 1 h, 2 h, 3 h e 4 h, na figura: ■ corresponde a membrana sem alteração e ♦ a membrana com alteração (PAMPA_{PELE}).

A partir do teste de difusão de íons (Figura 14), obteve-se os seguintes resultados, para a membrana sem alteração em 1 hora – 0 m/h ($\pm 0,12$ m/h); 2 horas – 0,21 m/h ($\pm 0,14$ m/h); 3 horas 0,54 m/h ($\pm 0,10$ m/h) e 4 horas 0,50 m/h ($\pm 0,03$ m/h), apresentando os valores para a membrana modificada, 1 hora – 0 m/h ($\pm 0,51$ m/h); 2 horas – 0,24 m/h ($\pm 0,01$ m/h); 3 horas 0,67 m/h ($\pm 0,29$ m/h) e 4 horas 0,30 m/h ($\pm 0,03$ m/h).

É possível observar que há um aumento do coeficiente de difusão até o tempo de 4 h, sendo que há tendência ao equilíbrio na concentração de íons após 3 horas de teste. O resultado demonstra um sistema de difusão simples em que há o fluxo de íons do meio mais concentrado para o menos concentrado, havendo incremento da concentração no compartimento receptor, ou em um meio real até que haja a quantidade necessária para a efetuação de atividades biológicas ou ação terapêutica de determinado composto concentrado (ALBERTS, 2008).

A diferença do tamanho dos poros pode interferir sobre o valor do coeficiente de permeabilidade para o tempo de 4 horas. Na Figura 13, é possível verificar a deposição localizada e a formação de várias camadas bem definidas, o que pode dificultar a passagem dos compostos a serem estudados, mimetizando assim de forma adequada a permeação transdérmica.

A modificação da membrana para modelo tipo *PAMPA_{PELE}* preconiza a deposição de miristato de isopropila, componente que possui um éster com cadeia graxa longa que repele água, simulando assim adequadamente o estrato córneo humano, que possui em torno de 31 % de esteres e colesterol em sua composição (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A utilização da glicerina associada, permite a adequação da membrana para o modelo *PAMPA_{PELE}*, pois este componente possui propriedades higroscópicas, sendo presente no estrato córneo humano em até 80% da camada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Assim, com a associação do miristato de isopropila (30 %) + silicone (70 %) tem-se a simulação adequada do estrato córneo humano. Além da simulação dos ácidos graxos, tem-se a alteração morfológica da membrana, conforme visualizado no MEV com aumento de 4000 vezes (Figura 13), o que simula as vias lipofílicas da camada córnea.

A camada córnea apresenta lipofilicidade, facilitando assim a passagem dos compostos que apresentam essa característica. Logo, quando se relaciona esse modelo com os compostos utilizados no estudo verifica-se que eles possuem habilidade limitada para permeação através da via cutânea, tanto por suas características apolares, como pela constituição do tecido.

4.3.2 Caracterização da membrana *PAMPA_{TGI}*

A caracterização da membrana modificada para condições gastrointestinais foi realizada no Núcleo de Eletrofotoquímica e Materiais Poliméricos (NEMP) da Univates. Nos estudos foram realizadas avaliações em MEV, difusão de íons, a partir da análise de MEV (Figura 15) observou-se uma maior homogeneidade da membrana após a modificação, sendo que não houve alteração do coeficiente de difusão de íons após a alteração das membranas, conforme artigo submetido para avaliação (Anexo1).

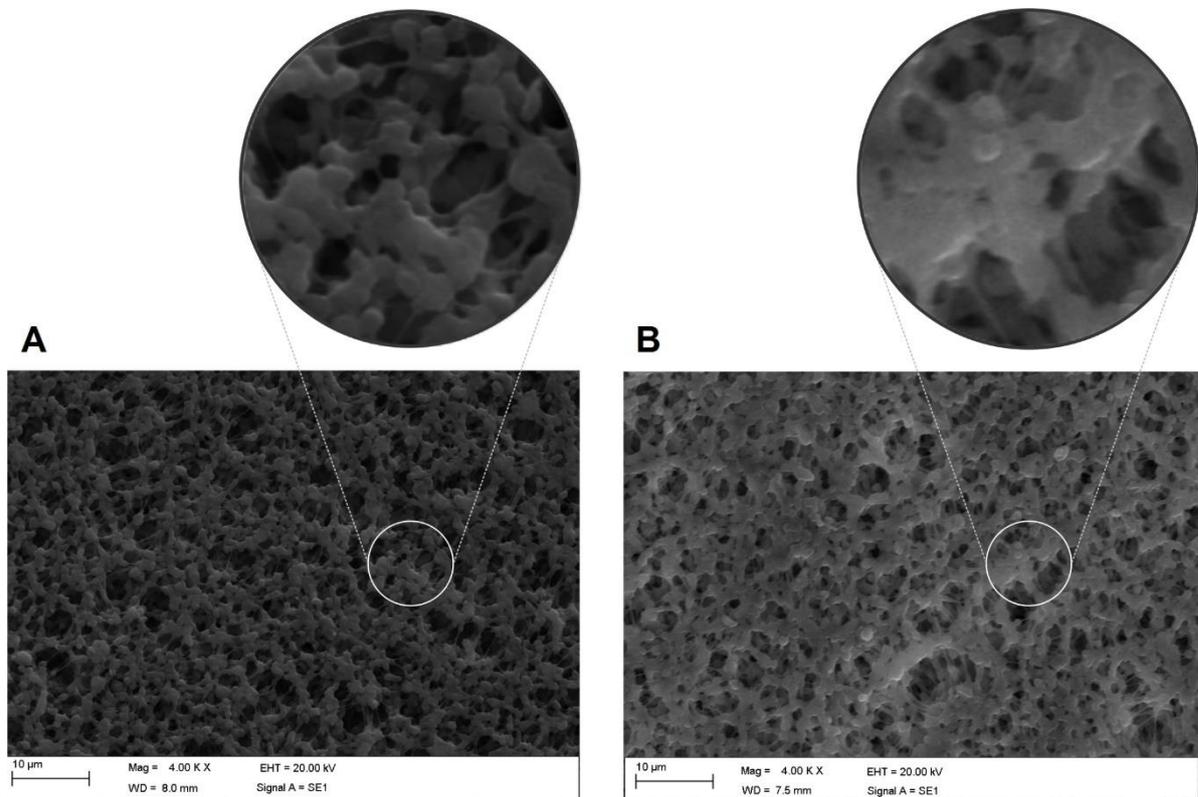


Figura 15 – Microscopia eletrônica de varredura da modificação do filtro de PVDF. (A) membrana PVDF aumento de 4000 x, (B) membrana $PAMPA_{TGI}$ aumento de 4000 x.

A membrana modificada do tipo $PAMPA_{TGI}$ apresenta adequação para a simulação das membranas TGI, com a deposição de fosfatidilcolina 2 %. A avaliação da porosidade superficial das membranas através do MEV com aumento de 1000 vezes identificou que a $PAMPA_{TGI}$ apresenta porosidade de $3,05 \mu\text{m} (\pm 1,16 \mu\text{m})$.

Assim foi possível verificar uma membrana com poros menores que a membrana sintética sem modificação ($8,25 \mu\text{m}; \pm 8,52 \mu\text{m}$) e que a $PAMPA_{PELE}$ $5,14 \mu\text{m} (\pm 2,70 \mu\text{m})$, o que apresenta relação com as membranas humanas, sendo que as membranas do trato gastrointestinal apresenta porosidade menor se comparada à superfície da pele, estudo realizado por Linnankoski et al (2010) identificou que o epitélio intestinal humano possui dois tamanhos de poro, grandes ($>10 \text{ \AA}$) e poros menores ($6,6 \text{ \AA}$), sendo que os poros menores recobrem a maior parte da superfície do trato gastrointestinal.

4.3.3 Caracterização da membrana *PAMPA*_{BHE}

A membrana modificada do tipo *PAMPA*_{BHE} permite inferir sobre a permeação de compostos através de uma membrana extremamente seletiva como o é o caso da barreira hematoencefálica. A Figura 16 apresenta através de MEV, a composição física da membrana *PAMPA*_{BHE}, após a adição da solução de 16 mg de PBL + 8 mg de colesterol dissolvido em 600 μ L de n-dodecano (KÖNCZÖL et al., 2013).

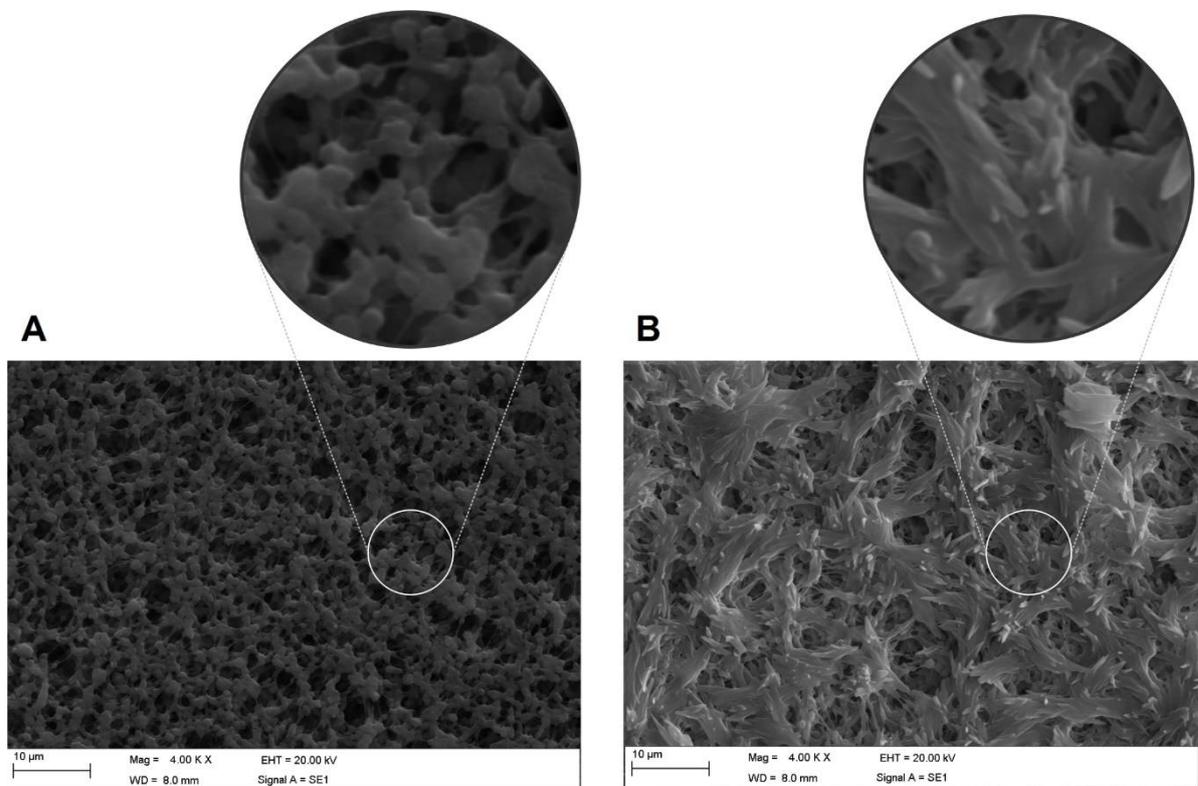


Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura da modificação do filtro de PVDF. (A) membrana PVDF aumento de 4000 x, (B) membrana *PAMPA*_{BHE} aumento de 4000 x.

A modificação da membrana apresenta um grande depósito superficial de compostos, levando a formação de poros irregulares e possivelmente dificultando a permeação de compostos através deste tipo de barreira.

A avaliação dos compostos Verapamil e Prednisona, em termos de valores de $\log Pe$ (Tabela 3) permitem inferir a adequação da modificação da membrana *PAMPA*_{BHE}, sendo o Verapamil considerado um composto de alta permeabilidade

(BHE+) e a Prednisona de baixa permeabilidade (BHE-) em membrana *PAMPA*_{BHE} (KONCZÖL et al., 2013).

Tabela 3 – Valores de log Pe para os compostos Verapamil e Prednisona, permeação em membrana modificada do tipo *PAMPA*_{BHE}, concentração inicial do composto de 0,1 mmol L⁻¹.

Composto	1 hora (log Pe)	2 horas (log Pe)	3 horas (log Pe)	4 horas (log Pe)
Verapamil	4,023 (±0,002)	4,023 (±0,002)	4,021 (±0,001)	4,029 (±0,001)
Prednisona	4,0167 (±0,0005)	4,0177 (±0,00002)	4,017 (±0,00054)	4,018 (±0,0002)

Para a avaliar a permeação destes compostos foi utilizado HPLC-DAD, com os seguintes parâmetros: coluna C18, fase móvel tampão fosfato monobásico pH 3,0 (60%) e acetonitrila (40%) (v:v), tempo de corrida 15 minutos, vazão de 1 mL/min, modo isocrático, os comprimentos de onda da avaliação dos compostos foram, 200 nm para o Verapamil e 254 nm para a Predinisona, os picos foram obtidos nos tempos 9,8 e 5,7 minutos, respectivamente.

Conforme os resultados obtidos (Tabela 2) verifica-se adequação da membrana em relação a permeação dos compostos, apresentando maior valor de log Pe do composto Verapamil em relação a Prednisona, dados que corroboram com Konczöl et al. (2013).

Para uma melhor avaliação da deposição dos compostos modificadores das membranas (*PAMPA*_{TGI}, *PAMPA*_{PELE} e *PAMPA*_{BHE}) foram realizadas avaliações de MEV em cortes transversais (Figura 17).

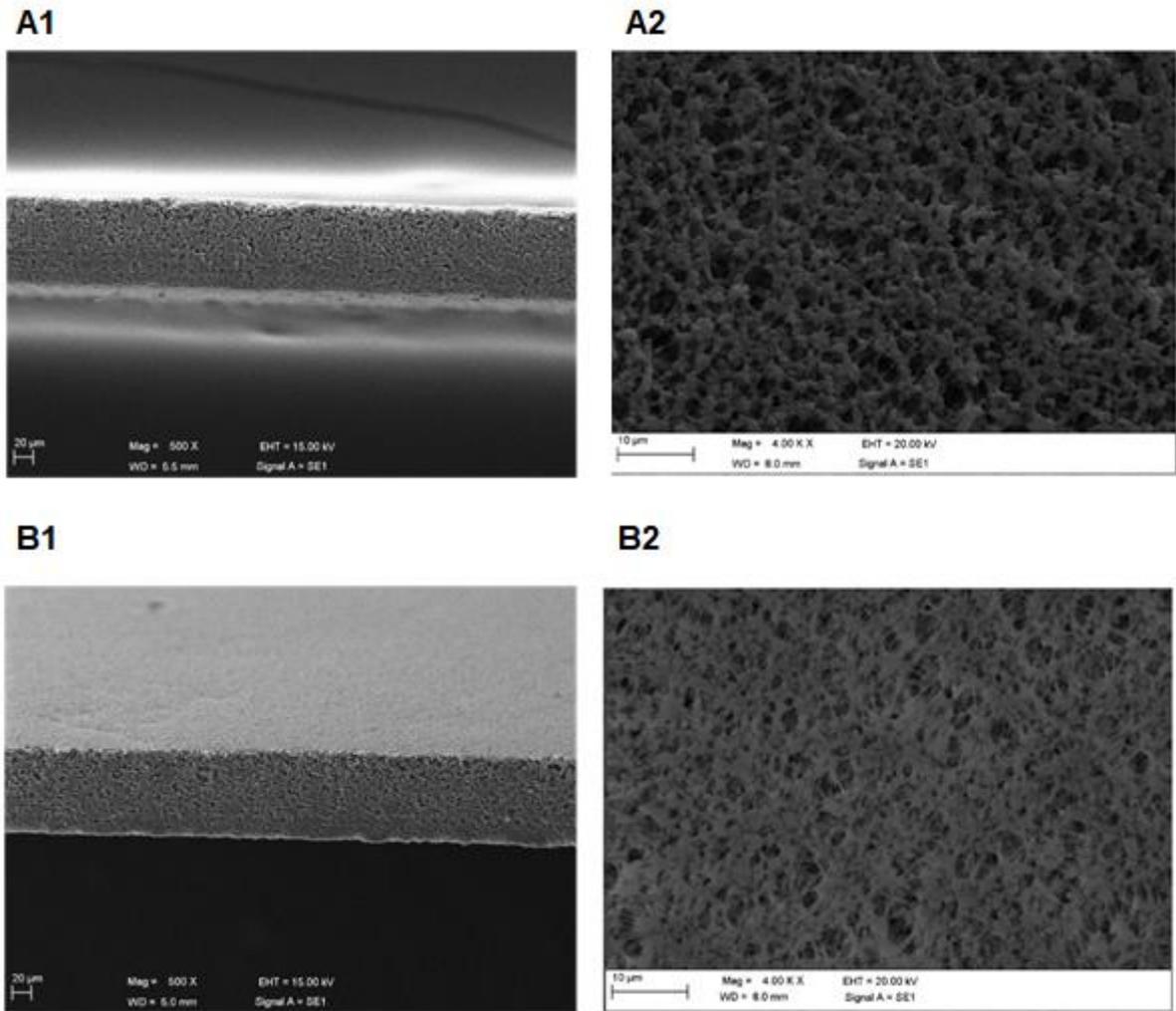


Figura 17 – Microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais das diferentes membranas de PVDF modificadas. A - Sem modificação; B – $PAMPA_{PELE}$; C – $PAMPA_{TGI}$; D – $PAMPA_{BHE}$, sendo na imagem 1= aumento de 500 vezes e na imagem; 2= aumento de 4000 vezes dos cortes transversais, continua na página 63.

Continuação figura 17...

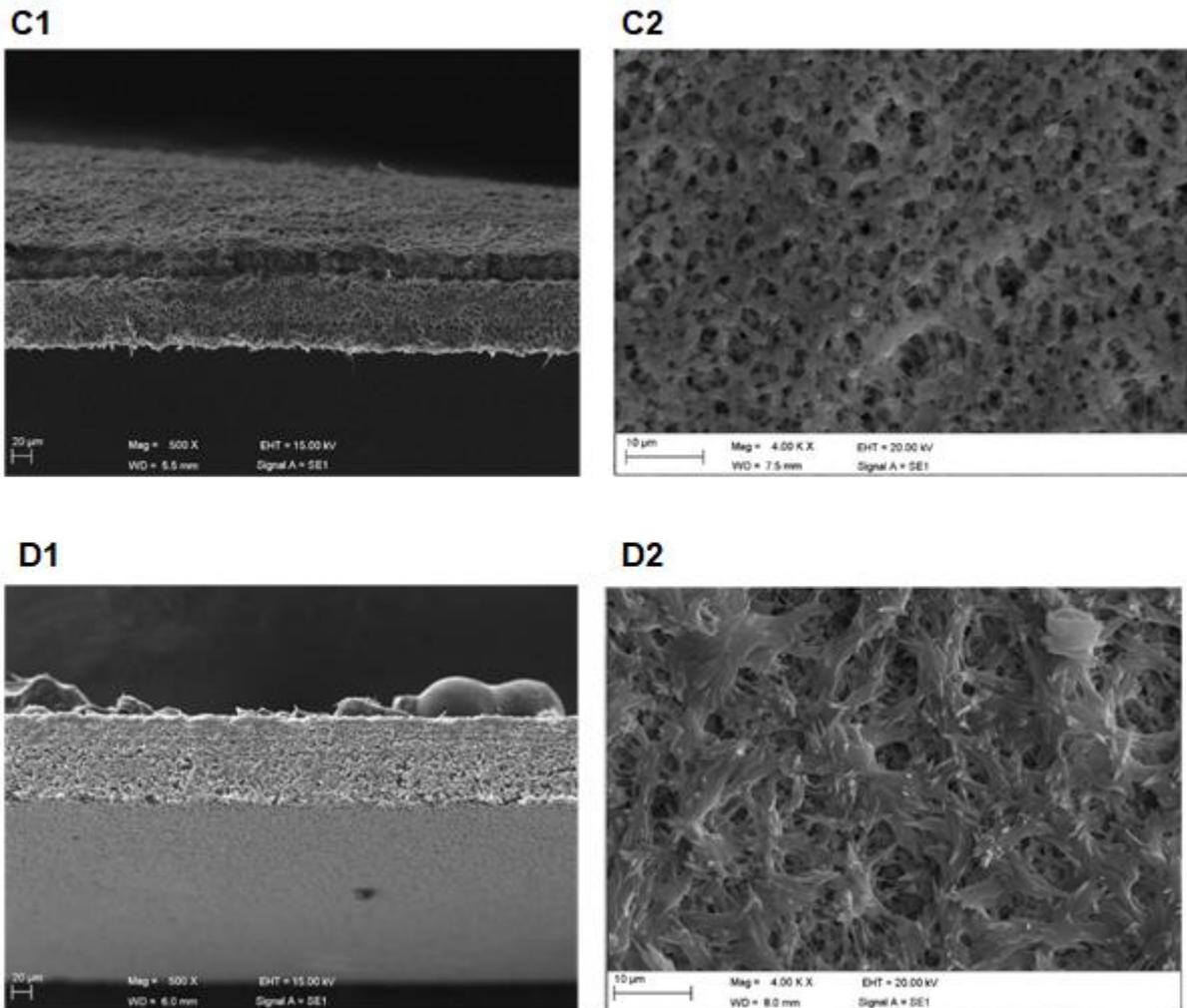


Figura 17 – Microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais das diferentes membranas de PVDF modificadas. A - Sem modificação; B – $PAMPA_{PELE}$; C – $PAMPA_{TGI}$; D – $PAMPA_{BHE}$, sendo na imagem 1= aumento de 500 vezes e na imagem; 2= aumento de 4000 vezes dos cortes transversais, continua na página 63.

É possível observar nas avaliações das imagens dos cortes transversais obtidas no MEV, que em todas as modificações de membranas realizadas há deposição do conteúdo modificador na espessura do filtro.

Identifica-se que na modificação $PAMPA_{PELE}$ com aumento de 500 vezes (Figura

17 – B1) que há uma aparente homogeneidade do filtro, no aumento de 4000 vezes (Figura 17 – B2) verifica-se a manutenção dos espaços entre as camadas do filtro, no entanto há uma maior deposição (aparentemente mais fechado) na parte inferior do filtro, o que poderia simular um corte de pele, em que na parte inferior se localizam as células da camada basal, justapostas e com maior concentração hídrica (AZULAY; AZULAY, 2008).

A modificação da membrana de PVDF para tipo $PAMPA_{TGI}$, apresenta uma maior deposição e homogeneidade em toda a área do filtro, no entanto a parte superior da membrana $PAMPA_{TGI}$ apresenta uma área mais escurecida, como se houvesse maior deposição do conteúdo lipídico neste local. O corte transversal com aumento de 4000 vezes (Figura 17 – C2), apresenta uma deposição maciça, homogênea, mas que possibilita a manutenção dos espaços do filtro.

A membrana modificada do tipo $PAMPA_{BHE}$, é a que apresenta maior depósito de substâncias sobre o filtro (Figura 17 – D1), assim como uma maior deposição de fragmentos dos constituintes da solução modificadora. No aumento de 4000 vezes (Figura 17 – D2) observa-se um filtro mais fechado e compacto, o que simula adequadamente o tecido em questão, já que a BHE é extremamente seletiva e apresenta uma barreira restritiva a passagem de compostos.

4.4 Estudos de permeação empregando Cromatografia Líquida com detector eletroquímico (HPLC – PAD)

O estudo da avaliação da permeação com cromatografia líquida com detector eletroquímico foi realizada como parte inicial da pesquisa, para averiguar se haveria diferença dos valores encontrados de permeação em diferentes detectores. Para tanto foram realizadas avaliações dos componentes individuais, nas membranas $PAMPA_{TGI}$, $PAMPA_{PELE}$ e $PAMPA_{BHE}$, Tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação da permeação (mmol L^{-1}) dos antioxidantes com determinação por HPLC-DAD e HPLC-PAD, nas membranas $PAMPA_{PELE}$ e $PAMPA_{TGI}$. Teste T Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparando valores obtidos com HPLC-DAD X HPLC-PAD, nos determinados tempos de 1h e 2h.

Composto	$PAMPA_{PELE}$ (mmol L^{-1})			
	1 hora		2 horas	
	HPLC DAD	HPLC PAD	HPLC DAD	HPLC PAD
Ácido Ferúlico	0,017 ($\pm 0,0004$)	0,025 ($\pm 0,0085$)	0,033 ($\pm 0,00018$)	0,081 ($\pm 0,0209$) *
Ácido Gálico	0,061 ($\pm 0,0001$)	0,074 ($\pm 0,0317$)	0,122 ($\pm 0,0043$) **	0,083 ($\pm 0,0037$)
Ácido Cafeico	0,011 ($\pm 0,0009$)	0,060 ($\pm 0,0013$)***	0,019 ($\pm 0,0021$)	0,097($\pm 0,0037$)***
Ácido Clorogênico	0,034 ($\pm 0,0462$)	0,179 ($\pm 0,0192$)**	0,046 ($\pm 0,0043$)	0,240($\pm 0,0293$) **
Ácido ρ -Cumárico	0,0009 ($\pm 3,0^{-6}$)	0,076 ($\pm 0,0076$)***	0,0009($\pm 0,00006$)	0,169 ($\pm 0,0366$) **
Catequina	0,048 ($\pm 0,0051$) *	0,026 ($\pm 0,0600$)	0,147($\pm 2,7^{-3}$) ***	0,060 ($\pm 0,000006$)
Rutina	0,023 ($\pm 0,0025$)	0,064 ($\pm 0,0005$)***	0,071 ($\pm 0,0002$)**	0,026 ($\pm 0,0084$)

Continuação Tabela 4...

PAMPA_{TGI} (mmol L⁻¹)

Composto	1 hora		2 horas	
	HPLC-DAD	HPLC-PAD	HPLC-DAD	HPLC-PAD
Ácido Ferúlico	0,001 (±0,00006)	0,016 (±0,0003)***	0,002 (±0,00001)	0,030(±0,0007)***
Ácido Gálico	0,004 (±0,0004)	0,022(±7,0 ⁻⁵)***	0,005 (±0,00005)	0,022(±7,0 ⁻⁵)***
Ácido Cafeico	0,008 (±0,0010)	0,039 (±0,0022)***	0,013(±0,0020)	0,102(±0,0062)***
Ácido Clorogênico	0,0091(±0,00004)	0,058 (±0,0006)***	0,126 (±0,0003)	0,134 (±0,0024)**
Ácido <i>p</i> -Cumárico	0,0025(±0,00003)	0,061 (±0,0012)***	0,090(±0,0020)	0,152(±0,0029)***
Catequina	-	0,015 (±0,0002)***	0,104 (±0,0011)	0,032(±0,0009)***
Rutina	0,037 (±0,0047)	0,389 (±0,0195)***	0,08 (±0,0090)	0,326(±0,0063)***

Observa-se que, de forma geral, o HPLC-PAD apresenta maior sensibilidade para avaliar os compostos estudados, no entanto sua metodologia de uso é mais trabalhosa e exige maior tempo para avaliação dos compostos, por ser realizada com curva externa, no HPLC-DAD optou-se por este método de detecção pela sua maior reprodutibilidade do sinal na medida óptica, em relação à superfície o eletrodo de ouro que pode alterar ao longo das medidas. Portanto, a partir de então serão apresentados resultados obtidos com o uso do HPLC-DAD.

4.5 Estudos de permeação empregando Cromatografia Líquida com detector de arranjo de diodos (HPLC–DAD).

4.5.1 Permeação com membrana modificada do tipo *PAMPA_{TGI}*.

A administração de fármacos por via oral, com consequente absorção gastrointestinal, é uma das vias mais populares de administração, sendo de fácil acesso e adesão. No entanto, por esta via o medicamento ingerido sofre uma série de alterações, pois ele deve resistir à ação enzimática da cavidade oral e à ação ácida do estômago (DELUCIA et al., 2007).

Após a absorção, quantidades terapêuticas devem estar distribuídas no meio celular. Logo, esta é uma via que pode apresentar uma grande disparidade de concentração da substância que foi ingerida, pois esses fatores dependem de características fisiológicas individuais e podem sofrer alterações pelo ritmo circadiano, pela quantidade de alimento e líquido ingeridos (MOURA; REYES, 2002).

Os testes de permeação em membrana do tipo *PAMPA_{TGI}* evidenciaram a passagem individual dos antioxidantes por uma barreira que mimetiza a absorção do trato gastrointestinal, em avaliação por HPLC–DAD (Figura 18).

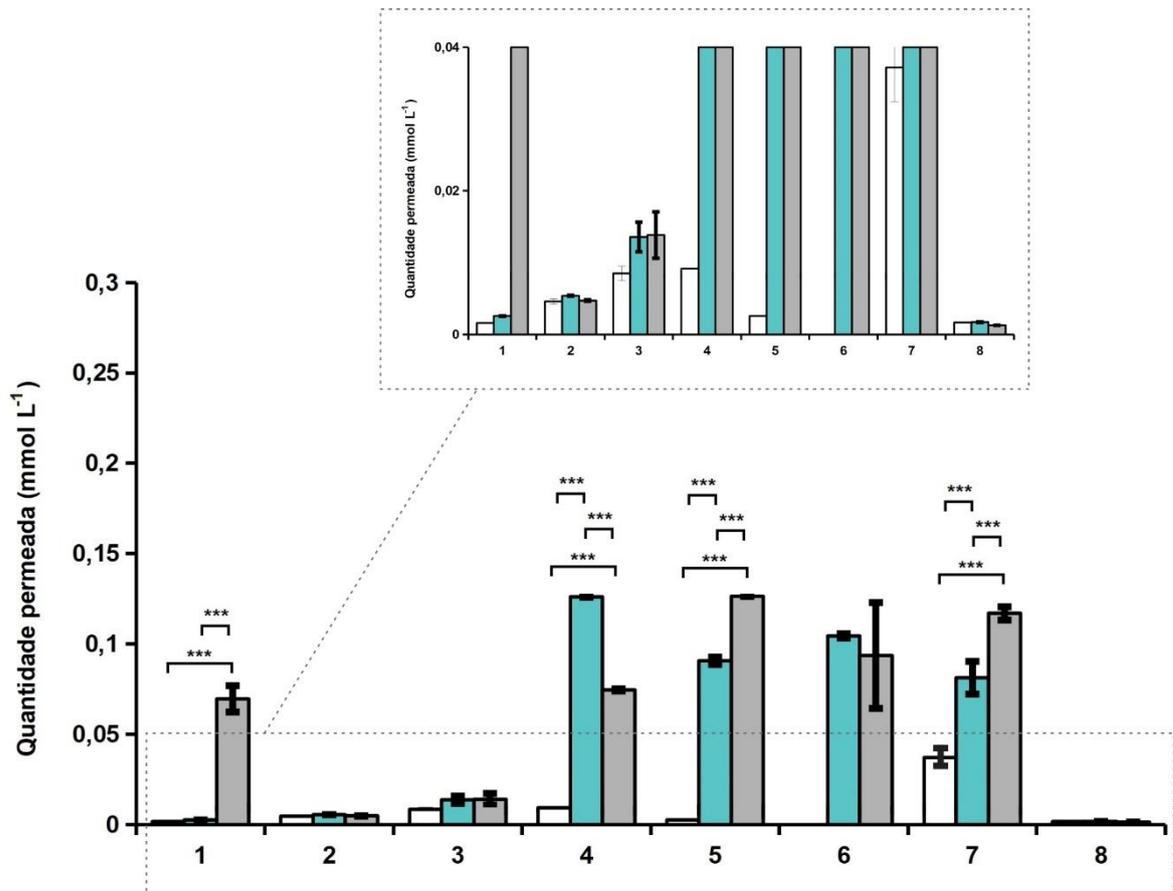


Figura 18 – Permeação individual dos diferentes compostos antioxidantes em mmol L^{-1} em membrana do tipo $PAMPA_{TGI}$ em HPLC–DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido ρ -Cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico; branco= 1 h, verde= 2 h e cinza= 3 h. Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$; sendo $***p < 0,001$.

É possível observar que nos tempos de 2 h e 3 h há maior quantidade permeada dos compostos: ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido ρ -Cumárico, catequina e rutina.

No processo de permeação de uma solução composta através de membranas pode ocorrer interação dos antioxidantes estudados, havendo a facilitação da permeação. Para verificar essa possível ação, foi realizada a avaliação dos antioxidantes misturados (Figura 19), para tanto foram adicionados todos os antioxidantes em uma mesma solução é avaliada a permeação destes nos tempos de 1 h, 2 h e 3 h.

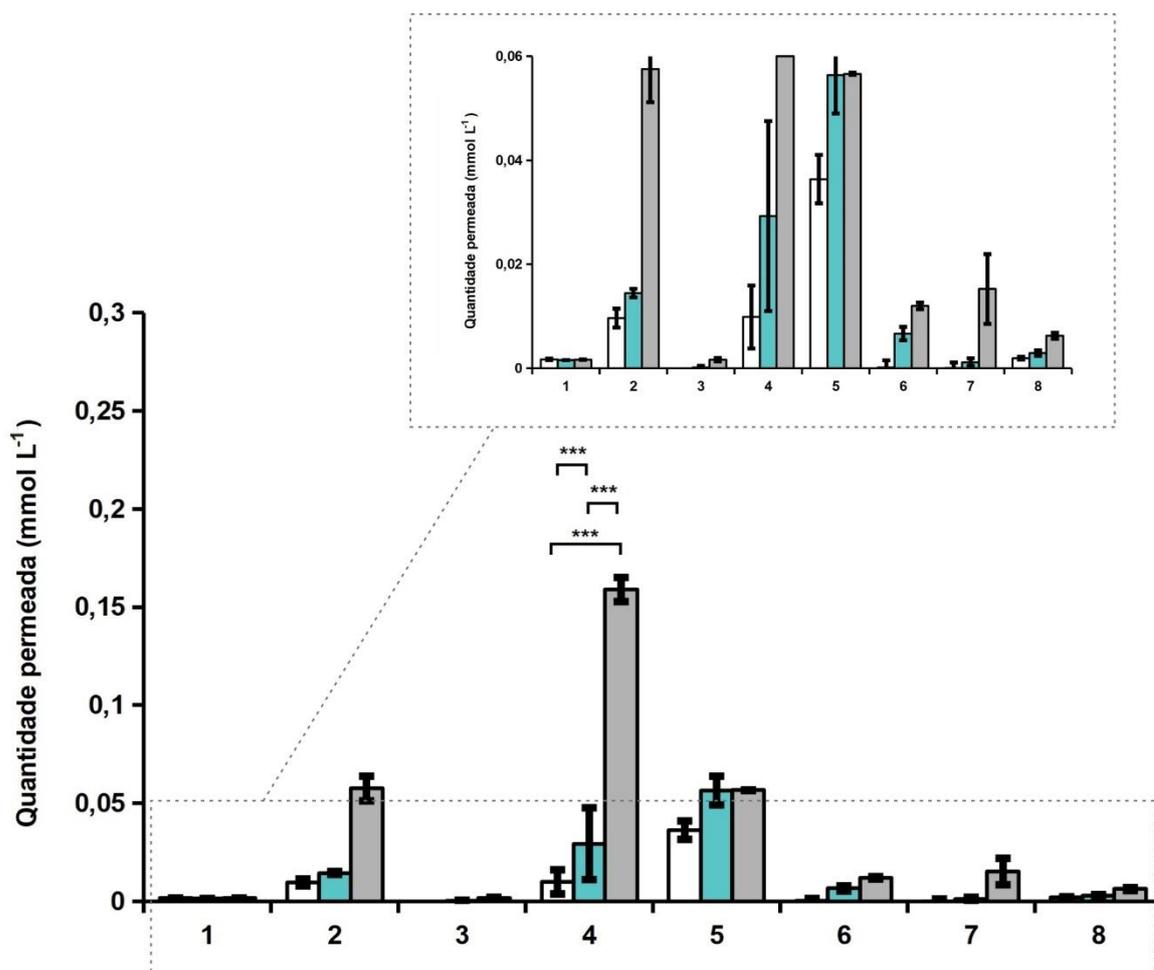


Figura 19 – Permeação da mistura dos antioxidantes em mmol L^{-1} em membrana do tipo PAMPA_{TGI} em HPLC–DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) catequina (6) rutina (7) ácido vanílico; branco= 1 h, verde= 2 h e cinza= 3 h. Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$; sendo $***p < 0,001$.

De forma geral há uma redução da permeação dos compostos (FIGURA 19), com exceção do ácido clorogênico e ácido gálico, que aumentam a permeação no tempo de 3 h para $0,1589 (\pm 0,0060)$ e $0,0575 (\pm 0,0063)$, respectivamente. O ácido gálico apresenta maior permeação nos tempos de 1 h e 2 h, na mistura do que na passagem individual dos compostos. Isso demonstra a possível ação sinérgica dos compostos presentes na solução doadora.

Quando comparados os percentuais de permeação dos compostos, tanto individual, como a mistura pode-se observar que há uma grande variabilidade do percentual de permeação (Tabela 5).

Tabela 5 – Percentual de permeação através da membrana *PAMPA_{TGI}*, valores comparados da solução inicial (1 mmol L⁻¹) com o conteúdo do compartimento receptor.

Composto	Individual (%)			Mistura (%)		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Ácido Ferúlico	0,42 (±0,36)	1,02 (±0,06)	37,38 (±0,36)	0,69 (±0,04)	0,64 (±0,04)	0,66 (±0,04)
Ácido Gálico	1,22 (±0,1)	1,43 (±0,01)	1,68 (±0,02)	2,58 (±0,48)	3,86 (±0,22)	15,38 (±1,69)
Ácido Cafeico	1,99 (±0,19)	3,19 (±0,46)	4,36 (±0,84)	-	0,06 (±0,05)	0,38 (±0,07)
Ácido Clorogênico	4,31 (±0,04)	59,53 (±1,04)	46,88 (±0,77)	4,67 (±2,89)	13,70 (±8,56)	75,03 (±3,26)
Ácido <i>p</i> -Cumárico	0,85 (±0,01)	30,31 (±0,66)	56,28 (±0,02)	12,16 (±1,54)	18,85 (±2,45)	18,94 (±0,06)
Ácido Vanílico	0,16 (±1,0 ⁻³)	0,16 (±3,0 ⁻³)	0,16 (±5,0 ⁻⁴)	0,18 (±0,02)	0,28 (±0,05)	0,61 (±0,05)
Catequina	-	23,00 (±3,15)	26,95 (±3,56)	0,21 (±0,02)	1,48 (±0,41)	2,64 (±0,41)
Rutina	8,85 (±1,12)	19,36 (±3,15)	27,90 (±0,64)	0,14 (±0,16)	0,28 (±0,17)	3,63 (±1,59)

É importante ressaltar que os compostos, ácido clorogênico, ácido ρ -Cumárico, catequina, e rutina, apresentaram interessantes valores percentuais de permeação nos tempos de 2 h e 3 h, na avaliação individual dos compostos. Quando avaliada a permeação dos compostos misturados há uma redução do percentual geral dos compostos, no entanto há um considerável aumento na permeação do ácido clorogênico no tempo de 3 h (75,03 %), assim como do ácido gálico que na permeação individual apresenta permeação de 1,68 % e na permeação da mistura é de 15,38 %.

4.5.2 Permeação com membrana modificada do tipo *PAMPA*_{PELE}

A Permeação transcutânea apresenta-se como uma boa alternativa para a permeação de compostos, quando esta via é utilizada, os problemas secundários ou efeitos rebotes podem ser significativamente reduzidos, pois os medicamentos não sofrem metabolismo de primeira passagem. No entanto, esta é uma via de difícil permeabilidade, tendo em vista as características do tecido.

Quando os compostos sintéticos foram permeados individualmente (Figura 20), observa-se que a maioria dos componentes apresenta uma maior permeação no tempo de 3 h, com exceção da rutina que apresenta em 3 h valores próximos a 0.

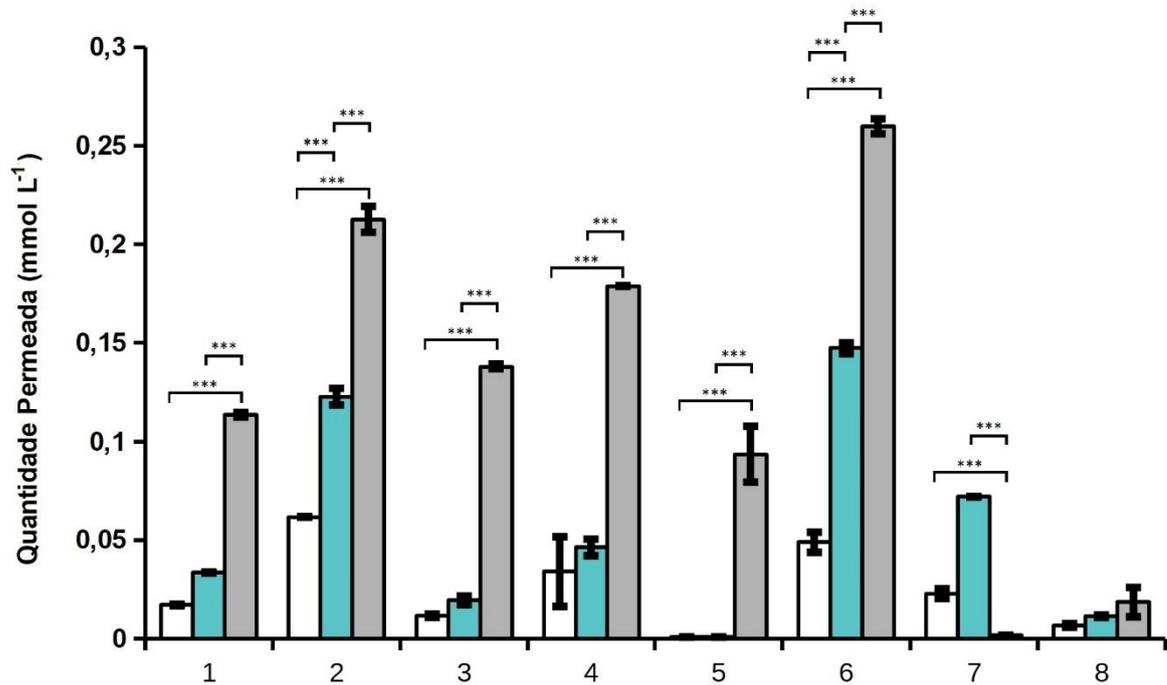


Figura 20 – Permeação individual dos diferentes compostos antioxidantes em mmol L^{-1} em membrana do tipo *PAMPAPELE* em HPLC–DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido ρ -Cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h e cinza= 3 h. Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$, sendo $***p < 0,001$.

Quando avaliados os compostos misturados (Figura 21) é possível observar que há uma alteração no perfil de permeação dos compostos. Há aumento da permeação da maioria dos compostos estudados, principalmente nos tempos de 1 h e 2 h. Observa-se uma maior uniformidade de permeação dos compostos entre os tempos estudados (1 h, 2 h e 3 h). A avaliação estatística permite inferir que apenas o ácido clorogênico apresentou diferença estatística para o teste Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$.

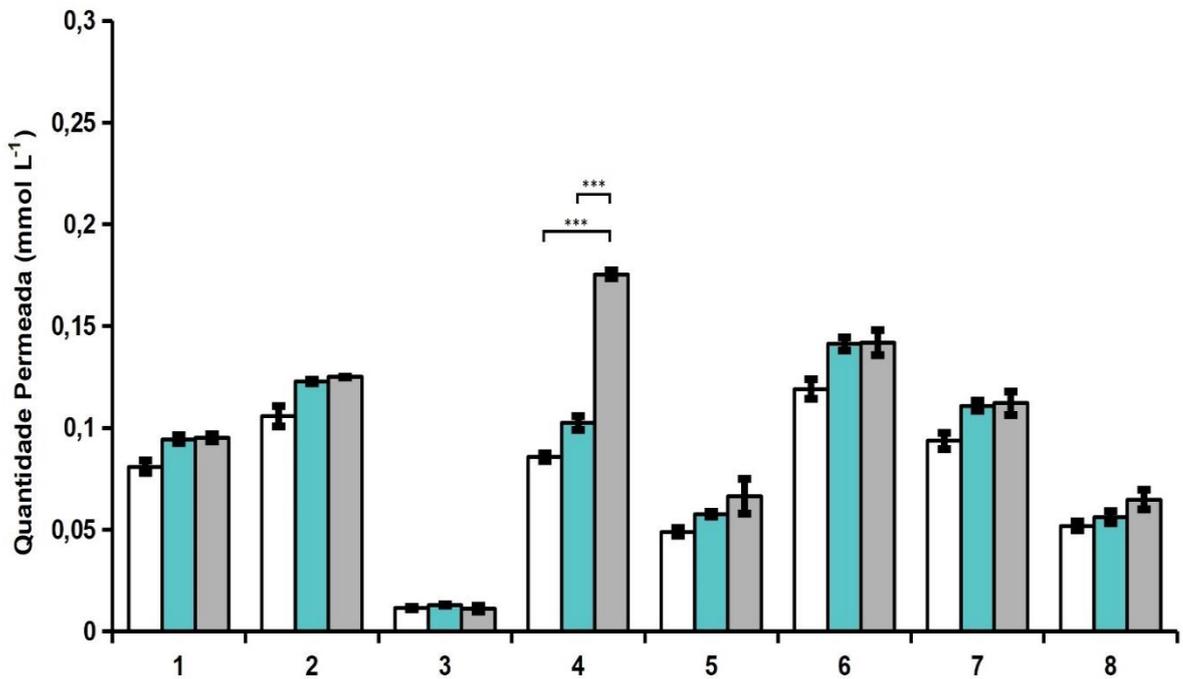


Figura 21 – Permeação da mistura dos antioxidantes em mmol L^{-1} em membrana do tipo *PAMPA_{PELE}* em HPLC – DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) catequina (6) rutina (7) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h e cinza = 3 h. Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$, sendo **** $p < 0,001$.

Quando comparados os percentuais de permeação dos compostos, tanto individual, como a mistura pode-se observar que há uma grande variabilidade do percentual de permeação (Tabela 6).

Tabela 6 – Percentual de permeação através da membrana *PAMPA_{PELE}*, valores comparados da solução inicial (1mM) com o conteúdo do compartimento receptor.

	Individual (%)			Mistura (%)		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Ácido Ferúlico	6,96 (±0,58)	13,58 (±0,84)	45,99 (±3,27)	32,71 (±1,90)	27,80 (±20,54)	38,45 (±2,32)
Ácido Gálico	22,93 (±11,20)	32,83 (±1,14)	56,45 (±1,41)	28,27 (±1,30)	32,84 (±0,25)	22,60 (±18,67)
Ácido Cafeico	2,79 (±0,25)	4,63 (±0,60)	32,58 (±0,92)	2,68 (±0,10)	3,01 (±0,12)	2,61 (±0,39)
Ácido Clorogênico	16,16 (±8,61)	21,84 (±2,38)	89,39 (±8,03)	40,44 (±1,05)	48,36 (±1,92)	83,01 (±32,66)
Ácido ρ-Cumárico	0,33 (±7,0 ⁻⁴)	0,32 (±2,0 ⁻³)	31,28 (±4,72)	16,35 (±0,62)	19,23 (±0,36)	22,61 (±2,82)
Ácido Vanílico	0,64 (±0,08)	1,12 (±0,06)	1,82 (±0,72)	5,03 (±0,20)	5,45 (±0,28)	6,29 (±0,45)
Catequina	10,87 (±2,73)	32,51 (±5,22)	57,26 (±8,39)	26,28 (±4,42)	31,17 (±4,82)	31,33 (±5,26)
Rutina	5,48 (±0,61)	16,97 (±0,28)	0,44 (±0,06)	22,28 (±0,92)	26,38 (±0,58)	26,69 (±1,36)

Observa-se que quanto maior o tempo do estudo, maior a quantidade permeada, na avaliação individual de permeação, os compostos: ácido ferúlico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ρ -Cumárico, catequina apresentam valores percentuais altos de permeação no tempo de 3h. Quando avaliada a mistura dos compostos, é importante salientar a permeação do composto ácido clorogênico, que apresenta 83,01 % de permeação no tempo de 3 h por esta via.

Observa-se também que há uma maior quantidade permeada dos compostos misturados do que os avaliados individualmente, nos tempos de 1 h e 2 h (FIGURA 22), o que permite avaliar a interação entre os compostos estudados e a resposta

cinética destes compostos na permeação através da membrana PAMPA_{PELE}.

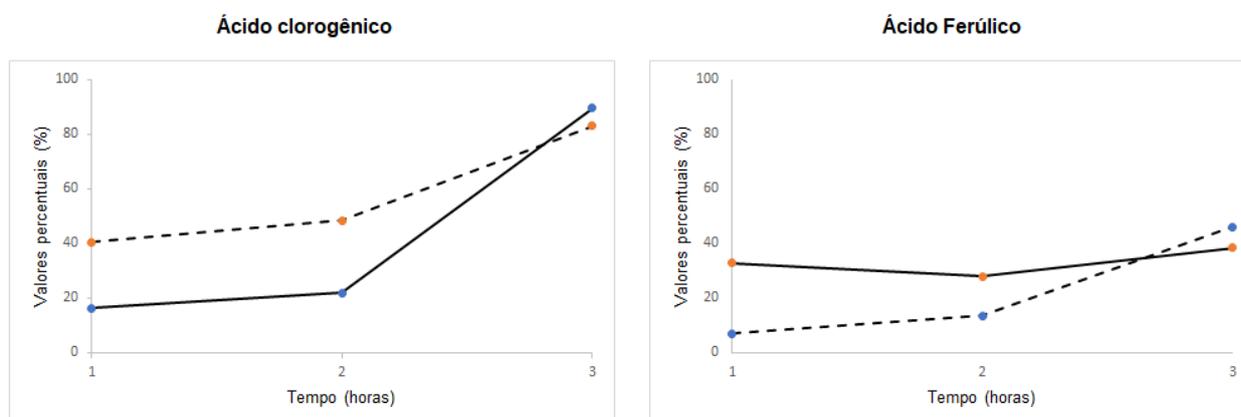


Figura 22 - Valores percentuais de permeação dos compostos ácido ferúlico e ácido clorogênico, nos tempos de 1h, 2h e 3h, através da membrana PAMPA_{PELE}. Linha preta= compostos permeados de forma individual; linha tracejada= compostos permeados na mistura.

No tempo de 3 horas ocorre o pico de permeação na maioria dos compostos, a figura 22 permite inferir que tanto o ácido clorogênico, como o ácido ferúlico apresentam valores similares de permeação no tempo de 3 horas, em ambas as formas avaliadas (permeação individual e na mistura). Assim como, é possível visualizar o aumento da permeação dos compostos no decorrer do tempo de avaliação (1h, 2h e 3h).

O perfil de permeação individual e da mistura são semelhantes, no entanto o estudo da permeação da mistura dos compostos, permite identificar a interação molecular que pode ocorrer em uma matriz complexa, podendo ocorrer o aumento da permeação de um composto em detrimento do outro. Ainda pode ocorrer o aumento da permeação do composto em um tempo específico, exemplo do ácido gálico que reduz a permeação nos tempos de 1 h e 2 h, mas em 3 h tem quantidades percentuais maiores permeadas.

4.5.3 Permeação com membrana modificada do tipo PAMPA_{BHE}

Após transpor as membranas de administração primária (PAMPA_{TGI} e PAMPA_{PELE}) os compostos estão disponíveis no organismo para exercer suas

diferentes funções, no entanto há mais uma barreira que apresenta importante papel que pode ser transposta, a BHE. Esta barreira impede que compostos danosos ao SNC permeiem, no entanto impede juntamente a passagem de ativos que poderiam ser benéficos a disfunções nervosas. Logo a avaliação da passagem de compostos com bioatividade por essa membrana pode apresentar relevância científica.

Após a passagem individual dos compostos estudados por essa membrana, pode-se observar (Figura 23) que praticamente todos os compostos têm habilidade de permear pequenas quantidades por essa membrana, sendo que o ácido *p*-Cumárico apresentou habilidade individual de permeação de quantidade maiores nos tempos de 3 h e 4 h.

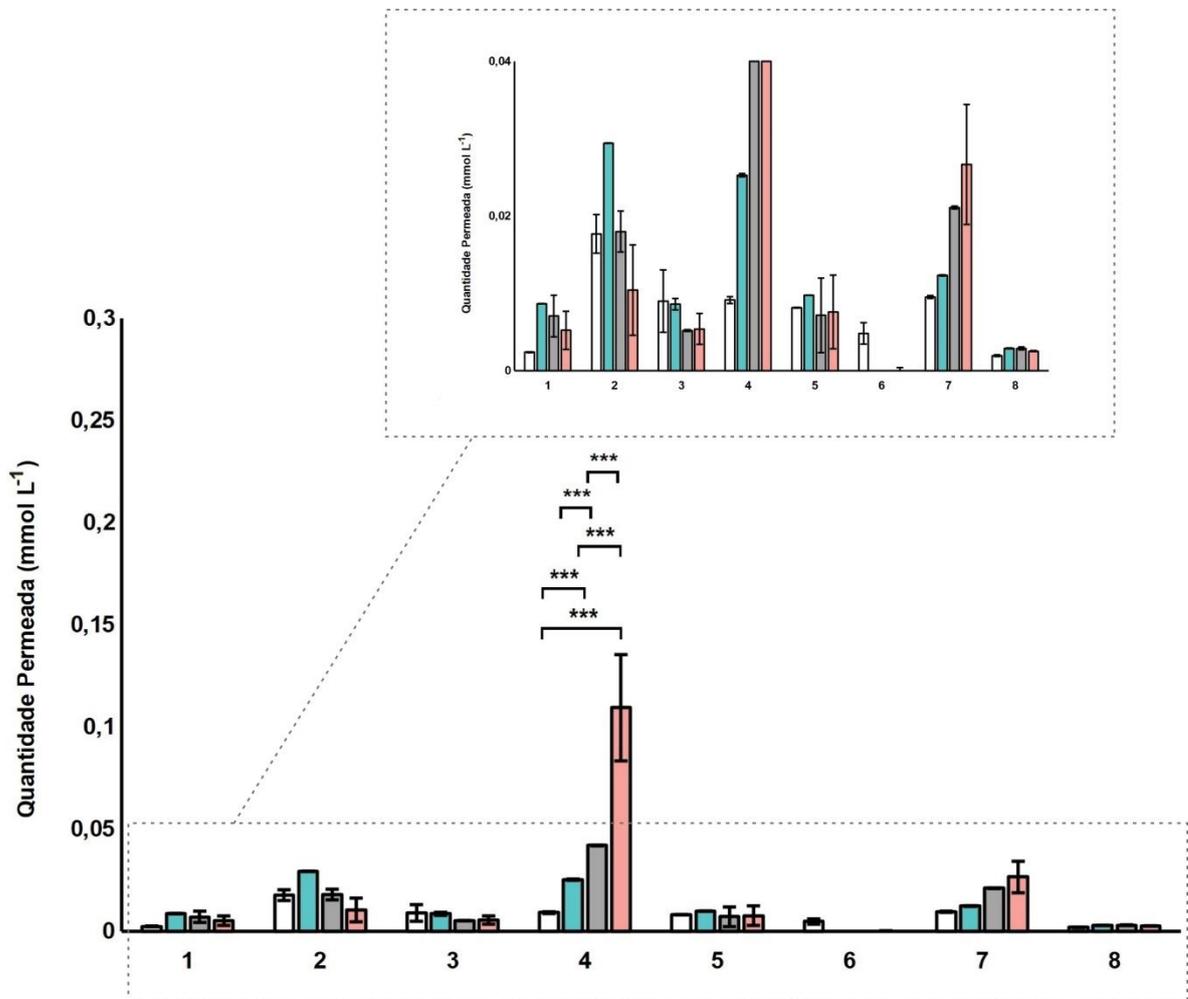


Figura 23 – Permeação individual dos diferentes compostos antioxidantes em mmol L^{-1} em membrana do tipo $\text{PAMPA}_{\text{BHE}}$ em HPLC–DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido *p*-Cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h, cinza = 3 h, rosa= 4 h. Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$, sendo **** $p < 0,001$.

Ao avaliar a permeação dos compostos misturados em uma única solução (Figura 24), pode-se observar uma redução da permeação de alguns compostos (ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido *p*-Cumárico, catequina e rutina; e o aumento da permeação do ácido gálico, principalmente nos tempos de 3 h e 4 h.

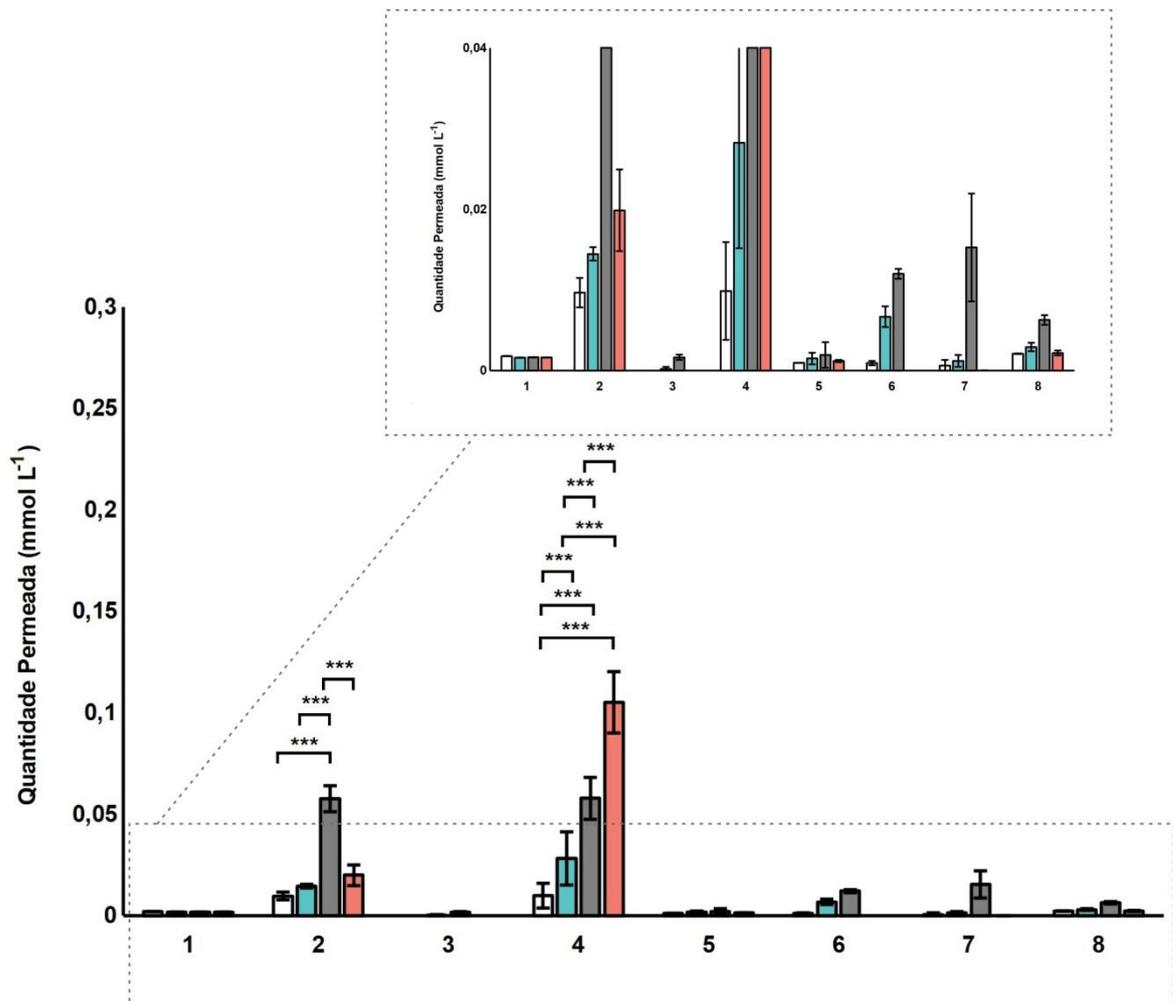


Figura 24 – Permeação dos compostos antioxidantes misturados em mmol L^{-1} em membrana do tipo $\text{PAMPA}_{\text{BHE}}$ em HPLC–DAD. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido *p*-Cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico; branco = 1 h, verde= 2 h, cinza= 3 h, rosa= 4 h. Anova seguido de Tukey para $p < 0,05$, sendo *** $p < 0,001$.

Logo o ácido clorogênico apresenta o maior perfil de permeabilidade para a membrana $PAMPA_{BHE}$, tanto na permeação individual, quanto na mistura, sendo este um composto de boa eleição para afecções do SNC. Wang et al. (2018), evidenciaram em seus estudos que o ácido clorogênico é um importante neuroprotetor, ele possui a capacidade de quelar o alumínio presente em áreas cerebrais e assim reduzir a sua deposição no hipocampo, sendo que a deposição deste pode induzir disfunções cognitivas.

Nas duas vias de administração primária ($PAMPA_{PELE}$ e $PAMPA_{TGI}$) este composto apresenta boas quantidades permeadas, figurando sempre entre os compostos que apresentam maior quantidade em $mmol L^{-1}$ permeadas.

Quando comparados os percentuais de permeação dos compostos, tanto individual, como a mistura pode-se observar que há uma grande variabilidade do percentual de permeação (Tabela 7).

Tabela 7 – Percentual de permeação através da membrana $PAMPA_{BHE}$, valores comparados da solução inicial (0,1mM) com o conteúdo do compartimento receptor.

	Individual (%)			Mistura (%)		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Ácido Ferúlico	6,96 (±0,58)	13,58 (±0,84)	45,99 (±3,27)	32,71 (±1,90)	27,80 (±20,54)	38,45 (±2,32)
Ácido Gálico	22,93 (±11,20)	32,83 (±1,14)	56,45 (±1,41)	28,27 (±1,30)	32,84 (±0,25)	22,60 (±18,67)
Ácido Cafeico	2,79 (±0,25)	4,63 (±0,60)	32,58 (±0,92)	2,68 (±0,10)	3,01 (±0,12)	2,61 (±0,39)
Ácido Clorogênico	16,16 (±8,61)	21,84 (±2,38)	89,39 (±8,03)	40,44 (±1,05)	48,36 (±1,92)	83,01 (±32,66)
Ácido ρ-Cumárico	0,33 (±7,0 ⁻⁴)	0,32 (±2,0 ⁻³)	31,28 (±4,72)	16,35 (±0,62)	19,23 (±0,36)	22,61 (±2,82)
Ácido Vanílico	0,64 (±0,08)	1,12 (±0,06)	1,82 (±0,72)	5,03 (±0,20)	5,45 (±0,28)	6,29 (±0,45)
Catequina	10,87 (±2,73)	32,51 (±5,22)	57,26 (±8,39)	26,28 (±4,42)	31,17 (±4,82)	31,33 (±5,26)
Rutina	5,48 (±0,61)	16,97 (±0,28)	0,44 (±0,06)	22,28 (±0,92)	26,38 (±0,58)	26,69 (±1,36)

Apesar de o ácido clorogênico apresentar maior quantidade permeada, os compostos: ácido ferúlico, ácido gálico, catequina (individualmente) e o ácido gálico e a catequina (mistura) apresentam satisfatórias porcentagens de permeação, o que pode ser interessante se avaliadas outras concentrações de administração dos compostos.

4.6 Estudos de permeação de compostos bioativos de plantas medicinais com o uso de Cromatografia Líquida com detector de rearranjos de diodo (HPLC – DAD).

O Brasil por possuir uma flora extensa apresenta uma grande gama de plantas com potencial terapêutico, no entanto há ainda uma restrição de estudos que consigam inferir a composição e doses de uso, assim como há dificuldade de entender a permeação destes compostos por diferentes membranas.

A Tabela 8 e 9 apresenta a quantidade (mmol L^{-1}) permeada de cada composto, quando realizada a permeação dos extratos brutos a 10% das plantas, nas diferentes membranas *PAMPA_{PELE}* (Tabela 6) e *PAMPA_{TGI}* (Tabela 5). Os estudos são realizados nessas membranas, pois são as vias primárias de administração, após permeados, a ação dos compostos passa a ser individual.

Tabela 8 – Permeação dos extratos brutos 10% nas membranas modificadas do tipo *PAMPA*_{PELE}, nos diferentes tempos de permeação 1 h, 2 h e 3 h; valores de concentração permeada em mmol L⁻¹. ND= não disponível na planta; NP= não permeou.

<i>PAMPA</i> _{PELE}						
Composto	Embaúba Vermelha (<i>Cecropia palmata</i> Willd.)			Pata de Vaca Branca (<i>Bauhinia variegata</i>)		
	1 hora	2 horas	3 horas	1 hora	2 horas	3 horas
Ácido Ferúlico (mmol L ⁻¹)	16,15 ⁻⁴ (±8,86 ⁻⁶)	18,27 ⁻⁴ (±2,32 ⁻⁴)	36,48 ⁻⁴ (±1,04 ⁻³)	22,00 ⁻⁴ (±2,5 ⁻⁴)	26,10 ⁻⁴ (±6,0 ⁻⁶)	22,60 ⁻⁴ (±2,3 ⁻⁵)
Ácido gálico (mmol L ⁻¹)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Cafeico (mmol L ⁻¹)	18,83 ⁻³ (±2,24 ⁻⁴)	16,42 ⁻³ (±1,68 ⁻³)	99,51 ⁻³ (±1,21 ⁻³)	NP	NP	2,68 ⁻² (±3,6 ⁻⁴)
Ácido Clorogênico (mmol L ⁻¹)	11,33 ⁻² (±1,46 ⁻³)	10,97 ⁻² (±1,79 ⁻²)	88,74 ⁻³ (±5,66 ⁻²)	47,71 ⁻³ (±7,0 ⁻⁵)	65,70 ⁻³ (±1,9 ⁻⁴)	47,0 ⁻³ (±5,7 ⁻⁴)
Ácido <i>p</i> -Cumárico (mmol L ⁻¹)	26,42 ⁻⁴ (±7,03 ⁻⁴)	36,93 ⁻⁴ (±6,95 ⁻⁴)	21,58 ⁻³ (±1,21 ⁻²)	27,30 ⁻⁴ (±8,7 ⁻⁴)	47,0 ⁻⁴ (±1,5 ⁻⁴)	38,30 ⁻⁴ (±5,3 ⁻⁴)
Ácido Vanílico (mmol L ⁻¹)	16,94 ⁻⁴ (±7,61 ⁻⁵)	24,13 ⁻⁴ (±7,43 ⁻⁴)	31,48 ⁻³ (±1,68 ⁻²)	19,70 ⁻⁴ (±1,70 ⁻⁴)	48,70 ⁻² (±2,93 ⁻³)	39,80 ⁻³ (±1,03 ⁻²)
Catequina (mmol L ⁻¹)	12,14 ⁻³ (±4,95 ⁻³)	88,11 ⁻⁴ (±1,42 ⁻³)	15,65 ⁻² (±0,10)	ND	ND	ND
Rutina (mmol L ⁻¹)	ND	ND	ND	30,10 ⁻³ (±3,2 ⁻⁴)	44,30 ⁻³ (±3,2 ⁻⁴)	31,30 ⁻³ (±5,6 ⁻⁴)

Continuação Tabela 8...

Composto	Barbatimão (<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> Radlk.)			Cipo-d'Iho (<i>Mansoa alliaceae</i>)		
	1 hora	2 horas	3 horas	1 hora	2 horas	3 horas
Ácido Ferúlico (mmol L ⁻¹)	17,0 ⁻⁴ (±9,7 ⁻⁶)	17,29 ⁻⁴ (±1,0 ⁻⁵)	33,03 ⁻⁴ (± 1,3 ⁻⁴)	21,66 ⁻⁴ (±5,5 ⁻⁵)	24,19 ⁻⁴ (±9,0 ⁻⁵)	42,09 ⁻⁴ (±7,0 ⁻⁵)
Ácido gálico (mmol L ⁻¹)	12,40 ⁻³ (±3,6 ⁻⁴)	15,73 ⁻³ (±2,2 ⁻²)	17,20 ⁻³ (±5,0 ⁻⁵)	ND	ND	ND
Ácido Cafeico (mmol L ⁻¹)	26,50 ⁻⁴ (±1,3 ⁻⁴)	31,33 ⁻⁴ (±2,0 ⁻⁵)	34,41 ⁻⁴ (±3,7 ⁻⁴)	71,21 ⁻⁴ (±2,0 ⁻⁵)	20,42 ⁻³ (±2,0 ⁻⁴)	44,16 ⁻³ (±2,4 ⁻⁴)
Ácido Clorogênico (mmol L ⁻¹)	19,20 ⁻³ (±2,3 ⁻³)	23,29 ⁻³ (±1,9 ⁻³)	23,80 ⁻³ (±1,3 ⁻³)	23,19 ⁻³ (±6,1 ⁻⁴)	48,25 ⁻³ (±4,0 ⁻⁵)	95,67 ⁻³ (±7,0 ⁻⁴)
Ácido <i>p</i> -Cumárico (mmol L ⁻¹)	87,17 ⁻⁴ (±3,3 ⁻⁴)	59,23 ⁻⁴ (±1,5 ⁻⁴)	12,36 ⁻³ (±1,0 ⁻⁵)	18,72 ⁻⁴ (±3,0 ⁻⁴)	20,06 ⁻⁴ (±6,3 ⁻⁴)	69,90 ⁻⁴ (±1,6 ⁻³)
Ácido Vanílico (mmol L ⁻¹)	38,21 ⁻⁴ (±7,0 ⁻⁵)	24,40 ⁻⁴ (±6,0 ⁻⁵)	40,16 ⁻⁴ (±2,0 ⁻⁴)	28,63 ⁻⁴ (±6,7 ⁻⁴)	34,10 ⁻⁴ (±1,0 ⁻⁴)	71,83 ⁻⁴ (±2,0 ⁻⁴)
Catequina (mmol L ⁻¹)	25,10 ⁻⁴ (±1,9 ⁻⁴)	24,87 ⁻³ (±1,1 ⁻⁴)	31,61 ⁻³ (±2,8 ⁻³)	ND	ND	ND
Rutina (mmol L ⁻¹)	ND	ND	ND	55,70 ⁻⁴ (±7,0 ⁻⁶)	17,09 ⁻³ (±1,2 ⁻⁴)	36,44 ⁻³ (±6,7 ⁻⁴)

A permeação dos extratos através da membrana *PAMPA_{PELE}*, demonstrou que de forma geral há maior permeação com o aumento do tempo de experimento. Nas plantas *Cecropia palmata* e *Connarus perrottetii* o composto ácido clorogênico apresenta um perfil de permeação diferente, reduzindo a permeação, no entanto, neste caso pode estar ocorrendo interação molecular e o composto facilitaria a passagem dos outros ativos.

Na planta *Bauhinia variegata* vários compostos apresentam maior permeação em 2 h (ácido clorogênico, ácido p-Cumárico, catequina e rutina). Na *Mansoa alliaceae* há aumento de permeação com o transcorrer do tempo em todos os compostos avaliados.

Tabela 9 – Permeação dos extratos brutos 10% nas membranas modificadas do tipo *PAMPA_{TGI}* nos diferentes tempos de permeação 1 h, 2 h e 3 h; valores de concentração permeada em mmol L⁻¹. ND= não disponível na planta; NP= não permeou.

<i>PAMPA_{TGI}</i>						
Composto	Embaúba Vermelha (<i>Cecropia palmata</i> Willd.)			Pata de vaca (<i>Bauhinia variegata</i>)		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Ácido Ferúlico (mmol L ⁻¹)	16,07 ⁻⁴ (±1,7 ⁻⁵)	16,38 ⁻⁴ (±1,4 ⁻⁵)	16,47 ⁻⁴ (±1,8 ⁻⁵)	17,69 ⁻⁴ (±5,00 ⁻⁵)	17,21 ⁻⁴ (3,00 ⁻⁶)	17,01 ⁻⁴ (±2,00 ⁻⁵)
Ácido Gálico (mmol L ⁻¹)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Cafeico (mmol L ⁻¹)	NP	NP	NP	26,58 ⁻² (±5,14 ⁻³)	11,30 ⁻⁵ (±1,0 ⁻⁵)	18,20 ⁻⁴ (±9,00 ⁻⁶)
Ácido Clorogênico (mmol L ⁻¹)	62,25 ⁻⁴ (±2,92 ⁻⁴)	62,99 ⁻⁴ (±1,17 ⁻⁴)	12,28 ⁻³ (±2,81 ⁻³)	46,65 ⁻³ (±8,25 ⁻⁴)	16,81 ⁻³ (±1,22 ⁻⁴)	56,80 ⁻⁴ (±1,60 ⁻⁵)
Ácido p-Cumárico (mmol L ⁻¹)	12,52 ⁻⁴ (±2,68 ⁻⁴)	11,18 ⁻⁴ (±5,00 ⁻⁵)	11,66 ⁻⁴ (±1,19 ⁻⁴)	41,20 ⁻⁴ (±3,87 ⁻⁴)	18,77 ⁻⁴ (±9,51 ⁻⁴)	13,90 ⁻⁴ (±8,00 ⁻⁵)
Ácido Vanílico (mmol L ⁻¹)	NP	18,76 ⁻⁴ (±3,0 ⁻⁶)	16,86 ⁻⁴ (±6,0 ⁻⁶)	36,50 ⁻⁴ (±7,9 ⁻⁵)	69,35 ⁻⁴ (±42,22 ⁻⁴)	38,85 ⁻⁴ (±6,16 ⁻⁴)
Catequina (mmol L ⁻¹)	NP	NP	NP	15,30 ⁻⁴ (±4,45 ⁻⁴)	NP	NP
Rutina (mmol L ⁻¹)	ND	ND	ND	23,95 ⁻³ (±1,97 ⁻⁴)	69,22 ⁻⁴ (±1,26 ⁻⁴)	82,1 ⁻⁵ (±2,6 ⁻⁵)

Continuação Tabela 9...

Composto	Barbatimão (<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i> Radlk.)			Cipo-d'lho (<i>Mansoa alliaceae</i>)		
	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Ácido Ferúlico (mmol L ⁻¹)	16,04 ⁻⁴ (±5,0 ⁻⁵)	17,82 ⁻⁴ (±5,0 ⁻⁶)	21,02 ⁻⁴ (±8,0 ⁻⁶)	91,10 ⁻⁴ (±6,0 ⁻⁵)	20,01 ⁻⁴ (±2,0 ⁻⁵)	21,49 ⁻⁴ (±4,0 ⁻⁵)
Ácido Gálico (mmol L ⁻¹)	76,23 ⁻⁴ (±13,10 ⁻⁴)	16,68 ⁻³ (±3,30 ⁻⁴)	22,32 ⁻³ (±7,22 ⁻³)	ND	ND	ND
Ácido Cafeico (mmol L ⁻¹)	NP	NP	NP	NP	NP	NP
Ácido Clorogênico (mmol L ⁻¹)	23,73 ⁻³ (±1,95 ⁻³)	67,50 ⁻³ (±7,52 ⁻³)	13,80 ⁻² (±1,81 ⁻³)	53,69 ⁻³ (±5,10 ⁻⁴)	10,15 ⁻³ (±2,80 ⁻⁴)	10,11 ⁻³ (1,80 ⁻⁴)
Ácido p-Cumárico (mmol L ⁻¹)	10,92 ⁻⁴ (±5,0 ⁻⁵)	12,89 ⁻³ (±1,50 ⁻²)	38,16 ⁻⁴ (±1,25 ⁻³)	19,81 ⁻⁴ (±2,10 ⁻⁴)	21,14 ⁻⁴ (±2,50 ⁻⁴)	11,68 ⁻⁴ (±3,80 ⁻⁵)
Ácido Vanílico (mmol L ⁻¹)	18,14 ⁻⁴ (±4,0 ⁻⁴)	21,02 ⁻⁴ (±1,0 ⁻⁵)	27,91 ⁻⁴ (±3,0 ⁻⁶)	34,99 ⁻⁴ (±6,0 ⁻⁵)	19,52 ⁻⁴ (±4,0 ⁻⁵)	21,47 ⁻⁴ (±4,3 ⁻⁴)
Catequina (mmol L ⁻¹)	90,13 ⁻⁵ (±1,16 ⁻³)	86,49 ⁻⁴ (±5,50 ⁻⁴)	19,82 ⁻³ (±3,0 ⁻⁴)	ND	ND	ND
Rutina (mmol L ⁻¹)	ND	ND	ND	NP	NP	NP

Quando avaliada a permeação dos extratos pela membrana *PAMPA_{TGI}* observa-se maior dificuldade de permeação de alguns compostos como: ácido cafeico, catequina, rutina e ácido vanílico na planta *Cecropia palmata*; da catequina na *Bauhinia variegata* e do ácido cafeico e rutina na *Mansoa alliacea*.

Os valores de permeação correspondem aos compostos presentes nas plantas, quando avaliada a porcentagem de permeação dos compostos em relação aos valores iniciais presentes da planta na concentração de 10%, sendo avaliados em mmol L⁻¹, observa-se que de forma geral a membrana *PAMPA_{TGI}* é menos permeável aos compostos presentes no extrato bruto do que a membrana *PAMPA_{PELE}*.

A avaliação do coeficiente efetivo de permeação (log Pe) das plantas estudadas, dos compostos isolados e na mistura, foi realizado no tempo máximo de realização do estudo (3 h) (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados do log do Coeficiente efetivo de permeação (log Pe) no tempo máximo de permeação (3 h), com membrana *PAMPA_{TGI}* e *PAMPA_{PELE}*, na permeação individual, da mistura e dos extratos das plantas. ND= não disponível na planta; NP= não permeou.

	Individual (log Pe)	Mistura (log Pe)	<i>Bauhinia variegata</i> (log Pe)	<i>Cecropia palmata</i> (log Pe)	<i>Connarus perrotteti</i> (log Pe)	<i>Mansoa alliacea</i> (log Pe)
Ácido Ferúlico	4,47 (±1,28 ⁻²)	4,34 (±1,57 ⁻⁵)	4,34 (±3,11 ⁻⁵)	4,34 (±2,21 ⁻⁵)	4,35 (±1,12 ⁻⁵)	4,34 (±5,8 ⁻⁵)
Ácido Gálico	4,35 (±1,55 ⁻⁴)	4,42 (±9,64 ⁻³)	ND	ND	4,37 (±9,67 ⁻³)	ND
Ácido Cafeico	4,36 (±4,29 ⁻³)	4,34 (±4,02 ⁻⁴)	4,34 (±1,25 ⁻⁵)	4,34 (±4,01 ⁻⁶)	4,34 (±2,42 ⁻⁵)	4,34 (±1,69 ⁻⁵)
Ácido Clorogênico	4,48 (±8,15 ⁻⁴)	4,61 (±0,20)	4,35 (±2,03 ⁻⁵)	4,36 (±3,66 ⁻³)	4,57 (±3,86 ⁻³)	4,35 (±2,2 ⁻⁴)
ácido ρ-Cumárico	4,63 (±1,53 ⁻⁴)	4,42 (±3,5 ⁻⁴)	4,34 (±1,01 ⁻⁴)	4,34 (±1,49 ⁻⁴)	4,35 (±1,59 ⁻³)	4,34 (±4,87 ⁻⁵)
Ácido Vanílico	4,34 (±6,2 ⁻⁶)	4,35 (±7,53 ⁻⁴)	4,35 (±7,79 ⁻⁴)	4,34 (±8,53 ⁻⁶)	4,35 (±4,21 ⁻⁷)	4,34 (±5,4 ⁻⁴)
Catequina	4,54 (±5,83 ⁻²)	4,35 (±8,12 ⁻⁴)	4,34 (±5,49 ⁻⁵)	4,34 (± 2,52 ⁻⁶)	4,37 (±4,01 ⁻⁴)	ND
Rutina	4,52 (±5,2 ⁻³)	4,36 (±8,72 ⁻³)	4,34 (±3,35 ⁻⁵)	ND	ND	4,34 (±3,07 ⁻⁶)

Continuação Tabela 10...

PAMPA_{PELE}

	Individual (log Pe)	Mistura (log Pe)	<i>Bauhinia variegata</i> (log Pe)	<i>Cecropia palmata</i> (log Pe)	<i>Connarus perrotteti</i> (log Pe)	<i>Mansoa alliacea</i> (log Pe)
Ácido Ferúlico	4,51 (±2,02 ⁻³)	4,48 (±3,09 ⁻³)	4,35 (±2,90 ⁻⁵)	4,35 (±1,33 ⁻³)	4,35 (±1,58 ⁻⁴)	4,34 (±1,0 ⁻⁴)
Ácido Gálico	4,76 (±1,88 ⁻²)	4,47 (±0,11)	ND	ND	4,36 (±6,86 ⁻⁵)	ND
Ácido Cafeico	4,56 (±2,12 ⁻³)	4,35 (±1,99 ⁻³)	4,38 (±4,85 ⁻⁴)	4,36 (±2,22 ⁻³)	4,35 (±4,70 ⁻⁴)	4,40 (±3,5 ⁻⁴)
Ácido Clorogênico	4,69 (±5,56 ⁻²)	4,67 (±1,66 ⁻²)	4,41 (±8,34 ⁻⁴)	4,48 (±9,79 ⁻²)	4,37 (±1,88 ⁻³)	4,48 (±1,21 ⁻³)
ácido p-Cumárico	4,48 (±2,49 ⁻²)	4,43 (±1,30 ⁻²)	4,35 (±6,76 ⁻⁴)	4,27 (±1,63 ⁻²)	4,36 (±2,49 ⁻⁵)	4,35 (±2,1 ⁻³)
Ácido Vanílico	4,36 (±9,9 ⁻³)	4,43 (±7,31 ⁻³)	4,40 (±1,46 ⁻²)	4,38 (±2,29 ⁻²)	4,35 (±2,49 ⁻⁴)	4,35 (±2,5 ⁻⁴)
Catequina	4,97 (±2,19 ⁻²)	4,57 (±1,30 ⁻²)	4,34 (±3,98 ⁻³)	4,53 (±7,80 ⁻²)	4,38 (±3,98 ⁻³)	ND
Rutina	4,34 (±3,50 ⁻⁴)	4,51 (±1,07 ⁻²)	4,38 (±7,73 ⁻⁴)	ND	ND	4,39 (±9,42 ⁻⁴)

O log Pe apresenta valores muito similares na permeação com a membrana *PAMPA_{TGI}*, tanto na passagem dos compostos individualmente, na mistura e nos extratos brutos a 10%. O ácido ferúlico, ácido p-Cumárico, catequina e rutina, apresentam coeficientes efetivos de permeação maiores na passagem individual dos compostos, enquanto que, os valores da mistura dos compostos apresentam na maioria dos casos semelhança de log Pe com a permeação dos extratos estudados.

Quando avaliado o log Pe da permeação em membrana *PAMPA_{PELE}*, observa-se um valor maior em praticamente todos os compostos, com exceção do ácido vanílico e da rutina. A mistura fica em geral com valores um pouco acima dos obtidos para os extratos, mas mais baixos que as permeações individuais.

Isso demonstra a interação que ocorre entre os compostos presentes nas matrizes complexas, como é o caso dos extratos brutos. O estudo da mistura propicia averiguar qual ação da combinação dos 8 compostos, mas deve-se levar em consideração os demais componentes majoritários e minoritários que podem estar presentes nas matrizes complexas.

Destaca-se no modelo de membrana *PAMPA_{TGI}* o log Pe do composto ácido clorogênico na planta *Conarus perrotteti*, esta é a única planta (dentre as estudadas) que apresenta ácido gálico em sua composição, sendo que o composto apresenta permeação nos dois modelos de membrana estudados.

Logo, os resultados encontrados no presente trabalho demonstram uma maior facilidade da permeação do composto ácido clorogênico, apesar de não apresentar a maior quantidade permeada, é o composto que figura entre os que mais permeiam quando exposto às membranas das diferentes vias de administração estudadas. Mesmo que este composto apresente uma maior massa molar (354,31 g/mol), se comparado aos demais compostos que apresentaram maior permeação na membrana *PAMPA_{PELE}*, principalmente quando comparado ao ácido cafeico que apresenta menor permeação e menos massa molar (180,16 g/mol).

Os ácidos clorogênicos são abundantes nas plantas, principalmente em chás e café, possuem grande variabilidade de isômeros e diferentes conjugações com outros ácidos, como é o caso do utilizado neste estudo, que apresenta o ácido quínico em

sua estrutura, fato este que pode interferir e/ou facilitar os processos de permeação do composto em diferentes meios, hidrofílicos (*PAMPA_{TGI}*) e lipofílicos (*PAMPA_{PELE}*).

A rutina quando utilizada individualmente, apresentou menor coeficiente de permeação na membrana *PAMPA_{PELE}*, do que na *PAMPA_{TGI}*, isso provavelmente ocorre por sua configuração molecular, um flavonoide associado a um açúcar, assim como pela dificuldade de deposição na pele (LINN et al, 2012).

5 CONCLUSÃO

O estudo proposto evidencia a importância de pesquisas que avaliem a permeação de diferentes compostos por membranas que mimetizam as barreiras de tecidos humanos, para que se possa ter mais eficácia quando da realização de tratamentos tanto por via tópica como por via oral.

O estudo também possibilita identificar qual a via mais adequada para a administração de diferentes compostos. Fica evidente que diferentes perfis de permeação ocorrem quando da utilização de diferentes vias, enaltecendo a partir deste estudo vias primárias de administração de compostos, via transcutânea e via oral (absorção por TGI), e vias finais como é o caso da barreira hematoencefálica, que favorece a ação dos diferentes compostos no SNC.

Foi possível inferir que deve-se ficar atento ao uso de matrizes complexas, pois as interações intermoleculares entre os componentes desta matriz poderão interferir no perfil de permeação dos diferentes compostos, quando comparada a permeação individual. Este fato que deve ser levado em consideração quando do uso de produtos manipulados, em que diversos produtos podem ser associados em uma mesma formulação, é preciso identificar o perfil de permeação tanto individual, como dos compostos associados.

Logo, identificou-se que a partir dos compostos estudados, o ácido clorogênico, ácido p-Cumárico, catequina e rutina, apresentam maior permeação individual com a membrana *PAMPA_{TGI}* e o ácido gálico e ácido clorogênico, quando avaliada a mistura de todos os compostos. Já nos extratos há uma permeação mais igualitária de todos dos compostos, mas o ácido clorogênico na planta *Conarus perrotteti* que demonstrou maior quantidade permeada, em comparação aos demais estudados.

Na membrana *PAMPA_{PELE}* a permeação individual dos ativos evidenciou a maior transposição da membrana pelos compostos: ácido ferúlico, ácido gálico, ácido clorogênico e catequina. Na mistura os compostos: ácido gálico, ácido clorogênico e a catequina foram mais eficazes na transposição da membrana. Na avaliação dos extratos todos apresentaram valores similares de permeação dos compostos.

A membrana *PAMPA_{BHE}* demonstrou ser uma barreira mais eficaz e seletiva,

como de fato a barreira hematoencefálica é no organismo, sendo que a permeação foi reduzida em todos os compostos tanto individual como na mistura, sendo que no primeiro caso o ácido clorogênico foi o que apresentou maior eficácia de permeação e no segundo o ácido gálico e ácido clorogênico.

Com isso evidencia-se a facilidade do ácido clorogênico de transpor as diferentes barreiras estudadas, mesmo que não apresente as maiores concentrações permeadas, pois apresentou permeação em todas as membranas.

Outro fator relevante a esta pesquisa é a interação intermolecular de permeação dos compostos, de forma geral, com passar do tempo (1 h, 2 h e 3 h), há aumento de permeação dos compostos. Também foi possível avaliar, que a maior disponibilidade dos compostos, não significam necessariamente que estes terão maior quantidade permeada, mas esta é dependente da afinidade entre membrana e composto, assim como de características da membrana, como a formação dos canais na deposição dos modificadores.

A partir desta Tese obteve-se material para a construção de três artigos científicos, o primeiro produzido como um estudo preliminar para identificar a possibilidade de permeação, sendo associado a estudos *ex vivo*, enviado para a revista *Biopharmaceutics & Drug Disposition* (Anexo 1). O segundo artigo, encaminhado para o periódico *Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas*, este visou a apresentação dos resultados obtidos no tempo de 3 horas de incubação com as membranas $PAMPA_{PELE}$ e $PAMPA_{TGI}$, assim como a avaliação morfológica destas. O terceiro artigo será escrito partir dos dados obtidos com os testes de permeação com a membrana $PAMPA_{BHE}$, evidenciando a passagem destes compostos pela membrana mais seletiva que o organismo possui, podendo-se assim inferir a chegada dos compostos ao SNC.

É importante relacionar a passagem dos compostos com sua ação terapêutica, e qual a dose necessária para que ocorram efeitos terapêuticos tanto a nível local como sistêmico, ou ainda sobre afecções do SNC, sendo esta uma possibilidade de estudos futuros a serem realizados a partir dos dados obtidos nesta Tese.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAME, A.; JACCOUD, C.V.; COBRA, E. A. Biodiversidade, biopirataria e aspectos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2005.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosia*. 18(3): 472-508, 2008.

ALBERTS, Bruce et al. **Molecular biology of the cell**. 5. ed. Nova York: Garland Science, 2008.

ALLEN., L; POPOVICH, N.C.; ANSEL, C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. Porto Alegre: ARTMED. 9ª Ed. 2013.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.

ARAUJO, J.M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, 2008.

AVDEEF, A. **Absorption and drug development**. Hoboken: Wiley. 2003.

AVDEEF, A.; ARTURSSON, P.; NEUHOFF, S.; LAZAROVA, 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*. 24(4):333-49, 2005.

AVDEEF, A.; BENDELS, S.; DI, L.; FALLER, B.; KANSY, M.; SUGANO, K.; YAMAUCHI, Y. PAMPA--critical factors for better predictions of absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96 (11) : 2893-2909, 2007.

AVDEEF, A.; STRAFFORD, M.; BLOCK, E.; BALOGH, M.P.; CHAMBLISS, W. et al. Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes 2. Studies of the permeability properties of lactones in piper methysticum forst. *Eur J Pharm Sci* 14: 271–280, 2001.

AZULAY, R.D.; AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BACH, M.; LIPPOLD, B. C. Percutaneous penetration enhancement and its quantification. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v.46, p. 1-13, 1998.

BALIMANE, P.V.; HAN, Y.H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. **AAPS J** 8(1):E1-13, 2006.

BALME, F. **Plantas medicinais**. Sao Paulo: Hemmus, 2000.

BAUMANN, L.; SAGHARI, S.; WEISBERG, E. **Cosmetic dermatology**: principles and practice. 2. ed. Nova York: McGraw-Hill, 2009.

BAUMANN, Leslie. **Pele saudável**: a fórmula perfeita para o seu tipo de pele. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, Michael A. **Neuroscience: exploring the brain**. 2. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G., BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.** 15 (3) : 285-292, 2004.

BERARDESCA, E.; ELSNER, P.; WILHELM, K. **Bioengineering of the skin**: methods and instrumentation. Boca Raton: CRC Press, 1995.

BERG, M.E.V.D. Plantas de origem africana de valor sócio-econômico tual na região amazônica e no meio-norte do Brasil. **Boletim Museu Emílio Goeldi**, Série Botânica. Belém, v.7, n.2, p.499-510, 1991.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BERMEJO, M.; AVDEEF, A.; RUIZ, A.; et al. PAMPA-a drug absorption in vitro model

Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. **Eur J Pharm Sci.** 21: 429–441, 2004.

CARLINI, E. A. Pesquisas com plantas medicinais usadas em medicina popular. **Revista da Associação de medicina Brasileira**, v.29, n.516, p.109-110, 1983.

CHAIPRASONGSUK, A.; ONKOKSOONG, T.; PLUEMSAMRAN, T.; LIMSAENGURAI, S.; PANICH, U. Photoprotection by dietary phenolics against melanogenesis induced by UVA through Nrf2-dependent antioxidant responses. **Redox Biology.** 8: 79–90, 2016.

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.** 25(7), 2008.

CHEN, Z.; MA, T.; HUANG, C.; ZHANG, L.; ZHONG, J.; HAN, J.; HU, T.; LI, J. Efficiency of transcellular transport and efflux of flavonoids with different glycosidic units from flavonoids of *Litsea coreana* L. in a MDCK epithelial cell monolayer model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** 53: 69–76, 2014.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 79 : 362 – 372, 1999.

DAGENAIS, C., AVDEEF, A.; TSINMAN, O.; DUDLEY, A.; BELIVEAU, R. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood–brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 38 : 121–137, 2009.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R.F.A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova.** 27 (4) : 586-592, 2004.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. Drug Absorption Studies. In situ, in vitro and in silico models. New York: Springer, v.VII. 2008.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; PLANETA, C. S.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M.C.W., (Eds). *Farmacologia integrada*. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.

DENESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H. S.; HOMAYOUN, N. Solubility of Gallic Acid in Methanol, Ethanol, Water, and Ethyl Acetate. **Journal of Chemical & Engineering Data**. 53, 776–778, 2008.

DI, L.; KERNS, E.H.; MCCONNELL, O.J.; CARTER, G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. **European Journal of Medicinal Chemistry**.38(3):223-32, 2003.

DOUGLAS, C.R. **Fisiologia aplicada à nutrição**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

ELISABTSKY, E. Pesquisa com plantas medicinais. **Ciência e Cultura**, v.39, n.8, p.697-702, 1987

ESLAMI, A.C.; WANVIMOL, P.; WAGNER, B.A.; BUETTNER, G.R. Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study. **Chemistry Central Journal**. 4:15, 2010.

FACCIN, H.; VIANA, C.; NASCIMENTO, P.C.; BOHRER, D.; CARVALHO, L.M. Study of íon suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 1427:11-124, 2016.

FLAMENT, F. FRANCOIS, H., QIU, H., ET AL., 2015. Facial skin pores: a multiethnic study. Clinical. **Cosmetic and Investigational Dermatology**. 8:85–93.

FRENHANI, P. B.; BURINI, R.C. Mecanismos de absorção de aminoácidos e oligopeptídios. Controle e implicações na dietoterapia humana. **Arquivos de Gastroenterologia**. 36 (4) : 227-237,1999.

GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTINEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**. 58(9):537-552, 2009.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D.H.M.; SCHULZE, J.; SOUZA, M.F.F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**. 80(6):339-44, 2009.

GUPTA, C.R. **Nutraceuticals**: efficacy, safety and toxicity. Academic Press: 1ª edição. 2016.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chemical Toxicology**. 37 (9/10): 937-42, 1999.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

ITOH, A.; ISODA, K.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; WATARI, A.; KOBAYASHI, M.; TAMESADA, M.; YAGI, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. **Biol Pharm Bull**. 33(6):983-7, 2010.

JUNG, S.K.; CHOI, D.W.; KWON, D.; KIM, M.J.; SEONG, K.S.; SHON, D. Oral Administration of *Achyranthis radix* Extract Prevents TMA-induced Allergic Contact Dermatitis by Regulating Th2 Cytokine and Chemokine Production in Vivo. **Molecules**. 20 : 21584–21596, 2015.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBENATOR, K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **J Med Chem**. 41:1007–1010, 1998.

KARADZOVSKA, D.; RIVIERE, J.E. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 50 : 69–576, 2013.

KERNS, E.; DI, L. **Drug-like Properties**: Concepts, Structure Design and Methods. Elsevier, 2008.

KIM, K.; KIM, Y.; LIM, J.Y.; MIN, S.J.; KO, H.; KIM, S.; KIM, Y. Intestinal anti-inflammatory activity of *Sasa quepaertensis* leaf extract by suppressing lipopolysaccharide-stimulated inflammatory mediators in intestinal epithelial Caco-2 cells co-cultured with RAW 264.7 macrophage cells. **Nutrition Research and Practice**. 9(1):3-10, 2015.

KONCZÖL, Á.; MÜLLER, J.; FÖLDES, E.; BENI, Z.; VEGH, K.; KERY, Á.; BALOGH, G. T. Applicability of a Blood-Brain Barrier Specific Artificial Membrane Permeability Assay at the Early Stage of Natural Product-Based CNS Drug Discovery. **Journal of Natural Products**. 76, 655-663, 2013.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.

LIMA F. Estudo da Bioatividade de Compostos Fenólicos em Plantas Medicinais. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química – UFSM. 2013.

LINNANKOSKI, J.; MÄKELÄ, J.; PALMGREN J.; MAURIALA, T.; VENDIN, C.; UNGELL, A.L; LAZOROVA, L.; ARTURSSON, P.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M. Paracellular Porosity and Pore Size of the Human Intestinal Epithelium in Tissue and Cell Culture Models. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 99: 2166-2175, 2010.

LIU, H.; SABUS, C.; CARTER, G.T.; DU, C.; AVDEEF, A.; TISCHLER, M. *In Vitro* Permeability of Poorly Aqueous Soluble Compounds Using Different Solubilizers in the PAMPA Assay with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Detection. **Pharmaceutical Research**. 20 (11):1820-1826, 2003.

LOCATELLI, C.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 60: 233-239, 2013.

LOCH-NECKEL, G. La barrera hematoencefálica y La concentración de fármacos em El sistema nervioso central. **Salud(i)Ciencia**. 19 : 646 – 649, 2013.

LUENGAS-CAICEDO, P. E. Contribuição Para A Padronização De Extratos De Folhas De *Cecropia Glaziovii* Snethl.: Estudos De Variação Sazonal E Intra-Específica De Flavonóides E Proantocianidinas, De Metodologias De Extração E De Atividade Vasorelaxante. **Tese de Doutorado Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - MG**, 2005.

MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNE, C.; TEXIER, O.; REGERAT, F.; REMESY, C.; Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **FEBS Lett.** 409:12-16, 1997.

MIOTO, R. C. T. Família e Política Social: uma introdução ao debate sobre os processos de responsabilização das famílias no contexto dos serviços públicos. **XII Encontro Nacional de Pesquisadores em Serviço Social/ENPESS.** 2010.

MATOS, F. J. de A. **Plantas Medicinais:** guia de seleção e emprego de plantas medicinais usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2a ed. Fortaleza: IU, 2000.

MONTENEGRO, G.; SANTANDER, F.; JARA, C.; NUÑEZ, G.; FREDES C. Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. **Boletín latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.** 12 (3): 257 – 268, 2013.

MOURA, M. R. L.; REYES, F. G. R. Interação fármaco-nutriente: uma revisão. **Revista de Nutrição.** 15 (2) 223-238, 2002.

MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implications of its intestinal absorption and metabolism. **Archives os Biochemistry and Biophysics.** 417 : 12-17, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** 5. ed. Porto Alegre Artmed, 2011.

NICOSAI-TORRES, M. P. et al., Production of chlorogenic acid and isoorientin hypoglycemic compounds in *Cecropia obtusifolia* calli and in cell suspension cultures with nitrate deficiency. **Acta Physiol Plant,** 34, p.307-316, 2012.

NIELSEN, P. E.; AVDEEF, A. PAMPA--a drug absorption in vitro model 8. Apparent filter porosity and the unstirred water layer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences.** 22 (1) : 33-41, 2004

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova.** 34 (6) : 1051-1056, 2011.

OLLER-SALVIA, B., SÁNCHEZ-NAVARRO, M., GIRALT, E., TEIXIDÓ, M. Blood–brain

barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. **Chemical Society Reviews**. 45, 4690-4707. 2016.

OOSTENDORP, R.L.; HUITEMA, A.; ROSING, H.; JANSEN, R.S., TERHEINE, R.; KEESEN, M.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H. Coadministration of ritonavir strongly enhances the apparent oral bioavailability of docetaxel in patients with solid tumors. **Clin Cancer Res**. 15;15(12):4228-33, 2009.

OTTAVIANI, G.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: A New Membrane for the Fast Prediction of Passive Human Skin Permeability. **Journal of Medicinal Chemistry**. 49 (13) : 3948 – 3954, 2006.

PAN, M. L., WALLACE, R. A. Cecropia Vitellogenin: Isolation and Characterization. **Amer. Zool.**, 14, 4, p.1239-1242, 1974.

PASCUAL-GARVI, J.M.; GONZÁLEZ-LNOS, F; PRIETO-ARRIBAS, R; CERDÁN, S; RODA, J.M. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. **Revue Neurologique**. 38 (6): 565-581, 2004.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**. 57 (5): 371-389, 1991.

PEDRIALI, C. A. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. **Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas**. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PIMENTEL, V.; VIEIRA, V.; MITIDIERI, T.; FRANÇA, F.; PIERONI, J.P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES** 43:41-89, 2015.

PLEWIG, G.; KLIGMAN, A.M. **Acne and Rosacea**. 3rd edition. Berlin, Heidelberg: Springer. 2000.

PRESS, B.; GRANDI, D. Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. **Current Drug Metabolism**.9(9):893-900, 2008.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**. 6 (11) : 1720-1731, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012.

REDDY, M.V.; REDDY, MK.; GUNASEKAR, D.; CAUX, C.; BODO, B. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from Bauhinia variegata. *Phytochemistry* 64, 879–882. 2003.

REIS, J.; SINKÓ, B.; SERRA, C.H.R. Parralel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA): is it better than Caco – 2 for human passive permeability prediction? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 10: 1071-1076, 2010.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobioteecnologia**. Sao Paulo: Editorial Premier, c1997.

ROCHA, G. G.; SIMOES, M.; LÚCIO, K.A.; OLIVEIRA, R.R.; COELHO KAPLAN, M.A.; GATTLAS, C.R. Natural triterpenoids from Cecropia lyratiloba are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioinorganic & Medicinal Chemistry**, 15, p.7355-7360, 2007.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3. ed. rev. ampl. São Paulo: Artes Medicas, 2008.

SARAVANAMUTTU, S., SUDARSANAM, D. Antidiabetic plants and their active ingredients: a review. **IJPSR**. 3(10): 3639-3650, 2012.

SCHEARER, J.; FARAH, A. PAULIS, T.; BRACY, D.P.; PENCEK, R.R.; GRAHA, T.E. WASSERMAN, D.H. Quinides of Roasted Coffee Enhance Insulin Action in Conscious Rats. **Nutrient Metabolism**. 113 (11) 3529 – 3532, 2003.

SCHMIDT, D.; LYNCH, J. Evaluation of the reproducibility of Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA). **Millipore corporation application note**. 2003.

SCHNEIDER, G.; BARINGHAUS, K.-H. Molecular design: concepts and applications. Frankfurt: Wiley-VCH. 2008.

SHINDE ET AL. Herbs In Pregnancy And Lactation: A Review Appraisal. **IJPSR**. 3(9): 3001-3006, 2012.

SILVEIRA G.D.; MOTTA M.J.; MÜLLER L.S.; LAMEIRA O.; ATHAYDE M.L; PIANA M.; ROSA M.B.; VIANA C.; CARVALHO L.M. Determination of Phenolic Antioxidants in Amazonian Medicinal Plants by HPLC with Pulsed Amperometric Detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. 38(13), 2015.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana**: uma abordagem. Porto Alegre: 5ª edição. Editora Artmed. 2010.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E.P; GOSMAN, G.; MELLO, J. C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 4 edição. Porto Alegre/Florianopolis, editora UFRGS/ editora UFSC, 2002.

SINKÓ, B.; KÖKÖSI J.; AVDEEF A.; TAKÁCS-NOVÁK K. A PAMPA study of the permeability-enhancing effect of new ceramide analogues. *Chem Biodivers*. 6(11):1867-74, 2009.

SINKO, P. J.; GONZALES-ORTEGA, G. **Martin**: físico-farmácia e ciências farmacêuticas. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista nutrição**. 15 (1) : 71-81, 2002.

SPOSITO, T. C., SANTOS, F. A. M., SCALING OF STEM AND CROWN IN EIGHT CECROPIA (CECROPIACEAE) SPECIES OF BRAZIL *American Journal of Botany*, 88(5), p.939–949, 2001.

TIWARI ET AL., PHYTOCHEMICAL SCREENING AND DIURETIC ACTIVITY OF ALLIUM SATIVUM STEROIDAL AND TRITERPENOID SAPONIN FRACTION IJPSR, Vol. 3(9): 3354-3361. 2012.

THÜRMER, M. B.; POLETTO, P.; MARCOLIN, M.; FERREIRA, D. G.; ZENI, M. **Polímeros**. 20(3), 170–174, 2010

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Medicinais**. 2a ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.

VIZSERÁLEK, G.; BERKÓ, S.; TÓTH, G.; BALOGH, R.; BUDAI-SZÜCS, M.; CSÁNYI, E.; SINKÓ, B.; TAKÁCS-NOVÁCK, K. Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 30 (76) : 165-172, 2015.

WAGNER, C.; FACHINETTOS, R.; CORTEA, C. L.D.; BRITTOA, V. B.; SEVEROA, D.; DIAS, G.O.C.; MOREL, A.F.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. **Brain Research**. 1107 (1) :192-198, 2006.

WAGNER, J.G. Biopharmaceuticals and relevant pharmacokinetics. 1 ed. **Hamilton: Drug Intelligence Publications**. 1971.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R., SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal and Agricultural and Food Chemistry**. 42 (6): 1285-90, 1994.

WANG, X.; XI, Y.; ZENG, X.; ZHAO, H.; CAO, J.; JIANG, W. Effects of chlorogenic acid against aluminium neurotoxicity in ICR mice through chelation and antioxidant actions. **Journal of Functional Foods**, 40, 365, 2018.

WATANABE, T.; ARAI, Y. ; MITSUI, Y. ; KUSAURA, T.; OKAWA, W. ; KAJIHARA, Y.; SAITO, Y. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. **Clin Exp Hypertens**_ 28 (5) : 439-49, 2006.

WHO, World Health Organization. **Opening remarks at the International Forum on Traditional Medicine**. China, 2015.

WOHNSLAND F, FALLER B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. **Journal of medicinal chemistry**. 15;44(6):923-30, 2001.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapeco: Argos, 2001.

ZHU, C., JIANG, L., CHEN, T.M., HWANG, K.K., A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. **Eur. J. Med. Chem.** 37, 399–407. 2002.

ANEXO 1 – Artigo submetido à revista Biopharmaceutics & Drug Disposition



Permeation characteristics of phenolic compounds in parallel artificial membrane permeability assays (PAMPA) and its relationship with antiradical action at the cellular level



Journal:	<i>Biopharmaceutics & Drug Disposition</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Carvalho, Leandro; Universidade Federal de Santa Maria, Stulp, Simone; Centro Universitario Univates Figuera, Michele; Universidade Federal de Santa Maria Royes, Luis Fernando; Universidade Federal de Santa Maria Viana, Carine; Universidade Federal de Santa Maria Bianchetti, Paula; Centro Universitario Univates Bresciani, Lais; Centro Universitario Univates Lima, Fernanda; Universidade Federal da Fronteira Sul Reis, Gabriel; Universidade Federal de Santa Maria
Keywords:	Phenolic compounds, permeability, PAMPA model, antiradical action, brain tissue cells
Abstract:	Bioactive compounds with a high ability to scavenge free radicals may not have sufficient permeability across biomembranes for their in vivo action. Thus, the correlation between in vitro antiradical activity and permeability in biomimetic physiological membranes is considered a more complete approach of the effective action of a bioactive compound. In this sense, the aim of this work was to evaluate the ability of some phenolic compounds to pass through the gastrointestinal membrane using the PAMPA model. The results were compared to the antiradical responses by in vitro and ex vivo methods using radical reactive oxygen species (ROS). The in vitro antiradical activity was evaluated by two models, involving three ROS generated artificially and the other involving peroxy radicals generated from brain tissue cell hemolysate (ex vivo). Quercetin and caffeic acid showed higher permeability in PVDF membrane modified with L-a-phosphatidylcholine beyond high reactivity against ROS at the cellular level. The permeability of quercetin, caffeic acid, resveratrol and catechin was obtained quantitatively in terms of Pe (cm s ⁻¹). The results of gastrointestinal permeability were correlated with the antiradical activity, SOD and catalase enzyme activity at the cellular level for quercitrin, caffeic acid, catechin and resveratrol. The results obtained with the PAMPA model showed a good correlation with antiradical activity at the cellular level for quercitrin. In addition, quercitrin showed higher activation of the antioxidant enzyme SOD in brain tissue cells (cortex).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Permeation characteristics of phenolic compounds in parallel artificial membrane permeability assays (PAMPA) and its relationship with antiradical action at the cellular level

Leandro M. de Carvalho^{*a}, Simone Stülz^{#b}, Michele R. Fighera^c, Luis F. F. Royes^d, Carine Viana^e, Paula Bianchetti^{b,e}, Laís Bresciani^b, Fernanda O. Lima^f, Gabriel Reis^e

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, C.P. 5051, 97110-970, Santa Maria-RS, Brazil

^b Centro Universitário Univates, Núcleo de Eletrofotocímica e Materiais Poliméricos – NEMP, Lajeado-RS, Brazil

^c Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^d Centro de Educação Física e Desportos, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Programa de Pós Graduação em Educação Física, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^e Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^f Federal University of Fronteira Sul, 85770-000 Realeza, PR, Brazil

Correspondence to: Leandro M. de Carvalho: Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria. E-mail address: lemacarvalho@gmail.com. Tel: +55-55-32208870

[#]Simone Stülz: Centro Universitário Univates, Núcleo de Eletrofotocímica e Materiais Poliméricos (NEMP). E-mail address: simone.stulp@gmail.com Tel: +55-51-37147000

1
2 **ABSTRACT:** Bioactive compounds with a high ability to scavenge free radicals may not have
3
4 sufficient permeability across biomembranes for their *in vivo* action. Thus, the correlation between
5
6 *in vitro* antiradical activity and permeability in biomimetic physiological membranes is considered a
7
8 more complete approach of the effective action of a bioactive compound. In this sense, the aim of
9
10 this work was to evaluate the ability of some phenolic compounds to pass through the
11
12 gastrointestinal membrane using the PAMPA model. The results were compared to the antiradical
13
14 responses by *in vitro* and *ex vivo* methods using radical reactive oxygen species (ROS). The *in vitro*
15
16 antiradical activity was evaluated by two models, involving three ROS generated artificially and the
17
18 other involving peroxy radicals generated from brain tissue cell hemolysate (*ex vivo*). Quercetin
19
20 and caffeic acid showed higher permeability in PVDF membrane modified with L- α -
21
22 phosphatidylcholine beyond high reactivity against ROS at the cellular level. The permeability of
23
24 quercetin, caffeic acid, resveratrol and catechin was obtained quantitatively in terms of P_e (cm s^{-1}).
25
26 The results of gastrointestinal permeability were correlated with the antiradical activity, SOD and
27
28 catalase enzyme activity at the cellular level for quercitrin, caffeic acid, catechin and resveratrol.
29
30 The results obtained with the PAMPA model showed a good correlation with antiradical activity at
31
32 the cellular level for quercitrin. In addition, quercitrin showed higher activation of the antioxidant
33
34 enzyme SOD in brain tissue cells (cortex).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 **Key words:** Phenolic compounds; permeability; PAMPA model; antiradical action,; brain tissue
47
48 cells.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Studies related to the antioxidant activity of phenolic compounds have been extensively described in the literature. These methods generally involve the *in situ* generation of free radicals, such as $\text{ROO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$ and $\text{HO}\cdot$, using spectrophotometric, spectrofluorometric and electrochemical detection methods.^{1,2} Although non-specific and non-representative of biological systems, synthetic free radicals such as DPPH and TBARS have also been used for studies of antioxidant activity. However, independent on the type of evaluation method used, effective studies of biological action would likely also involve the ability of these compounds to cross biological membranes. In this sense, a bioactive compound with high ability to scavenge free radicals may not have sufficient permeability in appropriate concentrations for their *in vivo* action. Therefore, the correlation between the *in vitro* antioxidant activity and permeability in biomembranes, which can mimic physiological systems, is considered a more complete approach to investigate the effective action of a specific bioactive compound.³

Some studies on permeability across biomembranes have used PAMPA and Caco-2 cell models.⁴ The PAMPA model utilizes polymeric membranes coated with phospholipids, such as phosphatidylcholine and cholesterol, simulating the gastrointestinal membrane.⁵ In turn, the Caco-2 model uses human intestinal cell lines (colorectal adenocarcinoma) for simulating the permeation of compounds at the cellular level.⁶ Herein, Li et al.⁷ performed studies comparing the activity and permeability of 34 protease inhibitors for hepatitis C virus by using the PAMPA model and permeability in Caco-2 cells. The permeability coefficient results for the PAMPA and Caco-2 methods were $0.6\text{--}825 \text{ nm s}^{-1}$ and $1\text{--}101 \text{ nm s}^{-1}$, respectively, suggesting that the PAMPA technique may be more predictive than the permeability technique using Caco-2 cells.⁷ In addition, Halifax and co-workers⁸ compared the permeability of 65 drugs by using the PAMPA and Caco-2 methods and observed that there is a high correlation using the PAMPA technique. Furthermore,

1
2 Kerns et al.⁹ suggest that there is a good correlation between the results obtained with the PAMPA
3
4 model and those obtained with Caco-2 cells. It is an important approach, since the Caco-2 model
5
6 gets closer to *in vivo* situations and allows a better analysis of drug permeation.
7

8
9 Moreover, few studies have described the correlation between the permeation of
10
11 compounds, such as phenolic compounds, through biomembranes and antiradical activity. Venzke et
12
13 al.¹⁰ used the PAMPA model coated with phosphatidylcholine in dodecane to assess the
14
15 permeability characteristics of molecules with antioxidant capacity, providing the passive
16
17 transcellular absorption of molecules. According to the study, hydrophobic isoflavones have lower
18
19 permeability than polar ones. Furthermore, Könczöl et al.¹¹ conducted a study employing the
20
21 PAMPA model for a large number of natural products, plant extracts and some of their bioactivity
22
23 markers, aiming to characterize and validate permeation studies across the blood-brain barrier
24
25 (PAMPA-BBB) using a solid filter support impregnated with porcine brain lipid (PBL).
26
27

28
29 The aim of the current study was to evaluate the ability of phenolic compounds from four
30
31 different classes (stilbenes, flavonoids, hydroxycinnamic acids and catechins) to pass through the
32
33 gastrointestinal membrane using the PAMPA model and to compare these results with antiradical
34
35 responses *in vitro* and *ex vivo* using radical reactive oxygen species (ROS). The choice of the
36
37 compound classes was based on their frequent and abundant presence (e.g. resveratrol, caffeic acid,
38
39 quercetin, quercetin, chrysin and catechin) (Fig. 1) in herbal extracts normally used in traditional
40
41 medicine^{12, 13}. Antiradical activity was evaluated by two different models, one involving three ROS
42
43 generated artificially (*in vitro*) and the other involving peroxy radicals generated from brain tissue
44
45 cell hemolysate (*ex vivo*). The permeability of quercetin, caffeic acid, resveratrol and catechin was
46
47 obtained quantitatively in terms of P_e (cm s^{-1}). The results of gastrointestinal permeability were
48
49 correlated with the antiradical activity, SOD and catalase enzyme activities at the cellular level for
50
51 the four compounds, which were able to cross the phospholipidic membrane.
52
53
54
55
56
57

58 [Figure 1]
59
60

Materials and Methods

Equipments

Chromatographic analyses were performed on a Knauer HPLC system (Berlin, Germany) with a Smartline Pump 1000 module coupled to a Smartline Manager 5000 and a Smartline 2600 UV spectrophotometer with diode array, equipped with ChromGateR (Knauer software, version 3.3.1).

Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to investigate the morphology of the membranes with and without the addition of phospholipids. Analyses were performed on a Carl Zeiss LS-10 with an SE detector and the voltage at 20 kV. Samples were fixed to the stub with carbon tape and coated with gold (sputtering - Quorum Q150R Model ES).

A Victor 2D spectrofluorometer (Perkin Elmer; Massachusetts, USA) was used to measure fluorescence of dichlorofluorescein (DCF). A Photonics SP 2000 UV Spectrophotometer (BEL Photonics do Brasil LTDA; Osasco, Brasil) was used to measure superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity. Conductivity measured using a Metrohm 856 Conductivity Module (Metrohm; Herisau, Switzerland).

Reagents

For the HPLC measurements, a mobile phase was prepared containing acetonitrile (Merck; Darmstadt, Germany), Milli-Q ultrapure water (Millipore; St. Louis, MO, USA) and 0.1% phosphoric acid, and tests with different gradient programs were performed. For the permeation studies, standards of quercetin, chrysin, quercetrin, resveratrol, catechin and caffeic acid were used (all from Sigma Aldrich; St. Louis, MO, USA), which were prepared at a concentration of 1 mM

1 and diluted in phosphate-buffered saline (PBS; pH 6.4). This buffer was used as a diluent as well as
2
3 the receiver solution in the permeation studies. PBS is composed of 80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g
4
5 NaH₂PO₄ and KH₂PO₄ dissolved 1 L of ultrapure water (all chemicals obtained from Vetec Química
6
7 Fina Ltda, Duque de Caxias/RJ, Brazil). Membrane modification was carried out with a solution of
8
9 phospholipids composed of 2% (w/v) L- α -phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich) in dodecane
10
11 (Vetec). 2'-7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), Tris-HCl, catalase enzyme, SOD enzyme,
12
13 H₂O₂, Glycine and Adrenaline were obtained from Sigma-Aldrich.
14
15
16
17
18
19

20 **Methods**

21 *Evaluation of the antiradicalar activity in ex vivo tests*

22
23
24
25
26
27
28
29 *Determination of the levels of oxidized 2'-7'-Dichlorofluorescein.* Levels of 2'-7'-
30
31 dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) were determined as an indicator of peroxide production
32
33 by cell components. This experimental approach is based on the deacetylation of the DCFH-DA
34
35 probe and its subsequent oxidation by reactive species of DCFH-DA, which is a highly fluorescent
36
37 compound.¹⁴ The supernatant fraction of the cerebral cortex was added to a medium containing
38
39 Tris-HCl buffer (10 mmol L⁻¹, pH 7.4) and DCFH-DA (1 mmol L⁻¹). After adding DCFH-DA, the
40
41 medium was incubated in the dark for 1 h to measure fluorescence (488 nm excitation; 525 nm
42
43 emission; both slit widths at 1.5 nm). DCFH-DA levels were determined using a standard curve of
44
45 DCF and the results were corrected for protein.¹⁵ Antioxidants, at a concentration of 50 μ mol L⁻¹,
46
47 were added individually to the supernatant of the cerebral cortex in a medium containing Tris-HCl
48
49 buffer (10 mmol L⁻¹, pH 7.4), and DCFH-DA (1 mmol L⁻¹). The concentration of 50 μ mol L⁻¹ was
50
51 based on responses obtained from *in vitro* activity against different ROS (ROO•, O₂•⁻ and HO•),
52
53 where a high antiradical activity for most of the studied compounds was observed.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Determination of catalase (CAT) activity. CAT activity was measured according to the method proposed by Aebi.¹⁶ The supernatant fraction of the cerebral cortex (40 μL) was added to a medium containing PBS (50 mmol L^{-1} , pH 7.4) and H_2O_2 (10 mmol L^{-1}). The kinetic analysis of catalase was started after the addition of H_2O_2 and the decomposition rate was measured spectrophotometrically at 240 nm for 120 seconds. One unit of the enzyme was considered as the amount of enzyme that decomposes 1 mol min^{-1} of H_2O_2 at pH 7.0.¹⁵ Antioxidants (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) were added individually to the supernatant of cerebral cortex in a medium containing PBS (50 mmol L^{-1} , pH 7.4) and H_2O_2 (10 mmol L^{-1}).

Determination of superoxide dismutase (SOD) activity. The activity of SOD in the cortex was determined according to the method proposed by Misra and Fridovich.¹⁷ This method is based on the ability of SOD to inhibit autoxidation of adrenaline to adrenochrome. Briefly, the supernatant fraction (20–60 μL) was added to a medium containing glycine buffer (50 mmol L^{-1} , pH 10.5) and epinephrine (1 mmol L^{-1}). The SOD kinetic analysis was started after the addition of adrenaline, and the color reaction was measured at 480 nm.¹⁵ Antioxidants were added individually at a concentration of 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ to the supernatant of cerebral cortex in a medium containing glycine buffer (50 mmol L^{-1} , pH 10.5) and epinephrine (1 mmol L^{-1}).

Analytical procedures in HPLC analysis. The separations in HPLC-DAD were performed in a Thermo Scientific C18 column (5 μ , 250 X 46 mm) using optimized gradient-elution conditions with the mobile phase composed of solvent A (0.1% orthophosphoric acid) and solvent B (100% acetonitrile). The mobile phase gradient program was the following: 90–80% A and 10–20% B (0–5 min); 80–75% A and 20–25% B (5–35 min); 75–0% A and 25–100% B (35–55 min). The flow rate gradient program was the following: 0.8 ml min^{-1} (0–35 min); 0.8–1.0 ml min^{-1} (35–55 min). After individual runs, the re-equilibration period was 10 min. The detection was performed simultaneously at different wavelengths (206, 254, 320 and 360 nm). The eluent was sonicated for

1 30 min and filtered through a 0.45 μm membrane before injection into the HPLC system.
2
3
4
5

6 *Permeation experiments using the PAMPA model.* Evaluation tests were performed in the PAMPA
7
8 model using 96-well MultiScreen-IP plates (Millipore; Bedford, MA, USA), consisting of a donor
9
10 compartment with hydrophobic membranes (0.45 μm polyvinyl difluoride membranes – PVDF –
11
12 Immobilon-P[®] Membrane) impregnated with phospholipid solution (5 μL of L- α -
13
14 phosphatidylcholine dodecane solution at 2% (w/v)) and a receptor compartment¹⁸ that simulates
15
16 gastrointestinal permeation of the active. The receptor solution used was PBS at pH 6.4, according
17
18 to the Millipore application note AN1728EN00.¹⁹ After the permeation tests, kinetic evaluation of
19
20 the permeation was performed and calculated according to Chen et al.¹⁸ The permeability (Pe) was
21
22 calculated using the maximum time of the PAMPA assay (incubation time). A preliminary step of
23
24 membrane characterization was performed by evaluation of ion diffusion.²⁰ For diffusion assays, a
25
26 vertical diffusion cell with two compartments (donor and acceptor) separated by the PVDF
27
28 membrane was used, with deionized water in the acceptor compartment and 10^{-3} mol L⁻¹ KCl in the
29
30 donor compartment. Aliquots from the diffusion cell were collected after 1, 2, 3 and 4 h and
31
32 analyzed by measuring the electric conductivity. To control the diffusion of KCl through the
33
34 membrane, a calibration curve was constructed by measuring the conductivity of KCl at various
35
36 concentrations. The analytical curve obtained was $y = 5.49 + 122365.24x$, with a correlation
37
38 coefficient of $r = 0.99828$. In addition, characterizations were performed by SEM to compare
39
40 polymeric membranes with and without surface modification.
41
42
43
44
45
46
47
48

49 *Study of in vitro antiradical activity against ROS.* The antiradical activity of phenolic compounds
50
51 against $\text{O}_2^{\bullet-}$ was determined by using the hypoxanthine (HPX)/xanthine oxidase (XOD) enzymatic
52
53 system²¹ where 100 μL of EDTA (30 mmol L⁻¹), 100 μL of HPX (3 mmol L⁻¹) and 200 μL of NBT
54
55 (1.42 mmol L⁻¹) were added to 100 μL of sample. After 3 min, 100 μL of the XOD enzyme (0.75
56
57 unit mL⁻¹; diluted with PBS) was added. The volume was made up to 3 ml with 0.05 mol L⁻¹ PBS
58
59
60

(pH 7.4), consisting of mono- and dibasic sodium phosphate. The blank samples contained all the reagents, except NBT. Concomitantly, a control solution containing all the reagents with the solvent used in the samples and another blank control without NBT were used. After a 40 min reaction time, spectrophotometric measurement was carried out at 560 nm. The antiradical activity of phenolic compounds against ROO• was determined by using the fluorometric method with 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a substrate²² in 96-wll analysis plates. The fluorometer is programmed to maintain the temperature at 37 °C and measure the fluorescence at 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) every 5 min for 30 min. The reaction buffer was made of HEPES (30 mmol L⁻¹), KCl (200 mmol L⁻¹) and MgCl₂ (1 mmol L⁻¹). The chemical deacetylation of DCFH-DA was performed with the addition of 2.0 ml of 0.01 mol L⁻¹ NaOH in an ethanolic solution of 5 mmol L⁻¹ DCFH-DA at room temperature, protected from light. After 30 min, 10 ml of 25 mmol L⁻¹ PBS (pH 7.4) was added and the solution was stored on ice bath until needed. To antiradical activity of phenolic compounds against OH• was determined using the method described by Carvalho et al.¹. A homemade photochemical reactor was used for generating OH• from H₂O₂ photolysis. Assays were performed in triplicate by adding 10 µL of 30% (v/v) H₂O₂ (0.29 mmol L⁻¹) in 10 mL of each sample antioxidant. The same assays were performed in the absence of hydrogen peroxide. The analyses were performed by HPLC using a chromatographic method¹ at specific wavelengths for each compound studied.

Results and discussion

Antiradical activity of phenolic compounds at cellular level

The intracellular concentration of ROS depends on the production and/or removal of them by antioxidant systems. Cells contain a large number of antioxidants that prevent or repair the damage caused by the action of ROS and regulate the mechanisms governed by redox systems. Thus, the

1
2 SOD enzyme converts superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) into H_2O_2 and molecular oxygen (O_2), while
3
4 catalase and peroxidase convert H_2O_2 into water and O_2 . This effect results in the conversion of at
5
6 least two potentially harmful species ($O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2) in water. The total amount of SOD, therefore,
7
8 provides a good indication of the overall detoxification ability of cells or tissues toward the radical
9
10 $O_2^{\bullet-}$.^{24, 25}

11
12
13 In this study, six phenolic compounds representing classes of stilbenes, flavonoids, catechins
14
15 and hydroxycinnamic acids, were initially studied in a comparative way in relation to their capacity
16
17 to scavenge ROS generated at cellular level. For this purpose, a pool of cells from the hippocampus,
18
19 striatum and cerebral cortex were employed, as described in section 2.3. The aim of these studies
20
21 was to observe which compounds had the highest activity in decreasing intracellular ROS, as well
22
23 as activating the enzymes involved in the antioxidant defenses in living organisms, such as catalase
24
25 and SOD. Regarding the studies on intracellular ROS, DCFH-DA levels were determined in
26
27 isolated antioxidants (Fig. 2A) at a concentration of $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, as an indicator of the production
28
29 of peroxides by cellular components. Our results show that quercitrin is the antioxidant compound
30
31 with the highest inhibition on the production of oxidizing species, being statistically superior to the
32
33 control and other compounds. SOD enzyme activity for the different antioxidants analyzed at a
34
35 concentration of $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, was significant only for quercitrin, confirming that it has antioxidant
36
37 properties compared to the control (Fig. 2B). The statistically significant increase ($p < 0.05$) of SOD
38
39 induced by quercitrin suggests that the antioxidant activity of this compound may occur due to the
40
41 reduction of reactive species at the cellular level. Therefore, the treatment of brain tissue cells with
42
43 the tested antioxidants indicates that only quercitrin attenuates the oxidative damage at the cellular
44
45 level, since it increased the enzyme activity (Fig. 2B). On the other hand, analysis of the enzyme
46
47 catalase activity for the tested antioxidants showed no significant difference compared to control
48
49 (Figure 2C). In other words, it can be said that the action of this enzyme was not potentiated by the
50
51 action of the studied antioxidants.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

[Figure 2A, B, C]*Permeability of phenolic compounds in models of phospholipidic biomembranes*

Initially, the evaluation of the permeation coefficients for KCl solutions was performed. From the evaluation of concentration versus time curves for KCl solutions in the permeation system, the mean results of the diffusion coefficient and its standard deviation for the synthetic and the modified membrane were $3.29 \mu\text{m h}^{-1}$ ($\pm 6.42 \times 10^{-7}$) and $3.51 \mu\text{m h}^{-1}$ ($\pm 6.33 \times 10^{-7}$), respectively. Analyzing these results, it can be observed that the diffusion coefficient is not altered in PVDF membranes when compared to the membranes with and without surface modification with L- α -phosphatidylcholine. Additionally, for comparison of membranes with and without surface modification, morphological analyses by SEM were carried out (Fig. 3).

[Figure 3]

Evaluation of the modified PVDF membrane compared to the membrane without modification indicated higher uniformity of the membrane surface, due to the surface deposition of the phospholipid. From these results, it can be seen that surface modification of the membrane did not affect the diffusion of ions through the studied biomembrane. In previous studies made with PVDF membranes, it has been found that a possible model for permeability is strongly linked to the area occupied by the lipid and, in the case of surface modification with cholesterol, water permeability is diminished.²⁶ In another study, analysis by SEM showed that the microporosity is changed by surface modification with carbon nanotubes, while without modification the PVDF membranes have a "sponge-like" structure,²⁷ similar to results observed in the present study.

After the characterization step of the modified membranes, permeability studies were conducted by the PAMPA assay and the permeability calculations followed the equation proposed

1
2 by Chen et al.¹⁸ In our studies of PAMPA gastrointestinal permeability, we initially assessed the
3
4 diffusion kinetics of the phenolic compounds. From the permeability data for the compounds, it was
5
6 initially observed that there was no permeation for quercetin and chrysin in the evaluated
7
8 permeation times. Regarding quercetin, there are reports on the permeation difficulty in other
9
10 models of biomembranes,^{18,28} while chrysin behaves similar to quercetin,^{29,30} also presenting
11
12 difficulty of permeation. Figure 4 shows the results obtained for the kinetic assays performed for the
13
14 phenolic compounds resveratrol, quercitrin, catechin and caffeic acid, from which the kinetic
15
16 constants (flow) were determined. Also using the equation proposed by Chen et al.,¹⁸ Pe values (cm
17
18 s⁻¹) were calculated for the phenolic compounds (Table 1). Based on the results shown in Table 1,
19
20 one can establish the ascending order in terms of flow for the studied compounds: resveratrol <
21
22 catechin < caffeic acid < quercitrin; quercitrin having the highest permeation values in the studied
23
24 conditions.
25
26
27
28
29
30

31 **[Figure 4]**
32
33
34

35 As already stressed in previously published work,³¹ further investigation is required in order
36
37 to understand how flavonoids are absorbed in the body. Furthermore, there are few studies on the
38
39 absorption of quercitrin, but there are suggestions that it occurs more rapidly than quercetin, being
40
41 highly dependent on the conditions of the test and the medium.³² After quercitrin, caffeic acid had
42
43 the highest permeation values, in agreement with previously published results reporting the
44
45 permeation and absorption of caffeic acid in intestine of rats and ileostomy fluids in humans.^{33,34}
46
47 This high permeation may be related to the structure of the compounds, where quercitrin probably
48
49 has a greater efficiency approaching the cell membrane. The permeability values for catechin (Pe =
50
51 3.66 x 10⁻⁶ cm s⁻¹) presented a result consistent with previous studies, where low intestinal
52
53 absorption of this compound is reported.³⁵ Permeation was also observed for resveratrol, but with
54
55 lower values of Pe (1.20 x 10⁻⁶ cm s⁻¹) than the other phenolic compounds (quercitrin, caffeic acid
56
57
58
59
60

1 and catechin); the rapid absorption of resveratrol by the intestine and consequent formation of
2
3
4 metabolites has already been reported in the literature.^{31,36}
5

6 The results in terms of permeation were obtained from the chromatographic quantification
7
8 (HPLC-DAD) of the compounds in the receiver compartment containing PBS. In addition to the
9
10 quantification of the compounds, chromatographic analysis allowed the identification of
11
12 comparative compounds before and after permeation across the phospholipidic membranes,
13
14 indicating the maintenance of their molecular structures (based on the UV absorption spectra and
15
16 retention time). Figures 5A and 5B show the chromatograms of quercitrin and caffeic acid before
17
18 and after permeation across the biomembranes after a 3h incubation period.
19
20
21
22
23

24 [Figure 5]

25
26
27

28 The results presented here demonstrate the ability to predict permeation behavior using the
29
30 gastrointestinal PAMPA assays. Few studies involving PAMPA tests are reported in the literature for
31
32 antioxidants (phenolic compounds); moreover, tests with the PAMPA model showed a good
33
34 correlation with antiradical activity at cellular level for quercitrin. This correlation is important
35
36 because it shows that, while the molecule has the highest permeability among the studied
37
38 compounds, it has also a high ability to scavenge ROS at the cellular level as well as to activate the
39
40 SOD enzyme.
41
42
43
44
45

46 *In vitro* antiradical action of phenolic compounds in the presence of ROS

47
48
49

50 Beyond the effects observed for membrane permeability, antiradical activity in cells and enzymatic
51
52 activation of SOD, the antioxidant species also showed antiradical action against three different
53
54 artificially generated ROS (Table 2). Positive activities for quercitrin, caffeic acid, catechin and
55
56 resveratrol after crossing a modified PVDF membrane supports the activity observed in *ex vivo*
57
58
59
60

1 assays against free radicals generated in the cellular environment. Here, the species were submitted
2
3
4 to controlled reactions toward free radicals with different reactivities ($\text{ROO}\bullet$, $\text{O}_2\bullet^-$ and $\text{HO}\bullet$). For
5
6
7 example, quercitrin showed high reactivity when scavenging $\text{HO}\bullet$ and $\text{O}_2\bullet^-$, with $\text{HO}\bullet$ being the
8
9 most damaging free radical at the physiological level with the highest standard reduction potential
10
11 ($E^0 = +2.30 \text{ V}$) and the shortest half-life time ($\sim 10^{-9} \text{ s}$) among the oxygen radicals. Moreover,
12
13 caffeic acid had the highest action against $\text{O}_2\bullet^-$, being the compound with the second highest
14
15 permeation across the PVDF/phospholipid membrane. Therefore, the high reactivity of quercitrin
16
17 and caffeic acid in the capture of $\text{O}_2\bullet^-$ and $\text{HO}\bullet$, coupled with the highest permeation through the
18
19 biomembrane, accredit these as possible bioactive compounds and important structures at the
20
21 physiological level among the phenolic compounds considered as “antioxidants”. However,
22
23 quercetin presented good action against $\text{ROO}\bullet$ and $\text{HO}\bullet$, but no permeation across biomembranes
24
25 in the evaluated times in the PAMPA model as well as in *ex vivo* studies. Interestingly, resveratrol
26
27 did not display any action against ROS in either *in vitro* or *ex vivo* models, but it has a well-known
28
29 action at the physiological level³⁷⁻³⁹ and cell permeation, as shown here for PVDF/phospholipidic
30
31 membranes. The fact that resveratrol has certain permeability across biomembranes must be
32
33 associated, therefore, to its already proven antioxidant action by an indirect mechanisms that does
34
35 not relate to its ability to scavenge free radicals³⁷⁻³⁹. Finally, the low action of chrysin against
36
37 different ROS and its non-permeability suggest that it is not a compound with action on the front
38
39 line in biological terms, which may apply to other structurally similar compounds.
40
41
42
43
44

45 These results indicate that quercitrin is more efficient than the other studied compounds at
46
47 approaching the cell membrane, inhibiting lipid peroxidation and suppressing damage of the
48
49 cellular membrane induced by ROS. This aspect can be demonstrated here by a good correlation
50
51 between the results obtained with the biomembrane model and the action at the cellular level,
52
53 mainly due the fact that quercitrin was the only compound capable of increasing the activity of the
54
55 SOD enzyme at the cellular level. These results support other studies that also show a good capacity
56
57 of quercitrin to cross biomembranes, such as monolayers of Caco-2 cells in the presence of other
58
59
60

1 phenolic compounds.⁴⁰⁻⁴² On the other hand, this result seems to be a counterpoint to the
2 differences between glycosylated compounds and aglycones, where a higher permeation of the
3 aglycone forms of phenolic compounds is expected.^{3,41} However, it is also known that, along with
4 lipophilicity, the solubility of the compounds influence the ability to cross biological membranes.⁴⁰
5
6
7
8
9

10 11 12 13 **Conclusion**

14
15
16
17
18 Studies related to the transport of phenolic compounds across different biomembranes remain
19 unclear and contradictory. In our studies, quercetin and caffeic acid had higher permeability in
20 PVDF membrane modified with L- α -phosphatidylcholine beyond high reactivity against ROS at the
21 cellular level (quercitrin). In addition, quercitrin showed higher activation of the antioxidant
22 enzyme SOD in brain tissue cells (cortex). Likewise, it was observed that compounds having higher
23 permeability across PVDF/phospholipidic membrane also had higher *in vitro* antiradical activity
24 against ROS. Thus, quercitrin crossed the cell membrane, maintained its post-membrane chemical
25 structure and acted in the scavenging of free radicals at the cellular level, thus being characterized
26 as the most relevant compound according to this approach. Therefore, quercitrin presented high
27 anti-oxidative activity, cellular protective effects and gastrointestinal permeability. Lastly, the
28 present study allowed some new approaches regarding the permeability of phenolic compounds in
29 relation to the structure of the compounds.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 47 **Acknowledgements**

48
49 This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
50 CNPq (processes 487028/2012-0 and 440132/2014-2). The authors specifically thank the Research
51 Program for the SUS (PPSUS) implemented by Decit/SCTIE/MS through the CNPq with the
52 support of FAPERGS and SES/RS. P. Bianchetti thanks the scholarship received from UNIVATES
53 (Centro Universitário UNIVATES, Lajeado/RS).
54
55
56
57
58
59
60

Conflict of Interest

The authors declare that they have no financial or ethical conflict of interest in connection with this paper.

References

1. Carvalho LM, Monserrat J M, Scholz F, Lima FO, da Rosa MB, Hilgemann M, Müller LS, Faccin H, Ramos PB, Silva CV. Substrate-free determination of the radical scavenging activity of phenolic compounds by photochemical generation of hydroxyl radicals and HPLC-UV detection. *Sep Sci Technol* 2013; **48**: 1123–1131.
2. Hilgemann M, Scholz F, Kahlert H, de Carvalho LM, da Rosa MB, Lindequist U, Wurster M, do Nascimento PC, Bohrer D. Electrochemical assay to quantify the hydroxyl radical scavenging activity of medicinal plant extracts. *Electroanal* 2010; **22**: 406–412.
3. Park SN, Kim SY, Lim GN, Jo NR, Lee MH. In vitro skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from Suaeda asparagoides extracts. *J Ind Eng Chem* 2012; **18**: 680–683.
4. Sandhya KV, Devi GS, Mathew ST. Liposomal formulations of serratiopeptidase: in vitro studies using PAMPA and Caco-2 models. *Mol Pharm* 2008; **5**, 92–97.
5. Serra H, Mendes T, Bronze MR, Simplicio AL. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. *Bioorg Med Chem* 2008; **16**: 4009–4018.
6. Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2000; **10**: 195–

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 204.
7. Li C, Nair L, Liu T, Li F, Pichardo J, Agrawal S, Chase R, Tong X, Uss AS, Bogen S, Njoroge FG, Morrison RA, Cheng KC. Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2008; **75**: 1186–1197.
8. Hallifax D, Turlizzi E, Zanelli U, Houston JB. Clearance-dependent underprediction of in vivo intrinsic clearance from human hepatocytes: Comparison with permeabilities from artificial membrane (PAMPA) assay, in silico and caco-2 assay, for 65 drugs. *Eur J Pharm Sci* 2012; **45**: 570–574.
9. Kerns EHK, Di L, Petusky S, Farris M, Ley L, Jupp P. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J Pharm Sci* 2004; **93**: 1440–1453.
10. Venzke D, Carvalho FK, Ruani AP, Oliveira AS, Brighente IMC, Micke GA, Barison A, Pizzolatti MG. PAMPA permeability, acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of pyranoisoflavones from *Polygala molluginifolia* (Polygalaceae). *J Braz Chem Soc* 2013; **24**: 1991–1997.
11. Könczöl A, Müller J, Földes E, Béni Z, Végh K, Kéry A, Balogh GT. Applicability of a blood–brain barrier specific artificial membrane permeability assay at the early stage of natural product-based CNS drug discovery. *J Nat Prod* 2013; **76**: 655–663.
12. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5th edition. Editora da UFSC, Florianópolis, 2004.
13. Matos FJA. *Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras*. Editora UFC: Fortaleza, 2004.
14. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc* 2007; **35**: 1147–1150.
15. Balk RS, Bridi JC, Portella RL, Carvalho NR, Dobrachinski F, da Silva MH, Amaral GP, Dias GRM, Barbosa NV, Soares FAA. Clomipramine treatment and repeated restraint stress alter parameters of oxidative stress in brain regions of male rats. *Neurochem Res* 2010; **35**: 1761–

- 1
2 1770.
3
4 16. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 121–126.
5
6 17. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of
7
8 hemoglobin. *J Biol Chem* 1972; **247**: 3170–3175.
9
10 18. Chen Z, Ma T, Huang C, Zhang L, Zhong J, Han J, Hu T, Li J. Efficiency of transcellular
11
12 transport and efflux of flavonoids with different glycosidic units from flavonoids of *Litsea*
13
14 *coreana* L. in a MDCK epithelial cell monolayer model. *Eur J Pharm Sci* 2014; **53**: 69–76.
15
16 19. Schmidt D, Lynch J. Evaluation of the reproducibility of Parallel Artificial Membrane
17
18 Permeability Assay (PAMPA). Millipore corporation application note, Literature Notes
19
20 AN1728EN00. 2003.
21
22
23 20. Thürmer MB, Poletto P, Marcolin M, Ferreira DG, Zeni M. Preparation and characterization of
24
25 asymmetric membranes of poly (vinylidene fluoride) supported in polyester - I: effect of heat
26
27 treatment in the properties of membranes. *Polímeros* 2010; **20**: 170–174.
28
29 21. Zhao H, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L, Lin Y, Fan W, Gu G. Effects of extraction solvent
30
31 mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free
32
33 phenolic compounds in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Agric Food Chem* 2006; **54**: 7277–
34
35 7286.
36
37 22. Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monserrat
38
39 JM. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic
40
41 organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Tot Environ* 2009; **407**: 2115–
42
43 2123.
44
45 24. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione
46
47 peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 2010; **5**: 51–66.
48
49 25. Jing L, Ma H, Fan P, Gao R, Jia, Z. Antioxidant potential, total phenolic and total flavonoid
50
51 contents of *Rhododendron anthopogonoides* and its protective effect on hypoxia-induced injury
52
53 in PC12 cells. *BMC Complement Altern Med* 2015; **15**: 1–12.
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
26. Mathai JC, Tristram-Nagle S, Nagle JF, Zeidel ML. Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *J Gen Physiol* 2008; **131**: 69–76.
 27. Mago G, Kalyon DM, Fisher FT. Membranes of polyvinylidene fluoride and PVDF nanocomposites with carbon nanotubes via immersion precipitation. *J Nanomater* 2008; **2008**: 1–7.
 28. Dagenais C, Avdeef A, Tsinman O, Dudley A, Beliveau R. P-glycoprotein deficient mouse in situ blood–brain barrier permeability and its prediction using an in combo PAMPA model. *Eur J Pharm Sci* 2009; **38**: 121–137.
 29. Walle KU, Galijatovic A, Walle T. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem Pharmacol* 1999; **58**: 431–438.
 30. Walle T. Flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med* 2004; **36**: 829–837.
 31. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 2004; **32**: 1377–1382.
 32. Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi MDLP. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim Nutr Araraquara* 2004; **15**: 285–292.
 33. Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 2001; **131**: 66–71.
 34. Lafay S, Morand C, Manach C, Besson C, Scalbert A. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *Br J Nutr* 2006; **96**: 39–46.
 35. Dube A, Nicolazzo JA, Larson I. Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (–)-epigallocatechin gallate. *Eur J Pharm Sci* 2010; **41**: 219–225.
 36. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau SC. Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations? *J Controlled Release* 2012; **158**: 182–193.
 37. Jøraholmen MW, Škalko-Basnet N, Acharya G, Basnet P. Resveratrol-loaded liposomes for

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- topical treatment of the vaginal inflammation and infections. *Eur J Pharm Sci* 2015; **79**: 112–121.
38. Gambini J, Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C. Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxid Med Cell Longevity* 2015; 1–13.
39. Friedrich RB, Kann B, Coradini K, Offerhaus HL, Beck RCR, Windbergs M. Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin. *Eur J Pharm Sci* 2015; **78**: 204–213.
40. Verjee S, Brügger D, Abdel-Aziz H, Butterwec V. Permeation characteristics of hypericin across Caco-2 monolayers in the absence or presence of quercitrin – a mass balance study. *Planta Med* 2015; **81**: 1111–1120.
41. Borrás-Linares I, Arráez-Román D, Gutiérrez AF, Herranz-López M, González-Álvarez I, Bermejo M, Micol V, Barrajon-Catalán E, Segura-Carretero A. Permeability study of polyphenols derived from a phenolic-enriched *Hibiscus sabdariffa* extract by UHPLC-ESI-UHR-Qq-TOF-MS. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 18396–18411.
42. Wang Y, Qi W, Yang X-W, Yang X, Wang K. The membrane transport of flavonoids from *Crossostephium chinense* across the Caco-2 monolayer. *Biopharm Drug Dispos* 2011; **24**: 16–24.

Figure legends

Figure 1. Molecular structures of the studied phenolic compounds using PAMPA model

Figure 2. *Ex vivo* responses using cells of cerebral cortex for the studied phenolic compounds ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ each): **(A)** Scavenging of intracellular ROS based on the levels of oxidized 2'-7'-Dichlorofluorescein, **(B)** catalase (CAT) activity, **(C)** superoxide dismutase (SOD) activity.

Figure 3. Morphological analyses by Scanning Electron Microscopy (SEM) of the $0.45 \mu\text{m}$ PVDF membranes **(A)** without and **(B)** with surface modification with phospholipid solution (2% L-a-phosphatidylcholine dodecane).

Figure 4. Permeation kinetic assays for the phenolic compounds resveratrol, quercitrin, catechin and caffeic acid in PAMPA studies using modified PVDF membranes.

Figure 5. Chromatograms of quercitrin and caffeic acid before and after permeation across the PVDF membranes in a 3h incubation period.

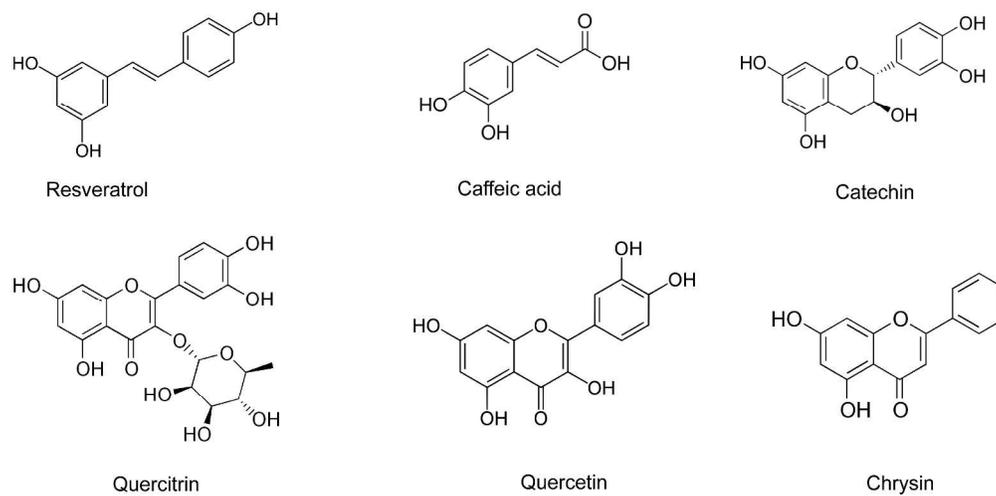
Table 1: Kinetic constants and permeability data for quercitrin, caffeic acid, catechin and resveratrol.

Phenolic compound	Kinetic constant (10^{-2}) ($\text{mmol L}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$)	Pe (10^{-6}) (cm s^{-1})
Quercitrin	3.06	20.82
Caffeic acid	2.00	14.08
Catechin	0.57	3.66
Resveratrol	0.17	1.20

Table 2: Comparative *in vitro* antiradical activity for the studied phenolic compounds ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$)

Phenolic compound	Antiradical activity (%)		
	ROO \cdot	O $_2^{\cdot-}$	HO \cdot
Quercitrin	24.20 \pm 1.95	26.6 \pm 1.3	95.9 \pm 1.2
Quercetin	88.65 \pm 0.13	40.3 \pm 1.6	62.3 \pm 1.2
Catechin	16.54 \pm 0.33	56.7 \pm 2.7	28.7 \pm 3.5
Caffeic acid	71.55 \pm 0.88	81.1 \pm 2.4	48.5 \pm 1.3
Chrysin	nd	nd	99.0 \pm 02
Resveratrol	nd	nd	9.8 \pm 0.7

nd: not detected



24 Figure 1. Molecular structures of the studied phenolic compounds using PAMPA model
25 538x261mm (300 x 300 DPI)

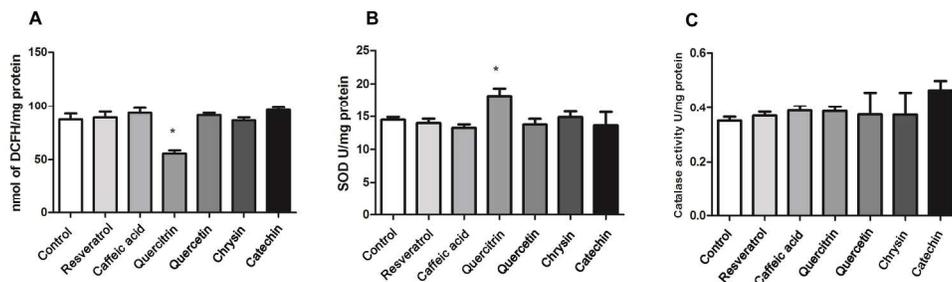


Figure 2. Ex vivo responses using cells of cerebral cortex for the studied phenolic compounds ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ each): (A) Scavenging of intracellular ROS based on the levels of oxidized 2'-7'-Dichlorofluorescein, (B) catalase (CAT) activity, (C) superoxide dismutase (SOD) activity.
208x59mm (300 x 300 DPI)

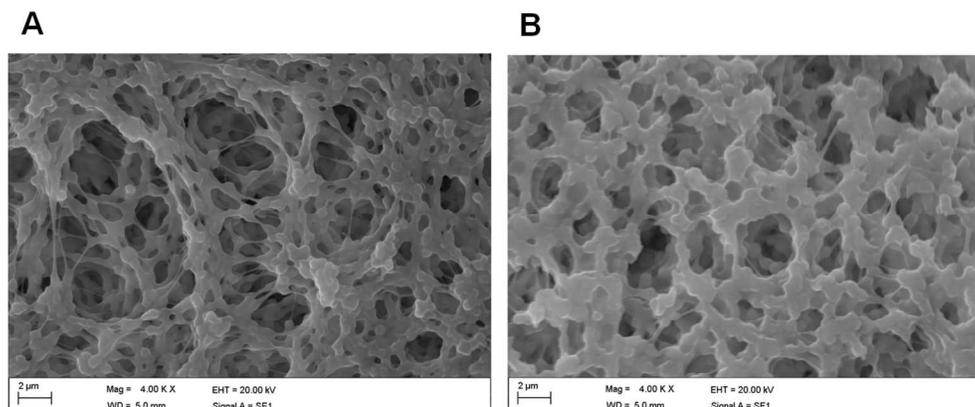


Figure 3. Morphological analyses by Scanning Electron Microscopy (SEM) of the 0.45 μm PVDF membranes (A) without and (B) with surface modification with phospholipid solution (2% L- α -phosphatidylcholine dodecane).
362x155mm (96 x 96 DPI)

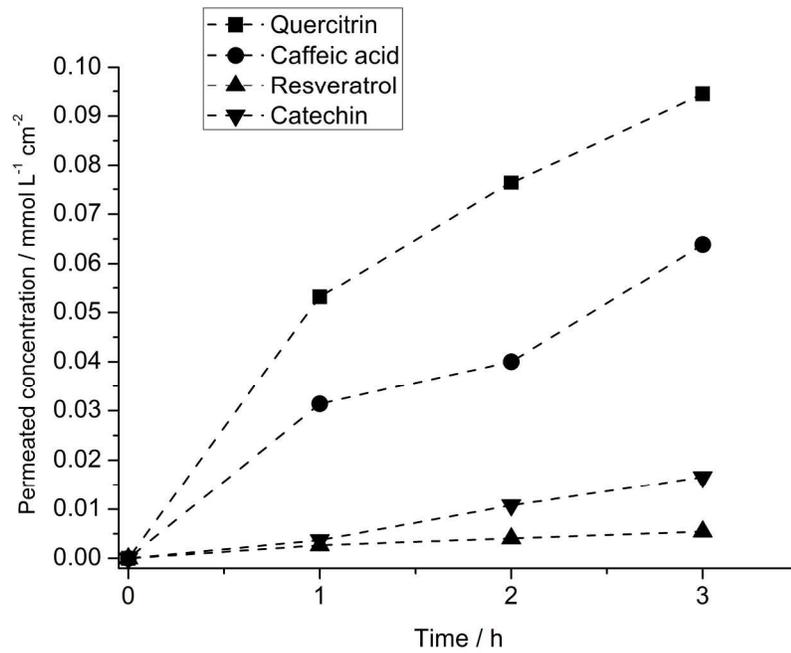


Figure 4. Permeation kinetic assays for the phenolic compounds resveratrol, quercitrin, catechin and caffeic acid in PAMPA studies using modified PVDF membranes.
216x152mm (300 x 300 DPI)

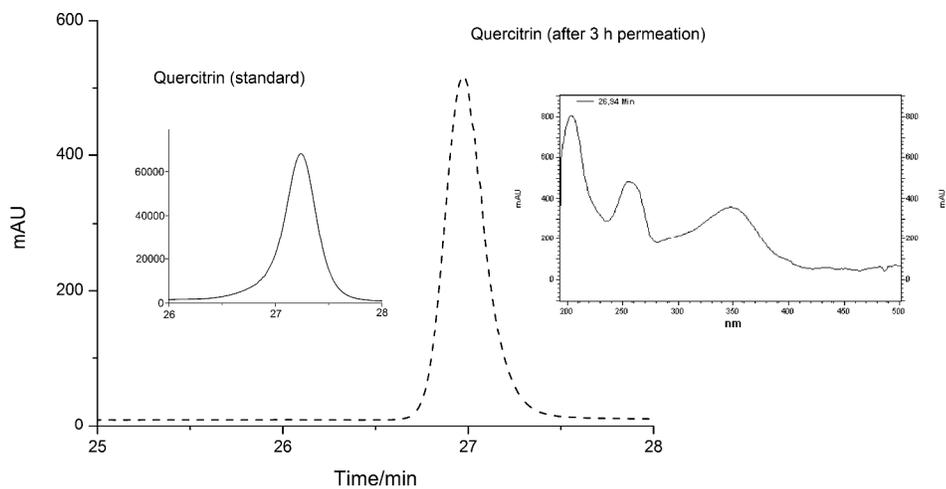


Figure 5. Chromatograms of quercitrin and caffeic acid before and after permeation across the PVDF membranes in a 3h incubation period.
433x245mm (300 x 300 DPI)

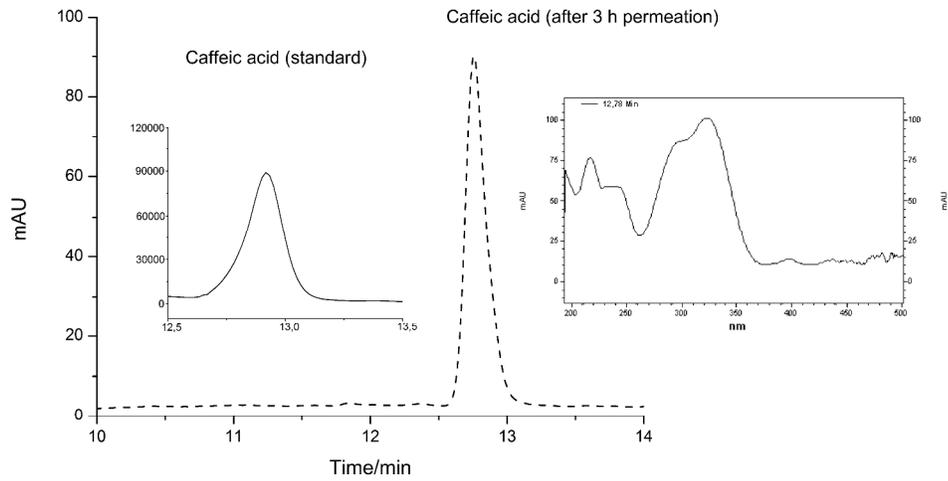


Figure 5. Chromatograms of quercitrin and caffeic acid before and after permeation across the PVDF membranes in a 3h incubation period.
447x249mm (300 x 300 DPI)

ANEXO 2 – Artigo submetido à revista Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas.

Avaliação da permeação de compostos bioativos de plantas medicinais da Amazônia através de sistemas PAMPA-TGI e PAMPA-Pele

Paula Bianchetti^{1,2}, Simone Stulp², Eduardo Miranda Ethur², Henrique Faccin¹, Leandro Machado
de Carvalho¹

Resumo

A eficácia terapêutica de compostos bioativos depende da permeação através de membranas biológicas. Este estudo avaliou a permeação de compostos fenólicos em sistemas PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), que simulam a epiderme e o trato gastrointestinal (TGI). Para a mimetização do transporte foram empregadas membranas de polivinildifluorideno (PVDF) modificadas com L-a-fosfatidilcolina 2%/dodecano (TGI) e miristato de isopropila 30%/óleo de silicone (Pele). Foram avaliados os compostos fenólicos ácido gálico, ácido ρ -cumárico, ácido vanílico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido cafeico, catequina e rutina na concentração 1 mmol L⁻¹, bem como os extratos hidroalcoólicos das plantas medicinais *Cecropia palmata*, *Bauhinia variegata* e *Conarus perrottetii* contendo estes compostos como marcadores químicos. A permeação foi avaliada no tempo de incubação de 3 h, sendo que a membrana do tipo Pele apresentou maior permeabilidade que a TGI para a maioria dos compostos estudados. O ácido clorogênico apresentou maior permeação em valores percentuais em ambas as membranas (83,01±32,66% para Pele e 75,03±3,26% para TGI) na mistura sintética contendo os compostos bioativo. Os resultados mostraram que quando os compostos estão presentes nos extratos vegetais, a permeação pode ser alterada por interferência mútua dos compostos, assim como por efeito da própria constituição da matriz complexa.

Unitermos: PAMPA, permeabilidade, biomembranas, compostos fenólicos, extratos de plantas.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Introdução

As espécies reativas de oxigênio podem causar diversas alterações no organismo humano, com a formação de bioprodutos que interferem nas reações metabólicas (Allen *et al.*, 2013). O estresse oxidativo pode causar resultados diretos e indiretos, como alterar a sinalização intracelular, interferir com processos de defesa celular, esses efeitos podem estimular o desenvolvimento de diferentes afecções no organismo como doenças cardiovasculares, neoplasias, diabetes, doenças neurodegenerativas infecções virais, bacteriológicas, osteoartrite (Menon, 2016; Gospodaryov e Lushchak, 2012). A administração de compostos bioativos favorece a homeostase dos processos metabólicos e das reações oxidativas que ocorrem no organismo humano (Ramaskrishna e Ravishanka, 2011).

Os compostos bioativos são derivados do metabolismo primário e secundário das plantas. O primeiro está relacionado com os processos de manutenção e o outro com sobrevivência das espécies, a partir da exposição a diferentes fatores ambientais. Dentre os compostos secundários, pode-se citar os ácidos fenólicos e os flavonoides. Estes compostos são relevantes para a indústria alimentícia e farmacêutica, pois contribuem com sabor, cor e odores específicos, assim como apresentam ação protetora (Singh *et al.*, 2017; Elmastas *et al.*, 2017).

Existem diversos tipos de ensaios que podem ser utilizados para a avaliação da permeabilidade de ativos, como físico-químicos, modelos computacionais, perfusão *in situ* e modelos *in vitro* e *ex vivo* (Avdeef *et al.*, 2005; Balimane *et al.*, 2006). Os ensaios mais utilizados para este tipo de testes são avaliações com células Caco-2 e o modelo *in vitro* PAMPA. O modelo Caco-2 utiliza linhagens celulares do tipo de tecido a ser testado, para avaliar a permeação de compostos em nível celular. Já o modelo PAMPA utiliza membranas poliméricas revestidas (Reis *et al.*, 2010), sendo este ensaio *in vitro* o mais utilizado, pois os dados obtidos podem ser correlacionados com a permeação animal (Kerns e Di, 2008). Tendo em vista que em organismos vivos a permeação paracelular ocorre em diversos momentos, como no jejuno (na permeação TGI -

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

administração por via oral) (Prasadani *et al.*, 2017), ou com a permeação intercelular (permeação transdérmica) (Allen *et al.*, 2013), este é um modelo que viabiliza os dados encontrados, uma vez que a modificação da membrana oferece similaridade ao tecido estudado.

O uso de plantas medicinais da flora brasileira é crescente na medicina popular. Neste contexto, o estudo da permeação dos constituintes bioativos, tanto por via oral como por via tópica, logo, é de grande relevância do ponto de vista farmacológico. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a permeação de oito compostos fenólicos (ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido cafeico, catequina e rutina) presentes em três plantas da amazônia brasileira. Além da avaliação dos compostos isolados, objetivou-se identificar se o perfil de permeação individual permanece no extrato hidroetanólico da planta ou se ocorre uma possível ação sinérgica entre os compostos fenólicos.

Materiais e Métodos

Materiais

Para este estudos foram utilizados padrões de oito compostos fenólicos: ácido gálico, (+)-catequina, rutina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido clorogênico (todos da Sigma-Aldrich). As soluções estoque dos padrões (1000 mg L⁻¹) foram preparadas dissolvendo-se quantidade apropriada das substâncias em metanol (grau HPLC) e após foram armazenadas em tubos Falcon a -30 °C até a análise. Para os testes de permeação foram feitas soluções dos padrões na concentração de 1 mmol L⁻¹.

A avaliação do extrato hidroetanólico de plantas medicinais da Amazônia brasileira, foi realizada com os extratos na concentração de 10% (m/v). As plantas foram obtidas do Horto Florestal da Embrapa Amazônia Oriental: Embaúba-vermelha (*Cecropia palmata* Willd. – registro IAN 185556), Pata-de-vaca branca (*Bauhinia variegata* – registro 18 IAN 185932) e Barbatimão

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

(*Connarus perrottetii* var. *angustifolius* Radlk. – registro IAN 184393). As plantas foram recebidas secas, prontas para a elaboração dos extratos, sendo utilizadas plantas da mesma e estação do ano.

Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄ – Vetec), hidróxido de sódio (NaOH – Synth), água ultrapura obtida a partir de um sistema Milli-Q UV Synergy (Millipore 13 SA, Molsheim, França). Os solventes, em grau HPLC, metanol e acetonitrila foram obtidos de Tedia Company (EUA), ácido fosfórico P.A. (Fmaia) para ajuste do pH.

Para a modificação das membranas do tipo PAMPA foi utilizado filtro hidrofílico de PVDF com porosidade controlada de 0,45 µm. Sobre este filtro foram dispostos diferentes composições. Para a modificação em PAMPA TGI foi utilizado L-a-fosfatidilcolina 2 % em dodecano (m/v) (Schmidt and Lynch, 2003); e para a PAMPA Pele de óleo de silicone (70 %) + miristato de isopropila (30 %) (v:v) (Otavianni *et al.*, 2006). Sobre a membrana foi disposto 5 µL das soluções e aguardou-se 15 minutos para a realização dos testes.

Instrumentação

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

As amostras permeadas foram avaliadas através de cromatografia líquida de alta eficiência com o uso do equipamento HPLC Shimadzu, com bomba LC – 20AT e detector SPD – N20A, equipado com software LC - Solutions (Shimadzu).

As corridas cromatográficas foram realizadas na temperatura de 23 °C (± 2 °C). Utilizou-se uma coluna do tipo C18, de dimensões 4,6 mm × 250 mm, tamanho de partícula de 5 µm (VertSep – GES, Vertical Chromatography). O injetor de amostras (SIL – 20AHT) é dotado de uma alça de amostragem com volume de 20 µL.

Para a separação cromatográfica dos compostos foi utilizado o modo isocrático, como eluente utilizou-se ácido fosfórico pH 3,0 (75%) e acetonitrila (25%), com fluxo de 0,8 mL min⁻¹, injeção da amostra de 20 µL e tempo de corrida de 20 minutos. Os comprimentos de onda avaliados

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

foram 210 e 320 nm. Os compostos avaliados foram adicionados em meio tampão fosfato pH 7,4 e pH 6,4, conforme avaliação (membrana) realizada.

2.2.2 Cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas (LC-MS/MS)

As separações foram realizadas em um sistema UHPLC 1260 Infinity Binary system (Agilent, Santa Clara, USA), operando com pressões de até 600 bar usando coluna de fase reversa Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HD column (2.1 × 50 mm, 1.8 m, Agilent) temperatura mantida de 40 °C. O volume de injeção foi 5 µL, as alíquotas foram acidificadas com ácido acético, com concentração final de 0,1% (v/v). A mistura dos componentes fenólicos foram separadas por gradiente de eluição composto por 0,1% de ácido acético (A) e acetonitrila (B) com uma fase móvel de fluxo constante (800 L min⁻¹) de acordo com o seguinte programa de eluição: 8,0% B (0,00–0,10 min); 8,0–25,8% B (0,10–3,45 min); 25,8–54,0% B (3,45–6,90 min); 54,0–100,0% B (6,90–7,00 min); and 100,0% B (7,00–9,00 min). Em todas as separações cromatográficas o 2-naftol foi usado como IS. O efluente cromatográfico gerado até 7 minutos, foi ionizado em uma fonte de ionização por eletropulverização, que foi otimizado para uma melhor resposta dos analitos, especialmente para estabilizar o sinal. Os parâmetros otimizado para a eletropulverização foram, fluxo de gás de 11 L min⁻¹, nebulizador de 30 psi, tensão capilar de ±2.4 kV e temperatura do gás de 250 °C, sendo o nitrogênio utilizado como gás de secagem. Os compostos foram analisados num espectrômetro de massas Agilent 6430 Triple Quadrupole operando com monitoração de múltiplas reações, com resolução de 0.7 m/z (FWHM). Nitrogênio ultrapuro (99.999%) obtido de Linde (Munich, Germany) foi usado para induzir a colisão.

O efluente cromatográfico gerado entre 7,0 e 9,0 min foi descartado, o que pode ser caracterizado como uma etapa de limpeza para a coluna cromatográfica. Após o término do programa de gradiente, aguardou-se 4 minutos para reequilibrar o sistema, baseado na pressão

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

inicial. Os dados obtidos foram avaliados através da análise qualitativa do software MassHunter (versão B.04.00, Build 4.0.479.0, Agilent Technologies, Inc., 2011).

Procedimentos experimentais

A avaliação da permeação dos compostos foi realizada com placas de 96 poços conforme protocolo Milipore®. Essa placa foi utilizada como uma célula de difusão vertical do tipo Franz. Nela há um compartimento doador e um compartimento receptor, sendo que entre os compartimentos fica disposta uma membrana de PVDF (hidrofóbica) com poro de 0,45 µm. A placa foi disposta em um banho ultratermostatizado, para simular o aquecimento corpóreo de cada via avaliada, sendo 37 °C (± 0,5 °C) para PAMPA TGI; e 32 °C (± 0,5 °C) para PAMPA Pele.

A solução utilizada nos compartimentos (doador e receptor) foi tampão fosfato pH 7,4 (PAMPA TGI) e pH 6,4 (PAMPA Pele). Este pH simula o fisiológico, sendo que no compartimento doador foi adicionado 1 mmol L⁻¹ dos padrões testados e 10% do extrato hidroetanólico. Foram determinadas a partir destas amostras a quantidade permeada em mmol L⁻¹ e o percentual de permeação, no tempo de 3 horas. As avaliações foram realizadas em triplicata.

Avaliação das membranas modificadas

2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a avaliação das membranas modificadas foi utilizada Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss, modelo LS-10, detector SE e a tensão de 20 kV.

Para a realização do estudo das membranas, foi aplicado sobre a membrana de PVDF o composto referente a respectiva modificação (PAMPA TGI ou Pele), a membrana foi disposta sobre o stub com fita de carbono e metalizada com camada de ouro (Sputtering – Quorum, modelo Q 150R ES), para que fosse possível a visualização da imagem no microscópio. As imagens foram

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

capturadas em aumentos de até 4000 vezes. O tamanho dos poros das membranas foi avaliado com o software CorelDraw a partir de imagens com aumento de 1000 vezes. A imagem da membrana foi dividida em quadrantes e de cada um deste foi avaliados 20 poros.

Difusão de íons

Para a validação das membranas, foi realizada a avaliação da difusão de íons de acordo com Thürmer e colaboradores (2010), sendo que para o ensaio foi utilizada uma célula de difusão vertical de dois compartimentos (doador e receptor), separados por uma membrana de PVDF modificada (de acordo com a membrana a ser testada), tendo como compartimento receptor água deionizada e como compartimento doador uma solução de KCl ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). As alíquotas da célula de difusão foram retiradas em tempos de 1, 2, 3 e 4 horas e analisadas pela medida de condutividade elétrica. Para o controle da difusão de KCl através da membrana, foi construída uma curva de calibração ($y = 5798,92x + 18,47$ $R^2 = 0,997$) pela medida da condutividade de várias concentrações de KCl.

Análise dos resultados

A avaliação quantitativa dos compostos permeados foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC – DAD). A tabulação, análises dos resultados e gráficos obtidos foram realizadas através do software Microsoft Excel®.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Resultados e Discussão

Caracterização e diferenciação das membranas PAMPA TGI e PAMPA Pele

O estudo da permeação de ativos através de membranas do tipo PAMPA possibilita identificar se a permeação de compostos por diferentes vias de administração é efetiva. Neste estudo foi possível a avaliação da administração de compostos fenólicos por duas vias primárias, TGI (administração via oral) e pele (administração via transepidermica).

A via mais comumente utilizada para a administração de fármacos é a via oral, por sua fácil adesão e conveniência de tratamento. No entanto, para que ocorra eficácia é necessário uma determinada concentração de ativo (concentração alvo/efetiva) disponível no TGI, assim como adequado pH do meio gástrico para não causar danos a estrutura dos compostos (Di *et al.*, 2003).

As possibilidades de rotas de permeação no TGI são variadas, sendo que a difusão passiva é a que ocorre com mais frequência e facilidade no processo de permeação no TGI. Esta ocorre através dos enterócitos, por via transcelular ou por rota paracelular (via junções oclusivas). A primeira ocorre em todo o TGI e a segunda está disponível apenas no intestino delgado (Schneider, Baringhaus, 2008).

Em testes *in vitro*, a diferença entre transporte ativo e por efluxo pode ser verificado através de testes com células Caco-2 e ensaio PAMPA (Kerns *et al.*, 2004). *In vivo*, o processo de absorção pelo TGI é dependente de eventos relacionados a aspectos fisiológicos, fatores físico-químicos inerentes à substância, como logP (constante de permeabilidade), solubilidade, pKa, quantidade de hidrogênios doadores e aceptores, peso molecular e área de superfície polar (Deferme *et al.*, 2008). A absorção gastrointestinal é o processo final da digestão de alimentos. Neste processo, através de processos físicos (mastigação), químicos (enzimas) e físico-químicos (emulsificação) há a quebra ou modificação dos alimentos, levando a transformação de componentes mais simples passíveis de absorção (Douglas, 2011).

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

No caso da permeação de polifenóis, quando utilizados na dieta, estes apresentam baixos valores de permeação, entre 10 e 20%. Isto ocorre pelo fato da permeação destes compostos ocorrer por via paracelular, que facilita a permeação de pequenas moléculas hidrofílicas (Prasadani *et al.*, 2017). Por outro lado, a pele pode oferecer diversas vantagens na administração de princípios ativos, como atingir o tecido alvo com maior facilidade, reduzir os efeitos sistêmicos e a flutuação plasmática da dose do composto administrado. Em geral, o tratamento por via transcutânea aumenta adesão ao tratamento pela facilidade de uso, evita o metabolismo de primeira passagem (Chen *et al.*, 2013) e alterações causadas pelo pH gastrointestinal. Além disso, a administração transcutânea proporciona o uso de várias doses durante o dia com uma única aplicação (liberação controlada), ampliando ação do ativo que possui meia vida curta, assim como permite a rápida parada da administração do fármaco caso seja necessário (Tozer, 2009). Neste sentido, a morfologia é importante nestes processos de liberação e permeação, tanto para a membrana pele como a do TGI.

A avaliação através de MEV, possibilitou a visualização das duas membranas utilizadas neste estudo: PAMPA TGI (FIGURA 1A) e PAMPA Pele (FIGURA 1B).

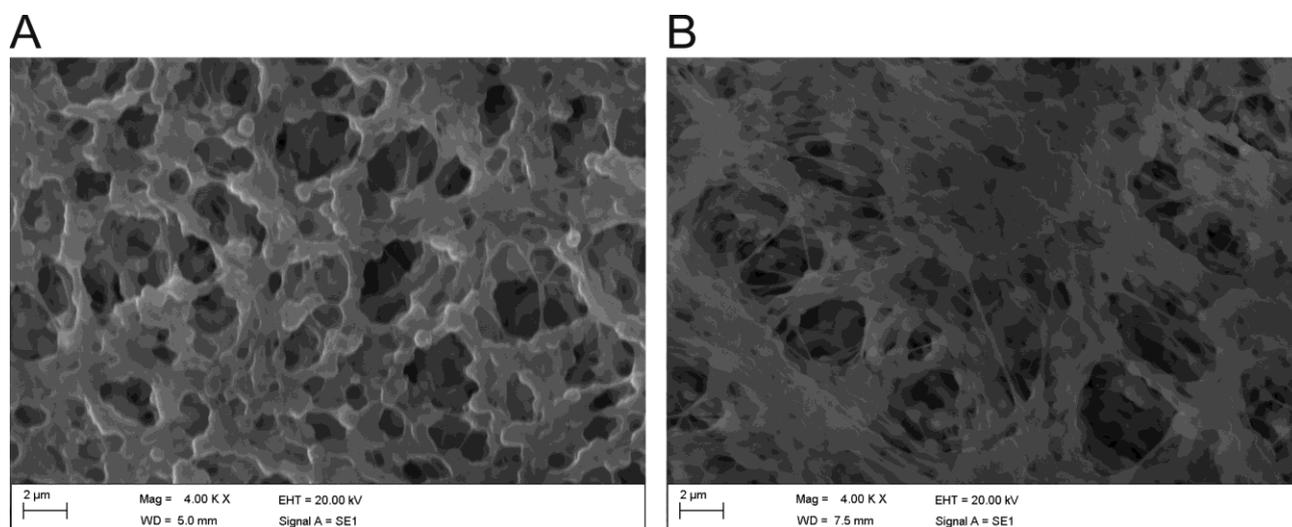


Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura da modificação do filtro de PVDF. Aumento de 4000 x. (A) membrana PAMPA TGI (B) membrana PAMPA Pele.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Além disso, a avaliação do tamanho superficial dos poros apresentou uma porosidade média para PAMPA TGI de 3,05 μm ($\pm 1,16 \mu\text{m}$) e PAMPA Pele de 5,14 μm ($\pm 2,70 \mu\text{m}$). Aqui, é possível avaliar que as membranas modificadas apresentam estabilidade no tamanho dos poros após a deposição dos seus modificadores. Ademais, verifica-se essa diferença a partir da FIGURA 1, em que apresenta a morfologia das membranas PAMPA Pele, sendo que o maior recobrimento superficial simula o tegumento.

A pele humana apresenta porosidade aproximada de 5 a 10 μm de diâmetro, quando avaliados os poros das glândulas sudoríparas e crinas. Ao se avaliar a porosidade dos folículos pilosos, observa-se porosidade maior, entre 40 e 80 μm (Plewig and Kliegman, 2000). As diferenças de porosidade podem ser influenciadas por diversos aspectos ambientais e hereditários (Flament *et al.*, 2015). Por outro lado, o TGI apresenta porosidade menor se comparada à superfície da pele, apresentando dois tamanhos de poro, sendo que os poros menores recobrem a maior parte da superfície do TGI (Linnankoski *et al.*, 2010).

Corroborando os ensaios morfológicos, a difusão de íons para as membranas com e sem modificação mantém-se inalteradas independentemente do recobrimento. Para todas as membranas avaliadas, observou-se o incremento crescente em função do tempo entre 1 h e 3 h de ensaio.

Sendo assim, o resultado demonstrou um sistema de difusão simples em que há o fluxo de íons do meio mais concentrado para o menos concentrado, havendo incremento da concentração no compartimento receptor (Alberts, 2008). Com isso, tem-se um sistema íntegro e apresentando adequada passagem de íons, o que permite as adequadas avaliações dos compostos estudados.

Estudos da permeação de compostos fenólicos isolados por PAMPA TGI e PAMPA Pele

Os compostos fenólicos apresentam grande relevância terapêutica, tanto na minimização de respostas agudas, como no retardo de alterações de sistema nervoso central e/ou periférico. Além disso, podem inibir respostas oxidativas e inflamatórias no organismo humano (Rahman *et al.*,

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

2007; Ratnam *et al.*, 2006; Sigh *et al.*, 2010, Carochó e Ferreira, 2013). Estes compostos são amplamente encontrados em plantas com fins medicinais, sendo o uso popular de muitas espécies amplamente difundido. No entanto, é preciso avaliar sua composição quanto a compostos majoritários e minoritários. Além disso, faz-se importante o estudo da ação individual destes compostos, para que se conheça melhor as respostas terapêuticas e sua eficácia. Para tanto, neste estudo foram realizadas avaliações quantitativas para verificar qual a composição da amostra e quais os compostos fenólicos majoritários apresentam alguma viabilidade para permear os diferentes tipos de membranas sintéticas modificadas.

Neste trabalho, a caracterização dos extratos obtidos das plantas foi realizada por HPLC com detecção por espectrometria de massa (LC-MS/MS) identificando quais os compostos mais abundantes presentes nos extratos hidroetanólicos (Faccin *et al.*, 2016). Sendo assim, os estudos de permeação foram direcionados aos compostos que apresentavam maior quantidade disponível.

Os oito compostos majoritários identificados e quantificados por LC-MS/MS apresentam propriedades antioxidantes (FIGURA 2), sendo que 6 são ácidos fenólicos e 2 flavonóis.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

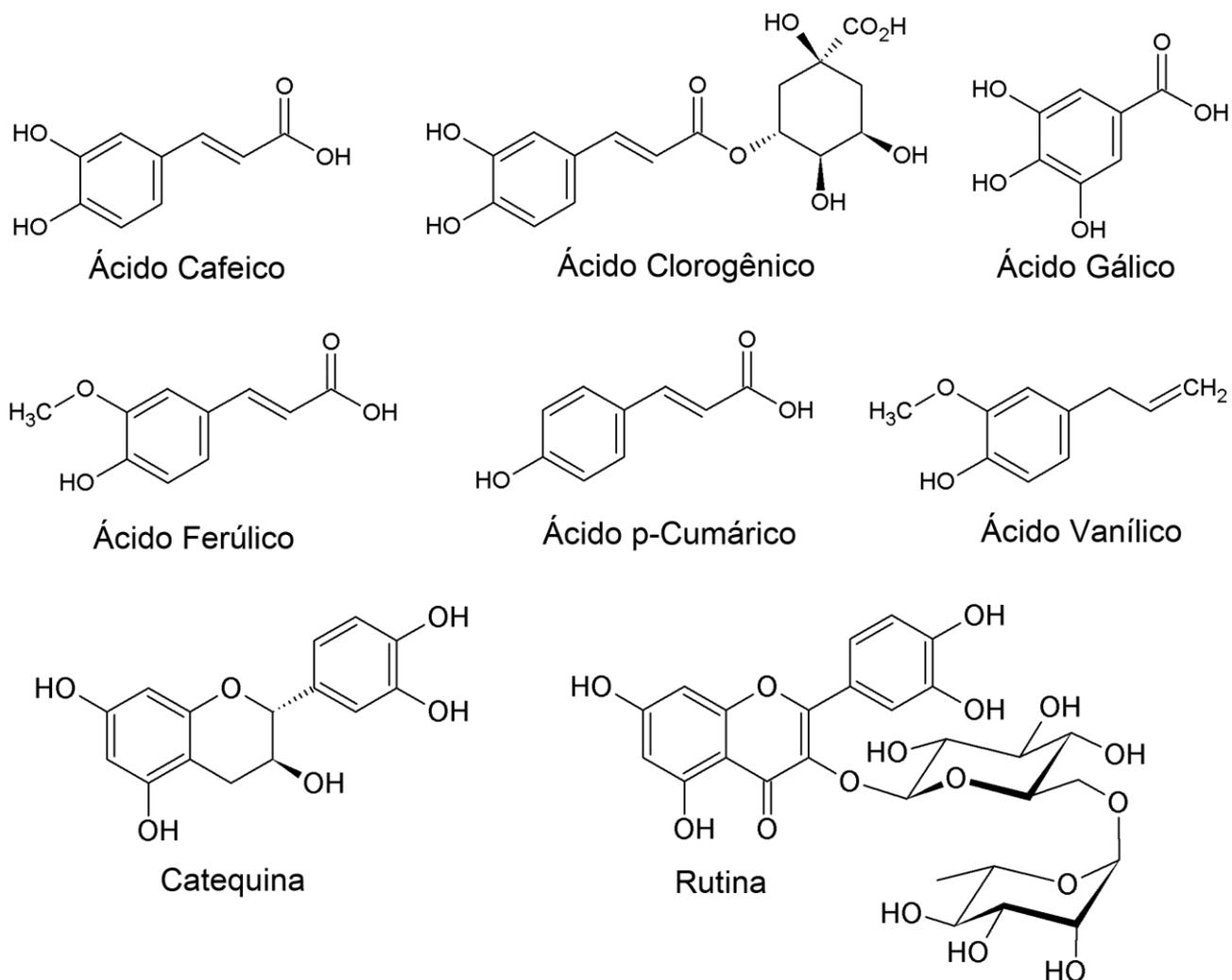


Figura 2 – Estrutura química dos compostos fenólicos selecionados a partir do estudo de quantificação por LC–MS/MS nos extratos das plantas.

Diferenças estruturais oferecem a estas classes de compostos variadas ações biológicas, assim como diferentes interações e perfis de permeação frente a diversas vias de entrega. A FIGURA 3 apresenta a quantidade permeada dos compostos estudados nas membranas PAMPA TGI e PAMPA Pele.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

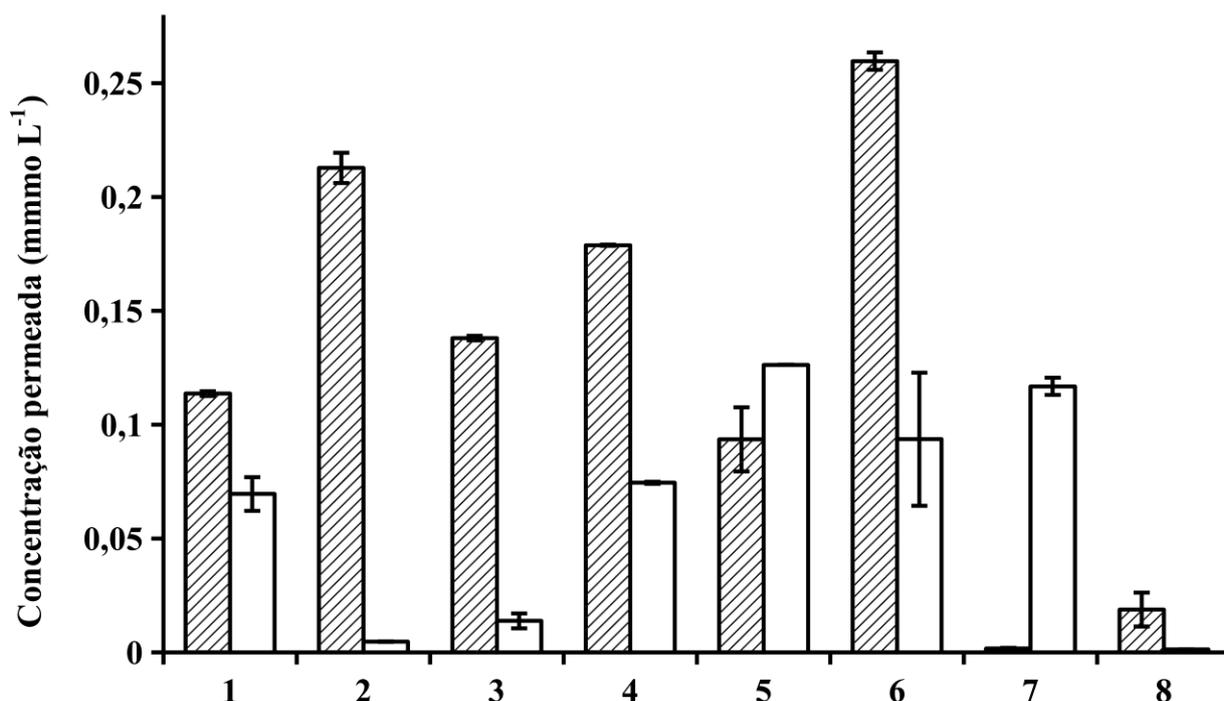


Figura 3 – Permeação dos diferentes compostos fenólicos (mmol L^{-1}) em membrana PAMPA Pele (coluna hachurada) e PAMPA TGI (coluna branca) no tempo de 3 h. (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido p-cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico.

Os resultados encontrados corroboram as características apresentadas por cada membrana (FIGURA 3), sendo que a PAMPA Pele apresenta maior quantidade de compostos permeados. Esta situação pode relacionar-se com o fato de que esta apresenta poros maiores que a membrana PAMPA TGI, podendo assim facilitar a permeação dos compostos estudados.

Observa-se a partir da FIGURA 3 que, na permeação individual, os compostos catequina ($0,259 \text{ mmol L}^{-1} \pm 0,003$), ácido gálico ($0,212 \text{ mmol L}^{-1} \pm 0,006$), ácido clorogênico ($0,178 \text{ mmol L}^{-1} \pm 0,003$) e ácido cafeico ($0,138 \text{ mmol L}^{-1} \pm 9,9 \times 10^{-4}$) apresentaram maior quantidade permeada no sistema PAMPA Pele, enquanto que para PAMPA TGI os compostos rutina ($0,116 \text{ mmol L}^{-1} \pm 0,003$), ácido p-cumárico ($0,126 \text{ mmol L}^{-1} \pm 6,03 \times 10^{-5}$), ácido clorogênico ($0,074 \text{ mmol L}^{-1} \pm 4,5 \times 10^{-4}$) e catequina ($0,093 \text{ mmol L}^{-1} \pm 0,029$) apresentaram maior permeação.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Neste caso, o caráter lipofílico da PAMPA Pele pode estar favorecendo a permeação dos compostos. Cabe destacar que dos compostos com maior permeação nesta membrana, a catequina é a que apresenta maior hidrofobicidade.

Já para a membrana PAMPA TGI, com caráter mais hidrofílico, os compostos que apresentaram maior permeação igualmente possuem maior hidrofiliabilidade, como é o caso dos ácidos p-cumárico e clorogênico. Por sua vez, os demais ácidos fenólicos deste estudo apresentaram valores de permeação reduzidos, fatores que podem estar relacionados com o tamanho molecular. A exceção de comportamento deste estudo foi a rutina que apresentou maior permeabilidade na membrana PAMPA TGI, apesar de ser mais hidrofóbica.

A forma glicosilada intacta dos flavonoides é dificilmente absorvida no intestino delgado. Para a rutina, o favorecimento da hidrofiliabilidade após processo de absorção ocorre em função da perda de seu grupo funcional glicosilado, formando quercetina 3-glicosídica e quercetina. Após a quebra, a molécula passa a apresentar maior afinidade e assim é melhor absorvida (Manach *et al.*, 1997; Behling *et al.*, 2004).

Cabe salientar que o ácido clorogênico apresenta permeação nos dois sistemas estudados, mesmo não apresentando a maior quantidade absoluta permeada. Este fato deve-se provavelmente às características de sua estrutura química e sua tendência à hidrofiliabilidade. Este composto, quando presente em plantas, possui grande variabilidade de isômeros e diferentes conjugações com outros ácidos (De Maria e Moreira, 2004), fato este que pode interferir e/ou facilitar os processos de permeação do composto em diferentes meios hidrofílicos e lipofílicos.

Outro aspecto que interfere na capacidade de absorção e permeação é a baixa solubilidade em meio aquoso (Souza, 2015) apresentada pelos compostos aqui estudados, além de variações de hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade (Araújo, 2016). Assim, os compostos fenólicos utilizados apresentam dificuldade em transpor as membranas com caráter mais hidrofílico, como é o caso da PAMPA TGI, com exceção da rutina, que permeia melhor nesta membrana por apresentar-se como

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

um composto glicosilado. Os flavonoides não glicosilados podem ser absorvidos com maior eficácia pelas células epiteliais, devido à sua lipofilicidade, que facilita a transposição de barreiras fosfolipídica das membranas celulares (Murota *et al.*, 2003). Assim, compostos como a catequina e, de forma análoga, o ácido clorogênico e ácido cafeico, apresentam maior habilidade em transpor a membrana modificada do tipo Pele.

Outro fator que pode interferir na passagem dos compostos através das membranas é a sua carga iônica. Substâncias não ionizadas apresentam maior facilidade de permeação paracelular (Tozer, 2009), permeação esta simulada pelas membranas do tipo PAMPA. A partir disso é possível inferir sobre as diferenças de permeação dos compostos deste estudo, pois mesmo que apresentem lipofilicidade e tamanho molecular semelhantes, há diferentes perfis de permeação. Isso deve-se ao fato de que suas cargas iônicas são diferentes, principalmente pela disponibilidade de hidrogênios estrutural de cada composto. Essa ação dos pólos pode estar ocorrendo na permeação do ácido vanílico, que apresenta ionização negativa (Libardi, 2010), o que pode reduzir significativamente a passagem pelas membranas biológicas, quando avaliada permeação por via paracelular.

Além das diferenças estruturais, lipofilicidade e carga iônica dos compostos, a formação de metabólitos ou subprodutos destes compostos pode interferir na permeação, já que esses apresentam capacidade de doação de hidrogênio ionizável facilitada. Alguns dos compostos estudados cedem esses hidrogênios de forma mais eficaz devido à função ácido carboxílico em suas estruturas. No entanto, no ácido clorogênico existe a possibilidade de formação de uma ponte de hidrogênio interna entre a função ácida e um grupo OH geminal, o que diminuiria a acidez da molécula e facilitaria a transposição na membrana menos polar (TGI). Os demais ácidos podem estar se ionizando e dificultando a passagem pela membrana em pH 7,4.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Estudo da permeação de compostos fenólicos em extratos vegetais

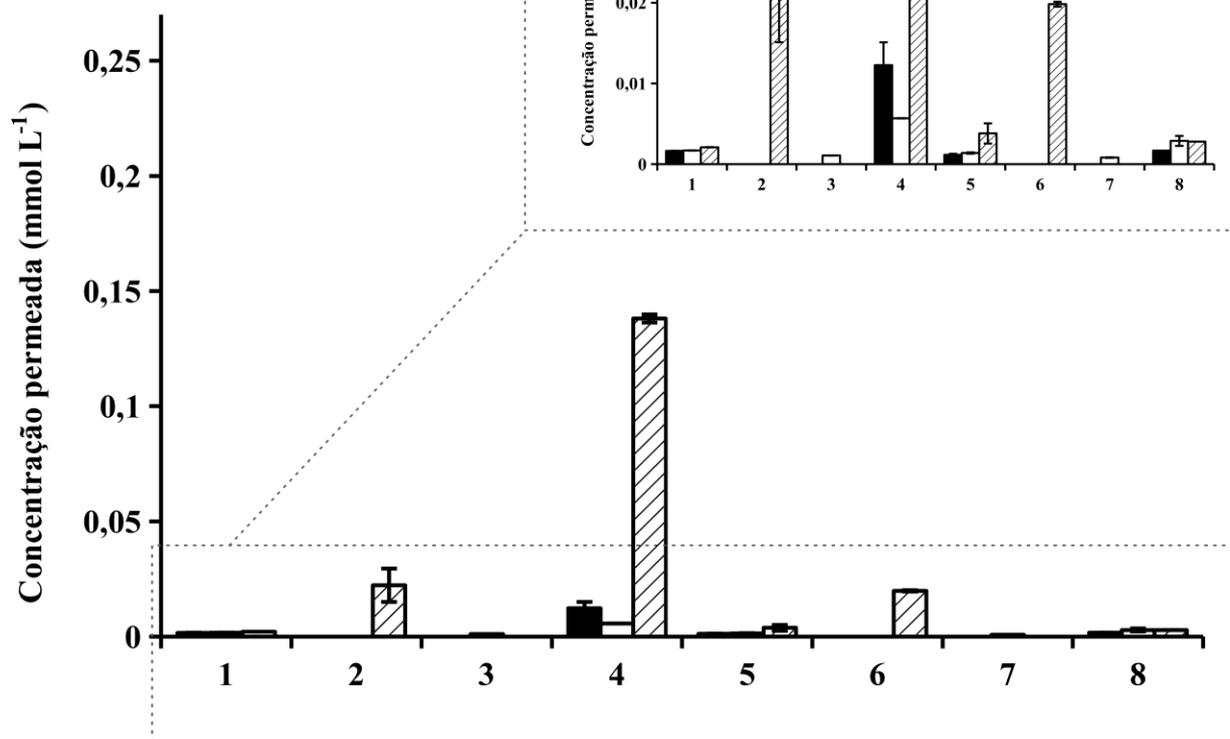
Os extratos vegetais possuem uma variabilidade química e vias metabólicas secundárias complexas, capazes de criar uma grande diversidade de compostos. O Brasil é um dos países que apresenta maior biodiversidade, tanto pelo número de exemplares, como pela complexidade de seus biomas (Pimentel *et al.*, 2015). Neste estudo, foram selecionadas três espécies vegetais da região amazônica a partir de seus extratos hidroetanólicos, que apresentam os oito compostos descritos anteriormente como marcadores químicos em concentrações relevantes (Faccin *et al.*, 2016).

A FIGURA 4 apresenta a concentração de permeação dos oito compostos fenólicos estudados, quando realizada a exposição dos extratos às membranas sintéticas. Observa-se na FIGURA 4 que o ácido clorogênico tem a capacidade de transpor ambas membranas em todas as espécies estudadas, não sendo este o comportamento de todos os compostos estudados. O ácido cafeico consegue permear no sistema PAMPA Pele em todos os extratos. Já a catequina permeia somente no extrato de *Cecropia palmata*. Comparando-se a FIGURA 3 e 4, é possível observar a interação que ocorre entre os compostos. Este sinergismo relaciona-se com a complexidade da matriz do extrato que pode favorecer a interação entre os compostos bioativos. Verifica-se, ainda, uma tendência de redução da porcentagem de permeação dos compostos quando avaliados no extrato e comparado com a permeação individual.

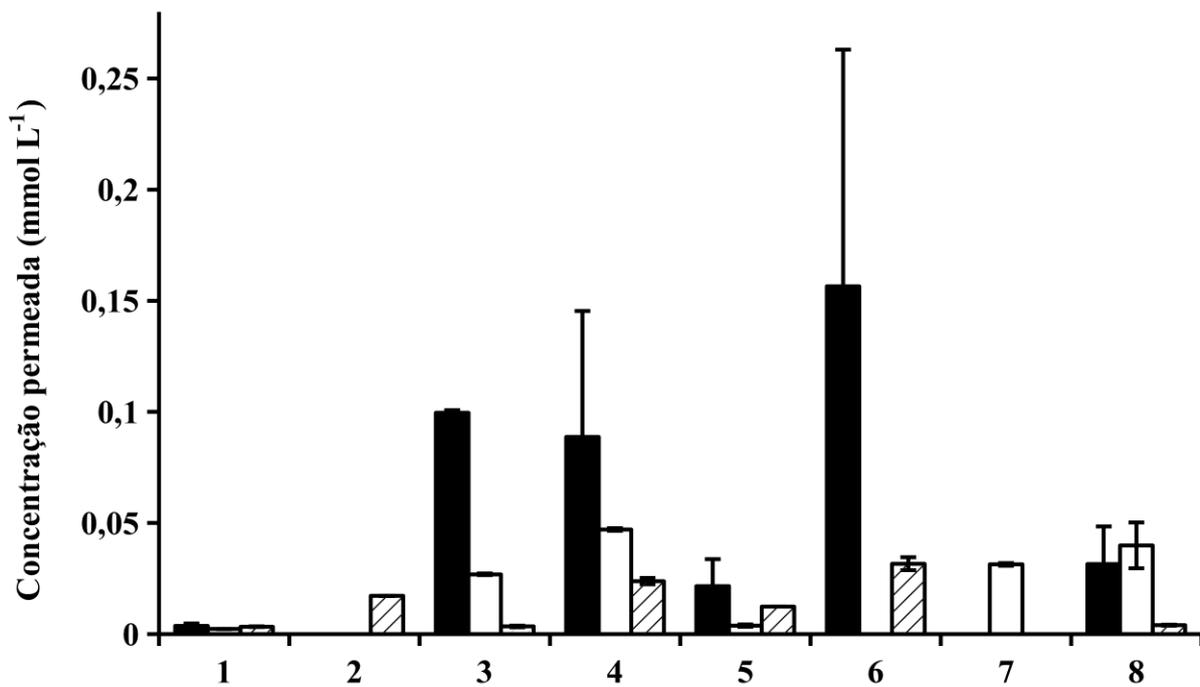
¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

A



B



¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Figura 4 – Permeação em mmol L^{-1} no tempo de 3 h dos diferentes compostos fenólicos presentes no extrato hidroetanólico (10%, m/v) nas espécies de plantas, em membranas do tipo PAMPA TGI (A) e PAMPA Pele (B). Preto= *Cecropia palmata*; branco= *Bauhinia variegata*; hachurado= *Conarus perrotteti*, sendo: (1) ácido ferúlico (2) ácido gálico (3) ácido cafeico (4) ácido clorogênico (5) ácido p-cumárico (6) catequina (7) rutina (8) ácido vanílico.

Desta forma, o estudo da permeação de uma solução contendo uma mistura dos compostos estudados é importante para avaliar a ação do meio em que estes estão inseridos, uma vez que quando presentes em uma matriz complexa, o perfil de permeação pode ser alterado por interferência mútua, assim como por efeito da própria matriz utilizada.

A partir da avaliação da permeação (em mmol L^{-1}) dos compostos bioativos misturados em uma solução, foi possível observar que para a membrana PAMPA Pele ocorreu a redução de permeação do ácido cafeico e o favorecimento da passagem dos compostos ácido vanílico e rutina. Para a membrana PAMPA TGI foi possível identificar o aumento do ácido clorogênico. Por sua vez o ácido gálico que individualmente apresentava dificuldade de permeação, passa a transpor a membrana. Ainda, observa-se a manutenção de permeação do ácido p-cumárico, sendo que os demais compostos apresentam intensa redução de permeação (dados não apresentados).

Com isso, foi avaliada a porcentagem de permeação dos compostos isolados, misturados e no extrato vegetal (TABELA I), podendo assim comparar de forma efetiva a ação da matriz, do meio e os efeitos sinérgicos sobre o processo de permeação nas membranas estudadas.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Tabela I – Comparativo dos percentuais de permeação na membrana PAMPA TGI e PAMPA Pele, dos compostos bioativos isolados, da mistura e dos extratos hidroetanólicos no tempo de 3 h. ND = não disponível na planta, NP = não permeou

PAMPA Pele					
	Composto isolado	Composto na	<i>Cecropia</i>	<i>Bauhinia variegata</i>	<i>Connarus perrottetii</i>
	(%)	mistura sintética (%)	<i>palmata</i> (%)	(%)	(%)
Ácido Ferúlico	45,99 (±3,27)	38,45 (±2,32)	4,86 (±1,39)	19,41 (±0,19)	8,89 (±0,33)
Ácido Gálico	56,45 (±1,41)	22,60 (±18,67)	ND	ND	18,71 (±0,05)
Ácido Cafeico	32,58 (±0,92)	2,61 (±0,39)	3,53(±0,04)	47,23 (±0,62)	39,89 (±4,29)
Ácido Clorogênico	89,39 (±8,03)	83,01 (±32,66)	4,12 (±2,68)	15,32 (±0,18)	4,93 (±0,28)
Ácido p-Cumárico	31,28 (±4,72)	22,61 (±2,82)	17,31 (±7,69)	12,77 (±1,77)	24,64 (±0,03)
Catequina	57,26 (±8,39)	31,33 (±5,26)	5,52 (±3,75)	NP	18,54 (±1,68)
Rutina	0,44 (±0,06)	26,69 (±1,36)	ND	6,72 (±0,12)	ND
Ácido Vanílico	1,82 (±0,72)	6,29 (±0,45)	0,79 (±0,42)	13,80 (±3,57)	3,43 (±0,16)

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

PAMPA TGI					
	Composto isolado (%)	Composto na mistura sintética (%)	<i>Cecropia palmata</i> (%)	<i>Bauhinia variegata</i> (%)	<i>Connarus perrottetii</i> (%)
Ácido Ferúlico	37,38 (±0,36)	0,66 (±0,04)	2,19 (±0,02)	14,75 (±0,21)	5,67 (±0,02)
Ácido Gálico	1,68 (±0,02)	15,38 (±1,69)	ND	ND	18,19 (±7,62)
Ácido Cafeico	4,36 (±0,84)	0,38 (±0,07)	NP	1,91 (±0,01)	NP
Ácido Clorogênico	46,88 (±0,77)	75,03 (±3,26)	0,57 (±0,13)	1,85 (±0,005)	28,91 (±0,37)
Ácido p-Cumárico	56,28 (±0,02)	18,94 (±0,06)	0,93 (±0,09)	4,44 (±0,26)	9,37 (±2,49)
Catequina	26,95 (±3,56)	2,64 (±0,41)	NP	NP	11,44 (±0,17)
Rutina	27,90 (±0,64)	3,63 (±1,59)	ND	0,18 (±0,005)	ND
Ácido Vanílico	0,15 (±0,0005)	0,61 (±0,05)	0,042 (±0,0001)	0,84 (±0,21)	2,38 (±0,0002)

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Avaliando os resultados da Tabela I, pode-se observar que a composição da matriz vegetal influencia na porcentagem de permeação dos compostos, uma vez que cada planta apresenta diferentes quantidades e tipos de compostos fenólicos estudados, assim como dos demais componentes da matriz orgânica.

Ainda, observa-se que a porcentagem de permeação, de forma geral, reduz na membrana PAMPA Pele quando comparada à avaliação da solução contendo a mistura dos compostos em relação à solução contendo o composto isolado (com exceção da rutina e do ácido vanílico). Na membrana PAMPA TGI há o mesmo padrão observado na PAMPA Pele, com exceção dos compostos ácido gálico, ácido clorogênico e ácido vanílico.

Quando avaliada a porcentagem de permeação dos extratos hidroetanólicos, em geral, observa-se uma diminuição da permeação nas diferentes espécies. Para o ácido cafeico há a redução de permeação na planta *Cecropia palmata* quando comparado ao estudo individual. No entanto, há similaridades entre os percentuais do extrato de *Cecropia palmata* e da solução sintética.

O ácido clorogênico está entre os compostos que apresentaram maiores quantidades permeadas (em mmol L^{-1}) na avaliação individual dos compostos (FIGURA 1). Já quando avaliada a porcentagem de permeação, observa-se que o extrato que apresenta o maior percentual é o de *Bauhinia variegata* na PAMPA Pele. Na PAMPA TGI a permeação do ácido clorogênico é maior na espécie *Connarus perrottetii*.

O efeito da influência da matriz sobre a permeação dos compostos bioativos pode ser suportado pelas diferenças da composição química de cada espécie, como demonstrado nos cromatogramas na FIGURA 5.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

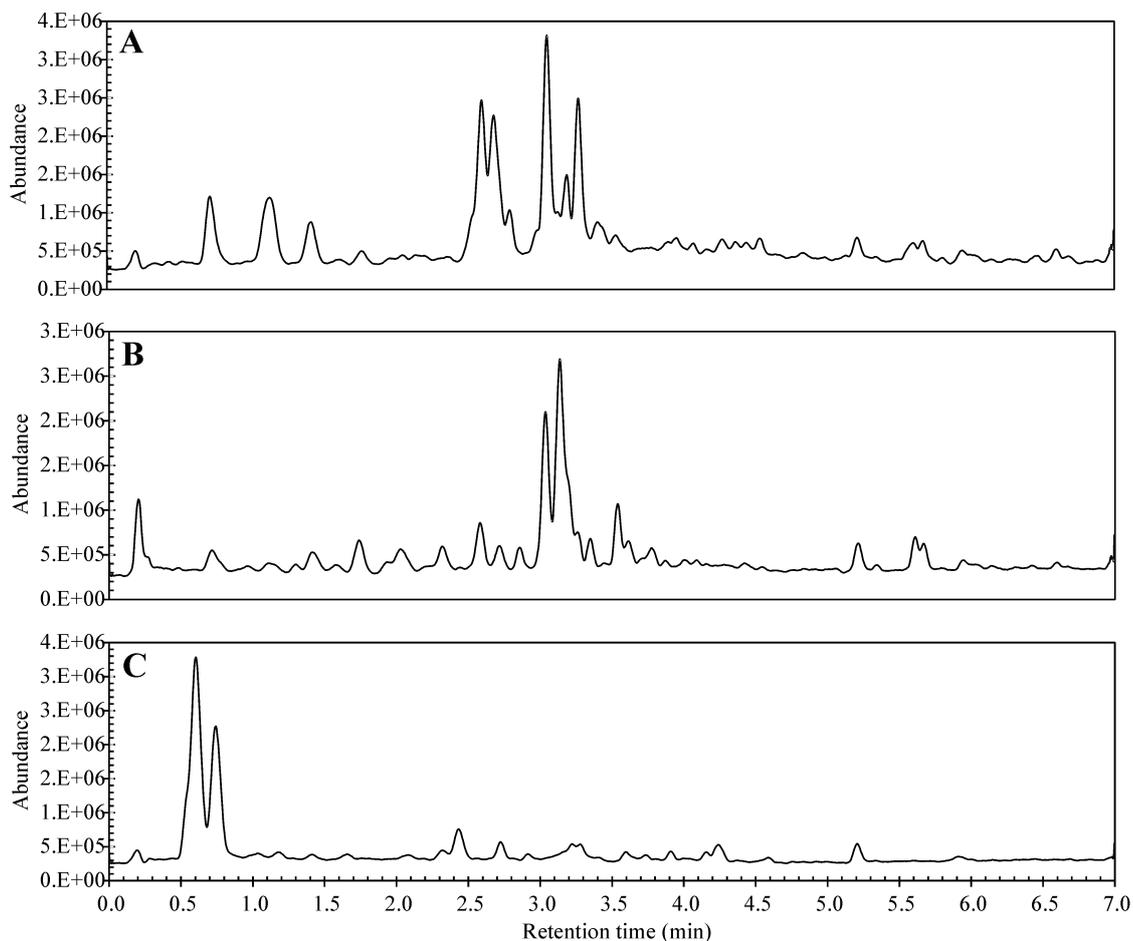


Figura 5 – Cromatogramas do tipo “*fingerprint*” para infusões das espécies por UHPLC-(–)ESI-MS, em modo de varredura (m/z 135-620). (A) *Cecropia palmata*, (B) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (C) *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*.

A FIGURA 5 mostra os cromatogramas do tipo “*fingerprint*” para as infusões das espécies estudadas obtidos por UHPLC-ESI-MS no modo de aquisição por varredura (m/z 135-620, com um tempo de varredura igual a 300 ms) com ionização em polaridade negativa. Nesta figura, diferenças significativas podem ser vistas entre os cromatogramas obtidos, o que pode confirmar a identidade química das plantas dentro de um mesmo gênero botânico. Destaca-se aqui a significativa diferença do perfil cromatográfico obtido para *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*, mostrando que a casca da referida espécie apresenta uma identidade química bastante diferente das folhas de *Cecropia palmata* e *Bauhinia variegata* var. *variegata*.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Conclusões

Este trabalho verificou que a permeação de compostos fenólicos em sistemas que simulam a epiderme e o trato gastrointestinal é diferenciada dentro de uma mesma classe de compostos. As diferenças estruturais, a lipofilicidade e a carga iônica podem influenciar a permeabilidade de compostos fenólicos. Além disso, observou-se que a interferência mútua dos compostos em uma mistura e o efeito da constituição da matriz (extrato hidroalcoólico da planta) também afetam a permeabilidade através das membranas estudadas no modelo PAMPA. A membrana do tipo Pele apresentou maior permeabilidade que a TGI para a maioria dos compostos estudados. Dentre os oito compostos fenólicos presentes como principais marcadores nos extratos de plantas estudados, o ácido clorogênico apresentou maior permeabilidade para as membranas estudadas em misturas sintéticas. No entanto, o mesmo não se aplica a extratos de plantas, provavelmente pelo efeito da matriz, onde sua estrutura química com a presença do ácido quínico pode interferir na permeação. Além disso, observou-se que a rutina não apresenta permeação significativa na sua forma isolada e também nos extratos na membrana tipo Pele. Entretanto, na membrana tipo TGI, a rutina apresenta permeação significativa de forma isolada, o que indica o efeito da matriz complexa sobre a permeação de diferentes compostos. Assim, compostos fenólicos apresentam efeitos sinérgicos que alteram o perfil de permeação em diferentes situações, dependendo do tipo de membrana, meios diferentes e composição das matrizes onde se encontram. A presença de uma matriz complexa altera significativamente a permeação de compostos bioativos, sendo que diferentes extratos influenciam diferentemente a permeação e absorção dos compostos, como observado para o extrato da planta *Conarus perrottetti* neste estudo. Por fim, salienta-se que as membranas que simulam a pele e o TGI apresentam diferentes perfis de permeação para os compostos fenólicos estudados. Sendo assim, estudos comparativos de permeabilidade são de grande importância quando se pretende utilizar diferentes compostos de uso medicinal por diferentes vias de administração.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

ABSTRACT

The therapeutic efficacy of bioactive compounds depends on its permeation through biological membranes. This study evaluated the permeation of phenolic compounds in PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) systems, which mimic the epidermis and gastrointestinal tract (TGI). For the transport mimetization, polyvinyl difluoride membranes were used, which were modified with 2% (w/v) L- α -phosphatidylcholine/dodecane (for TGI) and 30% (w/v) isopropyl myristate/silicone oil (for Skin). The phenolic compounds gallic acid, p -coumaric acid, vanillic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, caffeic acid, catechin and rutin were evaluated in the concentration 1 mmol L⁻¹, as well as hydroalcoholic extracts from the medicinal plants *Cecropia palmata*, *Bauhinia variegata* and *Connarus perrottetii*. Permeation was evaluated for the compounds and plant extracts at the incubation time of 3 h. The skin-type membrane presented higher permeability than TGI for most of the studied compounds. Chlorogenic acid presented higher permeation in percentage values in both membranes (83.01 \pm 32.66% for Skin and 75.03 \pm 3.26% for TGI) in the synthetic mixture containing the bioactive compounds present in the extracts as chemical markers. The results showed that, if the compounds are present in plant extracts, the permeation can be altered by mutual interference of the compounds, as well as by the own constitution of the complex matrix.

Unitermos em inglês: PAMPA, permeability, biomembranes, phenolic compounds, plant extracts.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo auxílio financeiro. L. M de Carvalho e S. Stülp agradecem ao CNPq pelas bolsas concedidas (processos nº 310253/2016-0 e 313109/2017-6).

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

REFERÊNCIAS

1. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology Of The Cell.. Nova York: Garland Science, 5ª Ed, 2008.
2. ALLEN, L.; POPOVICH, N.C.; ANSEL, C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos. Porto Alegre: ARTMED. 9ª Ed, 2013.
3. ARAÚJO, M.E.M.B. Biossíntese de novos derivados acilados de flavonoides e avaliação in vitro de sua bioatividade. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Tese de doutorado. Bragança Paulista, 2016.
4. AVDEEF, A.; ARTURSSON, P.; NEUHOFF, S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the double-sink PAMPA pKa(flux) method. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 24:333-49, 2005.
5. BALIMANE, P.V.; HAN, Y.H.; CHONG, S. Current Industrial Practices Of Assessing Permeability And P-glycoprotein Interaction. Aaps J. 8:E1-13, 2006.
6. BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais E Ações Biológicas. Alim. Nutr. 15 (3) : 285-292, 2004.
7. CAROCHO. M.; FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology. 51:15–25, 2013.
8. CHEN, J.; LU W.L.; GU, W.; LU, S.S.; CHEN, CAI, B.C. Skin permeation behavior of elastic liposomes: role of formulation ingredients. Expert opinion. 10:845-856, 2013.
9. DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Métodos Para Análise De Ácido Clorogênico. Química Nova. 27:586-592, 2004.
10. DI, L.; KERNS, E.H.; FAN, K.; MCCONNELL, O.J.; CARTEL, G.T. High Throughput

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

- Artificial Membrane Permeability Assay For Blood-brain Barrier. *European Journal Of Medicinal Chemistry*. 38:223-32, 2003.
11. DOUGLAS, C.R.; *Fisiologia aplicada à nutrição*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
 12. ELMASTAŞ, M.; DEMIR, A.; GENÇ, N. Changes in Flavonoid and Phenolic Acid Contents in Some *Rosa* species During Ripening. *Food Chemistry*. 235:154-159, 2017.
 13. FACCIN, H.; VIANA, C.; NASCIMENTO, P.C.; BOHRER, D.; CARVALHO, L.M. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1427:11-124, 2016.
 14. FLAMENT, F.; FRANCOIS, H.; QIU, H., YE, C.; HANAYA, T.; BATISSE, D.; COINTEREAU-CHARDON, S.; SEIXAS, M.D.G.; DAL BELO, S.E.; BAZIN, R. Facial skin pores: a multiethnic study. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*. 8:85–93, 2015.
 15. GOSPODARYOV, D.; LUSHCHAK, V. Oxidative Stress: Cause and Consequence of Diseases. In V. Lushchak & D. Gospodaryov (Eds.), *Oxidative stress and diseases* (pp. 13-38). Rijeka, Croatia: InTech, 2012.
 16. KERNS, E.; DI, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design And Methods*. Elsevier, 2008.
 17. LIBARDI, S.H. Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação de proteínas do soro de leite na desativação de radicais e ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestional. Dissertação. Instituto de Química da universidade de São Carlos. São Paulo, 2010.
 18. LINNANKOSKI, J.; MÄKELÄ, J.; PALMGREN J.; MAURIALA, T.; VENDIN, C.; UNGELL, A.L; LAZOROVA, L.; ARTURSSON, P.; URTTI, A.; YLIPERTTULA, M.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

- Paracellular Porosity and Pore Size of the Human Intestinal Epithelium in Tissue and Cell Culture Models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99: 2166-2175, 2010.
19. MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNE, C.; TEXIER, O.; REGERAT, F.; REMESY, C. Bioavailability Of Rutin And Quercetin In Rats. *Febs Lett*. 409:12-16, 1997.
20. MENON, S.; LU, C.; MENON, R.; SCHWARTZ, J.; GUAN, Y. Effects of Antioxidants in Human Cancers: Differential Effects on Non-Coding Intronic RNA Expression. *Antioxidants*. 5:1, 2016.
21. MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 417:12-17, 2003.
22. PIMENTEL, V.; VIEIRA, V.; MITIDIERI, T.; FRANÇA, F.; PIERONI, J.P. Biodiversidade Brasileira Como Fonte Da Inovação Farmacêutica: Uma Nova Esperança? *Revista Do Bndes* 43:41-89, 2015.
23. PLEWIG, G.; KLIGMAN, A.M. *Acne and Rosacea*. 3rd edition. Berlin, Heidelberg: Springer, 2000.
24. PRASADANI, W.C.; SENANAYAKE, C.M.; JAYATHILAKA, N.; EKANAYAKE, S.; SENEVIRATNE, K.N. Effect of three edible oils on the intestinal absorption of caffeic acid: An in vivo and in vitro study. *Plos One*. 12: e0179292, 2017.
25. RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Interv Aging*. 2:219–236, 2007.
26. RAMASKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 6:1720-1731, 2011.
27. RATNAM, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, N.M.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J. Control Release*. 113:189–207, 2006.
28. REIS J. M.; DEZANI A. B.; AVDEEF A. Lamivudine permeability study: A comparison

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)

- between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 48:781–789, 2013.
29. SCHNEIDER, G.; BARINGHAUS, K. *Molecular Design: Concepts And Applications*. Frankfurt: Wiley-vch, 2008.
30. SINGH, B.; KUMAR, A.; MALIK, A.K. Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 38: 820–832, 2017.
31. SOUZA, J.E.; CASANOVA, L.M.; COSTA, S.S. Bioavailability of phenolic compounds: a major challenge for drug development? *Revista Fitos*. 9: 1-72, 2015.
32. THÜRMER, M. B.; POLETTO, P.; MARCOLIN, M.; FERREIRA, D.G.; ZENI, M. Preparation and Characterization of Asymmetric Membranes of Poly(vinyl-idene fluoride) Supported in Polyester – I: Effect of Heat Treatment in the Prop-erties of Membranes. *Polímeros*. 20:170–174, 2010.
33. TOZER, T.N. *Introdução à farmacocinética e à farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica*. São Paulo: Artmed, 2009.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

² Universidade do Vale do Taquari (UNIVATES)