AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DO 4- NEROLIDILCATECOL ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E ERITRÓCITOS.

VALERIANO, Viviane Souto¹; **NASCIMENTO**, Thais Leite²; **SILVA**, Fabiana Fernandes de Santana³; **SOARES**, Lillian Amélia⁴, **REZENDE**, Kênnia Rocha^{5*}

Palavras-chave: 4-nerolidilcatecol, proteínas plasmáticas, extração em fase sólida, Centrifree.

1. INTRODUÇÃO

O 4-nerolidilcatecol (4-NRC) é um catecol prenilado abundante em *Pothomorphe umbellata* que exibe atividade antioxidante 40 vezes superior ao α -tocoferol, indicando-o como potencial fármaco para condições patológicas onde ocorra a participação de estresse oxidativo. Relativamente aos dados farmacocinéticos, apenas sua biodisponibilidade (REZENDE, 2002) é conhecida. O objetivo deste trabalho é quantificar a extensão da ligação do 4-NRC às proteínas plasmáticas e eritrócitos a fim de caracterizar a farmacocinética do fitofármaco e suas implicações.

2. METODOLOGIA

2.1 Purificação e análise cromatográfica do 4-nerolidilcatecol (4-NRC)

A partir do extrato bruto clorofórmico de raízes de *Pothomorphe umbellata* realizou-se a purificação do 4-NRC utilizando coluna cromatográfica (Sephadex LH20) fase móvel diclorometano:hexano:metanol (5:2:1) e análise por cromatografia em camada delgada com padrão autêntico do 4-NRC. As condições cromatográficas empregadas na análise por CLAE-UV foram Metanol/Acetonitrila/Ácido Trifluoroacético (0,1%) nas proporções 62:20:18 como fase móvel, coluna C₁₈ (150x4,6mm), fluxo de 1,0 mL / min e λ 282 nm. A cada análise, soluções padrão (5) para curva de calibração foram analisadas previamente a avaliação das amostras de concentrações desconhecidas.

2.2 Avaliação da fração livre do 4-NRC às proteínas plasmáticas por ultrafiltração

Duplicatas de plasma (10 mL) foram contaminadas com 50 μ L de soluções estoque de 4-NRC (em DMSO) a 1,0; 5,0 e 10,0 mg/mL para obter soluções de 5,0; 25,0; e 50,0 μ g/mL, respectivamente. Uma amostra de 25 μ g/mL de 4-NRC em água (10 mL) também foi preparada para quantificar a aderência do 4-NRC ao filtro de ultracentrifugação Centrifree® (TASSO *et al*). A seguir, as amostras foram homogeneizadas, incubadas por 30 minutos, alíquotadas (1 mL) e transferidas para filtros Centrifree®. Estes foram centrifugados a 2000 rpm/10 min. a 21° C e a seguir, o filtrado foi analisado por CLAE-UV.

2.3 Avaliação da fração livre do 4-NRC em suspensão de eritrócitos

A avaliação da fração livre a partir dos eritrócitos foi tentativamente acessada pelos dois métodos de extração abaixo descritos:

a) Extração líquido-líquido (ELL)

Solução tampão salina fosfato pH 7,4 foi adicionada ao concentrado de hemácias até completa remoção das proteínas plasmáticas. O volume plasmático foi substituído pelo mesmo tampão até obtenção de hematócitos a 0,4 e 0,2. Volumes de 50 mL de suspensões eritrocitárias em tampão foram contaminadas com alíquotas variadas da solução mãe de 4-NRC (10 mg/mL. em DMSO) perfazendo um máximo de 2% do volume final da suspensão. Ao final, obtiveram-se soluções a 20,0; 15,0 e 10 μ g/mL. Estas soluções foram incubadas a 37°C/30 min. em banho-maria, homogeneizadas de 10/10 minutos, e centrifugadas (10 min/3000 rpm). O

sobrenadante resultante foi submetido à ELL com diclorometano. As diferentes concentrações de amostras (20,0; 15,0 e 10,0 µg/mL) foram avaliadas em triplicata, cada, incluindo o branco.

b) Extração em fase sólida (EFS) do 4-NRC em tampão salina fosfato pH 7,4

Neste experimento, a solução tampão foi diretamente contaminada para verificar apenas a metodologia de extração a partir de soluções aquosas. Assim, empregou-se cartuchos de EFS do tipo Sep-Pak C₁₈ Waters®, submetidos à eluição a vácuo (300 mmHg) por 20 min. O experimento foi realizado em quintuplicata e foram utilizadas duas soluções controle (tampão sem amostra). O preparo das soluções e o método de coleta das frações estão descritos a seguir:

Experimento 1: Inicialmente preparou-se uma solução de 4-NRC em propilenoglicol (a 2,0 mg/mL). Transferiu-se 400 µL desta para 40 mL de solução tampão salina fosfato pH 7,4 obtendo-se uma solução de **20 µg/mL**. A seguir, esta amostra (40 mL) foi adicionada ao cartucho de EFS e eluída em 5 frações de 1 mL de MeOH cada.

Experimento 2: Inicialmente preparou-se uma solução de 4-NRC em propilenoglicol (a 1,0 mg/mL). Transferiu-se 400 µL desta para 40 mL de solução tampão salina fosfato pH 7,4 obtendo-se uma solução de **10 µg/mL**. A seguir, esta amostra (40 mL) foi adicionada ao cartucho de EFS e eluída em 4 frações, seguindo a seguinte ordem de solventes: Metanol 50% (obtendo-se a fração1), 2 mL de Metanol (F2), 1 mL de Metanol (F3) e 1 mL de Metanol (F4).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da fração livre do 4-NRC às proteínas plasmáticas por ultrafiltração

Na análise cromatográfica do ultrafiltrado do plasma o 4-NRC não foi detectado. Dentre os prováveis fatores destaca-se a de aderência do analito à membrana filtrante do Centrifree® e/ou a ligação/adsorção do 4NRC às proteínas plasmáticas, dada à solubilidade parcial do 4-NRC no plasma.

3.2 Avaliação da fração livre do 4-NRC em suspensão de eritrócitos

a) Extração líquido-líquido (ELL)

Os dados obtidos na ELL do 4-NRC a partir do sobrenadante das suspensões eritrocitárias demonstraram baixa recuperação do analito: 4,5 % e 0,5% para valores de hematócritos 0,4 e 0,2, respectivamente..

b) Extração em fase sólida (EFS) do 4-NRC em tampão salina fosfato pH 7,4

A recuperação do 4-NRC a partir da EFS nas concentrações de 20,0 e 10,0 µg/mL foi de 91,17µg/mL e 130,86 µg/mL, após a eluição de 3,0 e 2,0 mL do metanol adicionado, respectivamente (tabela 1). Embora tenha havido fraca recuperação (3,8 e 32,7%, respectivamente), houve otimização das condições cromatográficas de eluição do 4-NRC em uma única fração e boa repetibilidade (0,99% a 20 µg/mL e 4,5% a 10 µg/mL). Dentre os prováveis fatores responsáveis pela baixa recuperação está a degradação do grupo fenol da molécula de 4-NRC, devido a ligação irreversível aos grupamentos silanóis (SiOH) da fase estacionária (C₁₈).

Tabela1 – Dados de recuperação do 4-NRC empregando a extração em fase sólida (EFS)

Solução 4NRC	Q _{ad} (µg)	Frações com 4-NRC	C _{média} (µg/mL; n=5 ± DP;)	Q _{Média rec} (%)
20 µg/mL	800	F2, F3 e F4	91,17(±8,32)	3,8 (± 0,99)
10 µg/mL	400	F2	130,86 (±17,96)	32,7 (± 4,49)

* Q_{ad} = quantidade adicionada e Q_{média rec} = quantidade média recuperada

4. CONCLUSÕES

As metodologias de extração (ELL e EFS) do 4-NRC a partir da matriz empregada (tampão), não se mostraram satisfatórias. Para a completa solubilização do 4-NRC, a quantidade de solvente necessária perturbaria a dinâmica das ligações do analito às proteínas plasmáticas. Deste modo, são previstos experimentos com hidroxipropil- β -ciclodextrina visando aumentar a solubilidade do analito em meio aquoso por meio da formação de um complexo de inclusão da droga, otimizando sua solubilidade, principal fator responsável pela sua baixa recuperação a partir do meio aquoso. Relativamente ao experimento de ultrafiltração em Centrifree[®], a baixa recuperação do analito reflete possíveis ligações do 4-NRC as proteínas plasmáticas e/ou membrana e filtro. Estudos posteriores incluem a possibilidade de diluição do plasma normal. Espera que diminuindo os sítios de ligação das proteínas à droga, a recuperação do analito no ultrafiltrado seja superior à atual, permitindo a quantificação da fração livre.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REZENDE, K. R. (2002) Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. administrado a ratos Sprague Dawley. Tese de Doutorado – FCF – USP São Paulo-SP.

TASSO, L. T.; NEVES, G.; MENEGATTI, R.; MANSSOUR, A. F.; BARREIRO, E. Pharmacokinetics and tissue distribution of a new heterocyclic *N*-phenylpiperazine derivative (LASSBio-581) in rats European Journal of Pharmaceutical Sciences 26 (2005) 194–202.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/SECTEC

¹Aluna PIVIC, Faculdade de Farmácia/Laboratório de Farmacocinética de Produtos Naturais, vivi-souto@gmail.com

²Estagiária.Faculdade de Farmácia/Laboratório de Farmacocinética de Produtos Naturais, thaisleite@gmail.com

³Aluna de Mestrado. Faculdade de Farmácia/UFG, fabiana@icflab.com.br

⁴Aluna de Mestrado. Faculdade de Farmácia/UFG, lillian@unipam.edu.br

⁵Orientadora/Faculdade de Farmácia/UFG, kennia@gmail.com