



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CÁSSIA ARAÚJO CERQUEIRA

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA FARMACOCINÉTICA E
DA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DO RESVERATROL**

SALVADOR

2018

CÁSSIA ARAÚJO CERQUEIRA

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA FARMACOCINÉTICA E
DA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DO RESVERATROL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia como requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ederlan de Souza Ferreira

Orientador

Profa. Dra. Francine Johansson Azeredo

Coorientadora

SALVADOR

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cerqueira, Cássia Araújo
Avaliação Pré-Clinica da Farmacocinética e da
Distribuição Tecidual do Resveratrol / Cássia Araújo
Cerqueira. -- Salvador, 2018.
67 f. : il

Orientador: Ederlan de Souza Ferreira.
Coorientadora: Francine Johansson Azeredo.
Dissertação (Mestrado - Ciência de Alimentos) --
Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia,
2018.

1. CLAE-UV. 2. Validação. 3. Estudo pré-clínico. 4.
Farmacocinética. 5. Distribuição tecidual. I.
Ferreira, Ederlan de Souza. II. Azeredo, Francine
Johansson. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

CÁSSIA ARAÚJO CERQUEIRA

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA FARMACOCINÉTICA E DA PENETRAÇÃO TECIDUAL DO RESVERATROL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 29 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ederlan de Souza Ferreira
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Luciana Andrade
Dr^a. Luciana Nalone Andrade
Universidade Tiradentes

Ricardo David Couto
Dr. Ricardo David Couto
Universidade Federal da Bahia

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

À Força Superior, que me impulsiona a seguir em frente.

À minha mãe Rita e minhas avós, Marina e Helena, pelo carinho, apoio e confiança que depositam em mim, por sempre me incentivarem, acreditando sempre em tudo o que faço.

Aos meus familiares pela torcida e apoio, em especial à Thays pelos momentos de descontração.

Aos Professores Ederlan Ferreira e Francine Azeredo pela orientação e conhecimento compartilhado.

As minhas companheiras de pesquisa, Ene, Jackeline, Luana e Laiz, pela amizade e ajuda, vocês foram muito importantes nesse processo.

À todos do LAPAAC pela amizade, companheirismo e colaboração.

Às amigas de mestrado, que se tornaram amigas da vida, Calionara, Ynayara, Thamires e Tássia, obrigada todo apoio, parceria e amizade. Vocês fizeram esses dois anos serem muito mais leves.

À todos amigos pelas palavras de apoio e momentos de diversão, em especial Laura e Flávia.

Ao Prof. Dênis e Prof. Rodrigo por ceder o espaço para realização dos experimentos.

À Universidade Federal da Bahia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações pelo apoio financeiro ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.

À todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O resveratrol (3,5,4 trihidroxi-trans-estilbeno) é um composto antioxidante polifenólico produzido por uma grande variedade de plantas, sendo no vinho tinto a fonte mais conhecida. O interesse por este bioativo aumentou após a descoberta de seus efeitos farmacológicos, que incluem principalmente a ação antioxidante e anti-inflamatória, bem como efeito cardioprotetor, neuroprotetor, anticancerígeno, antienvelhecimento, anti-hiperlipidêmico, antiobesidade e antidiabético. Apesar de seus benefícios terapêuticos, o mecanismo de ação exercido por este composto bioativo e seus metabólitos ainda não está completamente elucidado, especialmente àqueles relacionados à sua farmacocinética. Assim, foi desenvolvido e validado um método bioanalítico para quantificação do 3,5,4 trihidroxi-trans-estilbeno em plasma de ratos *Wistar* em CLAE-UV. O método foi linear na faixa de concentração 62,5 - 5000 ng.mL⁻¹ ($r^2 = 1$). A exatidão intra e inter-dia esteve menor ou igual a 11,58% e 10,34%, respectivamente. Nenhuma outra substância foi detectada, garantindo a especificidade do método. Em relação ao estudo farmacocinético, a administração *i.v.bolus* 5 mg.kg⁻¹ obteve o Ke de 0,09 h⁻¹ ± 0,04, gerando uma meia vida de 9,5 h ± 3,7, o Vd foi de 5,8 L.kg⁻¹ ± 4,7, o Cl de 0,39 L.h.Kg⁻¹ ± 0,26, ASC total de 6076 ng.h/mL ± 2959 e MRT de 8,7h ± 3,4. A administração oral 100 mg.kg⁻¹, obteve Ke de 0,12 ± 0,07 h⁻¹, gerando uma meia-vida de 7,9 ± 4,2 h, o Vd foi de 13,3 ± 3,3 L.kg⁻¹ o Cl de 1,76 ± 0,49 L.h.Kg⁻¹ ± 0,26, ASC total de 6519 ± 1592 ng.h/mL e MRT de 7,7 ± 1,7 h. A metodologia bioanalítica desenvolvida mostrou linearidade, sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão que permitem a determinação de resveratrol plasmático em estudos farmacocinéticos pré-clínicos. A avaliação farmacocinética não compartimental e populacional após a administração oral e *i.v.* mostrou que o resveratrol apresentou modelo de dois compartimentos em ambas, com um maior tempo de exposição no organismo e maior distribuição após administração oral quando comparada a *i.v.* Também foi encontrada alta concentração cerebral após administração *i.v.* o que indica que esta molécula é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica de ratos *Wistar*.

Palavras-chave: CLAE-UV. Validação. Estudo pré-clínico. Farmacocinética populacional.

ABSTRACT

Resveratrol (3,5,4 trihydroxy-trans-stilbene) is a polyphenolic antioxidant compound produced by a wide variety of plants, with red wine being the most well-known source. The interest in this bioactive increased after the discovery of its pharmacological effects, which mainly include antioxidant and anti-inflammatory action, as well as cardioprotective, neuroprotective, anticancer, anti-aging, antihyperlipidemic, antiobesity and antidiabetic effect. Despite its therapeutic benefits, the mechanism of action exerted by this bioactive compound and its metabolites is still not fully elucidated, especially those related to its pharmacokinetics. Thus, a bioanalytical method for the quantification of 3,5,4-trihydroxy-trans-stilbene in plasma of Wistar rats in HPLC-UV was developed and validated. The method specific and linear in the concentration range 62.5 - 5000 ng.mL⁻¹ ($r^2 = 1$). The intra- and inter-day accuracy was less than or equal to 11.58% and 10.34%, respectively. In relation to the pharmacokinetic study, the i.v. bolus administration of 5 mg.kg⁻¹, obtained the Ke of 0.09 h⁻¹ ± 0.04, generating a half-life of 9.5 h ± 3.7, the Vd was 5.8 L.kg⁻¹ ± 4.7, CI 0.39 LhKg⁻¹ ± 0.26, total ASC of 6076 ng.h/mL ± 2959 and MRT of 8.7 ± 3.4. Oral administration of 100 mg.kg⁻¹, obtained Ke of 0.12 ± 0.07 h⁻¹, generating a half-life of 7.9 ± 4.2 h, the Vd was 13.3 ± 3.3 L.kg⁻¹ or CI of 1.76 ± 0.49 LhKg⁻¹ ± 0.26, total ASC of 6519 ± 1592 ng.h/mL and MRT of 7.7 ± 1.7 h. The bioanalytical methodology developed showed linearity, sensitivity, specificity, precision and accuracy that allow the determination of plasma resveratrol in preclinical pharmacokinetic studies. Non-compartmental and population pharmacokinetic evaluation after oral and intravenous administration showed that resveratrol presented a two compartment model in both, with a longer exposure time in the body and greater distribution after oral administration when compared to iv. In addition, a high cerebral concentration after i.v administration indicates that this molecule is able to cross the blood-encephalic barrier of Wistar rats.

Key words: *HPLC-UV; Bioanalytical Method Validation; Preclinical Study; Population Pharmacokinetics.*

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I	–	Avaliação pré-clínica da farmacocinética e da penetração tecidual do resveratrol.....	13
Figura 1.1	–	Representação esquemática do processo de biossíntese do resveratrol.....	16
Figura 1.2	–	Fontes de resveratrol.....	17
Figura 1.3	–	Estrutura química do (A) <i>trans</i> -resveratrol e (B) <i>cis</i> -resveratrol.....	20
Figura 1.4	–	Estrutura química dos principais metabolitos do resveratrol em humanos e ratos: (A) Resvetratrol-3-sulfato e (B) Resveratrol-3-O-glucoronido.....	23
Figura 1.5	–	Efeitos benéficos do resveratrol à saúde.....	25
Capítulo II	–	Avaliação farmacocinética pré-clínica e distribuição tecidual do resveratrol.....	39
Figura 2.1	–	Estrutura química do resveratrol (3,5,4 trihidroxi-trans-estilbeno).....	42
Figura 2.2	–	Curva de calibração média de resveratrol em plasma de rato.....	51
Figura 2.3	–	Perfil cromatográfico obtido a partir da amostra do plasma de ratos sem adição de resveratrol.....	52
Figura 2.4	–	Perfil cromatográfico obtido a partir da amostra do plasma de ratos com adição de resveratrol.....	53
Figura 2.5	–	Perfil médio de concentração plasmática de resveratrol após dose i.v. bolus única de 5 mg/kg para ratos <i>Wistar</i> machos.....	56
Figura 2.6	–	Perfil médio de concentração plasmática de resveratrol após dose oral única de 100 mg/kg para ratos <i>Wistar</i> machos.....	57
Figura 2.7	–	Curvas de concentração por tempo individuais do resveratrol após administração <i>i.v. bolus</i> (painéis acima) e oral (painéis abaixo) em ratos <i>Wistar</i>	58
Figura 2.8	–	Concentração tecidual de resveratrol vs tempo em diferentes órgãos e tecidos após administração intravenosa de 10 mg/kg.....	60

LISTA DE TABELAS

Capítulo I	– Avaliação pré-clínica da farmacocinética e da penetração tecidual do Resveratrol	13
Tabela 1.1	– Fontes de resveratrol e respectivas quantidades previstas em doses servidas	18
Capítulo II	– Avaliação farmacocinética pré-clínica e distribuição tecidual do resveratrol.....	39
Tabela 2.1	– Precisão do resveratrol em plasma de rato	53
Tabela 2.2	– Variação da exatidão intra e inter-dia do resveratrol em plasma de rato.....	54
Tabela 2.3	– Estabilidade do resveratrol (Concentração 5000 ng.mL ⁻¹) em plasma de rato.....	55
Tabela 2.4	– Parâmetros farmacocinéticos populacionais do resveratrol após a administração de doses únicas de 5 mg/kg pela via intravenosa (n = 6) e de 100 mg/kg pela via oral (n = 5). % EPR, erro padrão relativo por cento; BSV, variabilidade inter-individual.....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.1 Objetivos específicos	12
Capítulo I – AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA FARMACOCINÉTICA E DA PENETRAÇÃO TECIDUAL DO RESVERATROL	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3.1 Resveratrol: Perspectiva histórica	14
3.2 Biossíntese.....	15
3.3 Principais fontes	16
REFERÊNCIAS	32
Capítulo II – Manuscrito: Avaliação da farmacocinética pré-clínica e penetração tecidual do resveratrol.....	39
1 INTRODUÇÃO	42
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Material e reagentes químicos	44
2.2 Condições cromatográficas	44
2.3 Curva de calibração e amostras de padrão de qualidade	45
2.4 Preparação da amostra	45
2.5 Validação do método	45
2.6 Análise farmacocinética	48
2.7 Estudo de Distribuição Tecidual.....	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1 Parâmetros de validação	51
3.2 Modelagem farmacocinética	55
3.3 Distribuição tecidual.....	60
4 CONCLUSÕES	62

1 INTRODUÇÃO

No início da década de 40 um composto polifenólico foi descoberto e identificado como resveratrol (TAKAOKA, 1940). Porém, só em 1992 surgiu um real interesse em estudá-lo, quando foi postulado para explicar alguns efeitos cardioprotetores do vinho tinto (SIEMANN e CREASY, 1992; RENAUD e DELORGERIL, 1992). A partir deste momento, relações com diversas doenças e supostos mecanismos de ação foram atribuídos ao resveratrol ao longo dos anos.

O resveratrol é encontrado em uma gama de frutos e em partes de plantas, como uvas, amoras, mirtilos e amendoins, no entanto é nas raízes do *Polygonum cuspidatum* que se encontra a sua maior fonte, sendo muito utilizado na medicina oriental para prevenção e tratamento de diversas patologias (FONTECAVE et al., 1998; GOSWAMI e DAS, 2009; CHACHAY et al., 2011). Dentre os efeitos benéficos à saúde já comprovados nas últimas décadas de estudo deste composto temos como principais o efeito antioxidante (FILIP et al., 2003; YAO et al., 2010) e anti-inflamatório (LEIRO et al., 2010; LANZILLI et al., 2012), também atua na ação cardioprotetora (BRADAMANTE et al., 2004; BRESCIANI et al., 2014), neuroprotetora (JANG e SURH, 2003; ZAMIN et al., 2006), anticancerígena (JANG et al., 1997; ATHAR et al., 2007; PAUL et al., 2009), antienvhecimento (BAUR e SINCLAIR, 2006; KAEBERLEIN; 2010), antimicrobianas (DOCHERTY et al., 2007), antidiabética (KUMAR et al., 2013; BHAKKIYALAKSHMI et al., 2016) e de redução da obesidade (AGUIRRE et al., 2014; CHANG et al., 2016).

Mesmo com tantas propriedades terapêuticas positivas, o resveratrol apresenta uma biodisponibilidade reduzida, sendo rapidamente metabolizado e excretado. Além disso, as suas ações sobre o metabolismo, bem como a sua farmacocinética, ainda não foram completamente esclarecidas (TIMMERS et al.,

2014). Neste contexto, é importante e necessário a realização de mais estudos que possam contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na metabolização e farmacocinética deste composto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a concentração plasmática e tecidual do resveratrol em ratos *Wistar*, visando contribuir com a elucidação dos processos farmacocinéticos desse bioativo.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver e validar metodologia bioanalítica por CLAE-UV para quantificação do resveratrol em plasma e homogenato tecidual de ratos *Wistar*;
- ✓ Determinar as concentrações totais de resveratrol no plasma de ratos *Wistar* após administração i.v. bolus e oral;
- ✓ Avaliar a concentração do resveratrol no estômago, fígado, baço, rim, coração, pulmão, tecido adiposo e cérebro de ratos *Wistar* após administração *i.v. bolus*;
- ✓ Calcular os parâmetros farmacocinéticos pré-clínicos do resveratrol.

Capítulo I

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA FARMACOCINÉTICA E DA PENETRAÇÃO

TECNOLÓGICA DO REVERATROL

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Resveratrol: Perspectiva histórica

O resveratrol foi isolado pela primeira vez em 1940 a partir de raízes do lírio heléboro-branco (*Veratum grandiflorum*) (TAKAOKA, 1940). Já em 1963, o composto foi encontrado também em raízes da espécie *Polygonum cuspidatum* (NONOMURA, et al., 1963). Atualmente, a *P. cuspidatum* é reconhecida por ser a fonte natural detentora da maior concentração de resveratrol (181-350 mg.100 g⁻¹), sendo utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa no tratamento de dermatite supurativa, gonorreia, pé de atleta (*Tinea pedis*) e dislipidemia (CHACHAY et al., 2011).

Na década de 70, o resveratrol foi identificado nas uvas da espécie *Vitis vinifera* (LANGCAKE e PRYCE, 1976), após esta descoberta, vários estudos relataram encontrar resveratrol em uvas, sendo a casca o local com maior concentração (CREASY e COFFEE, 1988; JEANDET et al., 1991).

A partir de 1992 este composto polifenólico atraiu grande interesse da comunidade científica por ser identificado como sendo o potencial responsável pelos efeitos cardioprotetores do vinho tinto (SIEMANN e CREASY, 1992). Estudos epidemiológicos evidenciaram que o consumo de vinho tinto é inversamente relacionado com a incidência de doenças coronárias. Este fato colaborou com a compreensão do “Paradoxo Francês”, expressão utilizada para referir a contrariedade de a população francesa possuir uma alimentação rica em gorduras saturadas, praticar pouco exercício físico, consumir frequentemente vinho tinto e, no entanto, apresentar baixa incidência de doenças cardíacas, sendo a taxa de enfartes 40% menor do que outros países europeus (RENAUD e DELORGERIL, 1992; KOPP, 1998; CHACHAY, 2011; TIMMES, AUWERX e SCHRAUWEN, 2012).

Após estes achados, Jang et al. (1997) concluíram que o resveratrol possuía propriedades quimiopreventivas, inibindo a iniciação, promoção e progressão da carcinogênese. Desde então diversos estudos estão sendo publicados evidenciando não só os efeitos cardioprotetores e anticancerígenos, mas também os seus efeitos: antioxidante, anti-inflamatório, antienvhecimento, neuroprotetor, inibidor do ciclo celular e, mais recentemente, no tratamento da obesidade e diabetes. Também tem vindo a ser evidenciado que o resveratrol terá a capacidade de aumentar a expectativa de vida através da mimetização dos efeitos da restrição calórica, prevenindo a ocorrência de diversos processos de envelhecimento geneticamente programados (AGARWAL e BAUR, 2011).

3.2 Biossíntese

O resvetratol pertence ao grupo das fitoalexinas, substâncias importantes no mecanismo de defesa das plantas. Estas são um grupo de metabolitos secundários de baixo peso molecular que são sintetizados pelas plantas como resposta a lesões, ataques microbiológicos, estresse ambiental e radiação ultravioleta (KUNDU e SURH, 2008).

A biossíntese deste composto (**Figura 1.1**) é desencadeada por um sinal químico, gerado pelo estresse, que induz o aumento da expressão do gene estilbeno sintetase, o qual promove o acúmulo de mRNA estilbeno sintetase, responsável pela enzima estilbeno sintetase. Por sua vez, esta enzima catalisa a reação entre uma molécula de *p-coumaroyl-CoA* e três moléculas de *malonyl-CoA*, substratos estes presentes nas plantas, originando o resveratrol na área afetada (JEANDET et al., 2002)

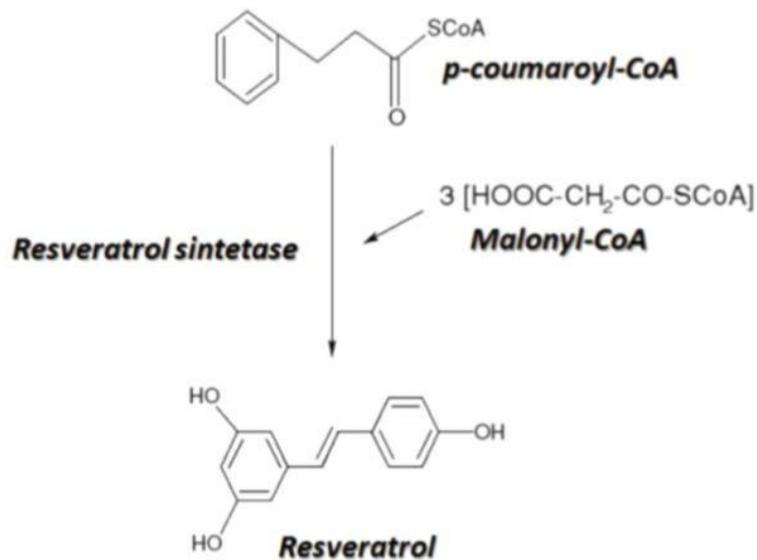


Figura 1.1 – Representação esquemática do processo de biossíntese do resveratrol.

3.3 Principais fontes

O resveratrol é um composto polifenólico produzido por vários frutos, como uvas, amendoins, groselhas, amoras e mirtilos e em outras partes de plantas, como o exemplo das raízes do *Polygonum cuspidatum* (**Figura 1.2**). Este último é a fonte mais rica em resveratrol e é muito utilizado na medicina oriental para tratar, entre outras, doenças hiperlipidêmicas, cardiovasculares, hepáticas e inflamação da pele, porém a fonte mais conhecida e difundida do resveratrol segue sendo o vinho tinto pela relação com o “Paradoxo Francês” (FONTECAVE et al., 1998; GOSWAMI e DAS, 2009; CHACHAY et al., 2011).

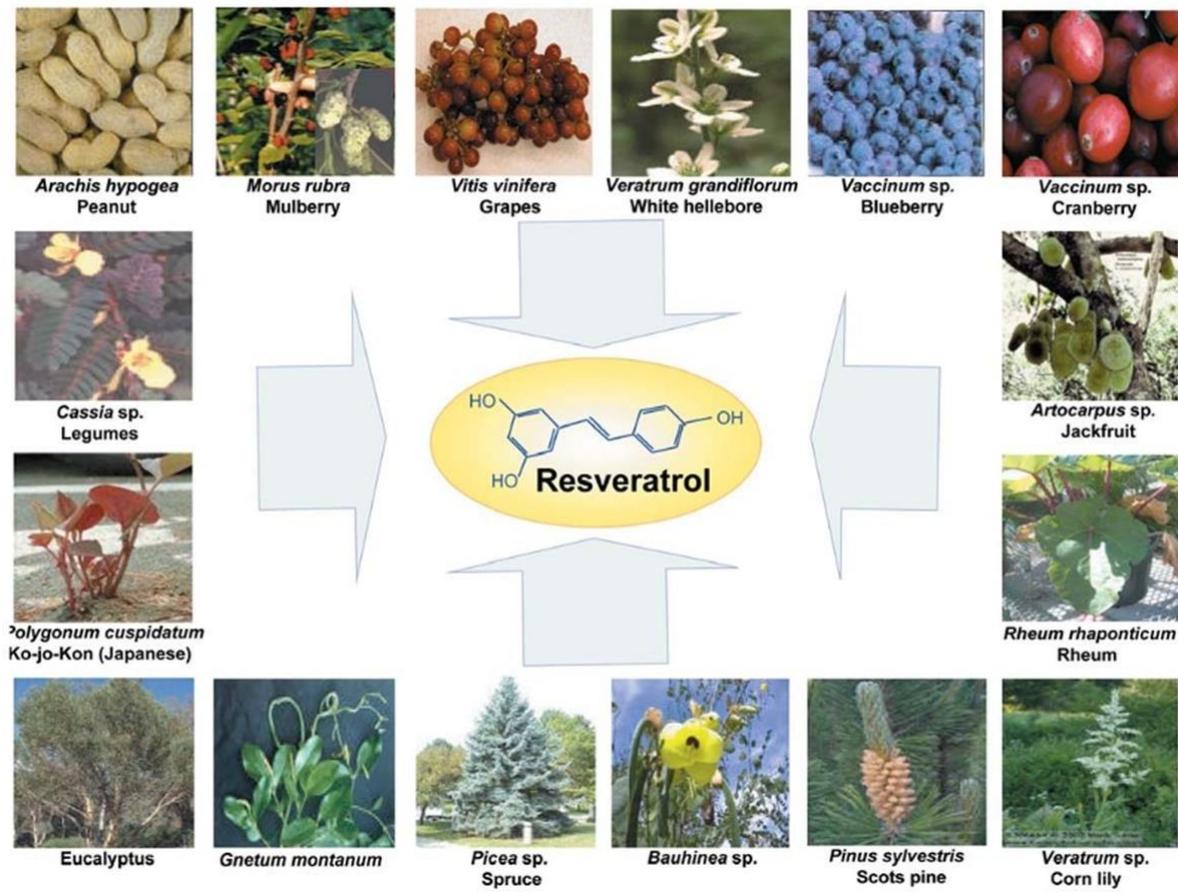


Figura 1.2 – Fontes de resveratrol (Adaptado de Aggarwal et al. (2004)).

Por sua presença na casca das uvas, o resveratrol é extraído para o vinho durante a maceração necessária à sua produção. Desta forma, ele vem sendo detectado em diversos tipos de vinho, oriundos de variadas regiões do mundo, sua concentração no vinho tinto pode variar entre 0,1-14,4 mg.L⁻¹, de acordo com o tipo de uva usada, região onde é produzida, fatores ambientais que variam ao longo do ano, tecnologia de produção e método de detecção/quantificação. Também pode ser encontrado nos vinhos brancos, mas em menor concentração que no vinho tinto, sendo tal situação explicada com base no processo de fabricação do vinho branco uma vez que este apenas é fermentado após a remoção da casca da uva, diferente do vinho tinto que a fermentação ocorre com a casca, permitindo a incorporação de

resveratrol em maior quantidade (CHACHAY et al., 2011; SMOLIA, BAUR e HAUSENBLES, 2011; UDENIGWE et al., 2008). O resveratrol está presente inclusive em sumos de uva (Uva preta – 0.5/100mL; Uva branca – 0.05/100mL), porém em menor quantidade que nos vinhos, o que reafirma que é na casca que existe uma maior concentração deste polifenol (CHACHAY, 2011; TIMMES, AUWERX e SCHRAUWEN, 2012).

Com o crescente desenvolvimento e adaptações das metodologias de análises, está sendo possível isolar e caracterizar o resveratrol em diferentes amostras de produtos alimentares (SOUTO et al., 2001; CARERI et al., 2003; WANG et al., 2007). Na **Tabela 1.1** são demonstradas as diferentes concentrações de resveratrol presentes em alimentos que fazem parte da dieta humana.

De outro modo, o resveratrol pode ser obtido de forma sintética sendo produzido por fermentação ou engenharia química, assim garantido um custo mais acessível de obtenção dessa substância. Na fermentação são utilizadas bactérias ou leveduras geneticamente modificadas, já na engenharia química a molécula é sintetizada com base em compostos orgânicos que reagem entre si (BETZ, 2014).

Tabela 1.1 – Fontes de resveratrol e respectivas quantidades previstas em doses servidas

Fonte alimentar	Concentração	Total de resveratrol por dose
Vinhos tintos	0,1-14.3 mg/L	Copo 150 mL: 0,015-2,15mg
Vinhos tintos “Pinot Noir”	10,5 mg/L	Copo 150 mL: 1,57mg
Vinhos brancos	<0,1-1,2 mg/L	Copo 150mL: 0,015-0,18mg
Vinho branco Riesling	>1,2 mg/L	Copo 150 mL: >0,32mg
Sumo de uva preta	5,0 mg/L	Copo 250 mL: 1,25 mg
Sumo de arando	2 mg/L	Copo 250 mL: 0,5mg
Casca de uva fresca	5-10 mg/100g	-
Uva (amostra seca)	0,64 mg/100g	1 taça (250g): 1,6mg

Mirtilo (amostra seca)	0,4 mg/100g	1 taça (150g): 0,6 mg
Morangos (congelados)	0,375 mg/100g	1 taça (150g): 1,56 mg
Groselhas vermelhas (congeladas)	1,5 mg/100g	½ taça (125g): 1,87 mg
Amendoins crus	0,15 mg/100g	1 taça (250g): 0,37 mg
Amendoins cozidos	0,52 mg/100g	1 taça (250g): 1,3 mg
Amendoins torrados	0,006 mg/100g	1 taça (250g): 0,015 mg
Chocolate negro	0,124 mg/100g	50g: 0,063 mg
Chocolate ao leite	0,001 mg/100g	50g: 0,0005 mg

Adaptado a partir de Chachay et al. (2011).

3.4 Características físico-químicas

O resveratrol apresenta como fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$ e respectiva massa molecular $228,24 \text{ g.mol}^{-1}$. É uma molécula polifenólica aromática pertencente à classe dos estilbenos (NCBI, 2016). Como é característico na maioria dos compostos fenólicos, é constituído por dois anéis fenólicos ligados por uma ligação dupla estireno, sendo que alguns dos carbonos da estrutura anélica encontram-se ligados a grupos hidroxilo, como é possível observar na maioria dos compostos fenólicos. Em cada molécula de resveratrol existem três átomos livres, conferindo assim a atividade antioxidante, já que estes estão disponíveis para transportar espécies reativas de oxigênio e interromper a cadeia oxidativa (KUNDU e SURH, 2008; UDENIGWE et al., 2008; CHACHAY et al., 2014).

Este analito em temperatura ambiente encontra-se no estado sólido, sendo um pó esbranquiçado e apresenta um intervalo de fusão de $253\text{-}255 \text{ }^\circ\text{C}$. Possuindo um LogP de 3,4, é uma molécula lipofílica que se dissolve facilmente em solventes orgânicos como etanol (50 mg.mL^{-1}) e DMSO (16 mg.mL^{-1}), sendo pouco solúvel em água (3 mg.100 mL^{-1}) (NCBI, 2016).

O resveratrol ocorre nas formas *cis* e *trans*, tendo diferentes efeitos biológicos devido à sua estabilidade. O *trans*-resveratrol é uma isoforma mais estável e encontrada comercialmente, o que não ocorre com o *cis*-resveratrol, composto instável e não usualmente encontrado para venda, podendo ser obtido a partir de *trans*-resveratrol por exposição à luz solar ou a radiação ultravioleta (**Figura 1.3**) (CAMONT et al., 2009; CHEN et al., 2007).

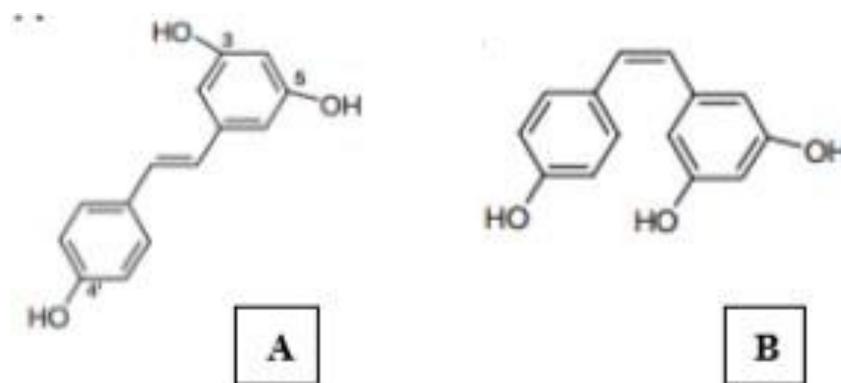


Figura 1.3 – Estrutura química do (A) *trans*-resveratrol e (B) *cis*-resveratrol.

3.2 PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

As propriedades farmacocinéticas do resveratrol têm sido largamente estudadas, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo* em animais e humanos (TIMMERS et al., 2014). O resveratrol, bem como outros polifenóis, possui uma biodisponibilidade muito baixa, Walle et al. (2004) demonstraram em estudo em humanos que a biodisponibilidade do resveratrol em si foi próxima de zero devido a rápida e extensa biotransformação, sendo quantificado apenas vestígios inalterados na circulação sistêmica, e um nível razoavelmente alto (máximo de 2 μ M) de metabólitos após a dose oral de 25 mg.

Quanto aos parâmetros farmacocinéticos, Soleas et al. (2001) demonstraram um pico máximo de concentração atingido após 30 minutos da administração oral em humanos. A concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) obtida, após administração única de 5000 mg, foi 2,4 μM e, 4,24 μM , após administração diária de 5000 mg durante 29 dias. Já em um estudo realizado por Almeida et al. (2009) para investigar a farmacocinética de doses múltiplas do resveratrol em adultos saudáveis, quatro grupos de 10 voluntários adultos jovens saudáveis (5 homens e 5 mulheres) foram estudados durante 48 h. Em cada grupo, 2 voluntários (1 masculino e 1 feminino) foram randomizados para receber o placebo e os 8 restantes receberam resveratrol de 25, 50, 100 ou 150 mg, 6 vezes por dia (intervalo de 4 h), 13 doses em total. Comparável com a maioria dos estudos, a $C_{\text{máx}}$ foi atingida entre 0,8 e 1,5 horas após a dose. O tempo de meia-vida do resveratrol foi prolongado de 1 a 3h após a administração única a 2-5 h após doses múltiplas. Após a administração repetida de 25, 50, 100 ou 150 mg de resveratrol em um intervalo muito curto (4 h), o grau de acúmulo observado não foi significativo, com médias variando entre 1,9 (100 mg) a 5,2 (50 mg).

No que diz respeito à absorção em humanos este é rapidamente absorvido no intestino através de difusão trans-epitelial, relevando a sua ampla aplicação. Estudos *in vitro* onde células Caco-2 foram tratadas com resveratrol demonstraram um transporte saturável dose-dependente da zona apical para a zona basolateral. Lancon et al. (2004) realizaram também um estudo *in vitro* utilizando células de hepatoblastoma da linha HepG2 e hepatócitos humanos, com o objetivo de comparar o transporte de resveratrol em células normais e células cancerígenas, demonstrando que os mecanismos de transporte envolvidos são possivelmente por difusão passiva e mediado por transportadores (SUBRAMANIAN et al., 2010).

Dado a sua lipofilicidade, seria de esperar que a administração de resveratrol associada a uma alimentação rica em lipídeos pudesse aumentar a absorção e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade (UDENIGWE et al., 2008; CHACHAY et al., 2011). Contudo, um estudo realizado em humanos por Vitaglione et al. (2005), concluiu que a biodisponibilidade de *trans*-resveratrol proveniente do vinho tinto é independente do conteúdo lipídico da refeição.

Em relação a sua distribuição, em estudos pré-clínicos, foi constatado que após administração oral ou intravenosa, o resveratrol tende a ser rapidamente eliminado da circulação sanguínea se depositando em diferentes órgãos, tais como: estômago, intestino, colón, fígado, baço, rim, coração, pulmão, cérebro e testículo (VITRAC et al., 2003; CHEN et al., 2007; WANG et al., 2008). No colón e no baço, observou-se uma significativa atividade do resveratrol, enquanto que no coração, testículos e no cérebro essa atividade foi considerada moderada. Já em humanos, cerca de 50% do resveratrol total encontra-se ligado às proteínas plasmáticas tais como albumina, hemoglobina e lipoproteínas (UDENIGWE et al., 2008; CHACHAY et al., 2011).

Quanto ao metabolismo, sofre um extenso metabolismo de primeira passagem no intestino delgado e fígado, sendo rapidamente metabolizado pelos enterócitos e hepatócitos (SMOLIGA e BLANCHARD, 2014). No fígado é metabolizado pelas enzimas de fase II conduzindo à biotransformação do resveratrol em metabolitos glucoronidos e sulfatados: *trans*-resveratrol-3-O-glucoronido, *trans*-resveratrol-3-sulfato (**Figura 1.4**), *trans*-resveratrol-4-sulfato, *trans*-resveratrol-3,5-dissulfato e *trans*-resveratrol-3,4,5-trissulfato. O metabolismo envolvendo enzimas de fase I não representa um papel importante, não existindo evidência de oxidação enzimática (UDENIGWE et al., 2008; CHACHAY et al., 2011).

Estudos clínicos realizados demonstraram que os metabolitos conjugados sofrem recirculação entero-hepática através da reabsorção após hidrólise intestinal. Esta situação é baseada na análise gráfica da concentração de resveratrol vs tempo, após administração oral, onde se observa um 2º pico de concentração máxima (WALLE et al., 2004). Porém, nos estudos de parâmetros farmacocinéticos analisados, foram observadas elevadas variabilidades inter-individuais e dose-independentes que poderão estar relacionadas com a sensibilidade do método utilizado, polimorfismos enzimáticos dos indivíduos incluídos nos estudos e existência/inexistência de distinção entre as formas isoméricas *cis*, *trans* ou conjugadas de resveratrol na determinação de $C_{máx}$. Adicionalmente demonstrou-se que a ingestão de resveratrol durante a manhã conduz a uma maior biodisponibilidade, talvez devido a influência dos ritmos circadianos no metabolismo enzimático da molécula e na circulação entero-hepática (CHACHAY et al., 2011).

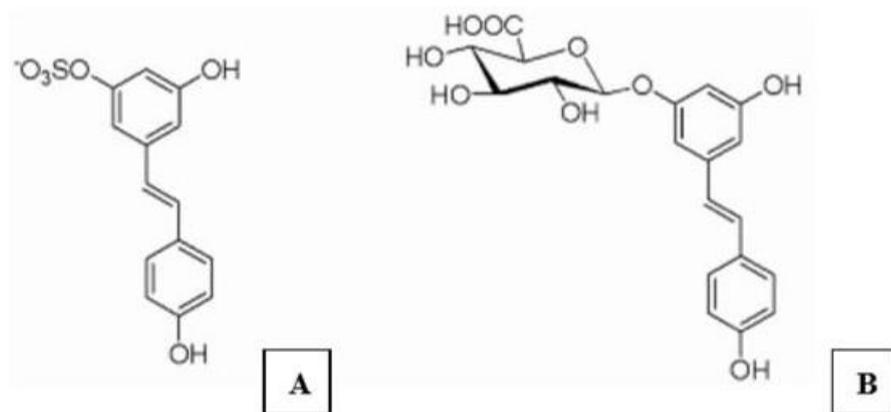


Figura 1.4 – Estrutura química dos principais metabolitos do resveratrol em humanos e ratos: (A) Resvetratrol-3-sulfato e (B) Resveratrol-3-O-glucoronido.

Após biotransformação, a excreção do resveratrol é realizada de forma eficaz com auxílio de líquidos biológicos como a bile, sendo eliminado do organismo entre

70-98% na urina e fezes em 24 h. O seu *clearance* parece diminuir com a administração de doses repetidas, evidenciando a possibilidade de existência de metabolismo saturável e biodisponibilidade alteráveis, o que é preocupante em situações de consumo prolongado (SMOLIGA et al., 2011).

3.3 BIOATIVIDADE E BENEFÍCIOS À SAÚDE

A descoberta do resveratrol, de acordo com o que foi anteriormente mencionado, ocorreu na década de 40, contudo apenas nos anos 90 foram realizados os primeiros estudos evidenciando os seus efeitos benéficos à saúde. Desde então, anualmente são publicados diversos estudos elucidativos da ação bioativa desta molécula.

Desta forma, o resveratrol pode prevenir ou reduzir a progressão de várias patologias, incluindo doenças cardiovasculares (BRADAMANTE et al., 2004; BRESCIANI et al., 2014), cancerígenas (JANG et al., 1997; ATHAR et al., 2007; PAUL et al., 2009), e neurodegenerativas (JANG e SURH, 2003; ZAMIN et al., 2006), bem como prevenir diversos processos de envelhecimento, aumentando a longevidade (BAUR e SINCLAIR, 2006; KAEBERLEIN; 2010), possui ainda propriedades anti-inflamatórias (LEIRO et al., 2010; LANZILLI et al., 2012), antioxidantes (FILIP et al., 2003; YAO et al., 2010) e antimicrobianas (DOCHERTY et al., 2007) e mais recentemente foram descobertas sua ação na redução da obesidade (AGUIRRE et al., 2014; CHANG et al., 2016) e antidiabética (KUMAR et al., 2013; BHAKKIYALAKSHMI et al., 2016), como está demonstrado na **Figura 1.5**.

Em seguida serão descritos alguns destes efeitos bioativos, e consequentemente, benéficos à saúde que o resveratrol proporciona.

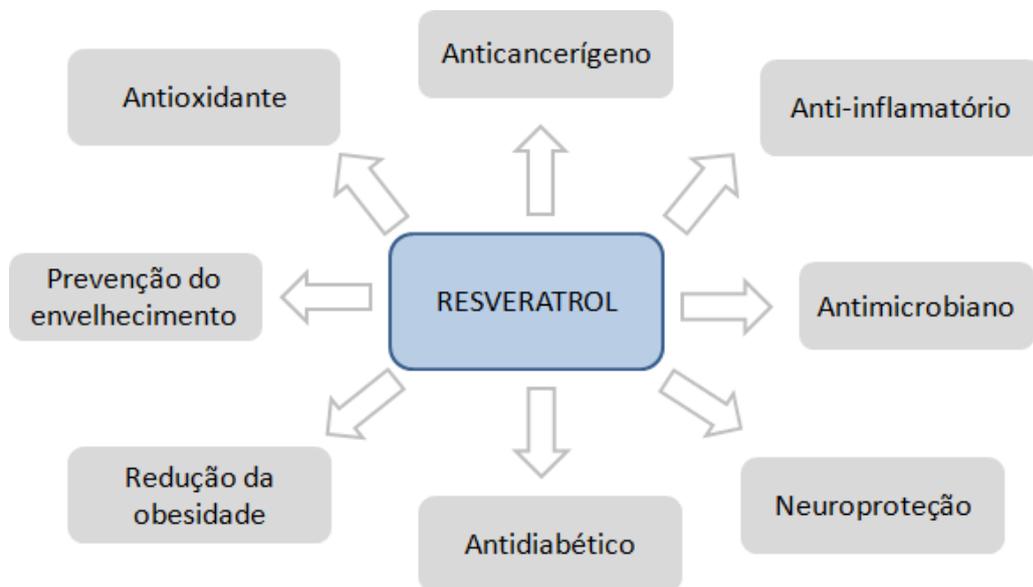


Figura 1.5 – Efeitos benéficos do resveratrol à saúde.

3.3.1 Ação antioxidante

O nosso organismo possui mecanismos que mantêm o equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. Quando este equilíbrio é perturbado e ocorre um excesso de produção de radicais livres, o organismo fica sob *stress* oxidativo, podendo provocar danos nas macromoléculas como lipídeos, carboidratos e proteínas (ácidos nucleicos) (LASTRA e VILLEGAS, 2007). A curto prazo, o *stress* oxidativo gera um aumento das enzimas produtoras de radicais livres, alterações na fosforilação oxidativa da cadeia transportadora de elétrons, liberação de íons de ferro ou cobre e ativação de fagócitos, conduzindo alterações fisiopatológicas como isquemia, síndrome de dificuldade respiratória no adulto, artrite, entre outros. Já a longo prazo, é responsável por causar doenças cardiovasculares, uma vez que induz a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), contribuindo para o processo de aterogênese (FONTES, 2013).

De acordo com as propriedades estudadas, o resveratrol atua não só como antioxidante, mas também como sequestrador de radicais livres, impedindo que seja gerado um estado de *stress* oxidativo. A sua capacidade antioxidante depende da propriedade redox dos grupos fenólicos e do potencial de deslocamento de elétrons ao longo da estrutura química. Os mecanismos envolvidos que conferem ao resveratrol as propriedades antioxidantes são a sua capacidade de competir com a coenzima Q10 diminuindo a atividade da cadeia oxidativa e, conseqüentemente, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), sequestrar os radicais O_2^- e $\cdot OH$ produzidos pelas mitocôndrias, interromper a formação de radicais induzidos pelos metais, bem como a peroxidação lipídica induzida pelos produtos da reação de Fenton, induzir a atividade de enzimas antioxidantes como glutathione S-transferases (GST), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) (LASTRA e VILLEGAS, 2007) e superóxido dismutase e reduzir a oxidação dos grupos tiol das proteínas presentes nas plaquetas (OLAS, 2004).

3.3.2 Ação cardioprotetora

No âmbito da proteção cardiovascular, a molécula de resveratrol demonstra possuir propriedades muito favoráveis que contribuem para diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Frankel e colaboradores (1993) foram os primeiros a estudar a capacidade antioxidante do resveratrol, tendo verificado que o resveratrol protege as LDL da oxidação catalisada pelo cobre. Desde então, vários estudos demonstraram que a atividade antioxidante do resveratrol se deve essencialmente à sua capacidade em quelar o cobre e captar radicais livres, essas características só são possíveis por conta da presença do grupamento hidroxilo na

estrutura química desse bioativo (FAUCONNEAU et al., 1997; FREMONT et al., 1999; STOJANOVIC et al., 2001; LEONARD et al., 2003).

Estudos pré-clínicos recentes demonstram a capacidade do resveratrol de produzir efeitos cardioprotetores através da atenuação da produção de ERO, melhorando a função endotelial, da inibição de processos inflamatórios e da diminuição da taxa de apoptose endotelial. Além de também atuar sob os mecanismos de agregação plaquetária (OLAS et al., 2008), possui propriedades vasodilatadoras (NADERALI, 2009), proteção do endotélio vascular contra disfunções e danos consequentes de dietas inadequadas (CHAVES et al., 2009), atividade estrogênica (GEHM et al., 1997), redução da obesidade (NADERALI, 2009) e efeitos benéficos sob os níveis de colesterol e triglicerídeos (LEONARD et al., 2003). No que diz respeito aos mecanismos subjacentes às suas ações protetoras cardioprotetoras, estes são inúmeros (BAUR e SINCLAIR, 2006; WANG et al., 2011).

No que diz respeito às propriedades anti-inflamatórias do resveratrol, diversos estudos publicados indicam que poderá melhorar a inflamação subjacente à aterosclerose (BERTELLI et al., 2001; NORATA et al., 2007).

3.3.3 Propriedades anti-inflamatórias

Diversas pesquisas têm demonstrado que o resveratrol possui capacidade de atuar nos processos inflamatórios através das suas propriedades antioxidantes, pois ao combater o *stress* oxidativo atenua a inflamação causada pela ativação de proteínas quinases responsáveis pelo aumento da atividade dos fatores de transcrição relacionados com o processo de inflamação. Este tem ainda capacidade de inibir a expressão da proteína C reativa e as enzimas prostaglandina H-sintetase (PHS), ciclooxigenases (COX) e lipooxigenases (LOX), as quais atuam na síntese de

eicosanóides a partir do ácido araquidônico. A PHS e COX (COX-1 e COX-2) são enzimas responsáveis pela biossíntese de prostaglandinas (vasodilatação, sensibilização à dor, febre, proteção gástrica e renal) e tromboxanos (broncoconstrição e agregação plaquetária) enquanto que as LOX são responsáveis pela síntese de leucotrienos (quimiotaxia dos neutrófilos, aumento da permeabilidade vascular, alergias) (SÉFORA-SOUSA e ANGELIS-PEREIRA, 2013).

O resveratrol minimiza ainda a atividade do fator de transcrição AP-1, importante para ativação das células imunitárias através da produção de citocinas e quimiocinas, e reduz a atividade do fator de transcrição NF- κ B, que controla vários genes envolvidos no processo de inflamação e inibe a expressão de IL-6, iNOS, ICAM-1 e VCAM-1 em células endoteliais da artéria coronária. Ao inibir a atividade dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, também irá diminuir a atividade de transcrição e expressão da enzima COX-2, responsável pela síntese de moléculas pró-inflamatória (DELMAS et al., 2006; SÉFORA-SOUSA e ANGELIS-PEREIRA, 2013)

3.3.4 Ação neuroprotetora

É crescente o número de estudos sugerindo que o resveratrol possa exercer um papel significativo regulando funções importantes no sistema nervoso central, especialmente em condições patológicas (DORE, 2005; ANEKONDA, 2006). Como referido anteriormente, o resveratrol possui fortes propriedades antioxidantes, não só por atuar como um sequestrador de radicais livres, mas também por suprimir a sua produção, protegendo assim os neurônios de danos oxidativos. Possui ainda capacidade de reduzir a citotoxicidade provocada pelos peptídeos β -amilóides, melhora as respostas glial, inflamatória e oxidativa, *in vitro*, protege as células da morte celular e acúmulo de ERO e suprime uma das vias de produção da proteína β -

amilóide, reduzindo a sua produção (MARKUS e MORRIS, 2008; VINGTDEUX et al., 2010; REGE et al., 2014).

Por conta das características anti-inflamatórias, esse bioativo previne os efeitos pró-inflamatórios do peptídeo β -amilóide, em macrófagos, reduz a ativação microglial relacionada com a deposição amilóide, reduz a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e JNK, a isquemia cerebral induzida e a regulação da COX-2.

Também atua diminuindo a resposta neuroinflamatória associada à doença de Alzheimer, melhorando os prejuízos de memória e aprendizagem (REGE et al., 2014).

Em relação à proteção isquêmica, estudos pré-clínicos produzidos por Sinha et al. (2002) e Wang et al. (2002) mostram que o resveratrol atravessa a barreira hemato-encefálica e é capaz de proteger contra isquemia cerebral. Além disto, os efeitos neuroprotetores do resveratrol têm sido demonstrados em modelos de isquemia focal e global, em diversas doses, vias e tempos de administração. O pré-condicionamento pelo resveratrol resultou na redução do volume isquêmico e diminuição do conteúdo de água (BAUR e SINCLAIR, 2006).

3.3.5 Ação anticancerígena

O resveratrol é um bioativo com capacidade de atuar inibindo a nível molecular todas as etapas da carcinogênese (iniciação, promoção/diferenciação e progressão).

A iniciação ocorre quando há uma alteração no material genético (mutação) de uma célula normal, por ação de um agente carcinogênico ou por um defeito genético inerente à própria célula. Após a ocorrência da mutação, a célula não consegue reparar o dano e esta alteração se torna irreversível, originando uma célula iniciada que tem capacidade de crescer e transmitir a mutação às suas células filhas, iniciando assim o processo de carcinogênese (KUMAR et al., 2003). A ação do

resveratrol nesta etapa é através da supressão da ativação metabólica de agentes carcinogênicos e/ou do aumento da desintoxicação através da modulação da atividade de enzimas envolvidas em reações de fase I (compostos lipofílicos são transformados em carcinogênicos eletrofílicos) e de fase II (convertem os metabolitos primários em compostos mais hidrossolúveis) (YEN et al., 2003; LOPEZ-BURILLO et al., 2003; BERGE et al., 2004; SZAEFER et al., 2004).

Na etapa de promoção/diferenciação, ocorre o desenvolvimento dessa mutação na célula estabelecendo-se o fenótipo neoplásico (WESTON e HARRIS, 2003). Assim, o resveratrol colabora na prevenção do câncer inibindo a ativação de proteínas quinases, por vários promotores, via *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (GARCIA-GARCIA et al., 1999; YU et al., 2001); da inibição da síntese de poliaminas, diminuindo o crescimento celular e aumentando a apoptose (SCHNEIDER et al., 2000; WOLTER et al., 2003); da inibição da libertação de mediadores lipídicos pró-inflamatórios sintetizados pelas enzimas fosfolipase A2, PHS, COX e LOX (MACCARRONE et al., 1999; MORENO, 2000); da perturbação da progressão do ciclo celular (G1, S, G2/M) conseguida através de interações estabelecidas entre o resveratrol e reguladores chave do ciclo celular, ativando ou inibindo ciclinas, cdks, factores de transcrição ou oncoproteínas; da indução de morte celular pela via mitocondrial uma vez que provoca *down-regulation* da expressão das proteínas Bcl-2, IAP e induz um aumento dos níveis de Bax/Bak e a sua relocalização para as mitocôndrias. Além disso, o resveratrol induz a agregação de receptores de morte celular no microdomínio lipídico, induzindo a formação de um complexo de sinalização indutor de morte que por sua vez conduz à ativação da cascata das caspases, resultando também em morte celular (DELMAS et al., 2006).

Na progressão ocorre a expansão de uma população de células iniciadas que, posteriormente, são convertidas em células malignas, levando à formação do câncer (WEATON e HARRIS, 2003). Nesta etapa, o estágio do câncer já é muito avançado para uma intervenção preventiva, mas não para uma intervenção terapêutica. Desta forma, o resveratrol poderá atuar como um agente terapêutico já que possui propriedades antiproliferativas, bloqueando a progressão do ciclo celular e induzindo a apoptose. Este possui ainda capacidade de inibir a produção de óxido nítrico, responsável por promover o crescimento de tumores endoteliais e a formação de metástases (JANG e PEZZUTO, 1999; YAGIHASHI et al., 2000) e inibe a angiogênese através da redução da expressão de genes que afetam a invasão tumoral e metástases (COX, ornitina descarboxilase, espermidina/espermina N-acetiltransferase) (BABBAR et al., 2003; IGNATENKO et al., 2004)

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, B. e BAUR, J. A. Resveratrol and life extension. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1215, p. 138-143, 2011.
- AGGARWAL, B. B.; BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, R. S.; SEERAM, N. P.; SHISHODIA, S.; TAKADA, Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. **Anticancer Research**. v. 24, p. 2783-2840, 2004.
- AGUIRRE, L.; FERNANDEZ-QUINTELA, A.; ARIAS, N.; PORTILLO, M. P. Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. **Molecules**. v. 19, p. 18632–18655, 2014.
- AHLIN, P. et al. Location of lipophilic substances and ageing of solid lipid nanoparticles studied by EPR. **STP Pharma Sci**. v. 10, p. 125-132, 2000.
- ALMEIDA, L.; VAZ-da-SILVA, M.; FALCÃO, A.; SOARES, E.; COSTA, R. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multipledose study in healthy volunteers. **Mol. Nutr. Food Res**. v.53, p. S7–15, 2009.
- ANEKONDA, T. S. Resveratrol – a boon for treating Alzheimer’s disease? **Brain Res. Rev.** v. 52, p. 316–326, 2006.
- ANSARI, K. A. et al. Cyclodextrin-Based Nanosponges for Delivery of Resveratrol: In Vitro Characterisation, Stability, Cytotoxicity and Permeation Study. **AAPS PharmSciTech**. v. 12, n. 1, p. 279-286, 2011
- ATHAR, M.; BACK, J. H.; TANG, X.; KIM, K. H.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; KIM, A. L. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicology and Applied Pharmacolog.** v. 224. p. 274-83, 2007.
- BABBAR, N. et al. Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon câncer. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 47762-47775, 2003.
- BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. Therapeutic potential of resveratrol: The *in vivo* evidence. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 5, p. 493–506, 2006.
- BERGE, G. et al. Resveratrol inhibits benzo[a]pyrene–DNA adduct formation in human bronchial epithelial cells. **Br. J. Cancer**. v. 91, p. 333–338, 2004.
- BERTELLI, A. A. A.; DAS, D. K. Grapes, Wines, Resveratrol, and Heart Health. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 54, p. 468-476, 2009.
- BETZ, J. **Resveratrol and its effects on human health and longevity** - Myth or Miracle? 2011. **Natural News**. Disponível em: <https://www.biotivia.com/assets/NewAsset/Resveratrol_and_its_Effects_on_Human_Health_and_Longevity.pdf>. Acesso: 10 jan. 2018.
- BHAKKIYALAKSHMI, E.; SIREESH, D.; SAKTHIVADIVEL, M.; SIVASUBRAMANIAN, S. GUNASEKARAN, P. Anti-hyperlipidemic and anti-peroxidative role of pterostilbene via Nrf2 signaling in experimental diabetes. **Eur. J. Pharmacol.** v. 777, p. 9–16, 2016.
- BRADAMANTE, S.; BARENGHI, L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. **Cardiovascular Drug Reviews**. v. 22. p. 169-188, 2004.
- BRESCIANI, L.; CALANI, L.; BOCCHI, L.; DELUCCHI, F.; SAVI, M. Bioaccumulation of resveratrol metabolites in myocardial tissue is dose-time dependent and related to cardiac hemodynamics in diabetic rats. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.** v. 24, p.408–415, 2014.

CADDEO, C. et al. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. **Int. J. Pharm.** v. 363, n. S1-2, p. 183-191, 2008.

CAMONT, L.; COTTART, C.H.; RHAYEMA, Y.; NIVET-ANTOINEA, V.; DJELIDI, R.; COLLINC, F.; BEAUDEUXA, J.L.; BONNEFONT-ROUSSELOT. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. **Analytica Chimica Acta.** p. 121–128, 2009.

CARERI, M.; CORRADINI, C.; ELVIRI, L.; NICOLETTI, I.; ZAGNONI, I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 51. p. 5226-5231, 2003.

CHACHAY, V. et al. Resveratrol - pills to replace a healthy diet. **British Journal of Clinical Pharmacology.** v. 71:1, p. 27-38, 2011.

CHANG, C. C.; LIN, K. Y.; PENG, K. Y.; DAY, Y. J.; Hung, L. M. Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. **Endocr. J.** v.63, p.169–178, 2016.

CHAVES, A. A.; JOSHI, M. S.; COYLE, C. M.; BRADY, J. E.; DECH, S. J.; SCHANBACHER, B. L.; BALIGA, R.; BASURAY, A.; BAUER, J. A. Vasoprotective endothelial effects of a standardized grape product in humans. **Vascular Pharmacology.** v. 50, p. 20-26, 2009.

CHEN, X.; HE, H.; WANG, G.; YANG, B.; REN, W.; MA, L.; YU, Q. Stereospecific determination of cis- and trans-resveratrol in rat plasma by HPLC: application to pharmacokinetic studies. **Biomed. Chromatogr.** v. 21, p. 257-265, 2007.

COTTART, C. H. et al. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Mol. Nutr. Food,** v. 54, p. 1-10, 2009.

CREASY, L.L.; COFFEE, M. Phytoalexin production potential of grape berries. **Journal of the American Society for Horticultural Science.** v. 113, p. 230, 1988.

DELMAS, D. et al. Resveratrol as a Chemopreventive Agent: A Promising Molecule for Fighting Cancer. **Current Drug Targets.** v. 7, p. 1-20, 2006.

DOCHERTYL, J. J.; MCEWEN, H. A.; SWEET, T. J., BAILEY, E.; Booth, T. D. Resveratrol inhibition of Propionibacterium acnes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 59, p.1182-1184, 2007.

DORE, S. Unique properties of polyphenol stilbenes in the brain: more than direct antioxidant actions; gene/protein regulatory activity. **Neuro-signals.** v. 14, p. 61–70, 2005.

DUZGUNES, N.; NIR, S. Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 40, p. 3-18, 1999.

FAUCONNEAU, B.; WAFFO-TEGUO, P.; HUGUET, F.; BARRIER, L.; DECENDIT, A.; MERILLON, J. M. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from Vitis vinifera cell cultures using in vitro tests. **Life Sci.** v. 61, p. 2103-2110, 1997.

FILIP, V.; PLOCKOVA, M.; SMIDRKAL, J.; SPICKOVA, Z.; MELZUCH, K.; SCHMIDT, S. - Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. **Food Chemistry.** v. 83, p. 585-593, 2003.

FOTECAVE, M.; LEPOIVRE, M.; ELLEINGAND, E.; GEREZ, C.; GUITTET, O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. **FEBS Letters.** v. 42, p. 277–279, 1998.

FONTES, I. **Antioxidantes como substâncias cosmetologicamente activas**. 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **Lancet**. v. 341. p. 1103-1104, 1993.

FREMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sciences**. v. 64. p. 2511-2521, 1999.

GARCIA-GARCIA, J. et al. The cancer chemopreventive agent resveratrol is incorporated into model membranes and inhibits protein kinase C alpha activity. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 372, p. 382-388, 1999.

GEHM, B. D.; MCANDREWS, J. M.; CHIEN, P. Y.; JAMESON, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94. p. 14138-14143, 1997.

GOSWAMI, S.K.; DAS, D.K. Resveratrol and chemoprevention. **Cancer Letters**. v. 284, p. 1-6, 2009.

HOWELLS, L. M. et al. Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. **Cancer Prev. Res. (Phila)**. v. 4, p. 1419-1425, 2011.

IGNATENKO, N. A. et al. The chemopreventive agent alphasulfamethylornithine blocks K-ras-dependent tumor formation and specific gene expression in Caco-2 cells. **Mol. Carcinog**. v. 39, p. 221-33, 2004.

JANG, M.; PEZZUTO J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. **Drugs Exp. Clin. Res**. v. 25, p. 65-77, 1999.

JANG, J. H.; SURH, Y. J. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. **Free radical Biology & Medicine**. v. 34. p. 1100-1110, 2003.

JANG, M. S. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**. v. 275, p. 218-220, 1997.

JEANDET, P.; BESSIS, R.; GAUTHERON, B. The production of resveratrol (3,5,4-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 42, p. 41-46, 1991.

JEANDET, P.; DOUILLT-BREUIL, A. C.; BESSIS, R.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; ADRIAN, M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 2731-41, 2002.

KAEBERLEIN, M. Resveratrol and rapamycin: Are they anti-aging drugs? **Bioessays**. v. 32, p. 96-99, 2010.

KOPP, P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? **European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**. v. 138, p. 619-620, 1998.

KUMAR, V., COTRAN, R. e ROBBINS, S. **Basic Pathology**. 7th Ed. Philadelphia: Saunders, 2003.

KUMAR, A.; NEGI, G.; Sharma, S. Neuroprotection by resveratrol in diabetic neuropathy: Concepts & mechanisms. **Curr. Med. Chem.** v. 20, p. 4640–4645, 2013.

KUNDU, J. e SURH Y. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. **Cancer Lett.** v. 269, p. 243-261, 2008.

LANCON, A. et al. Human hepatic cell uptake of resveratrol: Involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 316, p. 1132–1137, 2004.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological Plant Pathology.** v. 9, p. 77-86, 1976.

LANZILLI, G.; COTTARELLI, A.; NICOTERA, G.; GUIDA, S.; RAVAGNAN, G. Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation. **Inflammation.** v. 35, p. 240–248, 2012.

LASTRA, C.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. **Biochemical Society Transactions.** v. 35, p. 1156-1160, 2007.

LEIRO, J. M.; VARELA, M.; PIAZZON, M. C.; ARRANZ, J. A.; NOYA, M.; LAMAS, J. The antiinflammatory activity of the polyphenol resveratrol may be partially related to inhibition of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) pre-mRNA splicing. **Molecular Immunology.** v. 47, p. 1114-1120, 2010.

LEONARD, S. S.; XIA, C.; JIANG, B. H.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communication,** v. 309, p. 1017-1026, 2003.

LOPEZ-BURRILLO, S. et al. Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and α -lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. **Journal of Pineal Res.** v. 34, p. 269-277, 2003.

LOPEZ-NICOLAS, J. M. et al. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for beta-cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr. A.** v. 1135, p. 158-165, 2006.

LU, X. et al. Resveratrol-loaded polymeric micelles protect cells from Abeta-induced oxidative stress. **Int. J. Pharm.** v. 375, p. 89-96, 2009.

LUCAS-ABELLAN, C. et al. Cyclodextrins as resveratrol carrier system. **Food Chem.** v. 104, p. 39-44, 2007.

MACCRRONE, M. et al. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. **Eur. J. Biochem.** v. 265, p. 27-34, 1999.

MARKUS, M. A.; MORRIS, B. J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. **Clin Interv Aging.** v. 3, p.331-339, 2008.

MORENO, J. J. Resveratrol modulates arachidonic acid release, prostaglandin synthesis and 3T6 fibroblast growth. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 294, p. 333-338, 2000.

MULLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 54, p. S131-S155, 2002.

NADERALI, E. K. Obesity and cardiovascular dysfunction: A role for resveratrol? **Obesity Research & Clinical Practice**. v. 3. p. 45-52, 2009.

NCBI - **PubChem Compound**, Resveratrol. 2016. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445154#section=Top>>. Acesso: 20 fev. 2018.

NONOMURA, S.; KANAGAWA, H.; MAKIMOTO, A. Chemical Constituents of Polygonaceous Plants. I. Studies on the Components of Ko-J O-Kon. (Polygonum Cuspidatum Sieb. Et Zucc.). **Yakugaku Zasshi**. v. 83, p. 988-90, 1963.

NORATA, G. D.; MARCHESI, P.; PASSAMONTI, S.; PIRILLO, A.; VIOLI, F.; CATAPANO, A. L. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and transresveratrol in apolipoprotein E deficient mice. **Atherosclerosis**. v. 191, p. 265-271, 2007.

OLAS, B. et al. The protective effects of resveratrol against changes in blood platelet thiols induced by platinum compounds. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 55, n. 2, p. 467-476, 2004.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; NOWAK, P.; STOCHMAL, A.; OLESZEK, W.; GLOWACKI, R.; BALD, E. Comparative studies of the antioxidant effects of a naturally occurring resveratrol analogue -- trans-3,3',5,5'-tetrahydroxy-4'-methoxystilbene and resveratrol -- against oxidation and nitration of biomolecules in blood platelets. **Cell Biology and Toxicology**. v. 24, p. 331-340, 2008.

PADAMWAR, M. N.; POKHARKAR, V. B. Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: Drug deposition and stability. **Int. J. Pharm.**, v. 320, p. 37-44, 2006.

PAUL, S.; RIMANDO, A. M.; LEE, H. J.; JI, Y.; REDDY, B. S. Antiinflammatory action of pterostilbene is mediated through the p38 mitogenactivated protein kinase pathway in colon cancer cells. **Cancer Prev. Res.** v. 2, p. 650-657, 2009.

REGE, S. D. et al. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. **Front Aging Neurosci.** v. 6, p.1-12, 2014.

RENAUD, S.; DELORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart-disease. **Lancet**. v. 339, p. 1523-1526, 1992.

SCHNEIDER, Y. et al. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Lett.** v. 158, p. 85-91, 2000.

SÉFORA-SOUSA, M.; ANGELIS-PEREIRA, M., Mecanismos moleculares de ação antiinflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Rev. Bras. Pi. Med.** v. 15, p. 617-626, 2013.

SHAO, J. F. et al. Enhanced growth inhibition effect of Resveratrol incorporated into biodegradable nanoparticles against glioma cells is mediated by the induction of intracellular reactive oxygen species levels. **Colloid Surf. B-Biointerfaces**. v. 72, p. 40-47, 2009.

SHI, G. et al. Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. **Int. J. Pharm.** v. 349, p. 83-93, 2008.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 43, p. 49-52, 1992.

SINHA, K.; CHAUDHARY, G.; Gupta, Y. K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **LifeSci**. v. 71, p. 655-665, 2002.

SMOLIGA, J.; BAUR, J.; HAUSENBLAS, H. Resveratrol and health - A comprehensive review of human clinical trials. **Molecular Nutrition Food**. v. 55, p. 1129-1141, 2011.

SMOLIGA, J. M.; BLANCHARD, O. Enhancing the delivery of resveratrol in humans: If low bioavailability is the problem, what is the solution? **Molecules**. v. 19, p. 17154-17172, 2014.

SOLEAS, G. J.; YAN, J.; GOLDBERG, D. M. Measurement of transresveratrol, (1)-catechin, and quercetin in rat and human blood and urine by gas chromatography with mass selective detection. **Methods Enzymol**. v. 335, p. 130–145, 2001.

SOUTO, A. A.; CARNEIRO, M. C.; SEFERIN, M.; SENNA, M. J. H.; CONZ, A.; GOBBI, K. Determination of trans-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 14, p. 441-445, 2001.

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 391, p. 79-89, 2001.

SUBRAMENIAN, L. et al. Resveratrol: Challenges in Translation to Clinic - A Critical Discussion. **Clin. Cancer Res**. v. 16, p. 5942-5948, 2010.

SZAEFER, H. et al. Alteration in phase I and II enzymes activities and polycyclic aromatic hydrocarbons - DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis. **Nutr. Cancer**, v. 48, p. 70-77, 2004.

TAKAOKA, M. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). **Journal of the Faculty of Science Hokkaido Imperial University**. v. 3. p. 1-16, 1940.

TIMMERS, S.; AUWERX, J.; SCHRAUWEN, P. **The journey of resveratrol from yeast to human**. Março, 2012. Disponível em: < <http://www.impactaging.com> >. Acesso: 20 fev. 2018.

UDENIGWE, C. et al. Potencial of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutr Rev**. v. 66, p. 445-454, 2008.

VINGTDEUX, V. et al. AMP-activated Protein Kinase Signaling Activation by Resveratrol Modulates Amyloid- β Peptide Metabolism. **J. Biol. Chem**. v. 285, p. 9100–9113, 2010.

VITAGLIONE, P. et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. **Mol. Nutr. Food Res**. v. 49, p. 495-504, 2005.

VITRAC, X.; DESMOULIÈRE, A.; BROUILLAUD, B. Distribution of [^{14}C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. **Life Sciences**, v. 72, p. 2219–2233, 2003.

WALLE, T. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 32, p. 1377-1382, 2004.

WANG, D.; XU, Y.; LIU, W. Tissue distribution and excretion of resveratrol in rat oral administration of *Polygonum cuspidatum* extract (PCE). **Phytomedicine**. v. 15, p. 859-866, 2008.

WANG, S. Y.; CHEN, C. T.; WANG, C. Y.; CHEN, P. - Resveratrol content in strawberry fruit is affected by preharvest conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55. p. 8269-8274, 2007.

WANG, Z.; ZOU, J.; HUANG, Y.; CAO, K.; XU, Y.; Wu J. M. Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. **Chin Med J (Engl)**. v. 115, p. 378-380, 2002.

WESTON, A. e HARRIS, C. C. Multistage Carcinogenesis. **Cancer Medicine**, 6th edition, Hamilton (ON), BC Decker, 2003.

WOLTER, F., TURCHANOWA, L.; STEIN, J. Resveratrol-induced modification of polyamine metabolism is accompanied by induction of c-Fos. **Carcinogenesis**. v. 24, p. 469-474, 2003.

YAO, J.; WANG, J. Y.; LIU, L.; LI, Y. X.; XUN, A. Y. Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. **Arch. Med. Res.** v. 41, p. 288–294, 2010.

YEN, G. C., DUH, P. D. e LIN, C. W. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radic. Res.** v. 37, p. 509-514, 2003.

YU, R. et al. Resveratrol inhibits phorbol ester and UV-induced activator protein 1 activation by interfering with mitogen-activated protein kinase pathways. **Mol. Pharmacol.** v. 60, p. 217-224, 2001.

ZAMIN, L. L.; DILLENBURG-PILLA, P.; ARGENTA-COMIRAN, R.; HORN, A. P.; SIMAO, F.; NASSIF, M.; GERHARDT, D.; FROZZA, R. L.; SALBEGO, C. Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. **Neurobiology of Disease**. v. 24. p. 170-82, 2006.

Capítulo II

Manuscrito: Avaliação da farmacocinética pré-clínica e penetração
tecidual do resveratrol

AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA PRÉ-CLÍNICA E DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DO RESVERATROL

Pre-clinical pharmacokinetics evaluation of resveratrol and its tissue distribution

Cássia Araújo Cerqueira^(a), Valdeene Vieira Santos^(a), Jackeline Marley Santos de Araújo^(a), Luana Carvalho Sena^(a), Francine Johansson Azeredo^(a), Ederlan de Souza Ferreira^(a)

^aFaculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, 40170-115, Salvador, BA, Brasil

Running title: Determining resveratrol in rat plasma

***CORRESPONDING AUTHOR:**

Prof. Ederlan de Souza Ferreira

Department of Bromatological Analysis

Federal University of Bahia

Barão de Jeremoabo street, 147

40.170-115, Salvador, Brazil

Email address: ederlan.ferreira@ufba.br

Phone: ++55 71 3283-6932

RESUMO

Um método de CLAE foi desenvolvido e validado utilizando a detecção UV para a quantificação do resveratrol em plasma de ratos. As análises foram realizadas em um sistema CLAE/UV usando uma coluna e pré-coluna C18, a separação cromatográfica em gradiente utilizando as fases água (A) e acetonitrila (B) a um fluxo constante de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, em 20 minutos de corrida. A detecção do resveratrol foi realizada a 50°C no comprimento de onda de 310 nm. O método foi linear na faixa de concentração $62,5 - 5000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r^2=1$). A exatidão intra e inter-dia esteve menor ou igual a 11,58% e 10,34%, respectivamente. Nenhuma outra substância foi detectada, garantindo a especificidade do método. Em relação ao estudo farmacocinético, a administração *i.v.bolus* $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ obteve o K_e de $0,09 \text{ h}^{-1} \pm 0,04$, gerando uma meia vida de $9,5 \text{ h} \pm 3,7$, o V_d foi de $5,8 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1} \pm 4,7$, o Cl de $0,39 \text{ L}\cdot\text{h}\cdot\text{Kg}^{-1} \pm 0,26$, ASC total de $6076 \text{ ng}\cdot\text{h/mL} \pm 2959$ e MRT de $8,7 \text{ h} \pm 3,4$. A administração oral $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, obteve K_e de $0,12 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$, gerando uma meia-vida de $7,9 \pm 4,2 \text{ h}$, o V_d foi de $13,3 \pm 3,3 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ o Cl de $1,76 \pm 0,49 \text{ L}\cdot\text{h}\cdot\text{Kg}^{-1} \pm 0,26$, ASC total de $6519 \pm 1592 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ e MRT de $7,7 \pm 1,7 \text{ h}$. A metodologia bioanalítica desenvolvida mostrou linearidade, sensibilidade, especificidade, precisão e exatidão que permitem a determinação de resveratrol plasmático em estudos farmacocinéticos pré-clínicos. A avaliação farmacocinética não compartimental e populacional após a administração oral e *i.v.* mostrou que o resveratrol apresentou modelo de dois compartimentos em ambas, com um maior tempo de exposição no organismo e maior distribuição após administração oral quando comparada a *i.v.*. Também foi encontrada alta concentração cerebral após administração *i.v.* o que indica que esta molécula é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica de ratos *Wistar*.

Palavras-chave: Resveratrol; CLAE/UV; Farmacocinética; Validação; Estudo pré-clínico.

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com uma alimentação saudável ocasiona a busca por alimentos que ofereçam propriedades que vão além de nutrir, mas também proteger o organismo de enfermidades. O resveratrol (**Fig. 2.1**) é um composto antioxidante polifenólico produzido por uma grande variedade de plantas incluindo uvas, amendoins, mirtilos e amoras, sendo no vinho tinto a fonte mais difundida e conhecida.^[1,2] Nas últimas duas décadas, o interesse pelo estudo do resveratrol tem crescido devido aos seus efeitos farmacológicos relacionados principalmente com a proteção cardiovascular,^[3] e neuroproteção^[4,5]. Além dessas, outras ações benéficas tem sido reportadas, tais como analgésica,^[6] antioxidante,^[7,8] anti-inflamatória,^[9,10] anticancerígena,^[11] antienvhecimento,^[12,13,14] anti-hiperlipidêmica,^[15] antiobesidade^[16,17] e antidiabética.^[18]

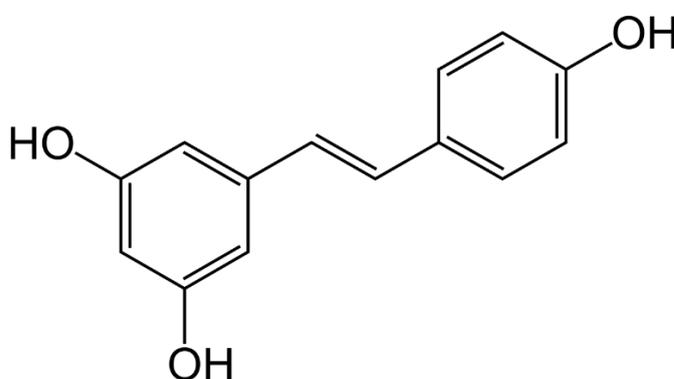


Figura 2.1 – Estrutura química do resveratrol (3,5,4 trihidroxi-trans-estilbeno).

A molécula do 3,5,4 trihidroxi-trans-estilbeno, trivialmente denominada de resveratrol é absorvido no intestino por difusão passiva ou formando complexos com proteínas presentes na membrana celular, como as integrinas. Uma vez na corrente sanguínea, este composto químico pode ser encontrado essencialmente em três formas diferentes: glucuronido, sulfato ou livre. A forma livre pode ser ligada à

albumina e lipoproteínas, tais como LDL (lipoproteína de baixa densidade). No entanto, estes complexos são dissociados nas membranas celulares que possuem receptores para a albumina e LDL. Portanto, possibilitando que o resveratrol seja absorvido para o interior das células.^[19]

Muitos estudos têm demonstrado a eficácia dos efeitos exercidos pelo resveratrol em diversos tratamentos terapêuticos. Por isso, a este composto tem sido atribuído uma propriedade bioativa. Apesar de que quimicamente, a estrutura molecular do resveratrol possui propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, devido a sua baixa biodisponibilidade, sendo ainda rapidamente e extensivamente metabolizado e excretado. Por outro lado, alguns estudos têm reconsiderado este fato. Haja vista, que a distribuição do resveratrol em órgãos-alvos, tais como o fígado, pode ocorrer pela conversão dos sulfatos e glucoronidos (metabólitos) novamente ao composto.^[20,21,22] Além disso, uma outra hipótese sugere que os metabólitos de resveratrol são facilmente reabsorvidos na porção do intestino delgado, após a sua desconjugação durante o processo de recirculação entero-hepática.^[23]

Estudos anteriores têm estabelecido alguns parâmetros farmacocinéticos do resveratrol. Os resultados de um estudo clínico mostraram que a administração oral, em dose única de 5000 mg/resveratrol, atingia a concentração plasmática máxima de 2,4 μM do composto após 30 minutos. Nessa mesma condição, o tempo de meia-vida observado foi de 1-3 h. No entanto, quando realizada a administração do resveratrol em doses múltiplas, este tempo de meia-vida oscilava entre 2-5 h. Além disso, a concentração máxima observada foi de 4,24 μM quando a mesma dose foi administrada durante 29 dias.^[24]

Para alcançar a eficácia terapêutica ideal, os fármacos ou moléculas bioativas devem apresentar alta potência e seletividade para interagir com um alvo biológico

específico, bem como a capacidade de atingir concentrações teciduais-alvo nos níveis necessários para produzir o efeito [25]. A farmacocinética de um composto determina sua disponibilidade no local da ação. Nesse sentido, a caracterização da absorção, distribuição, metabolismo e excreção de uma molécula com atividade biológica é crucial para que a posologia correta seja utilizada evitando, assim, o aparecimento de concentrações sub-terapêuticas e/ou tóxicas após a sua administração. [26]. Portanto, o objetivo do presente estudo é descrever a farmacocinética plasmática e a distribuição tecidual do resveratrol após administração por diferentes vias e doses em ratos *Wistar*. Uma modelagem com abordagem populacional é inédita para esta molécula.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material e reagentes químicos

O resveratrol (pureza > 98%) foi adquirido da empresa Bothânica Manipulação e Homeopatia (Araraquara, SP). Todos os demais reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Sigma, St Louis, EUA), quando não houver especificação.

2.2 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando-se um sistema de HPLC (PerkinElmer/Flexar™), equipado com forno automático, detector UV-Visível e bomba binária. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa (C18 x 4,2 mm x 150 mm, 5 µm, Phenomenex, Brasil), acoplada a uma pré-coluna (C 18 x 10 mm x 5 µm, Hypersil BDS/Thermo Scientific, EUA). A fase móvel utilizada foi constituída de água *Milli-Q* (A) e acetonitrila grau HPLC (B), sendo que o gradiente

utilizado foi o seguinte: 8,0 min em 10% (B); 5,0 min em 70% (B), 7,0 min em 10% (B) para retornar as condições iniciais, em um fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹, temperatura de 50 °C e o registro da leitura em 310 nm. Todas as soluções foram previamente filtradas, através de membrana de 0,45 µm (Millipore®, USA).

2.3 Curva de calibração e amostras de padrão de qualidade

Para elaboração de uma solução a 50 µg.mL⁻¹ o resveratrol foi solubilizado em solução de metanol (70%), a partir dessa solução mãe, por diluições sequenciais, foram preparadas soluções padrão de calibração para obter concentrações finais de 625, 2500, 10000, 20000 e 50000 ng.mL⁻¹ e três soluções de controle de qualidade, em concentrações de 1250, 5000 e 25000 ng.mL⁻¹. Todas as amostras foram previamente filtradas, utilizando filtros de 0,45 µm (Millipore®, USA).

2.4 Preparação da amostra

Após a preparação das soluções, foram misturados 10 µL de cada solução com 90 µL de plasma de rato em branco. Após agitação durante 20 segundos em vortex, as amostras foram centrifugadas (6000 g/10 min./4 °C). Em seguida, foi adicionado metanol gelado para extração das matrizes biológicas na proporção 3:1, misturados e centrifugados (10000 g/4 min./4 °C), o sobrenadante foi injetado no sistema CLAE/UV para análise.

2.5 Validação do método

Os procedimentos de validação foram realizados de acordo com as diretrizes do guia FDA,^[25] a qual se apresenta como guia para a validação de métodos

bioanalíticos, para determinar seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade do analito.

2.5.1 Teste de linearidade

As curvas de calibração foram realizadas por quantificação de cinco diferentes concentrações de solução de resveratrol na faixa de 62,5-5000 $\eta\text{g.mL}^{-1}$ adicionadas em plasma de ratos. As análises foram realizadas em triplicata, em dois dias consecutivos para análise inter-dia. A linearidade das curvas de calibração foi feita com base na relação da área do pico, a função da concentração nominal foi avaliada por regressão linear. Para aceitação dos dados era necessário a precisão possuir um desvio menor ou igual a 15% e menor ou igual a 20% em relação à concentração conhecida para o LIQ.^[27]

2.5.2 Teste de seletividade

A seletividade foi determinada por varredura UV com a análise de amostra de plasma de rato em branco e amostras de plasma de rato contendo resveratrol. Os resultados foram comparados e foi realizada investigação de interferentes nas regiões cromatográficas de pico do resveratrol.^[27]

2.5.3 Teste de precisão

A precisão foi calculada pela comparação entre a concentração quantificada nas amostras experimentais e a concentração conhecida do resveratrol. Os critérios de aceitação dos dados incluíram o coeficiente de variação para o desvio de até 15%, exceto para o LIQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de 20% do valor conhecido.^[27]

2.5.4 Teste de exatidão inter e intra-dia

No ensaio de validação a exatidão foi avaliada através do coeficiente de variação entre replicatas de controles de qualidade da curva de calibração com concentrações de 125, 500 e 2500 ng.mL⁻¹. A exatidão é ainda subdividida em intra e inter-dia. A intra-dia foi definida pela repetição em um curto intervalo de tempo, tendo os resultados obtidos as mesmas condições de análise, já a inter-dia foi definida em dois dias consecutivos, obtendo os resultados em condições de análise diferentes. Não foram admitidos valores do desvio padrão relativo (DPR) superiores a 20% para o LIQ e 15% para os outros valores de concentração.^[27]

2.5.5 Teste de recuperação

A recuperação do resveratrol foi realizada em três concentrações diferentes (125, 500 e 2500 ng.mL⁻¹) e determinada pela relação da área de pico entre as amostras extraídas com resveratrol e soluções de resveratrol. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em % de recuperação.^[27]

2.5.6 Teste de estabilidade em matriz biológica

A estabilidade do analito foi avaliada por armazenamento em longa duração em congelamento a -20 °C, as amostras foram armazenadas no período de 30, 60 e 90 dias, descongeladas e avaliadas. O experimento foi realizado em triplicata e os dados obtidos foram expressos em % de estabilidade, as amostras foram consideradas estáveis se os resultados estivessem dentro dos limites de variabilidade de 15%.^[27].

2.6 Análise farmacocinética

O experimento com os animais foi aprovado pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (043/2016). Os animais foram mantidos sob controle de 12 horas de ciclo luz-escuro durante o período de aclimatação com acesso livre a água e comida. A solução de resveratrol (3 mg.mL⁻¹) foi preparada com adição de 10% de DMSO, completando para o volume final com solução salina. A solução contendo resveratrol foi administrada pela na veia lateral caudal dos animais na dose de 5 mg.kg⁻¹ (n = 6) e por gavagem oral na dose de 100 mg.kg⁻¹ (n = 5). Amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal nos tempos 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8 e 22 horas após a administração intravenosa e 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 10 e 24 horas após a administração oral e foram transferidas para tubos heparinizados. As amostras de sangue foram centrifugadas (15000 rpm/4 °C/10 min.) para separar o plasma, em seguida o plasma foi congelado a -20 °C para posterior análise para quantificar o analito.

As concentrações de plasma versus perfis de tempo foram analisadas individualmente para cada animal utilizando a abordagem não compartimental e populacional. Na abordagem não compartimental, a concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo de concentração máxima (t_{max}) foram obtidos por inspeção visual dos dados da concentração plasmática - tempo após a administração oral. Parâmetros farmacocinéticos tais como constante de taxa de eliminação (k_e), área sob a curva (AUC_{0-∞}), depuração (CL_{tot}), meia-vida (t_{1/2}), volume de distribuição (V_d) e biodisponibilidade (F_{abs}) foram determinados usando equações clássicas^[28]. A análise por abordagem populacional foi realizada utilizando o software de modelagem de efeito misto não-linear Monolix® versão 4.4.0 (<http://www.lixoft.eu>). Os parâmetros e micro-constantes foram estimados calculando-se a estimativa de máxima

verossimilhança dos parâmetros sem qualquer aproximação do modelo (sem linearização) usando o algoritmo de maximização da expectativa de aproximação estocástica combinado com um procedimento de Monte Carlo. Um modelo de erro proporcional foi usado para descrever tanto a variabilidade residual (ϵ_{CONST}) como e a variabilidade entre os animais (BSV ou η). A contração de parâmetros foi calculada como $[1 - SD(\eta) / \omega]$, onde $SD(\eta)$ e ω são o desvio padrão dos parâmetros η individuais e a estimativa do modelo populacional do BSV, respectivamente. O teste de razão de verossimilhança incluindo a log-verossimilhança, o critério de informação de Akaike (AIC) e o critério de informação bayesiano (BIC) foram utilizados para testar diferentes hipóteses sobre o modelo final e o modelo de variabilidade residual. A partir do modelo final, foram realizadas 1000 simulações para computar as métricas de verificação preditiva visual (VPC) e de distribuição de predição normalizada (NPDE), cuja média, variância e distribuição não devem ser diferentes de 0, 1 e uma distribuição normal [28,29].

Um modelo aberto de dois compartimentos foi adaptado à concentração plasmática de resveratrol após administração i.v. em ratos *Wistar*:

$$C = a \cdot e^{-\alpha \cdot t} + b \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

onde C é a concentração total no plasma; a e b são os interceptos para as fases de distribuição e eliminação, respectivamente; α e β são as constantes de velocidade que representam a distribuição e a eliminação, respectivamente; t é tempo;

Um modelo aberto de dois compartimentos com eliminação e absorção de primeira ordem foi adaptado à concentração plasmática de resveratrol após administração oral em ratos *Wistar*:

$$C = a \cdot e^{-\alpha \cdot t} + b \cdot e^{-\beta \cdot t} - (a + b) \cdot e^{-k_a \cdot t}$$

onde C é a concentração total no plasma; a e b são os interceptos para as fases de distribuição e eliminação, respectivamente; α e β são as constantes de velocidade que representam a distribuição e a eliminação, respectivamente; k_a é a constante de taxa de absorção de primeira ordem; t é tempo.

2.7 Estudo de Distribuição Tecidual

Para o experimento de distribuição tecidual, ratos machos *Wistar* (250-300 g) foram utilizados. Depois de administração *i.v. bolus* de 10 mg.kg^{-1} de resveratrol, dois animais foram sacrificados a 1h, 3h, 6h e 11h. Amostras do fígado, pulmão, rim, coração, estômago, baço, tecido adiposo e cérebro foram removidos, suavemente absorvidos um papel absorvente, pesados e congelados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até o processamento. Além disso, amostras de sangue total foram coletadas em Eppendorf® tubos previamente heparinizados. No dia da análise, as amostras de tecido foram descongeladas e foi adicionado metanol na proporção 3:1 em relação a gramagem do tecido. Os tecidos foram homogeneizados por aproximadamente 5 min e os homogenatos foram então transferidos para tubos Eppendorf® e centrifugados a $15000 \times g$ por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi, então, processado de forma semelhante às amostras de plasma e analisadas por CLAE-UV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros de validação

Para a avaliação da linearidade as curvas analíticas foram elaboradas em concentração versus as áreas (média) absolutas dos picos correspondentes. O método foi linear na faixa de concentração de 62,5-5000 ng.mL⁻¹ em plasma de rato (**Fig. 2.2**). As curvas de calibração foram lineares usando regressão linear ponderada (1 = concentração), a equação média da curva de calibração de validação foi: $y = 44,285x + 2130,9$, $R^2 = 1$, onde y representa a área do pico de resveratrol e x representa a concentração plasmática do analito.

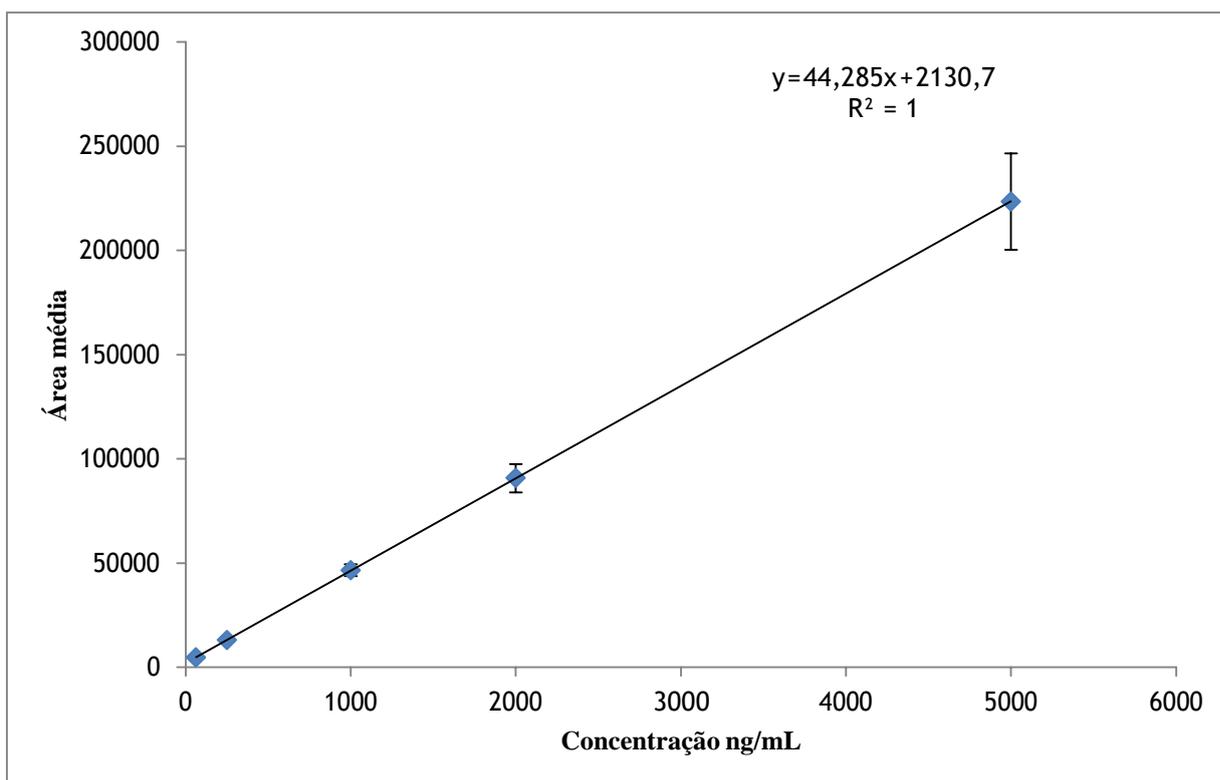


Figura 2.2 – Curva de calibração média de resveratrol em plasma de rato (MD ± D.P.).

A seletividade pode ser observada comparando os cromatogramas representativos de plasma em branco independente (**Fig. 2.3**) e o plasma de rato

contendo resveratrol (**Fig. 2.4**). Não foram detectados picos de absorção que possam interferir com o pico de absorção do resveratrol no espectro UV no comprimento de 310 nm, confirmando assim a seletividade do método.

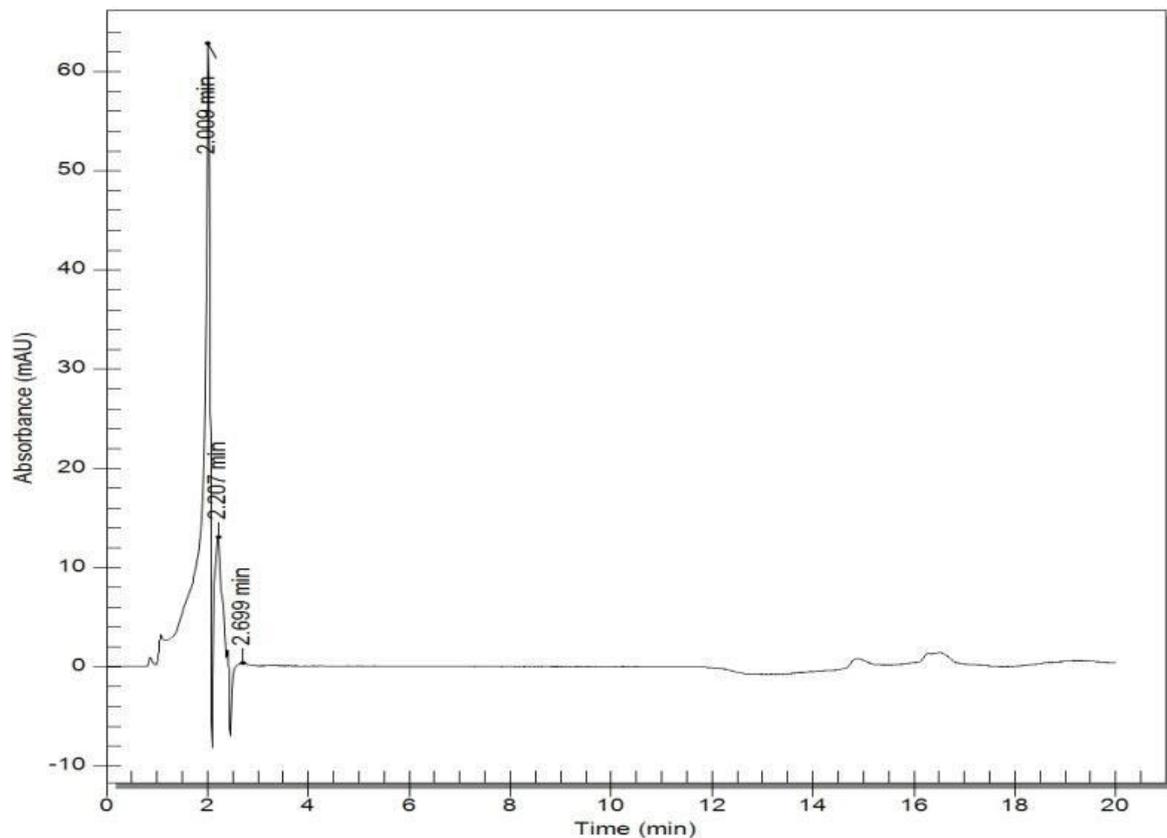


Figura 2.3 – Perfil cromatográfico obtido a partir da amostra do plasma de ratos sem adição de resveratrol (Controle negativo)

Os resultados de precisão estão expressos na **Tabela 2.1**, estando em concordância com o preconizado pelo guia FDA,^[25] onde o CV não deve exceder 15%, exceto o LIQ, onde não deve exceder 20%.

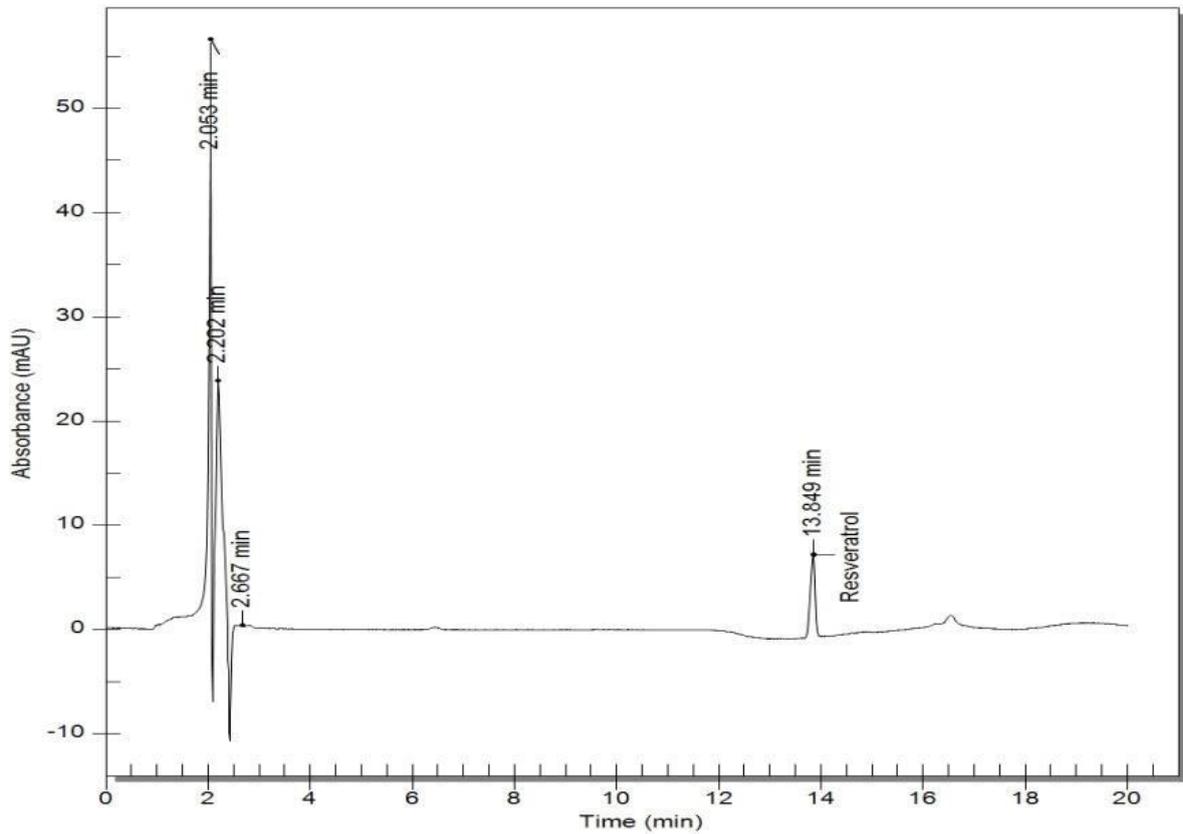


Figura 2.4 – Perfil cromatográfico obtido a partir da amostra do plasma de ratos com adição de resveratrol de $10.000 \text{ ng.mL}^{-1}$ (Controle positivo)

Tabela 2.1 – Precisão do resveratrol em plasma de rato.

[] de resveratrol (ng.mL^{-1})	CV% dia 1	CV% dia 2	CV% inter-dia
62,5	17,68	11,41	19,30
250	2,51	10,22	2,75
1000	1,94	2,82	2,76
2000	1,64	1,90	1,09
5000	0,19	0,27	0,27

O desvio padrão relativo intra e inter-dia para o resveratrol durante o experimento de validação é mostrado na **Tabela 2.2**. A exatidão do método bioanalítico foi determinada entre 85,01 e 115,03% para todos os controles de qualidade. Esses resultados indicam que o método desenvolvido para a quantificação de resveratrol em plasma de ratos mostrou exatidão dentro dos limites aceitáveis estabelecidos para métodos bioanalíticos de acordo com o guia FDA.^[27]

Tabela 2.2 – Variação da exatidão intra e inter-dia do resveratrol em plasma de rato.

Concentração (ng.mL ⁻¹)	Dia	Concentração quantificada		
		Média (%)	*D.P.	**D.P.R.
Intra-dia				
125	1	117,857	13,64642	11,57905
	2	142,899	1,145482	0,788333
500	1	529,761	19,64183	3,707678
	2	531,445	14,34005	2,698309
2500	1	2696,129	14,35391	5,323897
	2	2267,459	10,18963	4,493854
Inter-dia				
		139,9575	29,41825	2,101942
		5385,422	70,96311	1,317689
		2528,817	2613,578	10,33518

*D.P. = Desvio padrão. ** D.P.R. = Desvio padrão relativo.

As análises da estabilidade mostraram que o armazenamento do resveratrol no período de 30, 60 e 90 dias apresentou variabilidade aceitável dentro dos limites de 15% da concentração conhecida (**Tabela 2.3**). Como não houve diferença estatística ($\alpha = 0,05$) entre os valores, os resultados indicam que as amostras podem permanecer no freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por até 90 dias para serem analisadas por CLAE.

Tabela 2.3 – Estabilidade do resveratrol (Concentração 5000 ng.mL^{-1}) em plasma de rato.

Tempo (em dias)	Estabilidade (%)
30	$92,0 \pm 6,6$
60	$95,6 \pm 7,2$
90	$87,3 \pm 3,2$

O método desenvolvido foi considerado validado já que se mostrou linear, preciso, específico, exato e reprodutível sendo utilizado para a quantificação de amostras biológicas de ratos *Wistar* após a administração de resveratrol em três doses e por duas vias diferentes a estes animais.

3.2 Modelagem farmacocinética

A concentração média de resveratrol em relação ao tempo que ocorreu a administração de 5 mg.kg^{-1} pela via *i.v. bolus* a ratos *Wistar* ($n = 6$) pode ser visto na **Figura 2.5**. Os parâmetros calculados por abordagem não compartimental foram uma constante de eliminação (K_e) de $0,09\text{ h}^{-1} \pm 0,04$, gerando uma meia-vida ($t_{1/2}$) de $9,5\text{ h} \pm 3,7$, o volume aparente de distribuição (V_d) foi de $5,8\text{ L.kg}^{-1} \pm 4,7$, o *Clearance* (Cl) de $0,39\text{ L.h.Kg}^{-1} \pm 0,26$, Área sob a Curva (ASC) total de $6076\text{ ng.h/mL} \pm 2959$ e tempo de residência médio (MRT) de $8,7\text{ h} \pm 3,4$. Os resultados encontrados no presente

estudo divergem das pesquisas recentes de Qiu et al.^[30] que encontraram para o resveratrol $t_{1/2} = 2,21$ h, $V_d = 1,78$ L.Kg⁻¹ e $Cl = 6,63$ L.H.Kg⁻¹ e Chen et al.^[31] com seu achado de $V_d = 1,63$ L/Kg⁻¹; $Cl = 6,43$ L.H.Kg⁻¹, ambos utilizaram método LC-MS/MS e realizaram análise farmacocinética com administração de resveratrol *i.v. bolus*. Essa discordância entre os resultados pode ter relação com a variabilidade dos animais. Adicionalmente, o *Clearance* está diminuído neste experimento, indicando uma possível incapacidade metabólica destes ratos, já que o resveratrol é eliminado principalmente por metabolização.^[21,22]

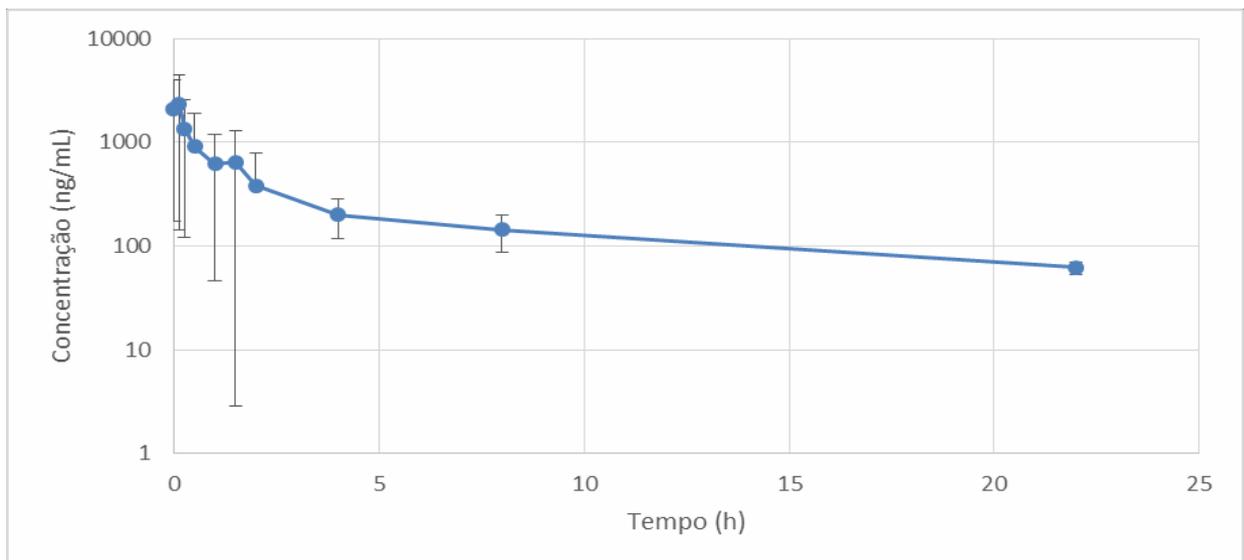


Figura 2.5 – Perfil médio de concentração plasmática de resveratrol após dose *i.v. bolus* única de 5 mg/kg para ratos *Wistar* machos (Média \pm D.P., $n = 6$).

A curva de concentração média do resveratrol após a administração oral do mesmo na dose de 100 mg.kg⁻¹ está na **Figura 2.6**. Como pode ser visto, o resveratrol apresentou dois picos de concentração nos tempos de 2 e 6 horas após a sua administração oral. Este dado indica que a molécula pode sofrer uma recirculação entero-hepática, ficando mais tempo no organismo aumentando, assim, sua

disposição neste ^[23].

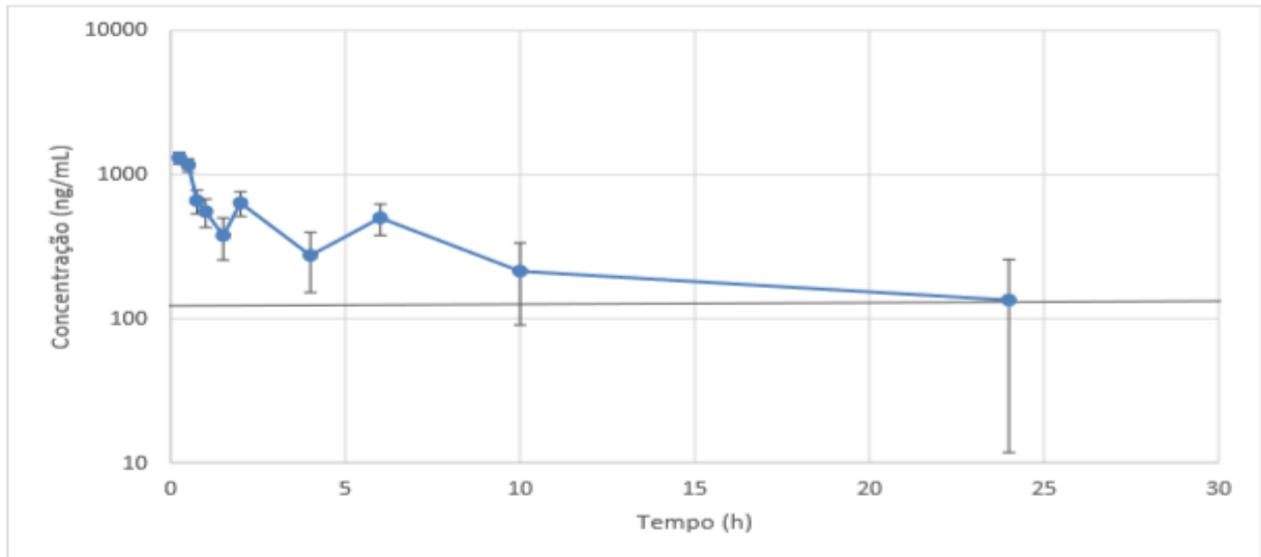


Figura 2.6 – Perfil médio de concentração plasmática de resveratrol após dose oral única de 100 mg/kg para ratos *Wistar* machos (Média \pm D.P., $n = 5$).

Os parâmetros calculados por abordagem não compartimental foram uma constante de Eliminação (K_e) de $0,12 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$, gerando uma meia-vida ($t_{1/2}$) de $7,9 \pm 4,2 \text{ h}$, o volume aparente de distribuição (V_d) foi de $13,3 \pm 3,3 \text{ L.kg}^{-1}$ o Clearance (Cl) de $1,76 \pm 0,49 \text{ L.h.Kg}^{-1} \pm 0,26$, Área sob a Curva (ASC) total de $6519 \pm 1592 \text{ ng.h/mL}$ e tempo de residência médio (MRT) de $7,7 \pm 1,7 \text{ h}$. O $t_{1/2}$ encontrado foi maior neste experimento do que em Qiu et al.^[30], onde o valor equivaleu a $3,61 \pm 0,72 \text{ h}$, a diferença pode ser decorrente da maior quantidade de pontos de coleta após administração, fornecendo uma melhor interpretação à cerca da fase de eliminação. Já em Liang et al.^[33] (2013), estudo mais completo com relação ao número de coletas realizadas para determinação plasmática de resveratrol, os parâmetros encontrados foram $t_{1/2} = 1,97 \pm 0,34 \text{ h}$, o $\text{Cl} = 0,005 \pm 0,00075 \text{ h}$ e o $V_d = 52,7 \pm 11,5 \text{ L}$. Tais dados corroboram parcialmente com os

resultados deste estudo, discrepando apenas com relação aos parâmetros de meia-vida.

A biodisponibilidade (f_{abs}) calculada através da fórmula descrita em Shargel [28] foi de aproximadamente 6%, de acordo com valores previamente descritos na literatura já que o resveratrol sofre extenso efeito de primeira passagem e, portanto, seus valores de concentração plasmática são menores quando a mesma dose é administrada pela via oral em comparação com a via intravenosa. [34,35] Os dados obtidos neste trabalho corroboram com esta informação como podemos analisar nos dois distintos gráficos de concentração vs tempo dispostos nas **Figuras 2.5 e 2.6**.

A modelagem farmacocinética populacional feita após a administração do resveratrol pelas vias oral (100 mg.kg^{-1}) e intravenosa (5 mg.kg^{-1}), estão mostradas nas **Figura 2.7 e 2.8**, respectivamente.

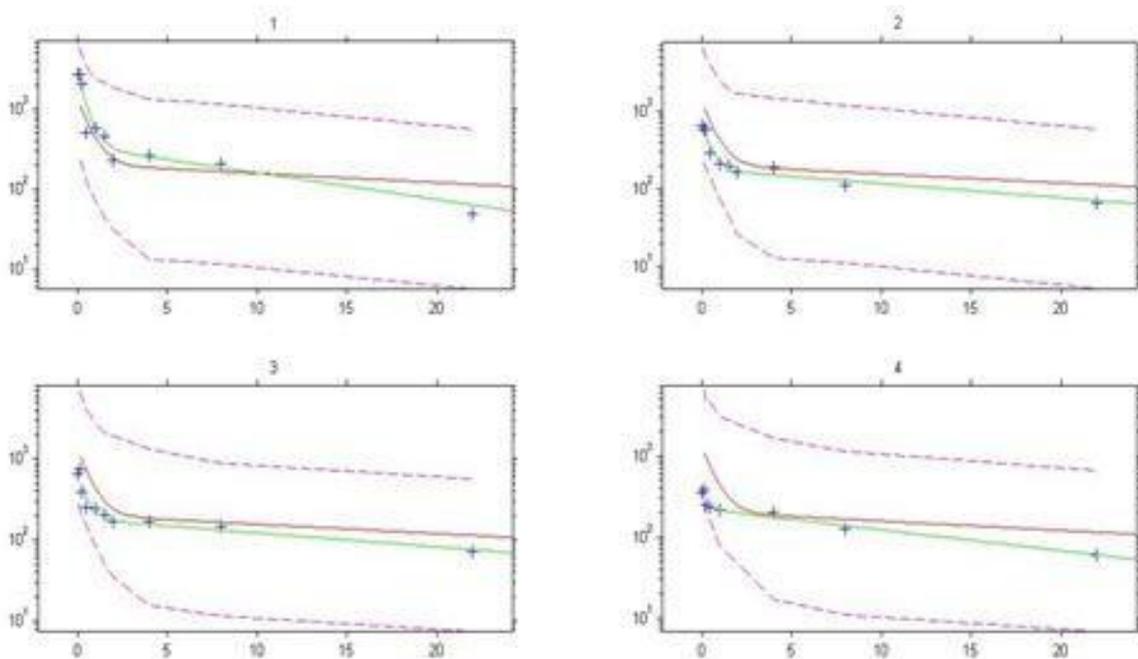


Figura 2.7 – Curvas de concentração por tempo individuais do resveratrol após administração intravenosa em ratos *Wistar*; (+, observações; linha vermelha, predição da população típica; linha verde, predição individual; linhas achuradas, previsão de concentrações previstas com intervalo de confiança de 90%).

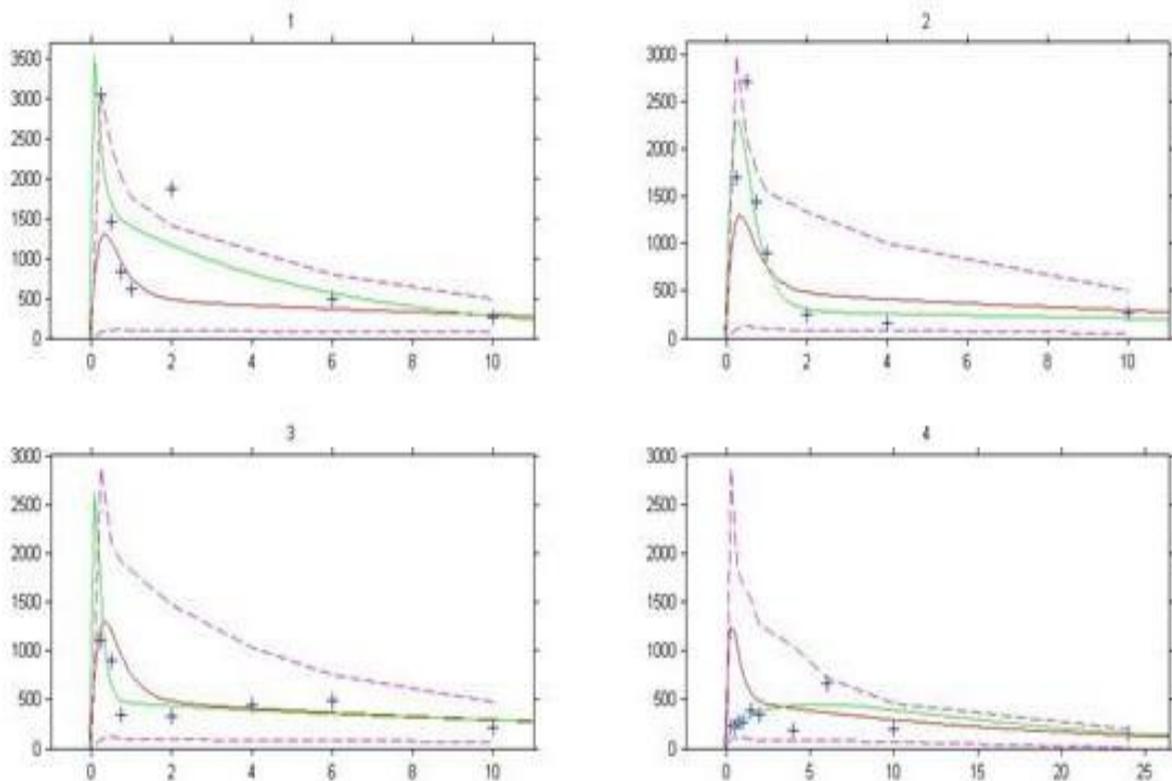


Figura 2.8 – Curvas de concentração por tempo individuais do resveratrol após administração oral em ratos *Wistar*, (+, observações; linha vermelha, predição da população típica; linha verde, predição individual; linhas achuradas, previsão de concentrações previstas com intervalo de confiança de 90%).

Os valores das constantes e parâmetros farmacocinéticos populacionais, bem como o valor matriz de variabilidade inter-individual estimados pelo software Monolix® estão descritos na **Tabela 2.4**. Adicionalmente, os valores de Erro Padrão Relativo (E.P.R.%) para as constantes e parâmetros populacionais bem como para a variabilidade se mantiveram abaixo dos 30% como preconizado [30, 36].

Os valores de volume de distribuição e da micro-constante de distribuição do compartimento central para o compartimento periférico, k_{12} , indicam que o resveratrol sofre uma maior distribuição tecidual quando

administrado pela via oral em comparação a via intravenosa, contribuindo com os valores menores de concentração plasmática encontrados.

Tabela 2.4 – Parâmetros farmacocinéticos populacionais do resveratrol após a administração de doses únicas de 5 mg/kg pela via intravenosa (n = 6) e de 100 mg.kg⁻¹ pela via oral (n = 5). % EPR, erro padrão relativo por cento; BSV, variabilidade inter- individual (η).

Constantes e Parâmetros PK	Média Estimada (%EPR) i.v.	BSV Estimada (%EPR) i.v.	Média Estimada (%EPR) oral	BSV Estimada (%EPR) oral
V (L/kg)	5,2 (22,3)	4 (20,1)	20,5 (24)	4,6 (14,5)
k ₁₀ (h ⁻¹)	0,27 (24,7)	0,21 (24,3)	0,39 (34)	0,06 (9,4)
k ₁₂ (h ⁻¹)	1,26 (19)	0,37 (24,5)	4,13 (26)	0,95 (29)
k ₂₁ (h ⁻¹)	0,52 (24,7)	0,36 (28,1)	0,58 (28)	0,44 (27)
ka (h ⁻¹)	-	-	2,43 (21)	1,67 (28)

*V é o volume de distribuição do compartimento central, k₁₀ é a microconstante de eliminação do compartimento central, k₁₂ é a microconstante de distribuição do compartimento central para o compartimento periférico, k₂₁ é a microconstante de redistribuição do compartimento periférico para o compartimento central e ka é a constante de absorção.

3.3 Distribuição tecidual

O gráfico com os valores de concentração tecidual do resveratrol vs tempo em diferentes órgãos e tecidos após a administração intravenosa de 10 mg.kg⁻¹ do resveratrol a ratos *Wistar* (n = 2/ponto) pode ser visto abaixo na **Figura 2.8**. Ao analisarmos estes dados, podemos perceber que no estômago, o resveratrol parece apresentar um aumento da concentração 11 h após a administração. Outro

fator interessante é a alta concentração do resveratrol no cérebro mostrando que esta molécula é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica dos animais, esta concentração cerebral parece ser a responsável pela ação neuroprotetora do resveratrol. Conforme o esperado, as concentrações renais e hepáticas diminuem após 3h de administração, já que estes são locais de eliminação da molécula. Vale ressaltar que estes resultados são indicativos e não confirmatórios, pois foram obtidos em apenas 2 (dois) animais por ponto e não em 3 (três) animais como preconizado para podermos fazer inferências significativas^[32,36].

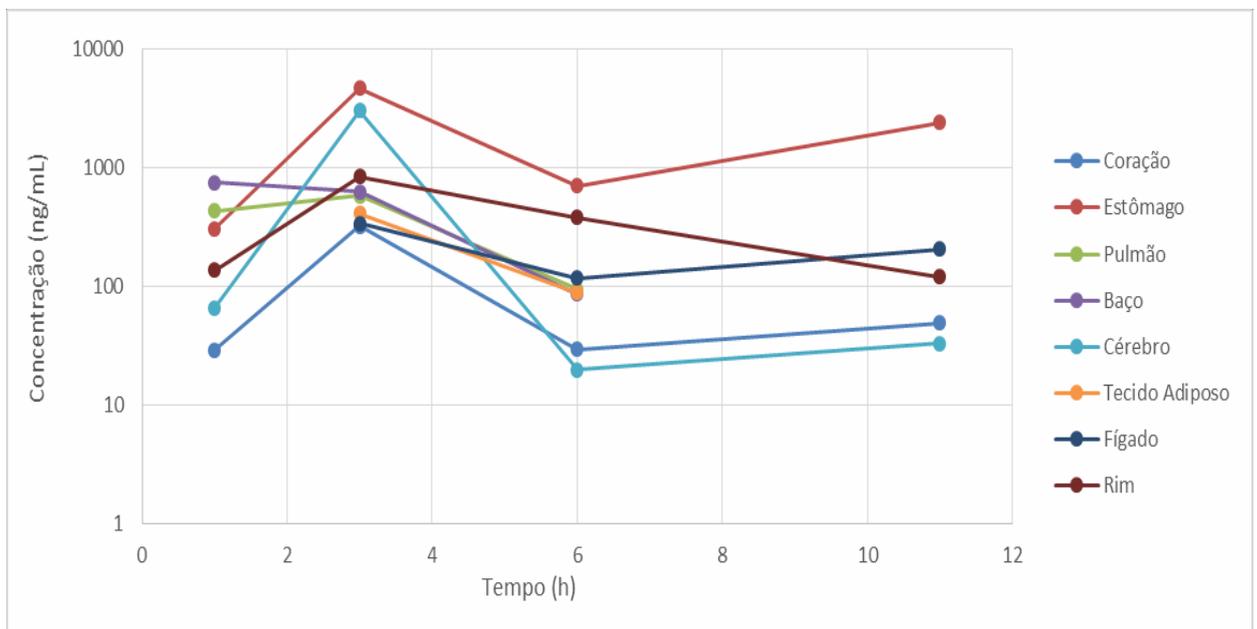


Figura 2.8 - Concentração tecidual de resveratrol vs tempo em diferentes órgãos e tecidos após administração intravenosa de 10 mg/kg do resveratrol a ratos *Wistar* (n = 2/ponto).

4 CONCLUSÕES

Um método de CLAE/UV eficiente e confiável foi desenvolvido e validado para quantificação de resveratrol em plasma de rato. Esse método mostrou-se sensível, linear, preciso, exato e reprodutível adequadamente tendo êxito na sua aplicabilidade farmacocinética em ratos. A avaliação farmacocinética não compartimental e populacional após a administração oral e intravenosa mostrou que o resveratrol apresentou como modelo ideal o de dois compartimentos em ambas, com um maior tempo de exposição no organismo e maior distribuição após administração oral quando comparada a intravenosa. O resveratrol apresentou alta concentração cerebral após administração i.v. o que indica que esta molécula é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica de ratos *Wistar*, capacidade crucial para sua atividade neuroprotetora.

Conflito de interesse

Todos autores declaram que não há conflito de interesse no que diz respeito à pesquisa realizada, a publicação dos resultados e em relação as questões financeiras.

REFERÊNCIAS

- [1] Fotecave, M.; Lepoivre, M.; Elleingand, E.; Gerez, C.; Guittet, O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Letters*. **1998**, 42, 277–279.
- [2] Goswami, S.K.; Das, D.K. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Letters*. **2009**, 284, 1–6.
- [3] Bresciani, L.; Calani, L.; Bocchi, L.; Delucchi, F.; Savi, M. Bioaccumulation of resveratrol metabolites in myocardial tissue is dose-time dependent and related to cardiac hemodynamics in diabetic rats. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2014**, 24, 408–415.
- [4] Jin, F.; Wu, Q.; Lu, Y. F.; Gong, Q. H.; and Shi, J. S. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, 600, 78–82.
- [5] Richard, T.; Pawlus, A. D.; Iglesias, M. L.; Pedrot, E.; Waffo-Teguo, P. Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, 1215, 103–108.
- [6] Bazzo, K. O.; Souto, A. A.; Lopes, T. G.; Zanin, R. F.; Gomez, M. V. Evidence for the analgesic activity of resveratrol in acute models of nociception in mice. *J. Nat. Prod.* **2012**, 76, 13–21.
- [7] Yao, J.; Wang, J. Y.; Liu, L.; Li, Y. X.; Xun, A. Y. Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Arch. Med. Res.* **2010**, 41, 288–294.
- [8] Liu, Y.; He, X. Q.; Huang, X.; Ding, L.; Xu, L.; Shen, Y.; Zhang, F.; Zhu, M.; Xu, B.; Qi, Z. Wang, H. Resveratrol protects mouse oocytes from methylglyoxal-induced oxidative damage. *PloS One*. **2013**, 8, e77960.
- [9] Lanzilli, G.; Cottarelli, A.; Nicotera, G.; Guida, S.; Ravagnan, G. Anti-inflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation. *Inflammation*. **2012**, 35, 240–248.
- [10] Li, X. M.; Zhou, M. T.; Wang, X. M.; Ji, M. H.; Zhou, Z. Q. Resveratrol pretreatment attenuates the isoflurane-induced cognitive impairment through its anti-inflammation and-apoptosis actions in aged mice. *J. Mol. Neurosci.* **2014**, 52, 286–293.
- [11] Paul, S.; Rimando, A. M.; Lee, H. J.; Ji, Y.; Reddy, B. S. Antiinflammatory action of pterostilbene is mediated through the p38 mitogenactivated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Cancer Prev. Res.* **2009**, 2, 650–657.

- [12] Kaeberlein, M. Resveratrol and rapamycin: Are they anti-aging drugs? *Bioessays*. **2010**, 32, 96–99.
- [13] Kasiotis, K. M.; Pratsinis, H.; Kletsas, D.; and Haroutounian, S. A. Resveratrol and related stilbenes: Their anti-aging and anti-angiogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 61, 112–120.
- [14] Hsu, S. C.; Huang, S. M.; Chen, A., Sun; C. Y., Lin; S. H. Resveratrol increases anti-aging Klotho gene expression via the activating transcription factor 3/c-Jun complex-mediated signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, 53, 361–371.
- [15] Bhakkiyalakshmi, E.; Sireesh, D.; Sakthivadivel, M.; Sivasubramanian, S.; Gunasekaran, P. Anti-hyperlipidemic and anti-peroxidative role of pterostilbene via Nrf2 signaling in experimental diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, 777, 9–16.
- [16] Aguirre, L.; Fernandez-Quintela, A.; Arias, N.; and Portillo, M. P. Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules*. **2014**, 19, 18632–18655.
- [17] Chang, C. C.; Lin, K. Y.; Peng, K. Y.; Day, Y. J.; and Hung, L. M. Resveratrol exerts anti-obesity effects in high-fat diet obese mice and displays differential dosage effects on cytotoxicity, differentiation, and lipolysis in 3T3-L1 cells. *Endocr. J.* **2016**, 63, 169–178.
- [18] Kumar, A.; Negi, G.; and Sharma, S. Neuroprotection by resveratrol in diabetic neuropathy: Concepts & mechanisms. *Curr. Med. Chem.* **2013**, 20, 4640–4645.
- [19] Delmas, D.; Aires, V.; Limagne, E. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *An. of the N.Y. Acad. of Sci.* **2011**, 1215, 48–59.
- [20] Vitrac, X.; Desmoulière, A.; Brouillaud, B. Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *L. Sci.* **2003**, 72, 2219–2233.
- [21] Wenzel, E.; Somoza, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. and Food Res.* **2005**, 49, 472–481.
- [22] Wenzel, E., Soldo, T., Erbersdobler, H., Somoza, V. Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Mol. Nutr. & Food Res.* **2005**, 49, 482–494.

- [23] Marier, J-F.; Vachon, P.; Gritsas, A.; Zhang, J.; Moreau, J-P.; M. P. Ducharme, M.P. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *The J. of Pharm. and Exp. Therap.* **2002**, 302, 1, 69–373.
- [24] Chachay, V. Resveratrol - pills to replace a healthy diet. *British Journal Of Clinical Pharmacolog.* **2011**, 71, 27-38.
- [25] Conrado DJ. et al. Pharmacokinetic evaluation of LASSBio-579: an N-phenylpiperazine antipsychotic prototype. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2008**, 60, 699-707.
- [26] Torres, BGS. et al. Pre-clinical pharmacokinetics and acute toxicological evaluation of a monastrol derivative anticancer candidate LaSOM 65 in rats. *Xenobiotica*, **2014**, 44, 254-263.
- [27] *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*; US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Rockville, MD, **2001**.
- [28] Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. McGraw-Hill, New York, **2005**, 52-184.
- [29] Kuhn, E., Lavielle, M. Maximum likelihood estimation in nonlinear mixed effects models. *Comput Stat Data Analysis*. **2005**, 49, 1020–1038.
- [30] Bergstrand, M., Hooker, A.C., Wallin, J.E., Karlsson, M.O. Prediction corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J.* **2011**, 13, 143–151.
- [31] Qiu, Z.; Yu, J.; Dai, Y.; Yang, Y.; Lu, X.; Xu, J.; Qin, Z.; Huang, F.; Li, N. A simple LC-MS/MS method facilitated by salting-out assisted liquid–liquid extraction (SALLE) to simultaneously determine trans-resveratrol (Res), its glucuronide and sulfate conjugates in rat plasma and its application to pharmacokinetic assay. *Bio. Chrom.* **2017**, 31, 1-9.
- [32] Chen, W.; Yeo, S.C.M. Elhennawy, M.G.A.A.; Lin, H-S. Oxyresveratrol: A bioavailable dietary polyphenol. *J. of Func. Foods*. **2016**, 22, 122-131.
- [33] Azeredo FJ, Hass SE, Sansone P, Derendorf H, Costa TD, De Araujo BV. Does the anesthetic urethane influence the pharmacokinetics of antifungal drugs? A population pharmacokinetic investigation in rats. *J Pharm Sci*, **2015**, 104:3314–3318.

- [32] Moraes BS, Azeredo FJ, Izoton JC, Amaral M, Barreiro EJ, Freddo RJ, Dalla Costa T, Lima LM, Haas SE. Leishmanicidal candidate LASSBio-1736, a cysteine protease inhibitor with favorable pharmacokinetics: low clearance and good distribution. *Xenobiotica*, **2017** DOI: 10.1080/00498254.2017.1405465.
- [33] LIANG, Li et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion study of resveratrol and its prodrug 3,5,4'-tri-O-acetylresveratrol in rats. *Phytomedicine*, v. 20, n. 6, 2013, p.558-563.
- [34] CARRIZZO, Albino et al. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 61, **2013**, p.215-226.
- [35] RUIVO, Joana et al. The main potentialities of resveratrol for drug delivery systems. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, [s.l.], v. 51, n. 3, **2015**, p.499- 513.
- [36] Kaiser, M. et al. Pre-clinical pharmacokinetics evaluation of an anticonvulsant candidate benzaldehyde semicarbazone free and included in β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2010**, 39(5):355-62.