

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

JOÃO CARLOS LIMA RODRIGUES PITA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DO
TRACHYLOBANO-360, UM DITERPENÓ ISOLADO DE *Xylopia
langsdoeffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE)**

JOÃO PESSOA

2014

JOÃO CARLOS LIMA RODRIGUES PITA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DO
TRACHYLOBANO-360, UM DITERPENÓ ISOLADO DE *Xylopia
langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral

COORIENTADOR:

Prof. Dr. Socrates Golzio dos Santos

João Pessoa

2014

P681a Pita, João Carlos Lima Rodrigues.

Avaliação da toxicidade e farmacocinética do Trachylobano-360, um diterpeno isolado de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) / João Carlos Lima Rodrigues Pita. - João Pessoa, 2014.

130f. : il.

Orientadora: Marianna Vieira Sobral.

Coorientador: Socrates Golzio dos Santos.

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. *Xylopia langsdorffiana*. 3. Trachylobano-360. 4. Farmacocinética. 5. Toxicologia. 6. CLAE-EM_n

UFPB/BC

CDU: 33(043)

JOÃO CARLOS LIMA RODRIGUES PITA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DO
TRACHYLOBANO-360, UM DITERPENÓ ISOLADO DE *Xylopia
langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE)**

APROVADA EM 26 / 02 / 2014

BANCA EXAMINADORA

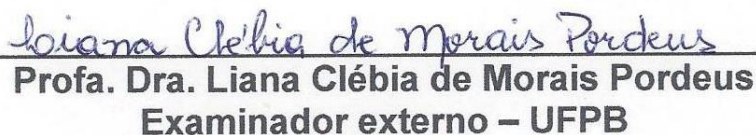

Prof.ª Dra. Marianna Vieira Sobral

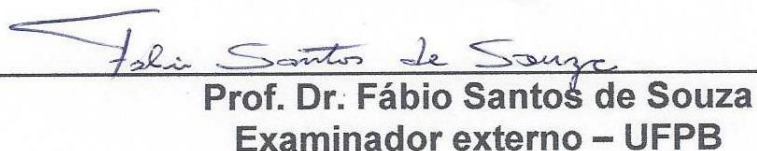
Orientadora – UFPB


Prof. Dr. Socrates Golzio dos Santos

Coorientador – UFPB

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Examinador interno – UFPB


Prof.ª Dra. Liana Clébia de Moraes Pordeus
Examinador externo – UFPB


Prof. Dr. Fábio Santos de Souza
Examinador externo – UFPB

Prof.ª Dra. Aurigena Antunes de Araujo
Examinador externo – UFRN

*À minha esposa, Patrícia Saraiva
Gadelha Pita, e aos meus pais, José Rodrigues
Pita Sobrinho e Maria de Fátima Lopes Lima
Rodrigues, pela presença constante, ensinamentos
e apoio em todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por iluminar meus passos todos os dias.

À minha melhor amiga e esposa **Patrícia Saraiva Gadelha Pita**, pelo amor, apoio, companheirismo, paciência em todos os momentos, contribuindo de forma direta e indireta para a conclusão de mais esta etapa tão importante. É um exemplo de determinação, coragem e garra para superar todos os obstáculos da vida.

Aos meus pais **José Pita** e **Maria de Fátima**, por todos os ensinamentos que me fizeram a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos **Rodrigo Pita** e **Ana Luzia Pita**, pelo apoio e torcida nessa longa caminhada.

À minha querida “voinha” **Luzia Lopes Lima** (*in memorian*), por todas as palavras de incentivo e apoio, e pela grande torcida, sempre demonstrada, pelo meu sucesso.

À Profa. Dra. **Marianna Vieira Sobral**, pela paciência e incentivo desde a iniciação científica, pelos seus ensinamentos, prestatividade e sua constante alegria. É um exemplo do que é ser professor, pesquisador e amigo que servirão de referência na minha vida pessoal e profissional. Sempre serei grato por tudo que me ensinastes e construístes em mim. Obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. **Socrates Golzio dos Santos**, pela coorientação, amizade, incentivo. Foi uma amizade construída nesses quatro anos que levarei para o resto da minha vida. Um exemplo de ser humano.

À **Equipe Farmacocinética**, composta pela doutoranda **Isis Fernandes Gomes** que foi presença marcante nessa nossa peregrinação (tese) e, sem dúvida, possui todo o mérito da conclusão deste trabalho, pela doutoranda **Hellane Fabrícia** que recentemente chegou para somar, sendo peça importante neste “quebra-

cabeça”, e a aluna de iniciação científica **Renata Abrantes** pela presteza desde o início e enorme contribuição nas etapas mais cansativas, sempre demonstrando muita vontade em aprender. Nos momentos mais difíceis, a nossa união nos fortalecia.

A Profa. Dra. **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, pelo incentivo há quase 10 anos, desde a iniciação científica, e contribuição na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Sobral da Silva**, pela amizade e colaboração em nosso grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Josean Fachine Tavares**, por colaborar com as substâncias estudadas.

A Profa. Dra. **Márcia Regina Piuvezam**, por permitir o uso do Laboratório de Imunologia, sempre com muita cordialidade, para realizarmos experimentos.

A Profa. Dra. **Hilzeth de Luna Freire Pessoa**, pelos ensinamentos em metodologias de avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade.

Ao Prof. Dr. **Robson Cavalcante Veras**, pela amizade, incentivos e ensinamentos que ficarão sempre guardados na minha mente e coração.

Ao Dr. **Hermann Ferreira Costa**, pela presteza de sempre.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação, pelos ensinamentos científicos e lições de vida.

A todos os amigos de doutorado, **Antônia, Bruna, Camila, Carlos, Maria do Carmo, Carol, Charlane, Dayseanne, Fillipe, Fábio, Marcelo, Thaísa, Thiago, Vivyanne, Wemerson**, pelo companheirismo e incentivo.

Em especial ao meu amigo **Rubens Batista Benedito**, pelo seu companherismo e incentivo nos momentos mais turbulentos da graduação/pós-graduação.

Às alunas de iniciação científica do Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) **Anna Rebeca**, **Bruna Laísa** e **Jamily Oliveira**, e às pós-graduandas do LABETOX, **Débora Pessoa**, **Heloísa Mara**, **Tatyanna Kelvia**, **Viviane Medeiros**, **Tatianne Motta**, **Monalisa Brito**, **Ana Paula Gomes** e **Daiene Lunguinho**, pelo incentivo e torcida durante essa caminhada.

Em especial à **Aline Lira Xavier**, pela amizade, incentivo e companherismo em todos esses nove anos de LABETOX.

Ao amigo **José Crispim Duarte** pelo constante incentivo e apoio.

A todos os **funcionários** do CBIotec e a secretária da Pós-graduação **Caroline Manguiera**, pelos serviços prestados.

A **Luis Cordeiro** e **Adriano Silva**, pela disponibilidade e apoio técnico imprescindível na execução deste trabalho.

Ao Biotério Prof. Dr. Thomas George da UFPB pelo fornecimento dos animais.

Ao **CNPq** pela bolsa concedida durante o período do doutorado.

MUITO OBRIGADO!

João Carlos Lima Rodrigues Pita

RESUMO

A avaliação do perfil farmacocinético e toxicológico é essencial no estudo de novos candidatos a fármacos. No entanto, estes estudos são escassos e vêm sendo realizados, em muitos casos, após o início dos ensaios clínicos. Trachylobano-360 (T-360), o diterpeno ácido *ent*-7 α -acetoxitrachylobano-18-óico, obtido de *Xylopia langsdorffiana*, apresenta atividades antitumoral e espasmolítica, tornando-se uma molécula promissora. Além disso, não há relatos na literatura de estudos toxicológicos e farmacocinéticos deste produto natural. Considerando todos esses aspectos, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade e a farmacocinética do T-360. No ensaio de toxicidade aguda em camundongos, o T-360 mostrou baixa toxicidade nas doses de 50 mg/kg (e.v.) e 300 mg/kg (i.p.), não induzindo nenhuma alteração comportamental e hematológica significantes. Porém, a dose de 300 mg/kg (e.v.) provocou morte em quatro de seis animais (DL_{50} estimada em 200 mg/kg). O T-360 não se mostrou genotóxico no ensaio do micronúcleo, pois não aumentou a frequência de eritrócitos micronucleados de camundongos tratados com 25, 150 e 300 mg/kg (i.p.). Dentre as técnicas bioanalíticas apropriadas para o estudo farmacocinético, destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM_n). Foi desenvolvido um método CLAE-EM_n que consistiu em ionização por ESI, em modo negativo, basificando o meio, com detecção do íon molecular 359 m/z. O estudo de fragmentação mostrou que o íon 359 m/z é quebrado em 299 m/z, sendo esta fragmentação utilizada para detecção do T-360. As melhores condições cromatográficas estabelecidas foram: eluição isocrática em coluna C₁₈, com fase móvel composta de H₂O:MeCN (65:35) e 0,1% de NH₄OH na fase aquosa. No desenvolvimento do método de extração do T-360 em sangue total avaliou-se as influências do tipo de solvente extrator e diferentes tempos e forças de centrifugação. O T-360 foi melhor recuperado (37,02%) da matriz sangue utilizando CHCl₃ e 14.000 x g por 15 min, apresentando efeito de matriz e eficiência do processo de extração de -51,23% e 18,05%, respectivamente. Após a otimização do método, repetindo-se o procedimento e acidificando a amostra, houve aumento da recuperação do T-360 (49,47%), diminuição do efeito de matriz (-37,60%) e aumento da eficiência do processo de extração (32,24%). Na validação do método analítico para quantificação do T-360 em sangue total, utilizando a Riparina I como padrão interno (PI), o método apresentou-se como seletivo/específico, linear no intervalo de concentrações avaliado, exato e preciso. Além disso, apresentou limite de detecção e quantificação de 50 e 100 ng/mL, respectivamente. Por último, parâmetros farmacocinéticos foram obtidos através da aplicação do método validado às amostras de sangue coletadas de camundongos submetidos ao tratamento com T-360 na dose de 25 mg/kg (e.v.), obtendo-se como resultados: C_{max} de 321,34 µg/mL, t_{1/2} de 3,89 min, K_e de 10,68 h⁻¹, CL_s de 830,97 mL/h/kg e V_d 0,08 L/kg, o que caracteriza distribuição tecidual. A partir das análises dos dados, pode-se sugerir que o T-360 continua sendo uma molécula promissora por apresentar baixa toxicidade. Além disso, os resultados farmacocinéticos obtidos impulsionam a continuidade da investigação de outros parâmetros, usando outras vias de administração, e o estudo de metabólitos responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade antitumoral.

Palavras-chave: *Xylopia langsdorffiana*. Trachylobano-360. Farmacocinética. Toxicologia. CLAE-EM_n.

PITA, J. C. L. R. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E FARMACOCINÉTICA DO TRACHYLOBANO-360, UM DITERPENO ISOLADO DE *Xylopi* langsdorffiana St. Hil. & Tul. (ANNONACEAE).** 2014. 130f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – CCS / UFPB, João Pessoa – PB.

ABSTRACT

Evaluation of the pharmacokinetic and toxicological profile is essential in the study of new drugs. However, these studies are rare and have been performed, in many cases, after the onset of clinical studies. Trachylobane-360 (T-360), a diterpene *ent*-7 α -acetoxytrachyloban-18-oic acid, obtained from *Xylopi* langsdorffiana, shows antitumor and spasmolytic activities, making it a promising molecule. Moreover, there are no reports on the toxicological and pharmacokinetic studies of this natural product. Considering all these aspects, the present study aimed to evaluate the toxicity and pharmacokinetics of T-360. In the acute toxicity test in mice, the T-360 showed low toxicity at doses of 50 mg/kg (i.v.), and 300 mg/kg (i.p.), showing no significant behavioral and haematological changes. However, the dose of 300 mg/kg (i.v.) caused death in four out of six animals (LD₅₀ of 200 mg/kg). T-360 was not genotoxic in micronucleus assay, because it does not increase the frequency of micronucleated erythrocytes of mice treated with 25, 150 and 300 mg/kg (i.p.). Among the appropriate bioanalytical techniques for pharmacokinetic study highlights the high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC/MS_n). A HPLC/MS_n method developed consisted of ESI ionization, in negative mode, basifying the medium, with detection of molecular ion 359 m/z. The fragmentation study showed that the ion 359 m/z is fragmented into 299 m/z, which is used to detect T-360. The best chromatographic conditions were established: C₁₈ column under isocratic elution with mobile phase consisting of H₂O:MeCN (65:35) and 0.1% of NH₄OH in the aqueous phase. In method developing of extracting the T-360 in whole blood was evaluated influences the type of extracting solvent and different times and centrifugation forces. T-360 was better recovered (37.02%) of the blood matrix using CHCl₃ and 14,000 xg for 15 min, showing the matrix effect and efficiency of the extraction process of -51.23% and 18.05 %, respectively. After optimization of the method, repeating the procedure and acidifying the sample, there was an increase recovery of T-360 (49.47%), reduction of matrix effect (-37.60%) and increase the efficiency of the process extraction (32.24%). In the validation of analytical method for quantification of T-360 in whole blood, using the Riparina I as internal standard (PI), the method presented himself as selective/specific, linear over the concentration range evaluated, accurate and precise. Moreover, presented limit of detection and quantification of 50 and 100 ng/mL, respectively. Finally, pharmacokinetic parameters were obtained by applying the validated method to samples of blood collected from mice subjected to treatment with T-360 at a dose of 25 mg/kg (i.v.), Obtaining the following results: C_{max} of 321,34 μ g/mL, t_{1/2} of 3,89 min, K_e of 10,68 h⁻¹ CL_s of 830,97 mL/h/kg and V_d 0,08 L/kg, which characterizes tissue distribution. From the data analysis, it can be suggested that the T-360 continues to be a promising molecule having low toxicity. Furthermore, the pharmacokinetic results propel the continued investigation of other parameters, using other routes of administration, and the study of metabolites responsible, at least in part, by anti-tumor activity.

Key-words: *Xylopi* langsdorffiana. Trachylobane-360. Pharmacokinetic. Toxicology. HPLC/MS_n.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do Trachylobano-360 (T-360).	23
Figura 2 – Modelos farmacocinéticos não-compartimentados. (A) único sítio acessível. (B) dois sítios acessíveis. Fonte: FOSTER; VICINI (2012).....	39
Figura 3 – Modelo compartimentado do comportamento da droga no organismo. Fonte: FOSTER; VICINI (2012).....	40
Figura 4 – Perfis de concentração plasmática em função do tempo em escala semi-logarítmica para um composto que exhibe um modelo de um compartimento (A) e dois compartimentos (B). Fonte: FAN; DE LANNOY (2014).....	40
Figura 5 – Exemplo de concentrações de um fármaco no sangue em função do tempo após administração endovenosa e oral. Fonte: KERNES; DI (2008).....	41
Figura 6 – Área sobre a curva (ASC) é a área do gráfico da concentração da droga no sangue em função do tempo. Fonte: KERNES; DI (2008).....	42
Figura 7 – Determinação da ASC pelo método trapezoidal linear. ASC entre t_1 e t_2 é mostrado na área hachurada. Uma diferença pode ser visualizada entre a interpolação dos pontos (linha sólida) e a regressão não linear (linha pontilhada) ajustando os pontos individuais. Fonte: KWON (2002)	43
Figura 8 – Curva dos percentuais do solvente B utilizados durante a corrida cromatográfica do T-360 e da riparina I (PI).....	63
Figura 9 – Espectro de massas do Trachylobano-360, por ionização em modo positivo (ESI+).	73
Figura 10 – Espectro de massas do Trachylobano-360, por ionização em modo negativo (ESI-).	73
Figura 11 – Espectro de massas do Trachylobano-360 aditivado com ácido fórmico, ionizado no modo positivo (ESI+).	74
Figura 12 - Espectro de massas do Trachylobano-360 aditivado com ácido fórmico, ionizado no modo negativo (ESI-).	74
Figura 13 – Espectro de massas do Trachylobano-360 aditivado com hidróxido de amônio, ionizado no modo positivo (ESI+).	74

Figura 14 – Espectro de massas do Trachylobano-360 aditivado com hidróxido de amônio, ionizado no modo negativo (ESI-)	75
Figura 15 – Espectro de massas do Trachylobano-360, alcalinizado com hidróxido de amônio, ionizado por ESI-. Fragmentação do íon molecular 359,2 m/z.	75
Figura 16 – Fragmentação do Trachylobano-360, originando os picos 299 e 317 m/z.	76
Figura 17 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 H ₂ O:MeCN), pelo sistema de eluição gradiente (5 a 95% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.	76
Figura 18 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 H ₂ O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (80% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.	77
Figura 19 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 H ₂ O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (60% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.	77
Figura 20 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 H ₂ O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (40% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.	78
Figura 21 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 H ₂ O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (30% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.	78
Figura 22 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 H ₂ O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (20% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.	78

Figura 23 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 H ₂ O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (35% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.	79
Figura 24 – Recuperação do Trachylobano-360 em solução, utilizando MeCN com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * p < 0,05 quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.	80
Figura 25 – Recuperação do Trachylobano-360 de sangue de camundongos, utilizando MeCN com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * p < 0,05 quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.	81
Figura 26 – Recuperação do Trachylobano-360 em solução, utilizando MeOH com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * p < 0,05 quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.	82
Figura 27 – Recuperação do Trachylobano-360 de sangue de camundongos, utilizando MeOH com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * p < 0,05 quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.	82
Figura 28 – Recuperação do Trachylobano-360 em solução, utilizando CHCl ₃ com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * p < 0,05 quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.	83
Figura 29 – Recuperação do Trachylobano-360 de sangue de camundongos, utilizando CHCl ₃ com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * p < 0,05 quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.	84
Figura 30 – Recuperação do Trachylobano-360 do sangue de camundongos, em relação aos solventes utilizados. * p < 0,05 quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.	85
Figura 31 – Otimização da recuperação do Trachylobano-360 do sangue de camundongos utilizando CHCl ₃ , com centrifugação a 14.000 x g por 15 min. * p < 0,05 quando comparados por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.....	86
Figura 32 – Estudo estatístico comparativo da recuperação (A), efeito de matriz (B) e eficiência do processo de extração (C) para o Trachylobano-360 em sangue de	

camundongos. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.....	87
Figura 33 – Espectro de massas, estrutura química e a fragmentação monitorada da Riparina I (PI).	88
Figura 34 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra branco (B-B).	88
Figura 35 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra de sangue contaminado com Trachylobano-360 (B-T360).....	88
Figura 36 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra de sangue contaminado com Riparina I (B-PI).....	89
Figura 37 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra de sangue contaminado com Trachylobano-360 e PI (B-T360-PI).....	89
Figura 38 – Linearidade representativa do método analítico de extração do Trachylobano-360 de sangue de camundongos. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média.	90
Figura 39 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra de sangue contaminado com Trachylobano-360 nas concentrações de 50 ng/mL (cromatograma azul), 80 ng/mL (cromatograma vermelho) e 100 ng/mL (cromatograma preto).....	91
Figura 40 – Perfil da concentração do T-360 no sangue (n = 6) em função do tempo após administração da dose de 25 mg/kg, pela via e.v.. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média.....	92

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Fórmula para cálculo da área sobre a curva (ASC).	42
Equação 2 – Fórmula para cálculo do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$).....	43
Equação 3 – Fórmula para cálculo do <i>clearance</i> (CL)	45
Equação 4 – Fórmula para cálculo do volume de distribuição (Vd).....	46
Equação 5 – Fórmula para cálculo da biodisponibilidade.....	47
Equação 6 – Fórmula para o cálculo da recuperação em relação ao processo de extração.....	59
Equação 7 – Fórmula para o cálculo do efeito de matriz.....	60
Equação 8 – Fórmula para o cálculo da eficiência do processo de extração.	62
Equação 9 – Fórmula para o cálculo da exatidão. Fonte: Brasil, 2003.	66
Equação 10 – Fórmula para o cálculo da precisão. Fonte: Brasil, 2003.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis utilizadas para a análise da solução de T-360.....	56
Tabela 2 – Amostras de sangue e solução analisadas, variando o tipo de solvente, força e tempo de centrifugação.	61
Tabela 3 – Amostras de sangue e soluções submetidas à otimização do método, realizando-se duas centrifugações e com a acidificação.....	62
Tabela 4 – Sistema isocrático e gradiente utilizado na corrida cromatográfica para eluição do T-360 e da riparina I (PI).	63
Tabela 5 – Energia de colisão e o fragmento monitorado na quebra do T-360 e da riparina I (PI).....	64
Tabela 6 – Efeito de doses únicas do Trachylobano-360 (i.p. ou e.v.) em camundongos.....	70
Tabela 7 – Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento agudo (i.p. ou e.v.) com Trachylobano-360.....	71
Tabela 8 – Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do Trachylobano-360 e ciclofosfamida.	72
Tabela 9 – Equações das regressões lineares e coeficientes de determinação obtidos através do método analítico de extração do Trachylobano-360 em três dias distintos.	90
Tabela 10 – Exatidão intra e intercorrida do método analítico de extração do Trachylobano-360, em sangue de camundongos, em concentrações baixa, média e alta (n = 5).	91
Tabela 11 – Precisão intra e intercorrida do método analítico de extração do Trachylobano-360, em sangue de camundongos, em concentrações baixa, média e alta (n = 5).	92
Tabela 12 – Parâmetros farmacocinéticos do T-360 após administração de 25 mg/kg e.v. (n = 6).	93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1 A família Annonaceae e o gênero <i>Xylopi</i>	21
2.2 A espécie <i>Xylopi langsdorffiana</i> St.-Hil. & Tul.	23
2.3 Diterpenos trachylobano biologicamente ativos	24
2.4 Toxicologia de produtos naturais.....	25
2.5 Estudos bioanalíticos para o desenvolvimento farmacocinético.....	29
2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) aplicada à bioanálise.....	29
2.5.2 Espectrometria de massas (EM) aplicada à bioanálise	31
2.5.3 Desenvolvimento do método em CLAE.....	33
2.5.4 Preparo da amostra.....	34
2.5.5 Efeito de matriz.....	35
2.5.6 Validação do método.....	36
2.5.7 Farmacocinética	38
2.5.7.1 Concentração máxima (C_{max}) e o tempo necessário para atingir a concentração máxima (T_{max})	41
2.5.7.2 Área sobre a curva (ASC)	42
2.5.7.3 Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)	43
2.5.7.4 Clearance ou depuração (CL)	44
2.5.7.5 Volume de distribuição (V_d)	45
2.5.7.6 Biodisponibilidade absoluta	46
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Local da pesquisa.....	52
4.2 Material.....	52
4.2.1 Diterpeno trachylobano	52
4.2.2 Animais.....	52
4.2.3 Drogas e reagentes	53
4.3. Métodos.....	54
4.3.1 Avaliação toxicológica	54
4.3.1.1 Toxicidade pré-clínica aguda.....	54
4.3.1.2 Genotoxicidade.....	55

4.3.2 Avaliação farmacocinética.....	55
4.3.2.1 Desenvolvimento do método analítico para análise do T-360 em solução....	55
4.3.2.2 Desenvolvimento do método de extração do T-360 em sangue total.....	57
4.3.2.3 Validação do método para determinação do T-360 em sangue total	62
4.3.2.4 Aplicação do método para determinação do T-360 em sangue total.....	67
4.4 Análise estatística.....	68
5 RESULTADOS	70
5.1 Avaliação toxicológica	70
5.1.1 Toxicidade pré-clínica aguda.....	70
5.1.2 Genotoxicidade.....	72
5.2 Desenvolvimento do método analítico para análise do T-360 em solução.....	73
5.3 Desenvolvimento do método de extração do T-360 em sangue total.....	79
5.4 Validação do método para determinação do T-360 em sangue total	87
5.5 Aplicação do método para determinação do T-360 em sangue total	92
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXO A – Certidão de aprovação do comitê de ética em uso de animais do CBiotec/UFPB (CEUA).....	129
ANEXO B – Procedimento para início do ensaio toxicidade aguda com a dose de 50 mg/kg.....	130
ANEXO C – Protocolo experimental elaborado pelo Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB (ALMEIDA et al., 1999).	131

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Há milênios a natureza tem sido fonte de produtos medicinais. Por séculos, as plantas representaram o único recurso para o tratamento de doenças que acometiam o homem (MOURA-COSTA et al., 2012). Especialmente durante o século passado, muitos fármacos clinicamente úteis foram originadas a partir dessa fonte natural (NEWMAN; CRAGG, 2010). Adicionalmente, dados recentes mostram que a natureza continuará sendo uma importante fonte de novos fármacos para o tratamento das mais diversas enfermidades (BROWN, 2013).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é datado desde antes de sua descoberta, quando os indígenas utilizavam a floresta como sua farmácia (MOURA-COSTA et al., 2012). Esse uso milenar de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que muitas plantas, e compostos delas obtidos, podem ser potencialmente perigosos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), o que torna os estudos de toxicidade pré-clínica imprescindíveis como parte da avaliação da possível aplicabilidade de um produto natural como droga farmacológica.

A avaliação de exposição à droga (farmacocinética) e suas respostas (farmacodinâmica) é essencial para selecionar moléculas apropriadas, estimar a segurança e eficácia de candidatos a fármacos, e desenhar estratégias posológicas ideais. Portanto, métodos para avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica são necessários para descrever e interpretar as complexas interações entre os fármacos e a biologia da doença. Observa-se que, geralmente, relatos de estudos farmacodinâmicos de produtos naturais precedem os estudos farmacocinéticos. Para estes, técnicas bioanalíticas apropriadas que permitam quantificar a exposição e respostas são cruciais. Dentre estas, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM) fornece capacidade superior para análise de estabilidade e especificidade para biofármacos (MARIAN; SEGHEZZI, 2013), e tem sido utilizada para a determinação farmacocinética de metabólitos secundários como saponinas (LIU et al., 2014), alcaloides, flavonas, antraquinonas (ZHANG et al., 2014), fenilpropanoides, dentre outros, fornecendo uma base para novos estudos acerca da bioatividade das substâncias (LI et al., 2014).

Apesar da importância inegável no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, estudos toxicológicos e farmacocinéticos abrangentes de produtos

naturais e seus derivados são escassos (ZHANG et al., 2014) e vêm sendo realizados, em muitos casos, após o início dos ensaios clínicos, como por exemplo do hydravin, derivado da vimblastina, utilizado para o tratamento do sarcoma metastático dos pulmões (KHAZIR et al., 2014).

Considerando todos esses aspectos, o presente trabalho objetiva contribuir para a pesquisa científica no que se refere à avaliação da toxicidade e farmacocinética do ácido *ent-7 α -acetoxitrachylobano-18-óico* (Trachylobano-360), um diterpeno inédito obtido de *Xylopiá langsdorffiana*. Apesar de poucos estudos farmacodinâmicos com o trachylobano-360, suas atividades biológicas descritas até o momento, atividades antitumoral e espasmolítica (PITA et al., 2012; SANTOS et al., 2012a; SANTOS et al., 2012b), tornam-no uma molécula promissora. Além disso, não há relatos na literatura de estudos toxicológicos e farmacocinéticos deste produto natural.

Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 A família Annonaceae e o gênero *Xylopia*

A família Annonaceae, por apresentar uma combinação de caracteres marcantes, é uma das mais uniformes do ponto de vista tanto anatômico quanto estrutural e uma das mais primitivas entre as Angiospermae (FECHINE et al., 2002). Possui distribuição pantropical, sendo considerada uma das famílias mais diversificadas do reino vegetal, com cerca de 112 gêneros e 2.440 espécies (COUVREUR et al., 2011; SRIVASTAVA; MEHROTRA, 2013). Dos gêneros que compõem esta família, 34 podem ser encontrados na América do Sul, onde predominam os gêneros *Annona* L, *Duguetia* St. Hil., *Guatteria* Ruiz et Pavon, *Rollinia* St. Hil e *Xylopia* L. No Brasil, encontram-se cerca de 29 gêneros (FECHINE et al., 2002), e, na Paraíba, registram-se cerca de seis gêneros (*Anaxagorea*, *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Rollinia* e *Xylopia*) e 15 espécies, sendo 11 delas novas referências para o Estado (PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004).

Contudo, apesar de sua grande diversidade, essa é uma das famílias de plantas tropicais menos estudadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico (RIBEIRO et al., 2013) . Até o momento, estudos realizados demonstraram a presença de uma variedade de compostos químicos em diferentes espécies dessa família (LEBOEUF et al., 1980; CHANG et al., 1998; KOTKAR et al., 2002; RIBEIRO et al., 2013) .

O gênero *Xylopia* compreende cerca de 150 espécies (BRUMMITT, 1992), sendo algumas conhecidas por seus usos etnomedicinais e atividade farmacológica. O extrato de *X. aethiopica* apresentou atividade analgésica (WOODE et al., 2012), antidiabética (ADEFEGHA; OBOH, 2012), antioxidante (ADARAMOYE et al., 2010; ADARAMOYE; POPOOLA; FAROMBI, 2010), hipolipidêmica (NWOZO; OROJOBI; ADARAMOYE, 2011), anti-inflamatória (OBIRI; OSAFO, 2013), antileishmania (FALL et al., 2003), antifúngica (KONNING; AGYARE; ENNISON, 2004), antiglaucoma (IGWE; AFONNE; GHASI, 2003), além de antitumoral (CHOUMESSI et al., 2012a; CHOUMESSI et al., 2012b; KUETE et al., 2013) com capacidade de indução de apoptose e parada do ciclo celular (ADARAMOYE et al., 2011). Óleos essenciais extraídos de suas diversas partes apresentaram ações antioxidante (KARIOTI et al.,

2004), antibacteriana (TATSADJIEU et al., 2003; FLEISCHER et al., 2008), antifúngica (TATSADJIEU et al., 2003; ASEKUN; ADENIYI, 2004), citotóxica (ASEKUN; ADENIYI, 2004) e antimalárica (BOYOM et al., 2003). Outros extratos de espécies do gênero *Xylopi*a apresentaram diversas atividades como: *X. arom*ática, atividade antileishmania (OSORIO et al., 2007), larvicida (RODRIGUES et al., 2006), antimalárica (GARAVITO et al., 2006), antibacteriana (TAKAHASHI et al., 2006) e antitumoral (SUFFREDINI et al., 2007; TAYLOR et al., 2013) ; *X. frutescens*, *X. amazonica* e *X. benthamii*, atividade antibacteriana (TAKAHASHI et al., 2006); *X. discreta*, atividade imunomodulatória e antileishmania (LOPEZ; CUCA; DELGADO, 2009); *X. parviflora*, atividade antinociceptiva (NISHIYAMA et al., 2010); e *X. frutescens*, atividade antimalárica (JENETT-SIEMS et al., 1999) e inibitória da 5-lipoxigenase (BRAGA et al., 2000).

Outros derivados vegetais de várias espécies deste gênero também forneceram importantes atividades farmacológicas como: óleo essencial das folhas de *X. discreta*, atividade imunomodulatória e antileishmania (LOPEZ; CUCA; DELGADO, 2009); óleo essencial das folhas de *X. laevigata*, atividade antitumoral (QUINTANS JDE et al., 2013); óleo essencial das folhas de *X. frutescens*, atividade antitumoral (LUNGUINHO, 2012; FERRAZ et al., 2013) e antitripanossomicida (DA SILVA et al., 2013); e frações alcaloídicas de *X. parviflora*, atividade antinociceptiva (NISHIYAMA et al., 2010).

Do ponto de vista fitoquímico, diversas espécies do gênero *Xylopi*a são responsáveis pela produção de várias classes de metabólitos secundários, incluindo alcaloides (CASAGRANDE; MEROTTI, 1970; NIETO et al., 1976; QUEVAUVILLER; FOUSSARD-BLANPIN, 1976; GRANELL et al., 2004; NISHIYAMA et al., 2006; PIMENTA; MENDONCA, 2012), acetogeninas (COLMAN-SAIZARBITORIA; GU; MCLAUGHLIN, 1994; COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 1994; COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 1995), diterpenos (FAULKNER; LEBBY; WATERMAN, 1985; NGOUELA et al., 1998; DE MELO et al., 2001; TAVARES et al., 2006; CASTELLO BRANCO et al., 2009; WOODE et al., 2012) e mono e sesquiterpenos como principais constituintes de óleos essenciais (FOURNIER et al., 1993; TAIRU; HOFMANN; SCHIEBERLE, 1999; BOYOM et al., 2003; KARIOTI et al., 2004; YAPI et al., 2012)

2.2 A espécie *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul.

Xylopia langsdorffiana é uma árvore de 5-7 m de altura, conhecida popularmente como “pimenteira-da-terra” (CORRÊA; DE AZEREDO PENNA; INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO, 1984). Possui folhas alternas, lanceoladas, inteiras, seríceas, flores roxas e pendunculadas, fornecendo madeira para carpintaria e caixotaria. É pouco relatada na literatura, tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como de suas atividades biológicas.

O estudo fitoquímico desta espécie permitiu o isolamento de três diterpenos dos tipos labdano, trachylobano e atisano. A partir do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico bruto obtido das folhas de *X. langsdorffiana*, com gel de sílica, obteve-se dois diterpenos. Um deles com peso molecular de 302 e fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$ foi identificado como sendo o ácido 8(17), 12*E*, 14-labdatrieno-18-óico (labdano). O outro diterpeno foi identificado como sendo o *ent*-atisano-7 α , 16 α -diol, ao qual foi atribuído o nome comum de xylodiol (peso molecular de 306 e fórmula molecular $C_{20}H_{34}O_2$) (TAVARES et al., 2007). A partir do extrato hexânico do caule de *X. langsdorffiana* foram isolados dois novos diterpenos: o ácido *ent*-7 α -hidroxitrachylobano-18-óico, sólido cristalino, com peso molecular de 318 e fórmula $C_{20}H_{30}O_3$ (trachylobano-318); e o *ent*-7 α -acetoxitrachylobano-18-óico, sólido cristalino, com peso molecular de 360 e fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_4$ (trachylobano-360, T-360) (Figura 1) (TAVARES et al., 2006).

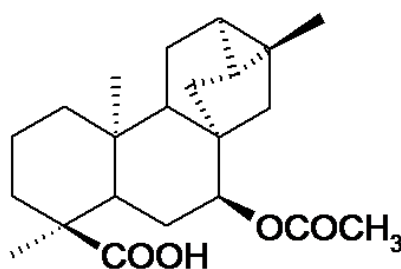


Figura 1 – Estrutura do Trachylobano-360 (T-360).

Estudos posteriores com esta espécie mostraram o isolamento e caracterização estrutural de quatro alcaloides, coritenchina, xylopinina, discretamina e xylopina; um diterpeno, o ácido *ent*-16 α -hidroxi-atisano-18-óico; um feoforbídeo, o

13² (S)-hidroxi-17³-etoxifeoforbídeo; além do flavonoide glicosilado quercetina-3- α -raminosídeo (SILVA et al., 2009) .

Já do ponto de vista farmacológico esta espécie é pouco estudada. O óleo essencial dos seus frutos apresentou atividade antitumoral (MOURA, 2012) e o extrato etanólico de suas folhas apresentou atividade gastroprotetora e cicatrizante (MONTENEGRO, 2011).

2.3 Diterpenos trachylobano biologicamente ativos

Os terpenoides formam uma família ampla e estruturalmente diversa de produtos naturais derivados de unidades do isopreno (C₅) unidos de modo cabeça-calda, contendo mais de 30.000 compostos identificados. A maioria dos terpenos tem sido isolado de plantas, os quais possuem uma grande utilidade no metabolismo e interações ecológicas (DAVIS; CROTEAU, 2000). O isopreno tem sido caracterizado como um produto de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos naturais e foi sugerido como a unidade fundamental de construção. São classificados como hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (DEWICK, 2002).

Diterpenos do tipo trachylobano são terpenoides que apresentam um ciclopropano em sua estrutura (Figura 1), sendo substâncias raras no reino vegetal, e, por isso, ainda apresentam poucos estudos de atividades biológicas (TAVARES et al., 2006). Porém, algumas dessas substâncias isoladas de diversas espécies têm demonstrado atividades biológicas, como: citotóxica em várias linhagens de células tumorais (BLOCK et al., 2002; BLOCK et al., 2004; GRAIKOU et al., 2004; LI et al., 2005); vasorrelaxante (MARTINSEN et al., 2010); antimicrobiana (LI et al. 2005); e antiosteoclastogênica (PAN et al., 2006). Foi relatado um diterpeno trachylobano capaz de induzir apoptose em células de leucemia promielocítica humana (HL60) por ativação de caspase-3 (BLOCK et al., 2005). Mais recentemente, o trachylobano-318, isolado de *X. langsdorffiana*, apresentou efeito relaxante em músculo liso traqueal de cobaias por modulação positiva de canais de potássio (MARTINS et al., 2013).

O trachylobano-360 ainda é pouco estudado do ponto de vista farmacológico, no entanto, já mostrou importantes atividades. Este diterpeno bloqueia canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), apresentando atividade espasmolítica (SANTOS et al., 2012a; SANTOS et al., 2012b).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o diterpeno trachylobano-360 apresenta fraca citotoxicidade frente linhagens leucêmicas humanas (K562, U937 e HL60) (CASTELLO BRANCO et al., 2009) e tumoral murina (Sarcoma 180) (PITA et al., 2012), além de células não tumorais (fibroblastos V79, hepatócitos de ratos (TAVARES et al., 2006) e eritrócitos de camundongos (PITA et al., 2012). Por outro lado, estudos *in vivo* mostraram que o trachylobano-360 inibiu significativamente o crescimento do tumor sólido Sarcoma 180 em camundongos transplantados, sem causar alterações em parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos que frequentemente estão associadas ao uso clínico de antineoplásicos (PITA et al., 2012). Portanto, apesar do trachylobano-360 demonstrar fraca atividade antitumoral *in vitro*, ele mostrou-se equipotente ao antineoplásico 5-fluorouracil, em modelo de Sarcoma 180, com menor toxicidade. Entretanto, apesar de diferentes estudos de aspectos farmacodinâmicos, não há relatos na literatura sobre dados farmacocinéticos dessa substância, sendo estes necessários para determinar o melhor esquema posológico, sua distribuição no organismo, bem como elucidar os possíveis metabólitos produzidos *in vivo*, responsáveis pela sua atividade farmacológica.

2.4 Toxicologia de produtos naturais

Plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população e possuem um papel importante na descoberta de novos agentes farmacológicos (MUNARI et al., 2010).

A toxicidade de medicamentos preparados a partir de plantas pode parecer trivial, quando comparada com os tratamentos convencionais. Porém, plantas medicinais podem desencadear reações adversas pelos seus próprios constituintes, devido a interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características do paciente, como idade, gênero, condições fisiológicas, características genéticas, dentre outros. Erros no diagnóstico da doença,

identificação incorreta de espécies de plantas e uso diferente da forma tradicional podem ser perigosos, levando a superdose, inefetividade terapêutica e/ou reações adversas. Além disso, o uso desses produtos pode comprometer a eficácia de tratamentos convencionais, por reduzir ou potencializar seus efeitos (CAPASSO et al., 2000; BALBINO; DIAS, 2010).

Neste sentido, a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Seus efeitos adversos e tóxicos, possíveis adulterações, bem como ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; PINHO et al., 2010).

No reino vegetal existem inúmeras plantas comprovadamente tóxicas e no Brasil são conhecidas cerca de 110 destas (CARVALHO, 2012). Espécies como a *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* (Loganiaceae), são responsáveis por até 90% das causas de morte de gado na região Amazônica (GONZAGA et al., 2007). A ingestão de favas de *Stryphnodendron obovatum* (barbatimão) em doses de 5 g/kg/dia é capaz de provocar aborto em animais (TOKARNIA et al., 1998). Esta espécie pode causar ainda distúrbios digestivos e fotossensibilidade (RIET-CORREA, 2007). Almeida et al. (2006) demonstraram que a ação tóxica de *Leucaena leucocephala* em animais causou perda de pelos, catarata e infertilidade (CARVALHO, 2012).

Veiga Júnior et al. (2005) citam que *Angelica archangelica* (angélica), *Himanthus sucuba* (sucubá), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Arnica montana* (arnica), *Cinnamomum canphora* (cânfora), *Symphytum officinale* (confrei), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) e *Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia* (sene) são abortivos, pois podem estimular a motilidade uterina. A angélica é utilizada como anti-coagulante e a cânfora tem largo uso como anti-séptico e sedativo em problemas genitais e urinários; a sucubá é usada no combate à amebíase, úlcera e gastrite; o alecrim apresenta propriedades estimulantes, antioxidantes, antiespasmódicas, anti-sépticas, antifúngicas e antibacterianas (JOLY, 1993; PORTE; GODOY, 2001; SARTORATTO et al., 2004; ADIGÜZEL et al., 2005); a arnica é utilizada topicamente em contusões, entorses, hematomas, distensões musculares, flebites, artrites; o confrei é utilizado em úlceras de difícil cicatrização,

psoríase, cicatrização de queimaduras, fissuras; o sene é utilizado como purgativa e laxativa. O uso do eucalipto é especialmente eficaz no tratamento de inflamações pulmonares e mucosidade excessiva (RODRIGUES et al., 2011).

A planta chapéu-de-couro (*Echinodorus macrophyllus*) é utilizada na medicina popular para tratamentos de doenças renais, reumatismo, afecções cutâneas e problemas do fígado. Em ensaios realizados com extratos aquosos de chapéu-de-couro em ratas, comprovou-se que os fetos apresentaram hepatomegalia branda, pontos hemorrágicos pelo corpo e pele viscosa. Um útero encontrava-se desprovido de fetos e preenchido com um líquido semelhante ao amniótico comprovando seu efeito abortivo (TOLEDO et al., 2004). Este efeito também foi comprovado estudando o falso boldo (*Coleus barbatus*), utilizado para o tratamento de problemas digestivos (FISCHMAN et al., 1991), que mostrou efeito anti-implantação e desenvolvimento retardado do feto (ALMEIDA; LEMONICA, 2000; RODRIGUES et al., 2011).

Tendo em vista o exposto, fica clara a importância dos estudos toxicológicos das plantas medicinais e de seus constituintes, buscando a terapêutica eficaz e trazendo um maior conforto e melhor qualidade de vida aos pacientes (HOCAYEN et al., 2012). A avaliação toxicológica pode ser realizada através de estudos científicos necessários para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa eficaz, segura e de qualidade, a qual não é tão econômica quanto se pensa, visto que exige um razoável investimento para o desenvolvimento das pesquisas.

Para esta finalidade, diversas organizações internacionais, como a OECD (*The Organisation for Economic Co-operation and Development*), desenvolveram protocolos para avaliação da toxicidade *in vivo* após exposição a substâncias químicas.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou um guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Neste, estão descritos como devem ser executados os estudos de toxicidade de dose única (aguda), de dose repetidas, reprodutiva, de genotoxicidade, dentre outros (BRASIL, 2013). A sua elaboração foi baseada em documentos de agências reconhecidas pela vigilância sanitária de medicamentos e de instituições de interesse na área, como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a OECD, visando uma maior harmonização com a regulamentação internacional.

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam a mortalidade causada dentro de um curto período de tempo pela administração de uma substância, dada numa dose única ou em doses múltiplas dentro de 24 horas (TEPONGNING et al., 2013). São obrigatórios para todo tipo de material em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las, permitindo dessa forma, conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste, os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte (LARINI, 1999).

Ainda, grande parte dos trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais e sintéticos, baseados em regulamentações nacionais e internacionais, utilizam parâmetros hematológicos e bioquímicos, dentre outros, para avaliar possíveis sinais de toxicidade (OLIVEIRA et al., 2010; PITA et al., 2012; SOUFANE et al., 2013). Nesses estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Ainda, exames anatomopatológicos macroscópicos são de extrema importância, pois analisam possíveis distúrbios estruturais e funcionais dos órgãos.

Os estudos de genotoxicidade desempenham um papel importante no desenvolvimento de novos medicamentos. A avaliação do potencial genotóxico de plantas medicinais é de fato uma questão importante. Isto porque, substâncias genotóxicas causam dano ao material genético podendo levar a mutações críticas e, portanto, a um aumento do risco de câncer e outras doenças (ROMERO-JIMÉNEZ et al., 2005; DEMMA; ENGIDAWORK; HELLMAN, 2009).

Inúmeros testes *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos podendo ser potencialmente usados para análise de compostos químicos genotóxicos (BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006). Dentre estes testes destaca-se o ensaio do micronúcleo *in vivo*. Este é o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo recomendado pelas agências internacionais e instituições governamentais como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial (SALVADORI, 2003; LUZ et al., 2012).

Um micronúcleo é definido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de cromossomos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim sendo, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico, sendo considerados como mutações que são transmitidas às células, uma vez que o dano genético se manifesta nas células filhas (SALVADORI, 2003) (FENECH, 2007). Portanto, quanto maior a frequência de eritrócitos micronucleados induzida por um produto teste, maior será a indicação de que ele interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, levando ao aparecimento de micronúcleos (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010).

Embora, no teste de micronúcleo, possam ser analisadas células de diferentes órgãos, os reticulócitos da medula óssea e os eritrócitos do sangue periférico são mais frequentemente empregados como células-alvo, permitindo avaliar danos citogenéticos cumulativos. Especialmente em camundongos, o ensaio em sangue periférico é bastante realizado já que o baço destes animais não sequestra os eritrócitos micronucleados, persistindo na circulação sanguínea (HAMADA et al., 2003; SILVA et al., 2011).

2.5 Estudos bioanalíticos para o desenvolvimento farmacocinético

2.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) aplicada à bioanálise

A cromatografia como método físico-químico de separação de misturas complexas foi descoberta no início do século XX pelo botânico italiano-russo M. S. Tswet o qual separou pigmentos coloridos presentes em extratos de folhas verdes de plantas, utilizando um tubo preenchido com carbonato de cálcio (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; LANÇAS, 2009).

A cromatografia é definida como um processo de migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas

fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Desde meados da década de 80, a técnica mais frequentemente utilizada em bioanálises de drogas tem sido a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Antes desta técnica, a de escolha era a cromatografia gasosa (CG). No entanto, na CG há a necessidade do analito de interesse ser volatilizado. Por outro lado, a CLAE exibe seu poder de resolução à temperatura ambiente ou levemente elevada, sendo necessário apenas que o analito tenha alguma solubilidade na fase móvel e alguma afinidade pela fase estacionária, sendo a força relativa de afinidade dos analitos para cada uma destas fases que dá a esta técnica sua capacidade de separação (EVANS, 2004).

Uma das técnicas mais utilizadas na CLAE é a fase reversa que emprega principalmente forças dispersivas (hidrofóbicas ou interações de van der Waals). Empregando-se fases estacionárias contendo grupos apolares, tais como octadecil (C-18), o processo é denominado fase reversa (*reversed phase*). Neste caso, a fase móvel será mais polar, usualmente empregando solventes como metanol (MeOH) ou acetonitrila (MeCN) misturados com água, podendo-se adicionar modificadores de pH, dentre outros (RIBEIRO et al., 2004; MALDANER, COLLINS; JARDIM 2010).

A separação em CLAE se dá pela distribuição de moléculas de soluto entre duas fases (estacionária e móvel) imiscíveis de acordo com seu coeficiente de partição. A fase móvel carrega o analito pela fase estacionária e durante essa passagem, os analitos da mistura interagem ora com a fase móvel, ora com a fase estacionária, o que retém seletivamente cada analito. Ao sair da fase estacionária, o analito passa por um sistema de detecção com alta sensibilidade que registra sua passagem em função do tempo, representado pelo cromatograma (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Outro fator responsável pelo crescimento da utilização da técnica CLAE é o seu uso em aplicações farmacêuticas utilizando vários tipos de detectores. Recentemente, tem se tornado rotina o uso do espectrômetro de massas (EM) como detector, consolidando a CLAE como uma técnica de primeira escolha para bioanálises na indústria farmacêutica devido à sua alta sensibilidade (EVANS, 2004).

2.5.2 Espectrometria de massas (EM) aplicada à bioanálise

Um espectrômetro de massas é um instrumento no qual íons positivos ou negativos em fase gasosa podem ser analisados de acordo com sua razão massa/carga (m/z) (MARCH, 2000).

Este equipamento, atualmente, é o mais importante e versátil detector para análise de baixas concentrações de compostos orgânicos em misturas complexas. A união da CLAE com a espectrometria de massas (CLAE-EM) passou por um estágio de longo desenvolvimento, antes da aceitação atual como uma técnica analítica robusta, versátil e com boa sensibilidade (CHEN et al., 2011).

Atualmente, a indústria farmacêutica utiliza a EM para examinar e sequenciar proteínas, oligonucleotídeos e polissacarídeos. Especialmente no desenvolvimento de medicamentos, a EM é utilizada em todas as fases deste processo, desde a descoberta de compostos importantes e análise estrutural até o desenvolvimento sintético e química combinatória na farmacologia e no metabolismo de fármacos. Em todo o mundo, esta técnica é usada em testes de sangue e urina para o registro da presença e do nível de certos compostos que são marcadores de estados patológicos, incluindo muitos cânceres, bem como para a detecção da presença e análise quantitativa de drogas ilícitas e anabolizantes (PAVIA et al., 2010).

Um espectrômetro de massas possui, essencialmente, cinco componentes: uma unidade de entrada da amostra, fonte de ionização, analisador de massas, detector e sistema de dados. O produto do sistema de dados é o espectro de massas, um gráfico bidimensional no qual no eixo Y são plotadas as intensidades das razões m/z que estão plotadas no eixo X (PAVIA et al., 2010).

Independente do método de introdução de amostra no EM, as mesmas deverão ser transformadas em partículas carregadas pela fonte de ionização, antes de serem analisadas e detectadas. Dentre estes métodos destaca-se a ionização por *electrospray* (ESI). Este método foi inicialmente considerado uma fonte de ionização direcionada à análise de proteínas. Posteriormente, seu uso foi estendido, não apenas a outros polímeros e biopolímeros, mas também a análise de pequenas moléculas (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007). O acoplamento CLAE-EM, utilizando a ionização por *electrospray* (ESI), torna-se um método poderoso devido à sua alta resolução e caracterização de uma vasta gama de compostos (VERARDO et al., 2010).

Na ESI, uma solução contendo as moléculas da amostra é borrifada na ponta de um tubo capilar fino para dentro de uma câmara aquecida, em pressão quase atmosférica. O tubo capilar pelo qual a solução da amostra passa tem um potencial de alta voltagem (na escala de kV) em sua superfície e pequenas gotículas carregadas são direcionadas para dentro da câmara de ionização. As gotículas carregadas enfrentam um contra-fluxo de um gás de secagem (em geral nitrogênio) que evapora as moléculas de solventes das gotículas. Assim, a densidade de carga de cada gotícula aumenta até que as forças repulsivas eletrostáticas excedam sua tensão superficial (o limite de Rayleigh), produzindo o cone de Taylor, originando gotículas menores com cargas. O processo continua até que íons da amostra, livres de solvente, sejam deixados na fase gasosa. Para detecção de íons positivos, elétrons têm que ser fornecidos pela solução, e assim ocorre uma oxidação. Para íons negativos, elétrons têm que ser consumidos, e assim ocorre uma redução. Essas reações eletroquímicas acontecem nos últimos micrômetros do capilar metálico (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

A escolha do analisador de massas é determinada pela sensibilidade e seletividade requerida para o analito alvo. Neste sentido, CLAE-EMn (cromatografia com detector de massas tipo *Ion Trap*) é uma técnica de baixo custo que atende aos requisitos de sensibilidade para a análise de rotina (GILBERT-LÓPEZ; GARCÍA-REYES; MOLINA-DÍAZ, 2012).

O *Ion trap* “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantém “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência seja aplicada tornando os íons de certa razão m/z instáveis de forma que são libertados do *trap* (ARDREY, 2003; HAGER; LE BLANC, 2003).

Neste instrumento a seleção e a subsequente análise dos íons são realizadas na mesma parte do instrumento, de maneira que estes processos ocorrem separados apenas pelo tempo. Para isso, o *trap* é ajustado para capturar todos os íons que entram no espectrômetro de massas e os íons de m/z que não são de interesse são levados à instabilidade para ocasionar sua ejeção do *trap*. O(s) íon(s) remanescente(s) no *trap* é(são) dissociado(s). Os íons produzidos na dissociação do íon de m/z selecionado tornam-se sequencialmente instáveis e são liberados do *trap* para gerar o espectro de massas (ARDREY, 2003).

Em um *Ion trap*, a análise é feita pelo uso de uma sequência adicional de operações na função *scan*. Esta função inicia com a ionização e é seguida pela

seleção de um íon precursor em uma etapa que envolve a ejeção de todos os outros íons do *trap*. O íon precursor é então translacionalmente excitado, tipicamente pela aplicação de uma voltagem suplementar do *trap*. O produto iônico resultante da dissociação induzida por colisão (DIC) desses íons excitados com gás hélio é registrado para executar uma segunda análise das massas. A principal vantagem da técnica EMn é sua especificidade aumentada. Isso é bastante útil na distinção de isômeros, sequenciamento de biopolímeros, e mais particularmente nas análises de matrizes complexas. Uma característica única do *Ion trap* é a capacidade de poder elucidatório estrutural. A seletividade da EMn significa que um composto pode ser fragmentado, e os fragmentos resultantes reisolados e analisados para produzir informações estruturais acerca de moléculas complexas (WONG; COOKS, 1997).

2.5.3 Desenvolvimento do método em CLAE

Muitos métodos de CLAE são utilizados durante o processo de desenvolvimento de um medicamento. Por isso, há a necessidade de caracterizar o objetivo da análise a fim de escolher o melhor método a ser desenvolvido. Alguns pontos devem ser considerados: tempo de desenvolvimento do método, tempo da corrida para análise, o número de amostras esperado por semana, a complexidade da mistura, características físico-químicas do analito, possíveis degradações (hidrólise, oxidação, fotólise, desidratação) e se o analito é ionizável (ALAANI; ALASHKAR; KARABET, 2013; FLORIANI et al., 2014).

Antes de iniciar o desenvolvimento do método, deve-se conhecer informações acerca do analito como sua estrutura, propriedades físico-químicas, toxicidade, pureza, solubilidade e estabilidade. Contudo, muitas vezes essas informações não estão disponíveis, e algumas medidas preventivas devem ser tomadas a fim de assegurar que o analito não se degradará ou sofrerá alguma alteração durante o desenvolvimento do método. Implementações como utilização de amostras recém-preparadas, armazenamento das amostras em refrigerador, e proteção da droga e soluções da luz representam algumas medidas de prevenção comuns (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

Além disso, antes da injeção da amostra no cromatógrafo líquido, deve-se ter a certeza de que o detector selecionado será sensível a todos os componentes

presentes. Neste sentido, o espectrômetro de massas possui a capacidade de detectar concentrações muito baixas de compostos orgânicos em matrizes complexas (LANÇAS, 2009).

Utilizando a fase reversa como fase estacionária na CLAE, as misturas de solventes mais comuns são: água e MeCN, água e MeOH, e água e tetrahidrofurano (THF). Nessas, a força eluotrópica aumenta proporcionalmente com o aumento do percentual de fase orgânica (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

Alterações do pH da fase móvel é uma das grandes ferramentas utilizadas na CLAE permitindo a mudança simultânea de retenção e de seletividade entre os componentes da amostra. O analito pode ser analisado na sua forma iônica ou neutra. Essa escolha vai depender do tipo de análise que é requerida. Além do pH, o aumento da taxa de fluxo, temperatura e concentração da fase orgânica podem ser usadas para obter tempos de corrida desejáveis (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007; HAN et al., 2012).

Uma eluição gradiente inicial fornece uma estimativa da faixa aproximada de retenção do analito, o que permite uma escolha entre a eluição isocrática ou gradiente para experimentos subsequentes (SNYDER; GLAJCH; KIRKLAND, 1997).

Tradicionalmente, separações isocráticas são consideradas mais reprodutíveis que separações gradientes. De fato, a composição constante do eluente fornece condições equilibradas na coluna e a velocidade da eluição dos compostos através da mesma são constantes. Isso se deve às interações constantes, durante a corrida inteira, entre analito-eluente e analito-fase estacionária (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

2.5.4 Preparo da amostra

Apesar de todas as etapas envolvidas em uma análise serem importantes, o preparo da amostra é uma das mais críticas por envolver maior tempo e cuidado do analista. Este preparo pode envolver várias etapas das quais, a extração do analito da matriz original, transferindo-o para um solvente apropriado, é uma das mais importantes (LANÇAS, 2009).

Além disso, há outras razões importantes para incluir o passo de preparo da amostra quando são desenvolvidos métodos em CLAE-EMn. Esses incluem a

redução dos componentes das matrizes biológicas das amostras e eliminação, ou atenuação, da supressão iônica, também chamada de efeito de matriz, na resposta do espectrômetro (XU, 2007).

Para aplicações bioanalíticas na descoberta de novas drogas, a precipitação de proteínas é o procedimento mais comumente empregado no preparo de amostras, embora a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida também tenham sido utilizadas (BRYTAN et al., 1997; CROMMENTUYN et al., 2004; DE JONGE et al., 2004; KORFMACHER, 2005).

Desde que solventes orgânicos tais como MeOH e MeCN são eficientes em remover mais de 98% das proteínas do sangue quando usadas em proporções de 2:1 ou maior (BLANCHARD, 1981) e são compatíveis com sistemas CLAE-EM, eles são os solventes mais utilizados para realizar a precipitação de proteínas para os estudos farmacocinéticos. Além desses solventes, a acidificação das matrizes também permite a precipitação de proteínas (SOUVERAIN; RUDAZ; VEUTHEY, 2004). Após a adição de um destes, a precipitação é facilitada pela agitação e centrifugação (KORFMACHER et al., 2001). O processo de desnaturação liberará os analitos das proteínas, mantendo-os no líquido sobrenadante.

A extração líquido-líquido é considerada uma técnica clássica de extração, possuindo como principais vantagens a simplicidade e o baixo custo, e principais desvantagens o uso de grandes volumes de solventes tóxicos e a morosidade da técnica. Nesta, duas fases imiscíveis são empregadas: uma fase que contém o soluto de interesse, e uma outra que será colocada em contato com a primeira. Dessa forma, ocorrerá uma distribuição do soluto entre as duas fases, após o que, o composto de interesse poderá ser submetido a outro processo de extração ou encaminhado para análise por CLAE (LANÇAS, 2009).

2.5.5 Efeito de matriz

O principal desafio no desenvolvimento de um método por CLAE-EMn está na variável seletividade devido ao efeito de matriz da amostra na eficiência da ionização. Efeito de matriz resulta da coeluição de componentes orgânicos e inorgânicos com o analito que podem afetar a eficiência e a reprodutibilidade do processo de ionização (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003;

WANG; CYRONAK; YANG, 2007) e assim alterar a sensibilidade e a exatidão do ensaio (ISMAIEL et al., 2010). Íons na matriz que competem com o analito pela ionização ou que perturbam o processo de eletropulverização (evaporação de gotículas) constituem a principal causa desse efeito de matriz (SHEN et al., 2005). Efeito de matriz também pode resultar em alteração no tempo de retenção, linhas de base elevadas e curvas de calibração divergentes. Esses problemas podem ser devido ao acúmulo de componentes endógenos da matriz fortemente retidos na coluna analítica, e, ao longo do tempo, esses componentes podem, vagarosamente, eluir causando aumento dos sinais de fundo e alterações na sensibilidade da ionização (ISMAIEL et al., 2010).

Efeito de matriz é dependente da complexidade dos constituintes da amostra (matriz), isto é, seus constituintes podem causar supressão ou aumento na ionização em diferentes tempos e graus (DAMS et al., 2003; ISMAIEL et al., 2010). Porém, podem ser também dependentes do analito, com o grau de efeito de matriz dependente da natureza química do composto estudado. Geralmente compostos polares são mais susceptíveis à supressão iônica (ISMAIEL et al., 2010).

Matrizes de tecidos biológicos que possuem fosfolipídios, como fosfatidilcolina, que são os principais constituintes da bicamada lipídica de membranas celulares, são considerados o principal grupo de componentes endógenos conhecidos por causarem efeito de matriz durante a análise por CLAE-EMn (LITTLE; WEMPE; BUCHANAN, 2006).

2.5.6 Validação do método

Validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente, até os insumos e matérias-primas que entram em sua composição. Em outras palavras, validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância, rigorosamente, pré-estabelecidos (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007; ELOY et al., 2012).

A importância da validação de um método tem sido enfatizada desde a década de 40 quando a *American Chemical Society and Merck & Co.* levantou a

questão de como a matemática e estatística são pré-requisitos necessários para o desenvolvimento bem-sucedido e adaptação de novos métodos analíticos (CLARKE, 1947).

Atualmente inúmeras organizações renomadas internacionalmente fornecem guias para validação de métodos bioanalíticos e tópicos relacionados. Dentre elas podemos citar *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, *American Society for Testing and Material (ASTM)*, *Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (CCMAS)*, *European Committee for Normalization (CEN)*, *Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry (CITAC)*, *European Cooperation for Accreditation (EA)*, *Food and Agricultural Organization (FAO)*, a *United States Food and Drug Administration (FDA)*, *International Conference on Harmonization (ICH)*, *International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC)*, *World Health Organization (WHO)*, *International Organization for Standardization (ISO)*, *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, *United States Pharmacopeia (USP)* e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ARAUJO, 2009; CASSIANO et al., 2009).

No início da década de 80, foi observado que a definição dos parâmetros característicos para validação do método e tópicos relacionados eram diferentes entre as organizações existentes (HUBER, 1998). Em 1990, a ICH foi criada como um projeto único para reunir as autoridades regulatórias da Europa, Japão e Estados Unidos, com o objetivo de alcançar uma maior harmonização de parâmetros, requisitos, bem como metodologias, para a validação do método (ARAUJO, 2009).

No Brasil, foi publicado o Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos através da Resolução Específica (RE) nº 899 de 29 de maio de 2003. Nesta, exigia-se a avaliação de parâmetros como especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

Recentemente, a ANVISA elaborou a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 27 de 17 de maio de 2012 que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, adicionando critérios, aos da RE 899/2003, para avaliar os métodos bioanalíticos, tais como efeito residual e efeito de matriz. A legislação nacional acerca desse assunto está em consonância com guias

internacionais, como o proposto pela FDA (FDA, 2001; ARAUJO, 2009; BRASIL, 2012).

2.5.7 Farmacocinética

Ao receber algum medicamento, o paciente será instruído sobre a frequência e o modo que ele deve ser utilizado. Essas informações não são arbitrárias e sim possuem uma base científica (SCHWARTZ; PATEMAN, 2004).

Após a administração de um fármaco, sua concentração na corrente sanguínea e nos tecidos variam com o tempo. Inicialmente, há aumento à medida que ele entra na circulação sistêmica, e então diminui com a distribuição para os tecidos, metabolização e eliminação (BIRKETT, 2002).

Farmacocinética é definida como o estudo das concentrações de fármacos e seus metabólitos no corpo em função do tempo, e é composta pelos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (KRISHNAN; WHITE, 2013).

Os parâmetros farmacocinéticos são classificados em duas categorias. A primeira é apenas qualitativa ou descritiva, isto é, são parâmetros observacionais que não requerem fórmulas para cálculo. Exemplos incluem a concentração plasmática máxima (C_{max}) e a quantidade de droga excretada na urina durante determinado período (k_e). A segunda é quantitativa, isto é, parâmetros que requerem fórmulas matemáticas, como por exemplo *Clearance* (CL) e volume de distribuição (V_d) (FOSTER; VICINI, 2012).

Os mais utilizados nos estudos *in vivo* são: CL (mL/h/kg), uma medida da habilidade do corpo eliminar a droga; V_d (L/kg), volume/espaco do corpo que contém o composto; tempo de meia-vida ($t_{1/2}$, min), tempo necessário para reduzir a concentração da droga à metade no tecido em que está sendo avaliado, por exemplo o sangue; biodisponibilidade (F, %) que é a fração da droga que alcança a circulação sistêmica após administração; concentração plasmática máxima (C_{max}); tempo levado para alcançar a C_{max} (T_{max}); e área sob a curva em função do tempo (ASC) (FAN; DE LANNOY, 2014).

Eles podem ser estimados por dois modelos: não-compartimentado ou compartimentado (EVANS, 2004).

A análise não-compartimentada faz uma análise direta das concentrações, independente dos pressupostos compartimentais e de transferência de massa, baseando-se nos momentos das observações concentração-tempo, isto é, na ASC, podendo ser aplicado a qualquer conjunto de dados farmacocinéticos (DANSIRIKUL; CHOI; B. DUFFULL, 2005). Há basicamente duas formas de modelo não-compartimentado: um único sítio acessível e dois sítios acessíveis (Figura 2).

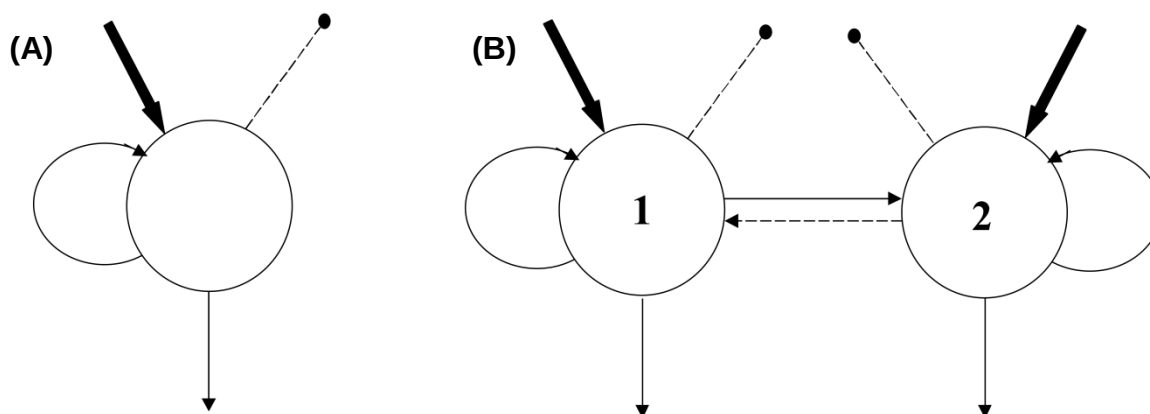


Figura 2 – Modelos farmacocinéticos não-compartimentados. (A) único sítio acessível. (B) dois sítios acessíveis. Fonte: FOSTER; VICINI (2012).

No modelo do único sítio acessível (Figura 2A), a droga é introduzida neste sítio e pode sair pela recirculação ou pela perda irreversível. A interação deste local com o resto do sistema ocorre apenas pela recirculação. Esse modelo é utilizado quando o sítio acessível é o plasma e a droga é administrada pela via endovenosa. Por outro lado, no modelo apresentado na figura 2B, os dois sítios acessíveis possuem recirculação e a droga pode fluir entre os dois sítios. Esse modelo é usado para descrever a administração extravascular ou uma situação onde plasma e urina são coletados (FOSTER; VICINI, 2012).

Já o modelo compartimentado visualiza o organismo como uma série de compartimentos farmacocineticamente distintos, cada um dos quais representando uma combinação de vários tecidos e órgãos os quais estão em equilíbrio químico (Figura 3), não sendo uma região fisiológica ou anatômica real. Compostos podem apresentar perfis de concentração plasmática em função do tempo de um compartimento (monoexponencial) ou multicompartmentos (bi ou triexponencial). Se os dados de ambos os perfis forem plotados em uma escala linear aparecerão de maneira curvilínea. Assim, a fim de determinar se a droga exibe um decaimento mono ou multiexponencial, a escala semi-logarítmica da concentração plasmática

em função do tempo aparecerá como uma linha reta (monoexponencial) ou como uma linha com declínio bi ou trifásico (Figura 4) (FAN; DE LANNOY, 2014).

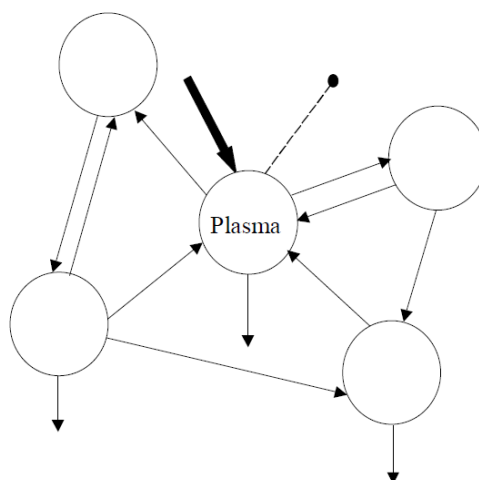


Figura 3 – Modelo compartimentado do comportamento da droga no organismo. Fonte: FOSTER; VICINI (2012).

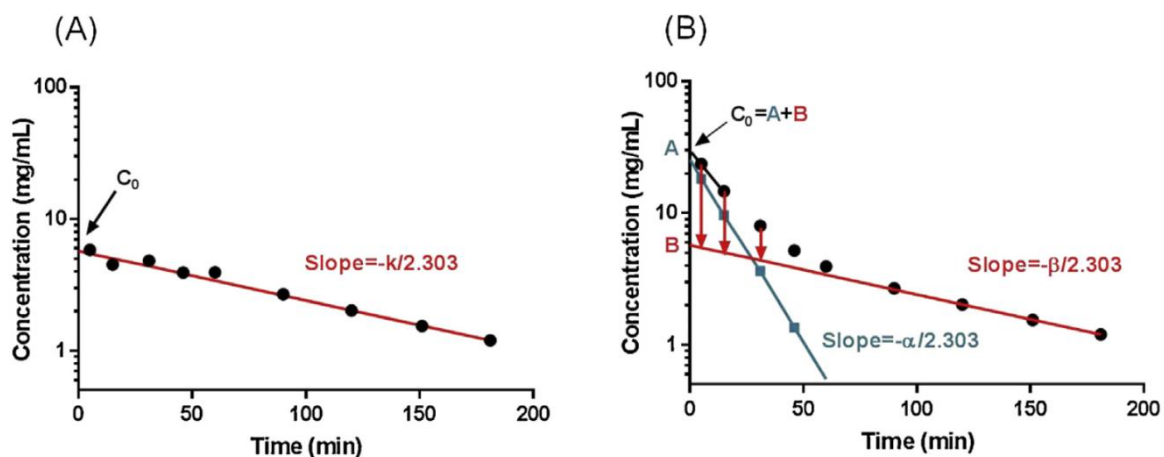


Figura 4 – Perfis de concentração plasmática em função do tempo em escala semi-logarítmica para um composto que exibe um modelo de um compartimento (A) e dois compartimentos (B). Fonte: FAN; DE LANNOY (2014).

Em geral, o modelo não-compartimentado é mais do que suficiente para descrever a evolução no tempo de novos compostos em animais e é o método mais frequentemente usado nas pesquisas pré-clínicas (EVANS, 2004). O principal objetivo do uso desse modelo é estimar vários parâmetros farmacocinéticos sem assumir ou compreender quaisquer propriedades estruturais ou mecanicista do comportamento farmacocinético de uma droga no organismo. Além disso, muitos métodos não-compartimentados permitem estimar perfis farmacocinéticos sem os complicados, e muitas vezes subjetivos, processos de regressão não linear necessários para os modelos compartimentados. Devido a essa versatilidade e

robustez, o modelo não-compartimentado é o principal método de análise farmacocinética para a indústria farmacêutica (KWON, 2002).

2.5.7.1 Concentração máxima ($C_{\max}$) e o tempo necessário para atingir a concentração máxima ($T_{\max}$)

A $C_{\max}$ e o $T_{\max}$ são obtidos diretamente da observação dos dados concentração em função do tempo. Quando um fármaco é administrado oralmente, ele deve ser dissolvido, permear através da membrana gastrintestinal, e passar pelo fígado antes de alcançar a circulação sistêmica. Como resultado, há um atraso até que ele atinja a $C_{\max}$. Uma vez na corrente sanguínea, ele sofre distribuição tecidual e eliminação. Este parâmetro geralmente é menor quando há uma exposição por qualquer via de administração em comparação com a endovenosa (Figura 5). Isso ocorre devido a barreiras adicionais, como permeabilidade, decomposição intestinal, que limitam a absorção, bem como metabolismo de primeira passagem e excreção biliar que diminuem a concentração da droga que alcança a circulação sistêmica, já que essas barreiras não são encontradas na via endovenosa (KERNS; DI, 2008).

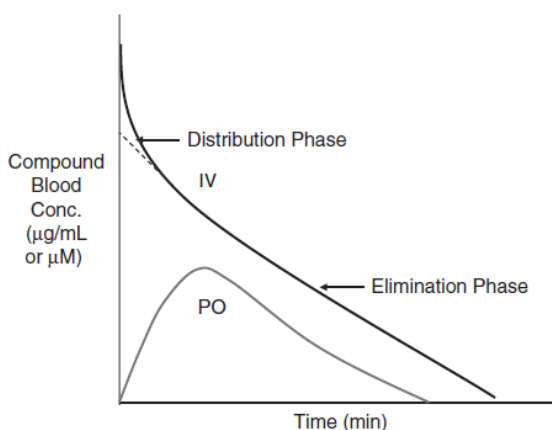


Figura 5 – Exemplo de concentrações de um fármaco no sangue em função do tempo após administração endovenosa e oral. Fonte: KERNS; DI (2008)

2.5.7.2 Área sobre a curva (ASC)

O grau de exposição a drogas é avaliado usando o parâmetro área sobre a curva (ASC). Esta é a área do gráfico da concentração da droga no sangue em função do tempo (Figura 6).

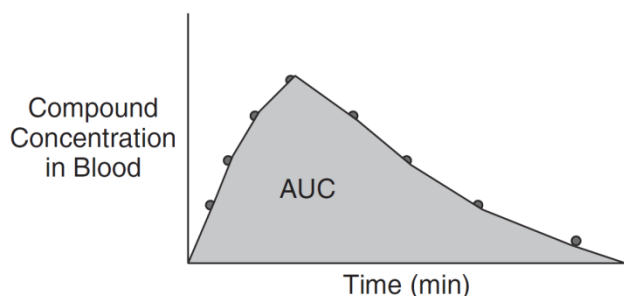


Figura 6 – Área sobre a curva (ASC) é a área do gráfico da concentração da droga no sangue em função do tempo. Fonte: KERNS; DI (2008)

Este parâmetro é estimado pelos métodos trapezoidais linear ou logarítmico, ou ainda uma combinação de ambos. O método trapezoidal linear é o mais bem conhecido para estimar a ASC. Por exemplo, ASC de dois pontos de tempo adjacentes, t_1 e t_2 (ASC_{t1-t2}), pode ser aproximada à área de um trapézio formado pela conexão dos pontos com uma linha reta (Equação 1) (Figura 7). Uma ASC sobre um período de tempo estendido pode ser estimada pela soma das áreas de uma série de trapézios individuais. Utilizando o método linear, os dados devem ser utilizados em uma escala linear (KWON, 2002).

$$ASC_{t1-t2} = \text{área do trapézio entre } t1 \text{ e } t2 = (t_2 - t_1) \times \frac{(C_2 + C_1)}{2}$$

Equação 1 – Fórmula para cálculo da área sobre a curva (ASC).

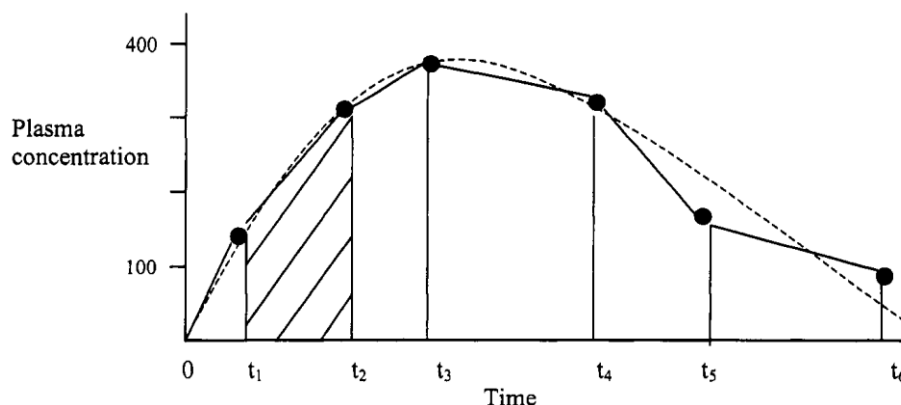


Figura 7 – Determinação da ASC pelo método trapezoidal linear. ASC entre t_1 e t_2 é mostrado na área hachurada. Uma diferença pode ser visualizada entre a interpolação dos pontos (linha sólida) e a regressão não linear (linha pontilhada) ajustando os pontos individuais. Fonte: KWON (2002)

2.5.7.3 Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$)

Tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) é o tempo que a concentração do fármaco no sangue reduz à metade. Esse parâmetro é importante, pois ajuda a definir a frequência com que a droga deve ser administrada, não havendo acúmulo significativo durante sua utilização. Um $t_{1/2}$ de 8h é o ideal para a utilização de uma única administração diária. Se o $t_{1/2}$ é muito curto, a frequência de utilização deve ser aumentada para fornecer um perfil de segurança e eficácia, e isso pode ser menos atraente comercialmente. Por outro lado, se o $t_{1/2}$ é muito longo, será difícil reverter a ação da droga caso ocorra algum evento adverso (EVANS, 2004).

Há várias formas de estimar o $t_{1/2}$ de uma droga a partir do seu gráfico de concentração plasmática em função do tempo. A primeira é através da inspeção visual do perfil do gráfico. Uma estimativa grosseira pode ser obtida a partir da observação do tempo em que a concentração diminui à metade. Uma outra maneira se faz através da razão entre o V_d e o CL (Equação 2) (FAN; DE LANNOY, 2014).

$$t_{1/2} = 0,693 \times \frac{V_d}{CL}$$

Equação 2 – Fórmula para cálculo do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$).

2.5.7.4 *Clearance* ou depuração (CL)

Outro importante parâmetro farmacocinético é o *Clearance* (CL) ou depuração. Ele indica o quão rapidamente o fármaco é extraído da corrente sanguínea e eliminado (YAP; LI; CHEN, 2006).

O CL determina a frequência de administração requerida para manter a concentração plasmática no nível desejado. Assim, um CL elevado pode levar a uma baixa exposição à droga e baixos níveis plasmáticos. Uma dose mais elevada será necessária para compensá-lo, o que aumentará o custo e a aceitabilidade do paciente (EVANS, 2004).

O CL ocorre principalmente em dois órgãos: rins e fígado (LIU; PANG, 2006; MATSSON; GIACOMINI; CRAIG BRATER, 2013). Uma porção do débito cardíaco vai para os rins, onde fármacos e seus metabólitos são extraídos para urina pela filtração glomerular e secreção ativa por transportadores. Isso resulta na eliminação destes compostos (PAINE et al., 2010).

O CL específico dos rins pode ser determinado por estudos farmacocinéticos detalhados e é utilizado o termo *clearance* renal (CL_R), que é resultante de três processos: taxa de filtração glomerular, que é a taxa de fluxo de fluido que passa por filtração dos glomérulos para o interior da cápsula de Bowman, de todos os néfrons nos rins; secreção tubular ativa, que acrescenta fármacos, que não foram filtrados no glomérulo, aos túbulos renais; e reabsorção passiva, permitindo o retorno do fármaco à circulação sanguínea (LEVEY; INKER; CORESH, 2014).

O fígado também recebe uma porção do débito cardíaco. Os compostos permeiam do sangue para dentro dos hepatócitos por difusão passiva e transporte ativo (SHITARA; HORIE; SUGIYAMA, 2006). Dentro dos hepatócitos, uma variedade de reações enzimáticas metaboliza-os. Metabólitos e uma porção de compostos não biotransformados podem ser extraídos para a bile por difusão passiva ou transporte ativo. A bile é armazenada na vesícula biliar e eliminada dentro do intestino, a partir do qual fármacos e seus metabólitos são eliminados nas fezes. O *clearance* hepático (CL_H) pode ser determinado em estudos farmacocinéticos específicos. Metabólitos e compostos não biotransformados podem também sair dos hepatócitos para o sangue por difusão passiva e transporte ativo e serem eliminados pelos rins. A quantidade de compostos e metabólitos que são extraídos para a bile ou urina

dependem de suas propriedades, como difusão passiva, afinidade por transportadores, estabilidade metabólica, dentre outras (KERNS; DI, 2008).

O termo *clearance* sistêmico (CL_S) é usado para indicar o clearance total de um fármaco de todas as suas fontes, sendo uma soma do CL_R e CL_H . Outras vias de *clearance* incluem saliva, suor e respiração. A unidade para o CL é tipicamente mL/min/kg (NOLIN; FRYE; MATZKE, 2003).

O CL por um órgão é determinado por dois fatores: fluxo sanguíneo dentro do órgão e a taxa de extração pelo órgão (FERREIRA, 2011). O fluxo sanguíneo direcionado para o fígado e os rins são bem caracterizados em cada espécie utilizada para o estudo farmacocinético, sendo dependente do débito cardíaco. A taxa de extração é a quantidade da droga removida pelo órgão após cada passagem de sangue através do órgão. Por exemplo, se o fluxo sanguíneo direcionado para o fígado é 55 mL/min/kg e o CL_H é medido como 25 mL/min/kg, então a taxa de extração hepática é 0,45, isto é, 45% dos compostos é removido após cada passagem pelo fígado. A taxa de extração é constante para uma droga específica, ao menos que a capacidade do órgão esteja saturada por sua alta concentração no sangue. O maior valor para a taxa de excreção é 1 (100%). Assim, o maior valor para o CL é o fluxo sanguíneo para o órgão (KERNS; DI, 2008).

O CL é calculado a partir de uma administração endovenosa em estudos farmacocinéticos utilizando a dose e a exposição total ao fármaco (ASC_{EV}) (Equação 3) (FAN; DE LANNOY, 2014):

$$CL = \frac{Dose}{ASC_{EV}}$$

Equação 3 – Fórmula para cálculo do *clearance* (CL)

Diante disto, se o CL é determinado, ele pode ser utilizado para estimar a dose que deve ser administrada para fornecer níveis farmacológicos necessários para o efeito terapêutico. Por exemplo, compostos com CL elevados requerem maiores doses para alcançar certo nível de exposição (ASC) para a atividade *in vivo* (KERNS; DI, 2008).

2.5.7.5 Volume de distribuição (V_d)

O V_d descreve como a droga se distribui no organismo. Se o volume de distribuição é muito baixo, uma molécula com um sítio de ação intracelular, como um agente antiviral, pode não alcançar elevadas concentrações intracelulares, mesmo a concentração plasmática estando elevada. Um V_d de 0,07 L/kg ou menos geralmente sugere que a droga está confinada na corrente sanguínea. Um V_d de 0,25 L/kg pode indicar que a droga alcança o líquido intersticial, mas não penetra nas células. Um grande V_d de 0,6 L/kg ou mais sugere que a droga é bem distribuída, mas não necessariamente significa que a droga entra em todas as células, e isso pode ser devido à captura por uma membrana ou tecido específico. Por exemplo, compostos muito lipofílicos são conhecidos por se distribuírem nos lipídios das membranas celulares e nos adipócitos, produzindo depósitos de liberação lenta de drogas e prolongando os níveis plasmáticos (EVANS, 2004).

V_d , em estudo farmacocinético não compartimentado, é calculado como (Equação 4):

$$V_d = \frac{Dose}{C_0}$$

Equação 4 – Fórmula para cálculo do volume de distribuição (V_d)

Onde Dose é a quantidade da droga dada ao animal por peso corpóreo pela via endovenosa e C_0 é a concentração sanguínea inicial do fármaco após sua administração endovenosa. C_0 é determinada após plotar o log da concentração sanguínea em função do tempo e extrapolar para o tempo zero (KERNES; DI, 2008).

2.5.7.6 Biodisponibilidade absoluta

Quando um fármaco é administrado por uma via, que não seja a endovenosa, ela tem que passar por barreiras de absorção e metabolismo antes de alcançar a circulação sistêmica. Se um fármaco é pouco absorvido ou extensamente metabolizado antes de atingir a corrente sanguínea, então apenas uma fração da dose administrada irá chegar a este local. Amostras de sangue são tomadas da circulação sistêmica para análise farmacocinética, consequentemente elas irão refletir unicamente a fração da droga que alcançou a circulação. Biodisponibilidade é a medida da fração da dose disponível sistemicamente após uma dose. Para um

composto ter boa biodisponibilidade, ele deve ser bem absorvido e ter baixo CL. Se uma droga é eliminada pelo metabolismo hepático, sua concentração no sangue que chega ao fígado é maior que a que sai. Esse fenômeno é conhecido como metabolismo de primeira passagem. Níveis sanguíneos ou plasmáticos tomados para análise farmacocinética inevitavelmente refletem o nível da droga na circulação geral, e, conseqüentemente, quando os níveis plasmáticos após administração oral são comparados com aqueles após endovenosa, os valores são menores para a oral devido à quantidade de droga removida pela primeira passagem pelo fígado. Elevado CL_H leva à baixa biodisponibilidade, mesmo se a droga é bem absorvida (EVANS, 2004).

A biodisponibilidade pode ser calculada como (Equação 5):

$$Biod = \frac{ASC_{\infty PO}}{ASC_{\infty IV}} \times \frac{Dose_{IV}}{Dose_{PO}} \times 100$$

Equação 5 – Fórmula para cálculo da biodisponibilidade

Onde $ASC_{\infty PO}$ e $ASC_{\infty IV}$ são as exposições aos fármacos após as administrações pelas vias oral e endovenosa, respectivamente.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade e desenvolver um método bioanalítico para quantificação do ácido *ent-7 α -acetoxitrachylobano-18-óico* (trachylobano-360), obtido de *Xylopia langsdorffiana*, e determinação dos parâmetros farmacocinéticos em camundongos Swiss.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade pré-clínica aguda do trachylobano-360 em camundongos Swiss, pelas vias endovenosa e intraperitoneal;
- Avaliar a genotoxicidade do trachylobano-360;
- Desenvolver método analítico para análise do trachylobano-360 em solução;
- Desenvolver método de extração do trachylobano-360 no sangue de camundongos Swiss;
- Desenvolver e validar um método bioanalítico para determinação do trachylobano-360, no sangue, através de CLAE-EMn;
- Aplicar o método para determinar os parâmetros farmacocinéticos, tais como: concentração sanguínea máxima (C_{max}), *Clearance* sistêmico (CL_s), área sobre a curva de concentração *versus* tempo (ASC), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e volume de distribuição aparente (V_d) para o trachylobano-360.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) e no biotério Prof. Thomas George, ambos situados no Centro de Biotecnologia (CBiotec), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, bem como no Núcleo de Caracterização e Análise (Nucal), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.2 Material

4.2.1 Diterpeno trachylobano

O diterpeno ácido *ent*-7 α -acetoxitrachylobano-18-óico (trachylobano-360, T-360) foi obtido de *X. langsdorffiana* por técnicas específicas e gentilmente fornecido pelos colaboradores da fitoquímica, os Professores Doutores Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares.

Caules secos de *X. langsdorffiana* (4 kg) foram exaustivamente extraídos com 95% de etanol (EtOH). O solvente foi evaporado até obtenção de um concentrado escuro (60 g), o qual foi particionado sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração hexânica foi submetida à separação cromatográfica em coluna, utilizando hexano e misturas de hexano com quantidades crescentes de acetato de etila como eluente, e monitorado por cromatografia em camada delgada. Ao todo, 95 frações de 100 mL cada foram coletadas e reunidas em 12 frações. A fração 1 foi recristalizada com metanol, obtendo-se o diterpeno T-360 (TAVARES et al., 2006).

4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), machos e fêmeas pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária próxima de 60 dias, obtidos do

biotério Prof. Thomas George (ANVISA/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 ± 1 °C, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (tipo pellets de ração da marca Purina®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, com bicos, colocadas nas grades metálicas das gaiolas na sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de doze horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do CBIotec/UFPB (CEUA), sob a certidão N° 1009/12 (ANEXO A).

4.2.3 Drogas e reagentes

Água ultra-pura (tipo I) foi produzida pela Direct-Q 5 Millipore (Molsheim, França). Acetonitrila (MeCN), metanol (MeOH) e clorofórmio (CHCl₃), todos grau CLAE, foram obtidos da Tedia (São Paulo, Brasil). Hidróxido de amônio (NH₄OH) e ácido fórmico (CH₂O₂) foram obtidos a partir da Tedia e VETEC (Rio de Janeiro, Brasil), respectivamente. Heparina sódica foi obtida do laboratório Hipolabor (Minas Gerais, Brasil).

A riparina I foi obtida por síntese orgânica de acordo com a metodologia descrita na literatura (BARBOSA-FILHO; SILVA; BHATTACHARYYA, 1990) e doada pelos doutores Stanley Juan Chavez Gutierrez e José Maria Barbosa Filho.

4.3. Métodos

4.3.1 Avaliação toxicológica

4.3.1.1 Toxicidade pré-clínica aguda

Os ensaios de toxicidade aguda em camundongos foram realizados de acordo com o OECD "*Guidelines for testing of chemicals*" n. 423 (OECD, 2001), com modificações.

Camundongos Swiss (n = 3 – 6), fêmeas, incluindo o controle, foram submetidas a doses intraperitoneal (i.p.) ou endovenosa (e.v.) únicas, e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (0,5% de Tween 80). O nível de dose para ser usada como a dose de partida é selecionado a partir de um dos quatro níveis fixos, 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. Pela via e.v., foram utilizadas duas doses, inicialmente 50 mg/kg e posteriormente 300 mg/kg. No entanto, para a via i.p., a dose de 300 mg/kg foi a escolhida já que no estudo de avaliação da atividade antitumoral a dose de 25 mg/kg não produziu nenhum sinal de toxicidade (PITA et al., 2012). Em princípio, o método não se destina a permitir o cálculo preciso da DL₅₀ (apesar de fornecer uma estimativa do seu valor), entretanto permite uma classificação da substância em categorias de acordo com o "Globally Harmonized Classification System" - GHS (ANEXO B).

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração do T-360 i.p. ou e.v., foi realizada observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental elaborado pelo Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB e descrito por Almeida et al. (1999) (ANEXO C). Desde a 24^a hora e até 14 dias após a administração da dose, foram observadas a variação do peso e o consumo de água e alimentos pelos animais experimentais.

Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg) para coleta do sangue em tubos contendo heparina (25 UI/mL) para avaliação hematológica dos seguintes

parâmetros: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina, hematócrito, número de hemácias e leucócitos.

4.3.1.2 Genotoxicidade

O ensaio do micronúcleo em camundongos foi realizado de acordo com o OECD "*Guidelines for testing of chemicals*" n. 474 (OECD, 1997).

Para isso, grupos de 5 camundongos Swiss, fêmeas, foram tratadas intraperitonealmente com três diferentes doses do T-360 (25, 150 e 300 mg/kg). A escolha desta via de administração se deve ao fato de ser a via utilizada nos experimentos farmacológicos já realizados (PITA et al., 2012). Os grupos controles positivo (ciclofosfamida – 50 mg/kg) e negativo (0,5% de Tween 80) foram incluídos. Após 48 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg), e o sangue periférico foi coletado pelo plexo orbital para a produção das distensões sanguíneas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com a coloração panótica (Newprov®) para análise em microscopia de luz. Para cada animal, três distensões foram preparadas e um mínimo de 2.000 eritrócitos foram contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados.

4.3.2 Avaliação farmacocinética

4.3.2.1 Desenvolvimento do método analítico para análise do T-360 em solução

1) Preparação de solução estoque e de trabalho

Todas as soluções estoque (1 mg/mL) e de trabalho do T-360 foram individualmente preparadas em MeCN e água (50:50, v/v, H₂O:MeCN). As soluções de trabalho foram individualmente obtidas (1000, 100, 10 e 1 µg/mL) por diluição de cada solução estoque. Soluções do T-360 (1 µg/mL) foram utilizadas para identificação do seu pico no espectro de massas e tempo de retenção (TR) no

cromatograma. Essas soluções foram mantidas à 4 °C e submetidas à temperatura ambiente antes do uso.

II) Análise da solução do T-360 em espectrômetro de massas

O espectrômetro de massas utilizado foi o modelo amaZon X da marca Bruker, com tipo de analisador *IonTrap*. O nitrogênio, utilizado como nebulizador, foi produzido por um gerador de elevado grau de pureza (PEAK Scientific Instruments Ltd., Chicago, EUA). A fragmentação induzida por colisão foi realizada utilizando hélio como gás de colisão. O T-360 foi ionizado por *electrospray* (ESI) nos modos positivo ou negativo. O modo de registro de íons selecionados (RIS) foi usado para a quantificação de íons moleculares. As condições de detecção foram: voltagem capilar 4,50 kV; *endplate offset*, 300 V; temperatura da fonte, 200 °C; pressão do gás nebulizador, 15 psi; fluxo de gás, 8 L/min; velocidade de *scan*, 52000 [(m/z)/s]; tempo máximo de acumulação, 200 ms.

A solução do T-360 (1 µg/mL) foi injetada com o objetivo de obter a melhor resolução do pico do analito e seu padrão de fragmentação no espectro de massas. Para isso, utilizou-se os modos positivo ou negativo de ionização, bem como a adição de 0,1% de CH₂O₂ ou 0,1% de NH₄OH (Tabela 1) às amostras.

Tabela 1 – Variáveis utilizadas para a análise da solução de T-360.

Fonte	Aditivo
ESI (+)	0,1% ácido fórmico (CH ₂ O ₂)
	0,1% hidróxido de amônia (NH ₄ OH)
ESI (-)	0,1% ácido fórmico (CH ₂ O ₂)
	0,1% hidróxido de amônia (NH ₄ OH)

III) Análise da solução do T-360 em CLAE-EMn

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizado foi um sistema Shimadzu LC-20AD UFLC constituído por uma bomba binária (CBM-20), um degaseificador de solventes (DGU-14A) e um injetor automático (Shimadzu Kyoto, Japão) acoplado ao EM. A separação foi realizada numa coluna Kromasil-ODS (250

mm x 4,6 mm, 5,0 μm de tamanho de partícula) equipada com uma pré-coluna Kromasil-ODS (4,6 mm, 5,0 μm de tamanho de partícula). A coluna foi mantida a 25 °C. O fluxo foi ajustado para 1,0 mL/min e o volume de injeção de 20 μL . O solvente A (água) foi aditivado com 0,1% de CH_2O_2 ou 0,1% de NH_4OH dependendo da melhor ionização fornecida no EM. O solvente B foi MeCN. A eluição por gradiente foi iniciada utilizando de 5 a 95% do solvente B durante 30 min. Subsequentemente, o método isocrático foi utilizado para obter as melhores condições de análise do T-360.

Após determinar a melhor forma para ionizar e detectar o T-360 no EMn, foi injetada uma solução do T-360 (1 $\mu\text{g/mL}$) no CLAE-EMn para determinar as melhores condições que proporcionem uma melhor resolução do pico no cromatograma de íons selecionados (CIS) com menor tempo de análise.

4.3.2.2 Desenvolvimento do método de extração do T-360 em sangue total

Para o desenvolvimento do método de extração do T-360, foi utilizado um *pool* de sangue de camundongos Swiss, machos (28 – 32 g), coletados em tubos contendo heparina (25 UI/mL).

1) Equipamentos e condições

A cromatografia foi realizada em um cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas, como descrito anteriormente, utilizando o método desenvolvido para a análise do T-360 em solução.

A separação foi realizada com uma coluna Kromasil C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) e com uma pré-coluna Kromasil C18 (4,6 mm). Eluição isocrática foi realizada com fase móvel $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ (65:35, v/v) (0,1% de NH_4OH na fase aquosa) e fluxo de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi controlada a 25 °C. O volume de amostra injetado foi 20 μL . Sob essas condições, T-360 mostrou tempo de retenção de $2,63 \pm 0,01$ min.

A detecção pelo espectrômetro de massas foi realizada através da ionização por *electrospray* (ESI), em modo negativo. As condições de operação utilizadas foram descritas anteriormente (item *Análise da solução do T-360 em espectrômetro*

de massas). A fragmentação induzida por colisão foi realizada utilizando gás hélio como gás de colisão, e a energia de colisão foi ajustada a 70% com monitorização da fragmentação 359,2 $\rightarrow$ 299,2 m/z.

As amostras de sangue foram agitadas em vortex (IKA MS3 Gehaka, São Paulo Brasil) e centrifugadas em centrífuga Rotina 380 R (Hettich Zentrifugen; Tuttlingen, Alemanha).

II) Preparo das amostras de sangue, de solução e controle de qualidade

Soluções do T-360 (S-T360) foram preparadas a partir da solução estoque (50:50, v/v, H₂O:MeCN), até alcançar a concentração de 800 ng/mL em um volume final de 400 μ L, o qual foi agitado por 30 s. O mesmo procedimento foi usado para preparar amostras de solução do T-360 que serviram como controle de qualidade (S-CQ).

O *pool* de sangue de camundongos foi congelado em N₂ líquido com posterior descongelamento à temperatura ambiente, para produzir 100% de hemólise. As amostras de sangue foram contaminadas com T-360 para obter a concentração de 800 ng/mL em um volume final de 400 μ L de sangue total (B-T360), as quais foram então agitadas por 30 s. As amostras de sangue sem adição do T-360 (branco, B-B) também foram agitadas por 30 s.

III) Curva de calibração

As amostras S-T360 foram preparadas nas concentrações de 240, 480, 800, 1.200 e 1.600 ng/mL para a curva de calibração da área do pico plotada no eixo Y em função da concentração teórica em ng/mL no eixo X com um coeficiente de determinação > 0,99, por regressão linear.

IV) Avaliação do método de extração

Amostras B-T360 foram separadas em grupos de acordo com o solvente extrator utilizado (MeCN, MeOH ou CHCl₃), em triplicada. Um volume de 1.200 μ L de cada solvente foi adicionado, fornecendo os seguintes grupos de amostras: B-T360-

MeCN, B-T360-MeOH e B-T360-CHCl₃. Essas misturas foram agitadas por 60 s e centrifugadas a 1.000, 7.000 ou 14.000 x g, a 4 °C. Todas as amostras foram centrifugadas por 5, 15 ou 25 min. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras S-T360 (Tabela 2).

Após centrifugação das amostras contendo sangue ou solução, 1.200 µL do sobrenadante foram transferidos para *vials* e, posteriormente, secados em N₂ gasoso. As amostras secas foram reconstituídas com 400 µL de H₂O:MeCN (50:50, v/v). As amostras S-CQ não foram submetidas ao processo de extração.

Uma alíquota de 20 µL das amostras foi injetada no cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas. A área do pico foi adquirida e a média e o desvio padrão das replicatas foram determinados. Os resultados foram correlacionados com a curva de calibração por regressão linear. Uma curva de calibração típica forneceu a seguinte equação: $y = 17682,636706 x - 461236,629247$ ($R^2 = 0,999630$).

V) Otimização do método de extração

A partir dos estudos de desenvolvimento do método de extração, onde foi observado o melhor o tipo de solvente extrator e força e tempo de centrifugação, a recuperação do T-360 foi otimizada. Esse procedimento consistiu em: repetição do método de extração no sedimento após remoção do sobrenadante em solução (S-T360-2x) e sangue (B-T360-2x); e acidificação com ácido fórmico (0,5%) das amostras de solução (S-T360-2x-A) e sangue (B-T360-2x-A) antes de cada extração do T-360 (Tabela 3).

VI) Recuperação em relação ao processo de extração (RE%)

A recuperação em relação ao processo de extração em soluções (RE%) foi calculada (Equação 6) pela comparação da área do pico da amostra que foi submetida ao processo de extração (B) em relação à área do pico da amostra que não sofreu o processamento (C) (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; MATAR, 2008).

$$RE\% = \left(\frac{B}{C} \right) \times 100$$

Equação 6 – Fórmula para o cálculo da recuperação em relação ao processo de extração.

VII) Avaliação do efeito de matriz (EM%)

O efeito de matriz (EM%) foi avaliado utilizando o método proposto por Dos Santos et al. (2011). As áreas das amostras de sangue contendo o analito (B) foram comparadas com as áreas das amostras em solução que também sofreram o processo de extração (A). Um valor de 0% indica que não houve efeito de matriz (Equação 7) (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; VAN DE STEENE; LAMBERT, 2008).

$$EM\% = \left(\left(\frac{B}{A} \right) \times 100 \right) - 100$$

Equação 7 – Fórmula para o cálculo do efeito de matriz.

Tabela 2 – Amostras de sangue e solução analisadas, variando o tipo de solvente, força e tempo de centrifugação.

Amostra	Solvente	Força de centrifugação (x g)	Tempo de centrifugação (min)
S-T360	MeCN	1.000	5
	MeCN	1.000	15
	MeCN	1.000	25
	MeOH	1.000	5
	MeOH	1.000	15
	MeOH	1.000	25
	CHCl ₃	1.000	5
	CHCl ₃	1.000	15
	CHCl ₃	1.000	25
S-T360	MeCN	7.000	5
	MeCN	7.000	15
	MeCN	7.000	25
	MeOH	7.000	5
	MeOH	7.000	15
	MeOH	7.000	25
	CHCl ₃	7.000	5
	CHCl ₃	7.000	15
	CHCl ₃	7.000	25
S-T360	MeCN	14.000	5
	MeCN	14.000	15
	MeCN	14.000	25
	MeOH	14.000	5
	MeOH	14.000	15
	MeOH	14.000	25
	CHCl ₃	14.000	5
	CHCl ₃	14.000	15
	CHCl ₃	14.000	25
B-T360	MeCN	1.000	5
	MeCN	1.000	15
	MeCN	1.000	25
	MeOH	1.000	5
	MeOH	1.000	15
	MeOH	1.000	25
	CHCl ₃	1.000	5
	CHCl ₃	1.000	15
	CHCl ₃	1.000	25
B-T360	MeCN	7.000	5
	MeCN	7.000	15
	MeCN	7.000	25
	MeOH	7.000	5
	MeOH	7.000	15
	MeOH	7.000	25
	CHCl ₃	7.000	5
	CHCl ₃	7.000	15
	CHCl ₃	7.000	25
B-T360	MeCN	14.000	5
	MeCN	14.000	15
	MeCN	14.000	25
	MeOH	14.000	5
	MeOH	14.000	15
	MeOH	14.000	25
	CHCl ₃	14.000	5
	CHCl ₃	14.000	15
	CHCl ₃	14.000	25

Tabela 3 – Amostras de sangue e soluções submetidas à otimização do método, realizando-se duas centrifugações e com a acidificação.

Amostras (n=3)	Solventes	Força de centrifugação (x g)	Tempo de centrifugação (min)
S-T360-2x	CHCl ₃	14.000	15
S-T360-2x-A	CHCl ₃	14.000	15
B-T360-2x	CHCl ₃	14.000	15
B-T360-2x-A	CHCl ₃	14.000	15

VIII) Eficiência do processo de extração (EP)

A eficiência do processo de extração foi determinada pela Equação 8 (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; MATAR, 2008):

$$EP = \frac{((EM + 100) \times RE)}{100}$$

Equação 8 – Fórmula para o cálculo da eficiência do processo de extração.

4.3.2.3 Validação do método para determinação do T-360 em sangue total

I) Padrão interno

Dentre várias substâncias testadas, a riparina I foi selecionada como padrão interno (PI) para validação dos métodos desenvolvidos.

II) Equipamentos e condições cromatográficas

Para análise conjunta do T-360 e do PI, foi necessária a adaptação do método CLAE-EMn desenvolvido.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna Kromasil C₁₈ (250 mm X 4,6 mm, 5 µm) equipada com uma pré-coluna Kromasil C₁₈ (4,6 mm), e a temperatura da coluna foi mantida a 25 °C. A eluição foi realizada utilizando os solventes A (0,1%, v/v, solução aquosa de NH₄OH) e B (MeCN). Para que fosse possível a análise concomitante do T-360 e do PI, houve a necessidade da

combinação da eluição isocrática com a gradiente, como descrito a seguir (Tabela 4 e Figura 8).

Tabela 4 – Sistema isocrático e gradiente utilizado na corrida cromatográfica para eluição do T-360 e da riparina I (PI).

Intervalo de tempo (min)	% Solvente B	Eluição
0, 0 → 3,5	35	Isocrática
3,5 → 3,6	35 → 60	Gradiente
3,6 → 10,0	60	Isocrática
10,0 → 10,1	60 → 35	Gradiente
10,1 → 15,0	35	Isocrática

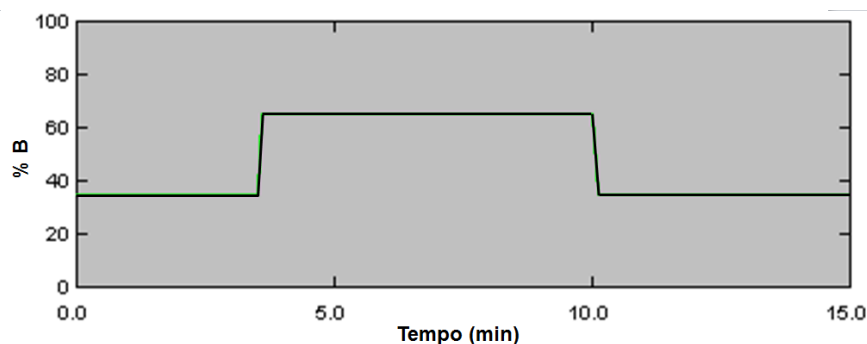


Figura 8 – Curva dos percentuais do solvente B utilizados durante a corrida cromatográfica do T-360 e da riparina I (PI).

A taxa de fluxo do solvente foi mantida a 1,0 mL/min. O volume da amostra injetada foi de 20 μ L.

A detecção do T-360 e da riparina I foi realizada usando um detector *IonTrap* (amazona X, Bruker), ionizando-os por ESI em modo negativo e positivo em uma única corrida dividida em dois períodos: de 0,0 – 3,5 min, o T-360 foi detectado em modo negativo de ionização; de 3,5 – 15,0 min, a ionização foi invertida para o modo positivo para o detecção do PI. As fragmentações induzidas por colisão foram executadas utilizando gás hélio. A energia de colisão foi ajustada como apresentada na Tabela 5.

Tabela 5 – Energia de colisão e o fragmento monitorado na quebra do T-360 e da riparina I (PI).

Substância	Energia de colisão (%)	Fragmento monitorado (m/z)
T-360	70	359,2 → 299,2
Riparina I	40	256 → 134,5

III) Preparação das soluções padrão e das amostras do controle de qualidade

As soluções do T-360 foram preparadas como descrito anteriormente. Uma solução da Riparina I foi preparada na concentração de 1 mg/mL. Esta foi finalmente diluída a 2.000 ng/mL com H₂O:MeCN (50:50, v/v). Todas as soluções foram mantidas a 4 °C.

Para validação do método, três níveis de concentrações de soluções padrão contendo T-360 (100, 950 e 2.000 ng/mL) foram usadas para o preparo das amostras de sangue do controle de qualidade.

As curvas de calibração (100, 500, 950, 2.000 ng/mL) foram preparadas por contaminação do sangue com quantidade suficiente das soluções de trabalho para alcançar o intervalo de concentração desejado (100 – 2.000 ng/mL). A riparina I foi utilizada na concentração de 20 ng/mL.

IV) Preparação das amostras de sangue

Volumes das soluções de trabalho do T-360 (8 µL) e PI (4 µL) foram adicionados às amostras de sangue (392 µL) e agitados por 30 s. Posteriormente, 1.200 µL de CHCl₃ foram adicionados, para realizar extração líquido-líquido, e a mistura foi agitada por 60 s. Então, foram adicionados 8 µL de ácido fórmico, para atingir a concentração de 0,5%, com consequente agitação por mais 60 s. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 15 min. Da fase orgânica, 1.000 µL foram transferidos para *vials*, onde foram submetidos à secagem insuflando N₂ gasoso. Esse processo foi repetido. Os resíduos foram dissolvidos em 400 µL de H₂O:MeCN (50:50, v/v) e 20 µL dessas amostras foram injetadas para análise utilizando CLAE-EMn.

V) Validação do método

V-1) Seletividade/especificidade

A seletividade/especificidade do método foi avaliada utilizando um *pool* de sangue de mais de cinco camundongos. A amostra branco (B-B) foi empregada para averiguar a presença de compostos endógenos da matriz que possam causar interferências no desenvolvimento do método proposto e nas condições da CLAE-EMn. O cromatograma da amostra B-B foi comparado aos das amostras contaminadas apenas com o T-360 (B-T360) na concentração baixa (100 ng/mL), aos das amostras de sangue contaminadas apenas com o PI (B-PI) e aos das amostras com T-360 e PI (B-T360-PI) (BRASIL, 2003).

V-2) Linearidade

As amostras de sangue da curva de calibração foram preparadas pela contaminação do sangue (392 µL) dos animais com o T-360 (8 µL) e o PI (4 µL), como descrito no item *Preparação das amostras de sangue*. Essas foram, então, submetidas ao processo de extração desenvolvido. A curva de calibração consistiu de cinco níveis de concentração, preparadas em três dias distintos. As concentrações baixa (100 ng/mL), média (950 ng/mL) e alta (2.000 ng/mL) foram preparadas em cinco replicatas. Já as intermediárias (500 e 1.500 ng/mL) foram preparadas em triplicata. Os dados, obtidos de cada um dos dias individualmente, foram plotados em um gráfico da razão da área do pico do T-360 pela do PI no eixo Y, em função da razão da concentração teórica do T-360 no eixo X, descritos na forma $y = a + bx$ (BRASIL, 2003).

V-3) Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) foi estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003).

Para determinar o limite de quantificação (LQ), preparou-se amostras de sangue com concentrações decrescentes do T-360. A menor concentração que apresentar precisão de até 20% e exatidão de 80 a 120% será o limite inferior de quantificação (BRASIL, 2003).

V-4) Exatidão

A exatidão foi determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em três corridas diferentes (exatidão intercorridas), utilizando três concentrações em cinco replicatas: baixa (100 ng/mL), média (950 ng/mL) e alta (2.000 ng/mL) (BRASIL, 2003). A exatidão (E) foi calculada usando a Equação 9:

$$E = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Equação 9 – Fórmula para o cálculo da exatidão. Fonte: Brasil, 2003.

Não se admitiu valores fora da faixa de $\pm 15\%$ (quinze por cento) do valor teórico, exceto para o LQ, para o qual não se admitem valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal (BRASIL, 2012).

V-5) Precisão

Do mesmo modo, a precisão foi determinada em uma mesma corrida analítica (precisão intracorrída) e em três corridas diferentes (precisão intercorridas), utilizando três concentrações em cinco replicatas: baixa (100 ng/mL), média (950 ng/mL) e alta (2.000 ng/mL) (BRASIL, 2003).

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2012), segundo a Equação 10:

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

Equação 10 – Fórmula para o cálculo da precisão. Fonte: Brasil, 2003.

4.3.2.4 Aplicação do método para determinação do T-360 em sangue total

Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), machos (28 – 32 g), foram divididos em oito grupos (n = 6) de acordo com o tempo de coleta do sangue. Inicialmente, 120 mg do T-360 foram dissolvidos em 48 mL de salina (0,5% de Tween-80) para obter a concentração de 2,5 mg/mL. Após todos os camundongos serem administrados com a dose de 25 mg/kg (e.v.), 400 µL de sangue foram coletados de cada tempo dos respectivos grupos: 10, 15, 30 min; 1, 2, 4, 8 e 24 h. Amostras branco de sangue (B-B) foram coletadas de animais que não receberam o T-360. Para a coleta do sangue, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg) pela via intramuscular no trem posterior e a coleta realizada pelo plexo braquial. As alíquotas de sangue foram transferidas para tubos contendo heparina (25 IU/mL) e congeladas em N₂ líquido. Após descongelamento, foram adicionados 8 µL do PI, agitadas por 30 s e acidificadas com ácido fórmico (8 µL) com posterior agitação por 60 s. Foi, então, adicionado CHCl₃ (1.200 µL) para extração do T-360 e PI. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 15 min, A fase orgânica foi coletada (1.000 µL) e o sedimento foi ressubmetido à extração. Ao término do processamento, toda a fase orgânica coletada (2.000 µL) foi submetida à secagem, insuflando N₂ gasoso. Todas as amostras foram mantidas a -20 °C até sua injeção no equipamento de análise.

Os dados de concentração em função do tempo foram analisados utilizando o modelo farmacocinético não-compartimentado. Os parâmetros farmacocinéticos, tais como concentração sanguínea máxima (C_{max}). Os parâmetros tempo de meia-vida de eliminação (t_{1/2}), *clearance* sistêmico (CL_s) e volume de distribuição aparente (V_d) foram determinados a partir das equações 2, 3 e 4, respectivamente. A área sob a curva (ASC_{0 – t}) foi determinada utilizando a regra trapezoidal. A constante de eliminação (K_e) foi calculada utilizando a razão entre o logaritmo natural de dois (ln2) e o t_{1/2}.

4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos nas avaliações toxicológicas e no desenvolvimento do método de extração do T-360 tiveram seus valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). Já os resultados da validação do método de extração e da aplicação farmacocinética tiveram seus resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Os resultados foram analisados empregando-se o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de *Bonferroni* (para variáveis paramétricas) e o teste de Mann-Whitney (para variáveis não paramétricas). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação toxicológica

5.1.1 Toxicidade pré-clínica aguda

No ensaio pré-clínico agudo, observou-se que os tratamentos com o T-360 iniciados pelas doses de 50 mg/kg (e.v.) ou 300 mg/kg (i.p.) não provocaram mortes aos animais tratados. Com o objetivo de avaliar uma possível toxicidade hematológica do T-360, foram utilizados seis camundongos fêmeas para administração do próximo nível de dose (300 mg/kg e.v.). Nesse ensaio, quatro dos seis animais morreram (Tabela 6). Com isso, baseado na tabela publicada no guia 423 da OECD (Anexo B), o T-360 foi classificado na categoria 3 da GHS, com valor estimado da DL_{50} de 200 mg/kg para a via e.v..

Tabela 6 – Efeito de doses únicas do Trachylobano-360 (i.p. ou e.v.) em camundongos

Grupos	Dose (mg/kg)	Sexo	M/T	Alterações comportamentais
Via intraperitoneal				
Trachylobano-360	300	F	0/3	Ataxia, resposta ao toque diminuída, diarreia
Via endovenosa				
Trachylobano-360	50	F	0/3	-
Trachylobano-360	300	F	4/6	-

F – Fêmeas; M – Mortes; T - Total

Foram observados efeitos característicos de alterações no sistema nervoso central (SNC) e autonômico (SNA). Ao administrar o T-360 (300 mg/kg i.p.), observou-se moderados efeitos depressores do SNC, de curta duração (até 30 min), tais como ataxia e resposta diminuída ao toque. Com relação às mudanças autonômicas, diarreia esteve presente em todos os animais desse grupo experimental.

Como a dose de 300 mg/kg i.p. já é 12 vezes maior que sua dose farmacologicamente ativa em relação à atividade antitumoral na mesma espécie animal (PITA et al., 2012) e esta não causou mortes nem mudanças comportamentais significantes e duradouras, não realizou-se avaliação toxicológica com a dose de 2.000 mg/kg.

A dose de 50 mg/kg, via e.v., não induziu alterações comportamentais e/ou autonômicas. Na dose de 300 mg/kg, não se observou nenhuma mudança pois os animais morreram imediatamente após administração.

Os animais submetidos aos diferentes tratamentos com o T-360 (i.p. ou e.v.) não apresentaram nenhuma alteração hematológica significativa (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento agudo (i.p. ou e.v.) com Trachylobano-360.

Grupos	Dose (mg/kg)	Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Via intraperitoneal					
Controle	-	$6,07 \pm 0,86$	$9,59 \pm 0,12$	$14,87 \pm 0,13$	$48,93 \pm 0,23$
Trachylobano-360	300	$6,00 \pm 0,55$	$9,31 \pm 0,27$	$14,33 \pm 0,50$	$46,90 \pm 2,11$
Via endovenosa					
Controle	-	$7,47 \pm 0,97$	$10,10 \pm 0,22$	$14,93 \pm 0,12$	$49,00 \pm 0,63$
Trachylobano-360	50	$10,17 \pm 1,10$	$10,02 \pm 0,28$	$15,30 \pm 0,20$	$49,60 \pm 0,67$
Trachylobano-360	300	$5,05 \pm 0,95$	$10,70 \pm 0,12$	$15,25 \pm 0,55$	$51,05 \pm 2,35$

Dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Dados comparados pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 7 – Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos submetidos ao tratamento agudo (i.p. ou e.v.) com Trachylobano-360 (Continuação).

Grupos	Dose (mg/kg)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Via intraperitoneal				
Controle	-	51,00 ± 0,58	15,53 ± 0,15	30,40 ± 0,17
Trachylobano-360	300	50,33 ± 0,88	15,27 ± 0,12	30,30 ± 0,35
Via endovenosa				
Controle	-	48,33 ± 0,88	14,87 ± 0,33	30,57 ± 0,38
Trachylobano-360	50	49,33 ± 0,67	15,27 ± 0,35	30,83 ± 0,34
Trachylobano-360	300	47,50 ± 1,50	14,25 ± 0,35	29,95 ± 0,35

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. Dados comparados pelo teste de Mann-Whitney.

5.1.2 Genotoxicidade

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* do T-360, foi realizado o ensaio do micronúcleo, cujo resultado está apresentado abaixo, na Tabela 8. O tratamento dos animais com diferentes doses do T-360 não induziu aumento na frequência de eritrócitos micronucleados no sangue periférico quando comparados ao grupo controle.

Tabela 8 – Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com diferentes doses do Trachylobano-360 e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de animais	Total de células	Células micronucleadas
Controle	-	5	2000	2,92 ± 0,43
Ciclofosfamida	50	5	2000	17,67 ± 1,38 ^{a,b}
Trachylobano-360	25	5	2000	2,59 ± 0,19
Trachylobano-360	150	5	2000	3,27 ± 0,99
Trachylobano-360	300	5	2000	2,95 ± 0,56

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média.

^a $p < 0,05$ comparado com grupo controle por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

^b $p < 0,05$ comparado com os grupos experimentais T-360 (25, 150 e 300 mg/kg) por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.2 Desenvolvimento do método analítico para análise do T-360 em solução

1) Análise da solução do T-360 em espectrômetro de massas

Após injeção direta da solução do T-360 (1 µg/mL) no EM, obteve-se o espectro de massas através da ionização por ESI em modo positivo (Figura 9) e negativo (Figura 10).

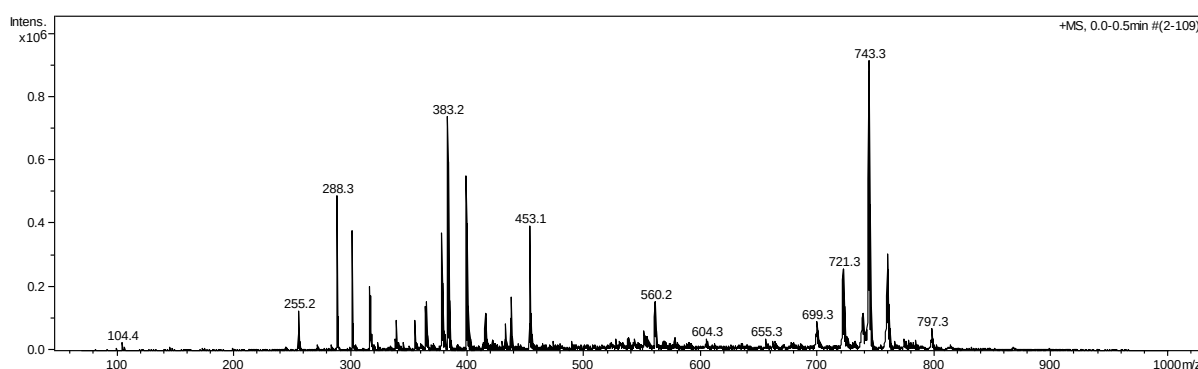


Figura 9 – Espectro de massas do Trachylobano-360, por ionização em modo positivo (ESI+).

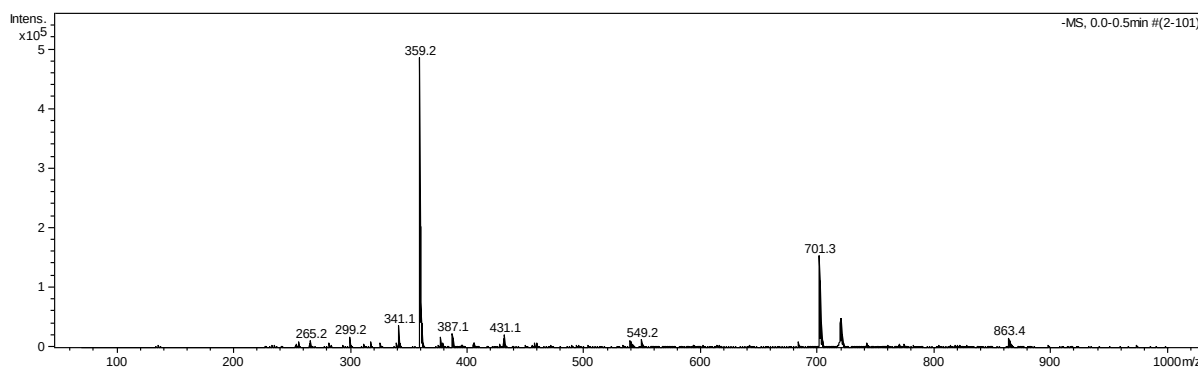


Figura 10 – Espectro de massas do Trachylobano-360, por ionização em modo negativo (ESI-).

Como esperado, as análises dos espectros das soluções de T-360, sem aditivo, demonstraram que o T-360 foi melhor detectado quando ionizado por ESI-, apresentando o íon molecular 359,2 m/z, condizente com a fórmula do íon molecular $[M - H]^+$ produzido por reação de desprotonação.

O uso do aditivo, CH₂O₂, na solução do T-360, influenciou na intensidade do íon em modo negativo diminuindo-o (Figura 12) comparativamente à análise sem

uso de aditivo (Figura 10). No modo positivo, com uso do aditivo CH_2O_2 , o íon 359,2 m/z não foi observado (Figura 11).

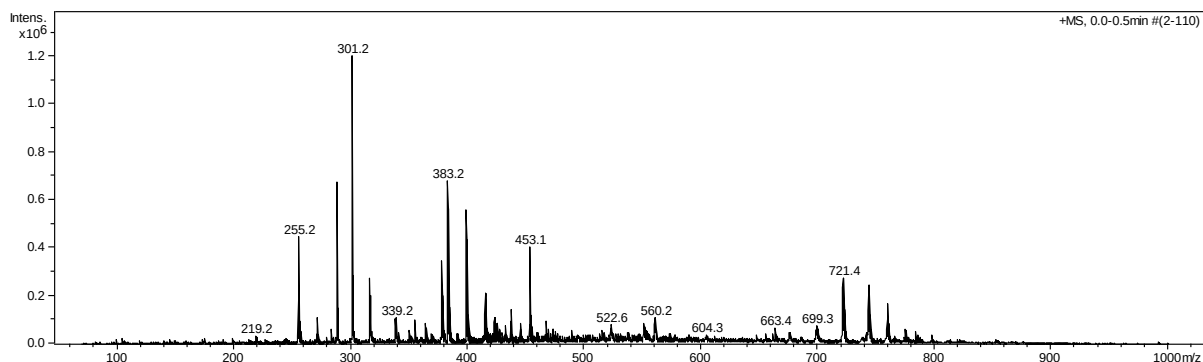


Figura 11 – Espectro de massas do Trachylobano-360 aditivado com ácido fórmico, ionizado no modo positivo (ESI+).

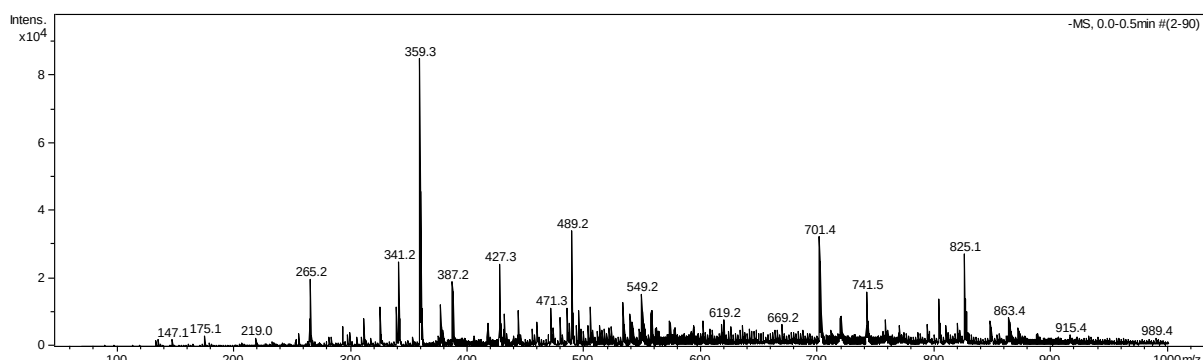


Figura 12 - Espectro de massas do Trachylobano-360 aditivado com ácido fórmico, ionizado no modo negativo (ESI-).

Os estudos das soluções T-360 com o uso do aditivo NH_4OH analisadas por ESI no modo positivo (Figura 13) e negativo (Figura 14) demonstraram que, em modo negativo, a intensidade do íon (359,2 m/z) foi maior comparativamente ao estudo sem aditivo (Figura 10) e ao estudo com o aditivo CH_2O_2 (Figura 12).

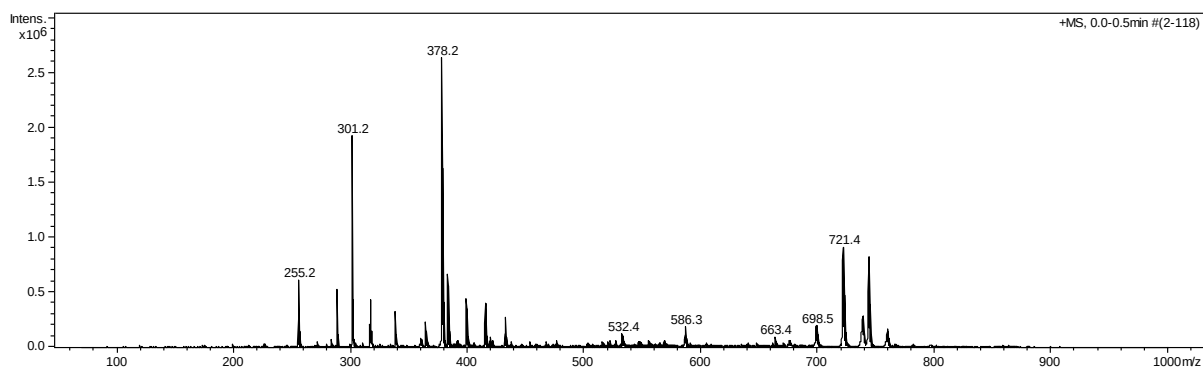


Figura 13 – Espectro de massas do Trachylobano-360 aditivado com hidróxido de amônio, ionizado no modo positivo (ESI+).

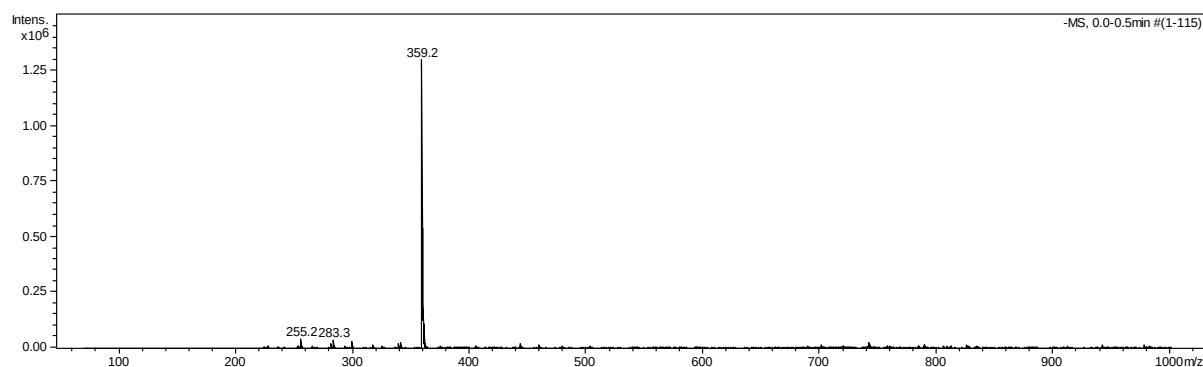


Figura 14 – Espectro de massas do Trachylobano-360 aditivado com hidróxido de amônio, ionizado no modo negativo (ESI-).

No estudo de fragmentação do íon 359,2 m/z , com NH_4OH (Figura 15), foram observados picos de 299,2 m/z que se origina pela perda da acetoxila (60 m/z), e 317,2 m/z , correspondendo à quebra do anel e perda de um grupo C_3H_6 (42 m/z), conforme apresentado na Figura 16.

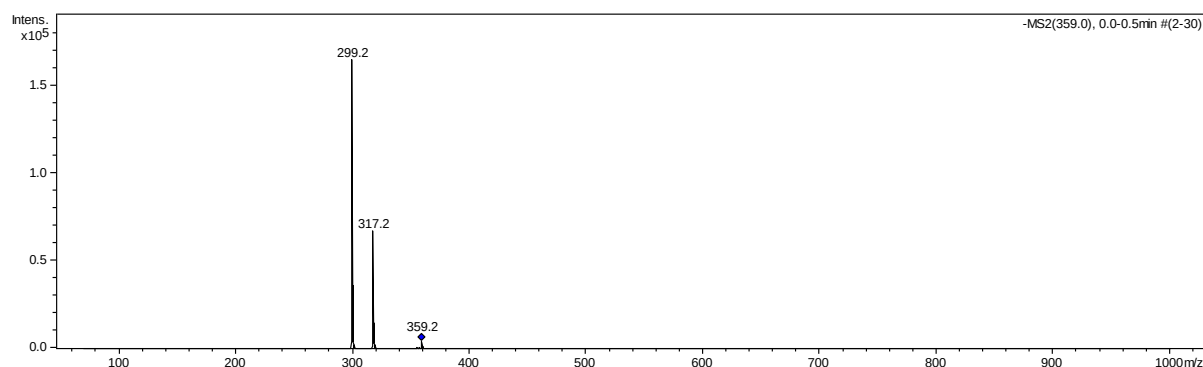


Figura 15 – Espectro de massas do Trachylobano-360, alcalinizado com hidróxido de amônio, ionizado por ESI-. Fragmentação do íon molecular 359,2 m/z .

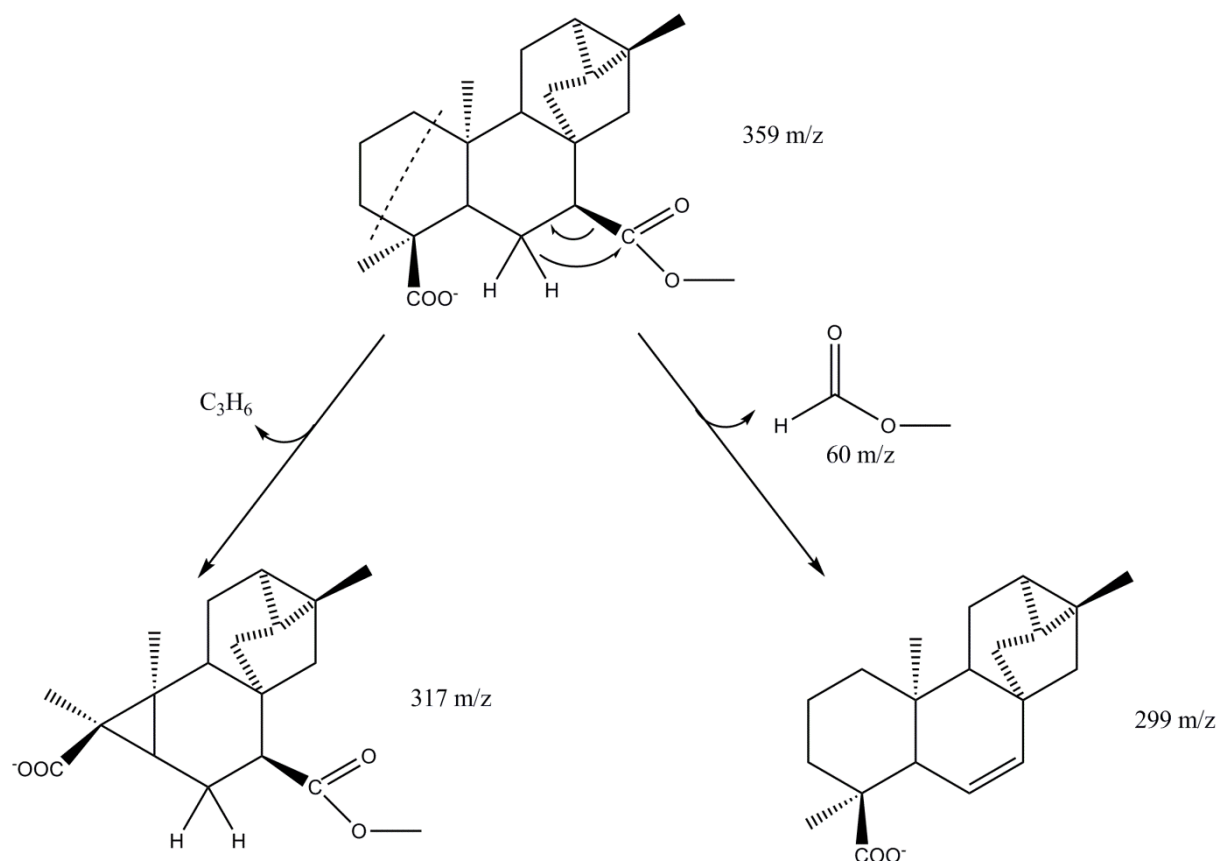


Figura 16 – Fragmentação do Trachylobano-360, originando os picos 299 e 317 m/z.

II) Análise da solução do T-360 em CLAE-EMn

No desenvolvimento analítico por cromatografia líquida iniciou-se a eluição por gradiente (5 a 95% de MeCN) com duração de 30 min. A detecção do íon 359,2 m/z foi monitorado pela fragmentação e observação do íon filho 299,2 m/z (Figura 17).

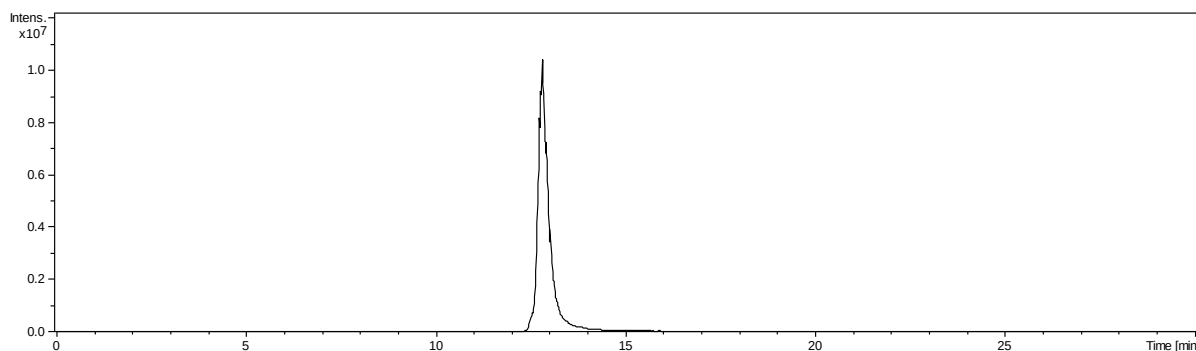


Figura 17 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 | H₂O:MeCN), pelo sistema de eluição gradiente (5 a 95% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.

Observa-se no cromatograma que o pico do T-360 apresentou tempo de retenção em 12,8 min, utilizando eluição gradiente (5 a 95% de MeCN) durante 30 minutos.

Em seguida, métodos isocráticos foram utilizados para encontrar a melhor porcentagem de solvente orgânico a ser utilizado para eluição do T-360.

Inicialmente, realizou-se uma corrida com 80% de MeCN (Figura 18). Posteriormente, foram utilizados percentuais decrescentes: 60% (Figura 19), 40% (Figura 20), 30% (Figura 21) e 20% (Figura 22) de MeCN.

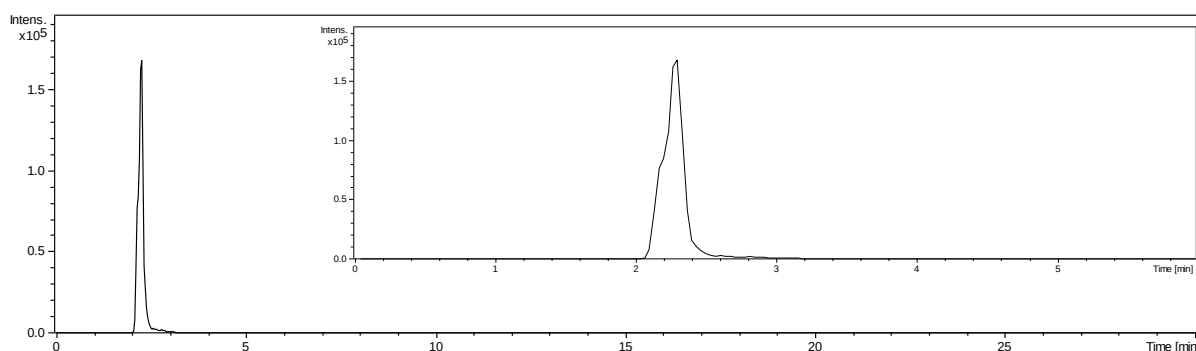


Figura 18 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 | H₂O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (80% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.

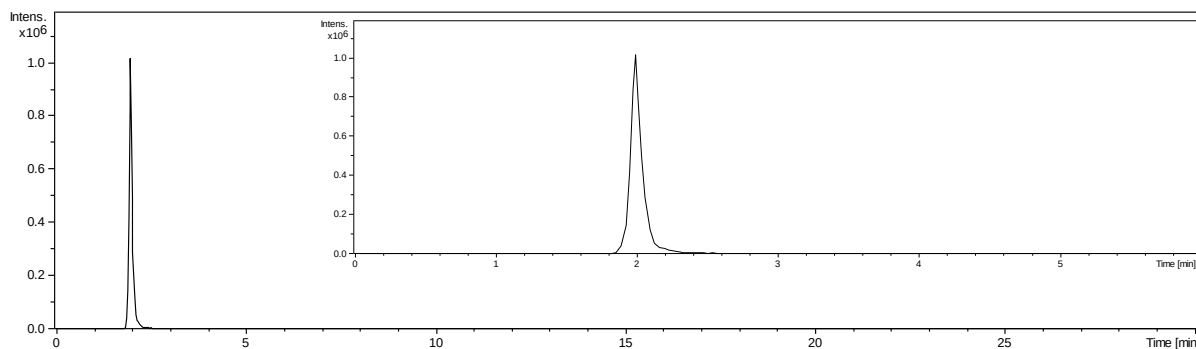


Figura 19 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 | H₂O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (60% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.

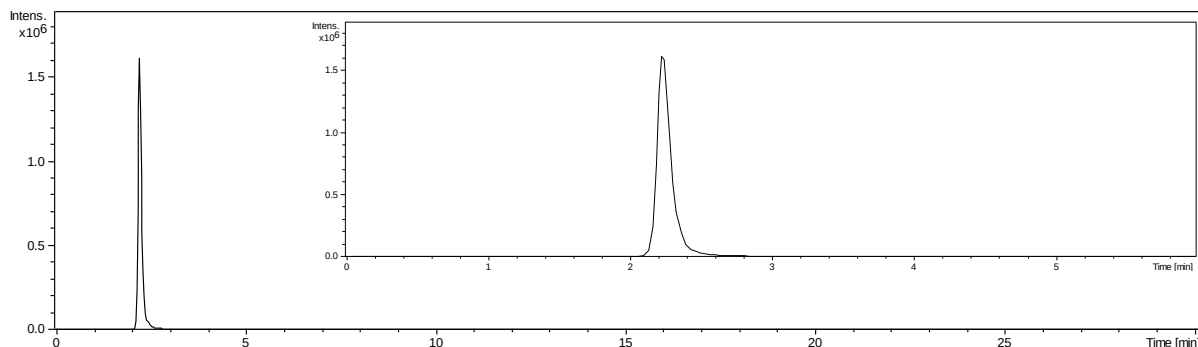


Figura 20 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 | H₂O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (40% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.

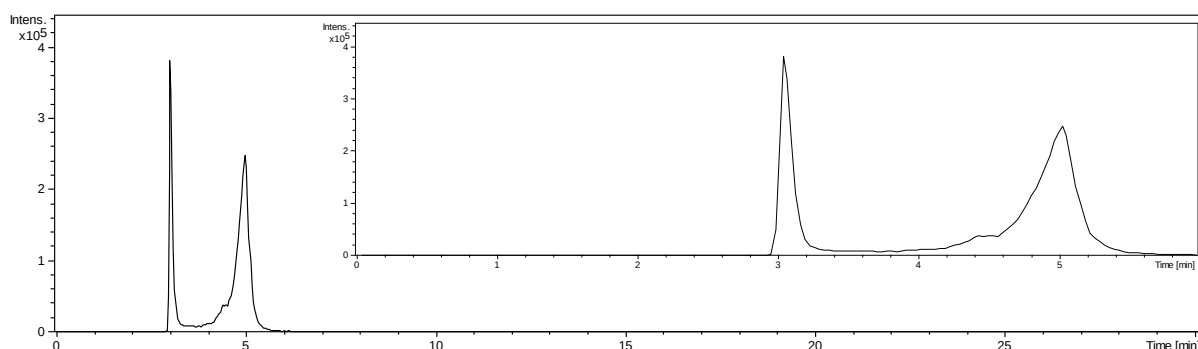


Figura 21 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 | H₂O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (30% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.

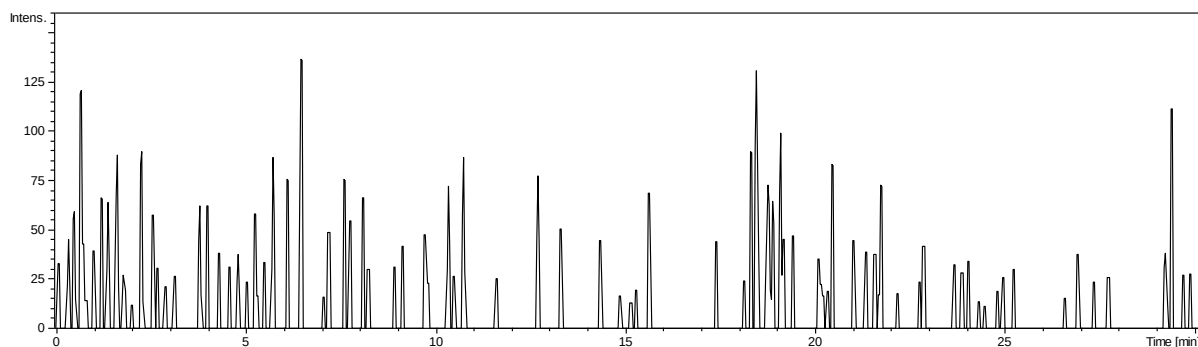


Figura 22 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 µg/mL (50:50 | H₂O:MeCN), pelo sistema de eluição isocrática (20% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.

A partir do estudo de desenvolvimento cromatográfico, verificou-se que as maiores porcentagens de MeCN na fase móvel, 60 e 80%, permitem eluição isocrática mais rápida quando comparada com a eluição com uma proporção menor desta fase orgânica. Além disso, a corrida com 80% de MeCN provocou uma distorção no pico e intensidade inferior quando comparada a 60%.

Diminuindo para 40% de MeCN, houve aumento no TR (2,2 min) e na intensidade do pico ($1,6 \times 10^6$), com nenhuma distorção quando comparada à proporção de 60% (1,9 min e $1,2 \times 10^6$).

Utilizando 30% de MeCN, observou-se a presença de dois picos. Já a eluição com 20% de MeCN mostrou que o analito não foi eluído.

Após concluir que 40% de MeCN forneceu o melhor cromatograma e que 30% não pode ser usado para a corrida analítica, uma outra eluição foi realizada com 35% com o objetivo de reduzir ao máximo a utilização de solvente orgânico (Figura 23).

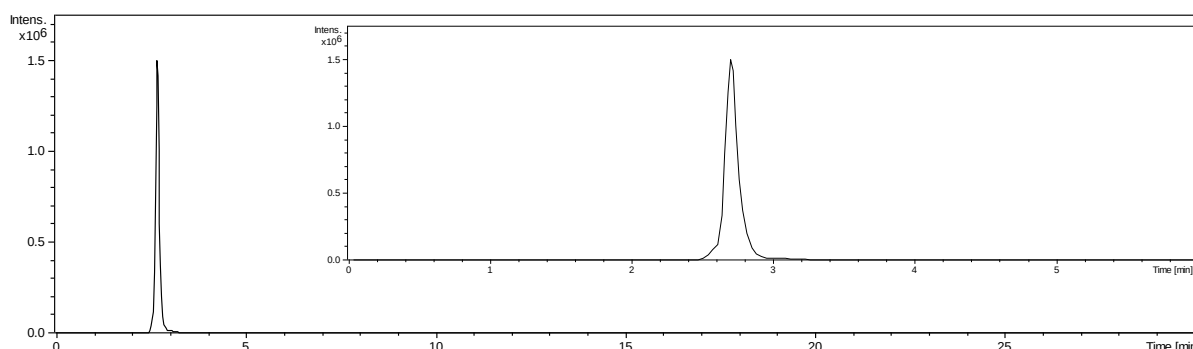


Figura 23 – Cromatograma do Trachylobano-360, 1 $\mu\text{g/mL}$ (50:50 | $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$), pelo sistema de eluição isocrática (35% de MeCN durante 30 minutos) em CLAE-EMn, utilizando coluna C_{18} (250 mm x 4,6 mm, 5,0 μm de tamanho de partícula) equipada com pré-coluna.

Considerando este resultado, observa-se que 35% de MeCN forneceu o pico no cromatograma com a mesma intensidade que quando utilizado 40 ou 60%. Além disso, o TR aumentou para 2,7 min.

5.3 Desenvolvimento do método de extração do T-360 em sangue total

Os percentuais de recuperação do T-360 em solução, influenciada pela força e tempo de centrifugação, com a utilização dos solventes MeCN, MeOH e CHCl_3 estão apresentados nas Figura 24, Figura 26 e Figura 28, respectivamente. As Figura 25, Figura 27 e Figura 29 mostram as recuperações do T-360 do sangue de camundongos utilizando MeCN, MeOH e CHCl_3 , respectivamente. Todos os solventes e forças e tempos de centrifugação aplicados forneceram melhores recuperações do T-360 em soluções quando comparadas às recuperações em sangue.

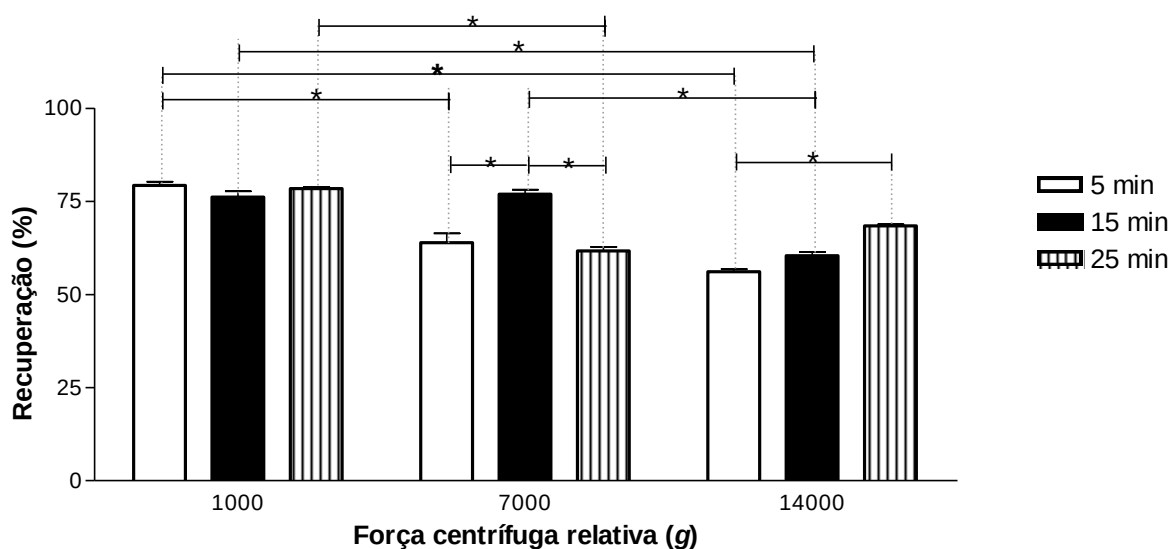


Figura 24 – Recuperação do Trachylobano-360 em solução, utilizando MeCN com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Os resultados obtidos para S-T360-MeCN (Figura 24) mostram que não houve diferença entre os tempos de centrifugação de 5 ($79,32\% \pm 1,65$), 15 ($76,16\% \pm 2,66$) e 25 min ($78,43\% \pm 0,76$), usando a força de centrifugação relativa de $1.000 \times g$. A centrifugação a $7.000 \times g$ por 15 min ($76,96\% \pm 2,10$) forneceu maior recuperação quando comparada a 5 min ($63,94\% \pm 4,32$) e 25 min ($61,66\% \pm 1,97$), não havendo diferenças entre os dois últimos tempos. A recuperação foi maior com centrifugação a $14.000 \times g$ por 25 min ($68,42\% \pm 0,80$) do que por 5 min ($56,13\% \pm 1,22$), não apresentando diferença quando comparada a 15 min ($60,38\% \pm 1,78$).

Contudo, comparando o mesmo tempo de centrifugação nas diferentes forças aplicadas, observou-se que 5 min produziu maior recuperação na centrifugação a $1.000 \times g$ que nas outras forças. O tempo de centrifugação de 15 min forneceu melhor recuperação utilizando as forças de centrifugação de 1.000 e $7.000 \times g$, com nenhuma diferença significativa entre elas. Já para o tempo de 25 min, a melhor recuperação foi obtida quando as amostras foram centrifugadas a $1.000 \times g$ quando comparadas a $7.000 \times g$, não havendo diferença significativa quando comparada a $14.000 \times g$.

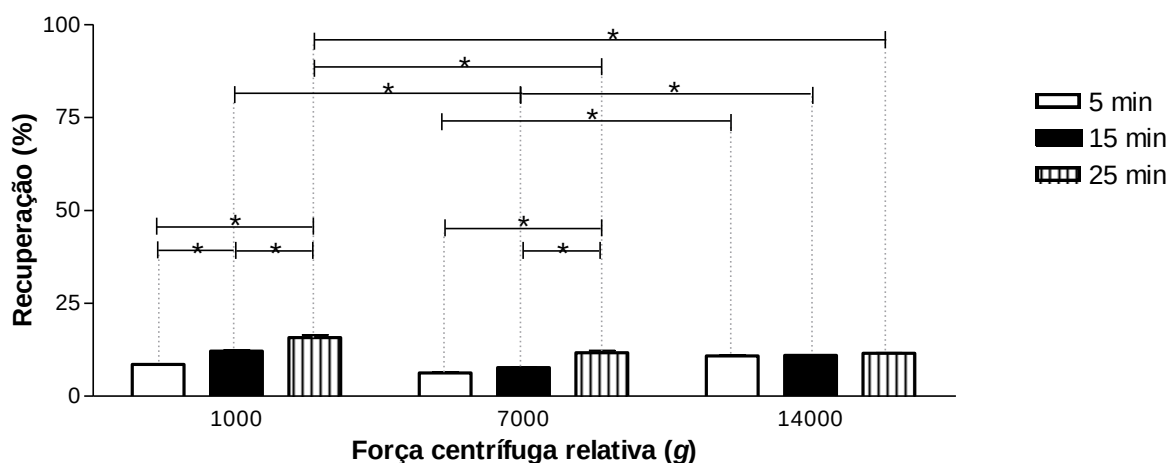


Figura 25 – Recuperação do Trachylobano-360 de sangue de camundongos, utilizando MeCN com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Os resultados obtidos para B-T360-MeCN (Figura 25) diferiram entre todos os tempos para a força de centrifugação de 1.000 x g, na qual 25 min forneceu maior recuperação (15,79% $\pm$ 1,20), comparado a 5 min (8,53% $\pm$ 0,10), e 15 min (12,10% $\pm$ 0,52). Do mesmo modo, 7.000 x g apresentou a melhor recuperação com 25 min (11,69% $\pm$ 1,05), comparado a 5 (6,26% $\pm$ 0,48) e 15 min (7,69% $\pm$ 0,10). No entanto, não houve diferenças entre os três tempos na força de centrifugação de 14.000 x g. Além disso, a força de centrifugação de 1.000 x g forneceu melhor recuperação que a de 7.000 x g com os tempos de 15 e 25 min. Ainda, a centrifugação de 1.000 x g por 25 min apresentou melhor recuperação que a de 14.000 x g no mesmo tempo. A centrifugação de 14.000 x g mostrou recuperação superior a de 7.000 x g com os tempos de 5 e 15 min.

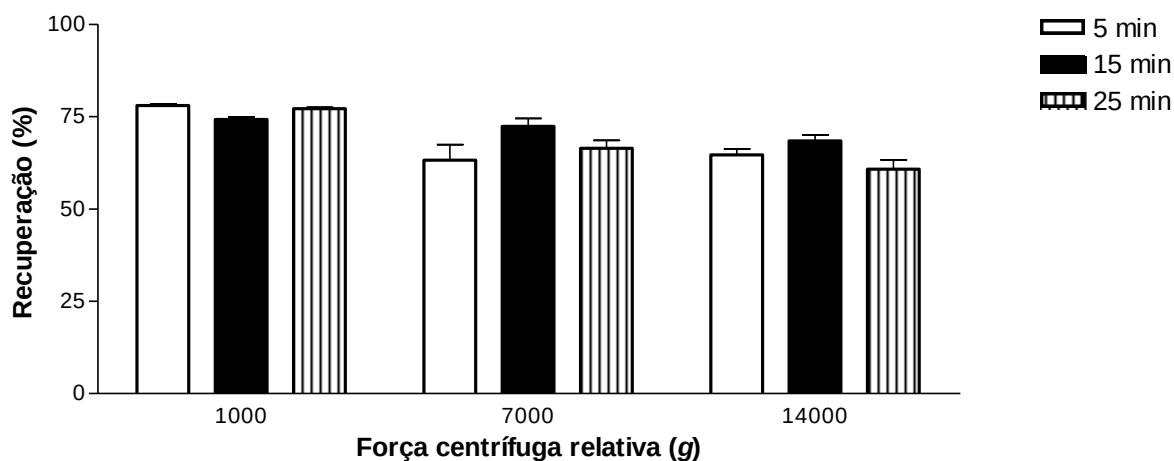


Figura 26 – Recuperação do Trachylobano-360 em solução, utilizando MeOH com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Os resultados obtidos para S-T360-MeOH (Figura 26) mostram que não houve diferenças nas extrações do T-360 comparando os três tempos e forças de centrifugação.

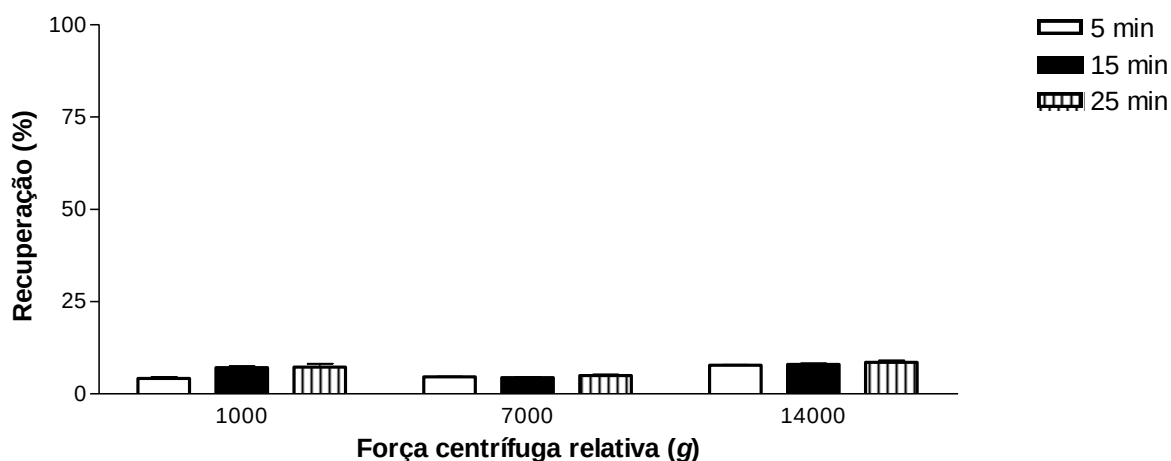


Figura 27 – Recuperação do Trachylobano-360 de sangue de camundongos, utilizando MeOH com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

De maneira semelhante, os resultados obtidos para B-T360-MeOH (Figura 27) mostraram que não houve diferença na extração do T-360 comparando os três tempos e forças de centrifugação.

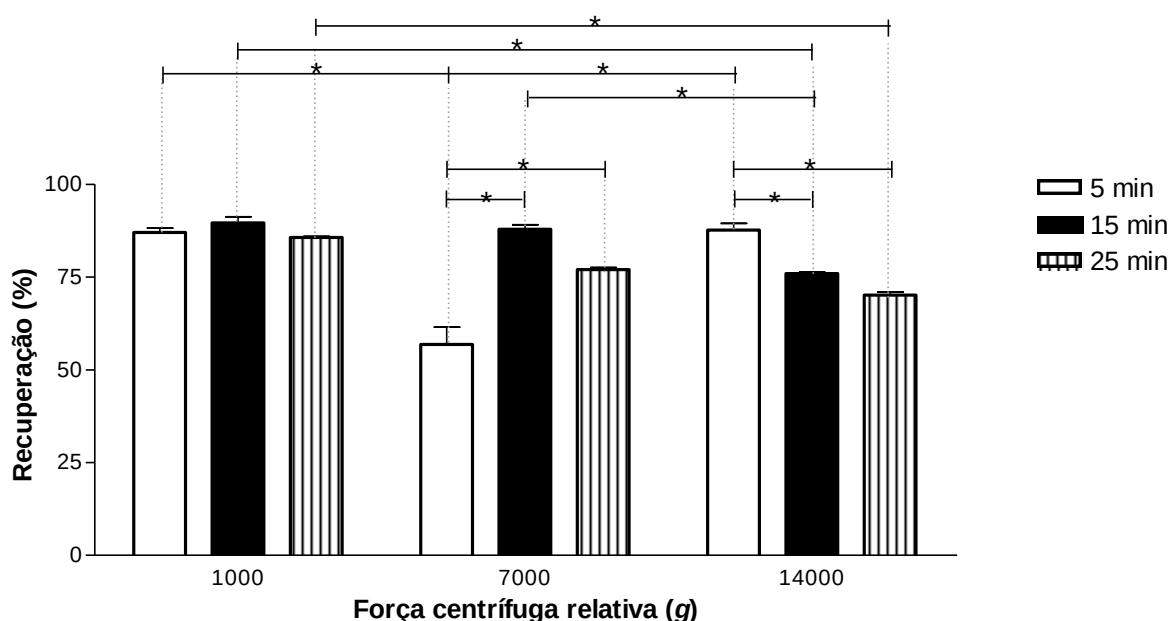


Figura 28 – Recuperação do Trachylobano-360 em solução, utilizando CHCl_3 com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

As porcentagens de recuperação para S-T360- CHCl_3 (Figura 28) mostram que usando a força de centrifugação de $1.000 \times g$, não houve diferença entre os tempos de 5 ($87,04\% \pm 1,95$), 15 ($89,60\% \pm 2,83$) e 25 min ($85,67\% \pm 0,51$). Com a força de $7.000 \times g$, o tempo de 15 min ($87,84\% \pm 2,14$) forneceu melhor recuperação quando comparado a 5 min ($56,84\% \pm 7,98$) que também mostrou menor recuperação que 25 min ($77,00\% \pm 0,93$). Utilizando a força de centrifugação de $14.000 \times g$, foi observado que o tempo de 5 min proporcionou melhor recuperação ($87,68\% \pm 3,02$) que 15 ($75,91\% \pm 1,01$) e 25 min ($70,16\% \pm 1,82$). Além disso, as forças de centrifugação de 1.000 e $14.000 \times g$ mostraram melhor recuperação quando comparada a $7.000 \times g$, utilizando o tempo de 5 min. No entanto, a força de centrifugação de $1.000 \times g$ resulta em melhor recuperação com os tempos de 15 e 25 min quando comparada a $14.000 \times g$, a qual forneceu menor recuperação que $7.000 \times g$ por 15 min.

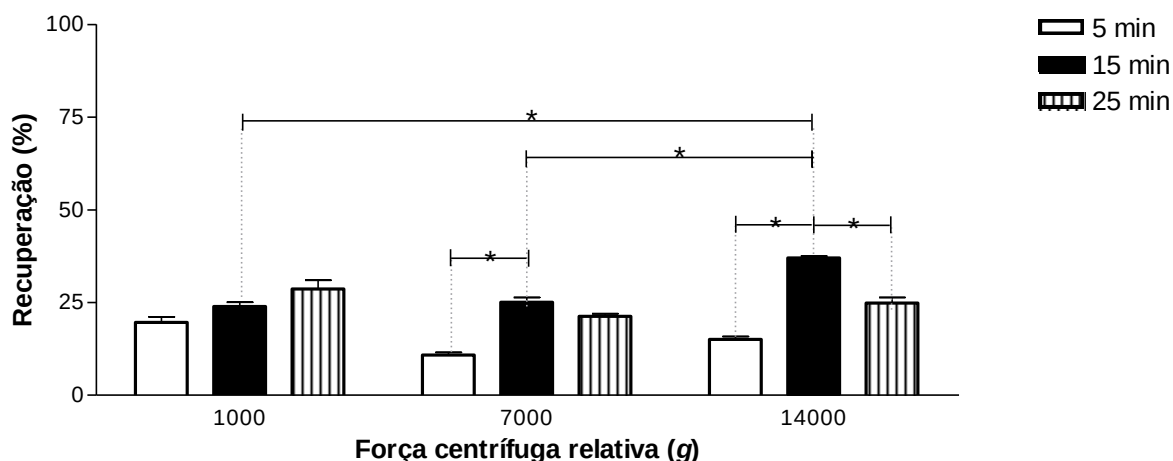


Figura 29 – Recuperação do Trachylobano-360 de sangue de camundongos, utilizando CHCl_3 com os diferentes tempos e forças de centrifugação. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

A análise dos resultados obtidos para B-T360- CHCl_3 (Figura 29) mostra que com a centrifugação de 1.000 x g não houve diferença na extração do T-360 quando comparados os tempos de 5 (19,61% $\pm$ 2,65), 15 (23,94% $\pm$ 1,95) e 25 min (28,67% $\pm$ 4,08). A centrifugação de 7.000 x g forneceu maior recuperação com o tempo de 15 min (25,06% $\pm$ 2,20) comparado a 5 min (10,85% $\pm$ 1,20), enquanto que não apresentou diferença em relação a 25 min (21,25% $\pm$ 1,32). Utilizando a força de 14.000 x g, maior recuperação foi observada com 15 min (37,02% $\pm$ 1,26) comparado a 5 (15,03% $\pm$ 1,36) e 25 min (24,84% $\pm$ 3,39). Além disso, foi observada maior recuperação com a força de centrifugação de 14.000 x g for 15 min quando comparado ao mesmo tempo de centrifugação a 1.000 e 7.000 x g.

As percentagens de recuperação do T-360 do sangue, para todas as forças e tempos de centrifugação foram agrupadas de acordo com o tipo de solvente utilizado. Os resultados estão apresentados na Figura 30.

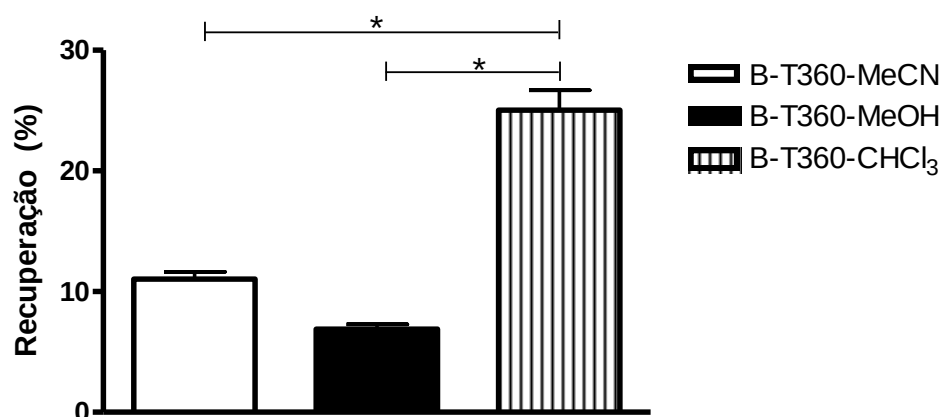


Figura 30 – Recuperação do Trachylobano-360 do sangue de camundongos, em relação aos solventes utilizados. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Os resultados demonstram que a extração com CHCl_3 , agrupando todos os tempos e forças de centrifugação, forneceu maior percentagem de recuperação do T-360 ($25,03\% \pm 1,66$) quando comparado a MeCN ($11,04\% \pm 0,61$) e MeOH ($6,88\% \pm 0,40$).

Diante de todos esses dados, a melhor recuperação do T-360 do sangue foi obtida utilizando o solvente CHCl_3 e centrifugação a $14.000 \times g$ por 15 min ($37,02\% \pm 1,26$).

l) Otimização do método de extração

Com base nos resultados obtidos, passos adicionais foram implementados na extração para aperfeiçoá-la. Os resultados estão apresentados na Figura 31.

Como pode ser visto, a recuperação do analito na amostra B-T360- CHCl_3 -2x-A ($49,47\% \pm 3,20$) diferiu significativamente em relação às amostras B-T360- CHCl_3 -2x ($39,91\% \pm 0,67$) e B-T360- CHCl_3 ($37,02\% \pm 1,26$), enquanto que não houve diferença entre as duas últimas.

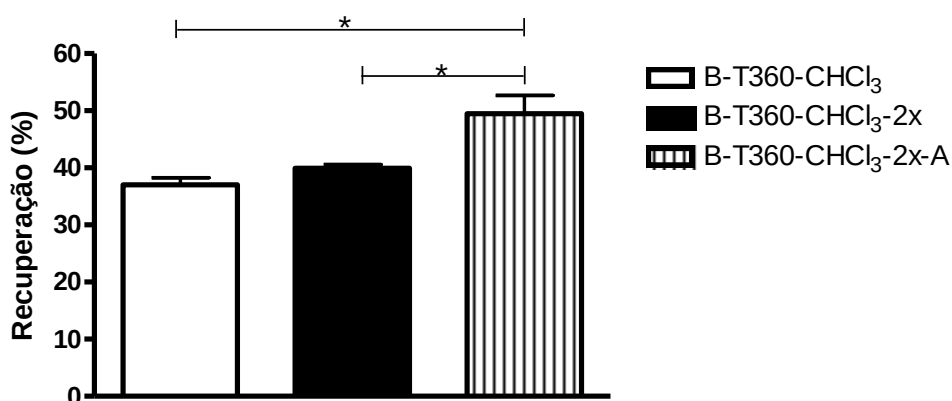


Figura 31 – Otimização da recuperação do Trachylobano-360 do sangue de camundongos utilizando CHCl₃, com centrifugação a 14.000 x *g* por 15 min. * *p* < 0,05 quando comparados por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

II) Recuperação, efeito de matriz e eficiência do processo de extração

Os resultados da análise da recuperação, do efeito de matriz e eficiência do processo de extração do T-360 estão apresentados na Figura 32.

Como visto nas figuras 32 e 33A, houve aumento significativo na recuperação do T-360 na amostra B-T360-CHCl₃-2x-A (49,47% ± 3,20), em comparação com as amostras B-T360-CHCl₃ (37,02% ± 1,26) e B-T360-CHCl₃-2x (39,91% ± 0,67). Entretanto, a recuperação para as duas últimas amostras não diferiram entre si.

A repetição do processo de extração e a acidificação do meio foram essenciais em aumentar o processo de extração pela diminuição do efeito de matriz como mostrado na figura 32B, onde as amostras B-T360-CHCl₃-2x-A (-37,60% ± 5,51) e B-T360-CHCl₃ (-51,23% ± 1,66) diferiram significativamente a respeito do efeito de matriz.

Com relação à eficiência do processo de extração (Figura 33C), observou-se que, após otimização com duas extrações e acidificação, houve aumento de 14,19% quando comparada à do método inicial, sendo de 18,05% ± 0,62 para B-T360-CHCl₃ e 32,24% ± 2,10 para B-T360-2x-A.

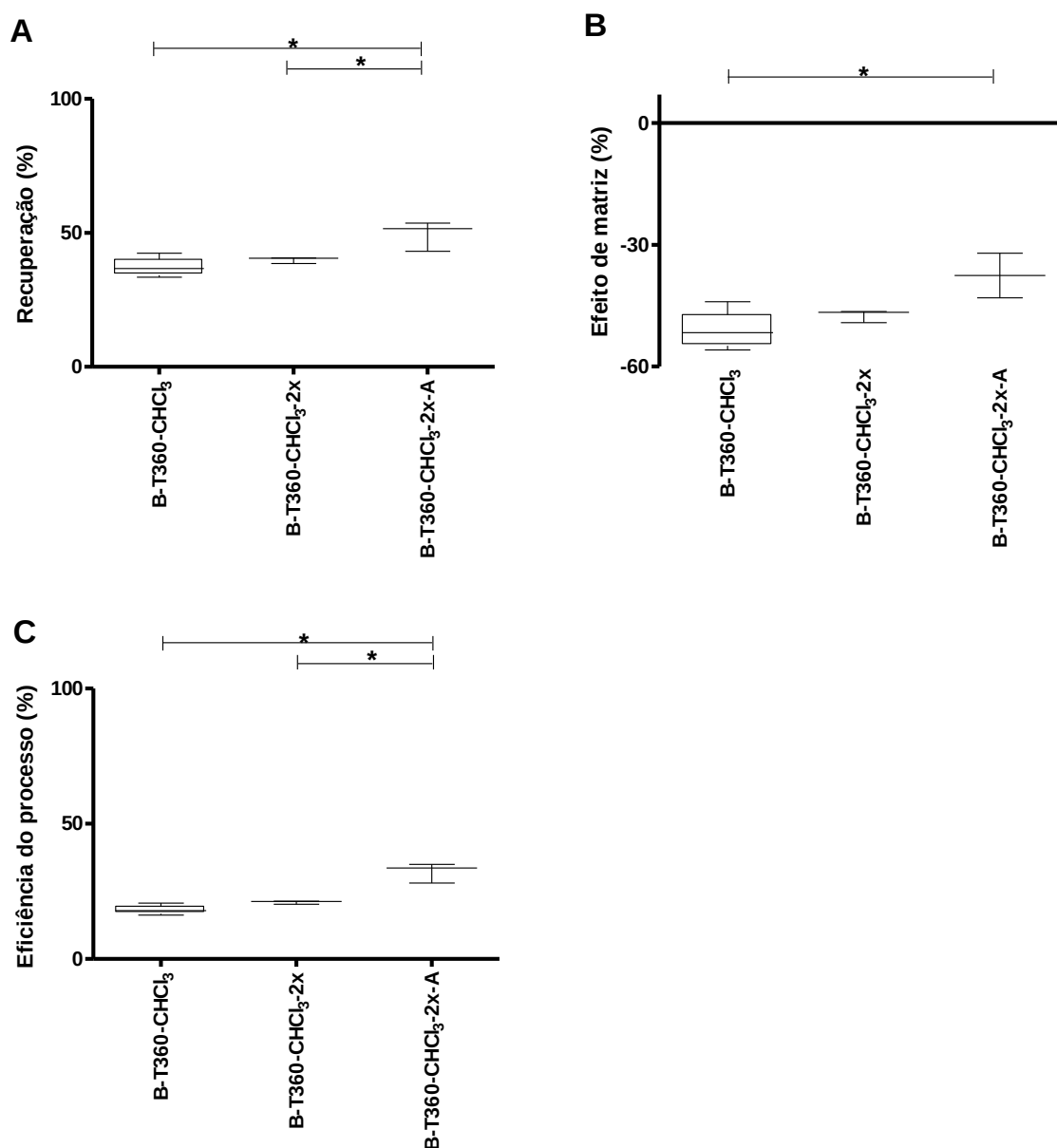


Figura 32 – Estudo estatístico comparativo da recuperação (A), efeito de matriz (B) e eficiência do processo de extração (C) para o Trachylobano-360 em sangue de camundongos. * $p < 0,05$ quando comparado por ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

5.4 Validação do método para determinação do T-360 em sangue total

Para validação do método proposto para determinação do T-360 em sangue total foi obtido inicialmente o espectro de massas para Riparina I, usada como PI que está representado na Figura 33.

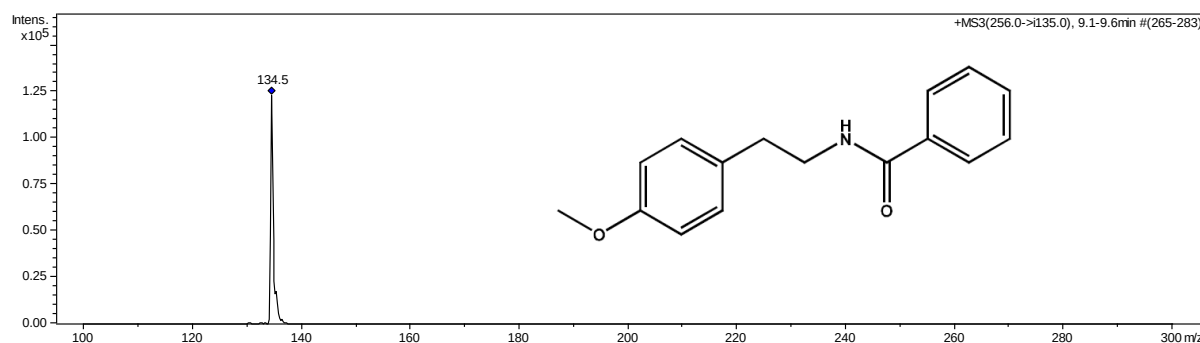


Figura 33 – Espectro de massas, estrutura química e a fragmentação monitorada da Riparina I (PI).

l) Seletividade/especificidade

A seletividade/especificidade do método foi demonstrada pela comparação dos cromatogramas da amostra B-B (Figura 34), B-T360 (Figura 35), B-PI (Figura 36) e B-T360-PI (Figura 37). Os tempos de retenção do T-360 e PI foram 2,63 e 9,0 min, respectivamente. Como apresentado na Figura 34, nenhum pico interferente com o T-360 ou PI foi encontrado na amostra B-B.

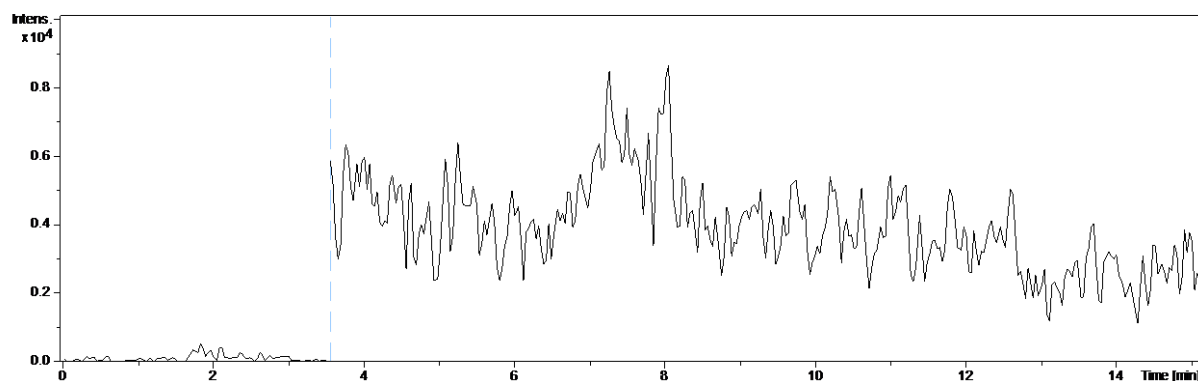


Figura 34 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra branco (B-B).

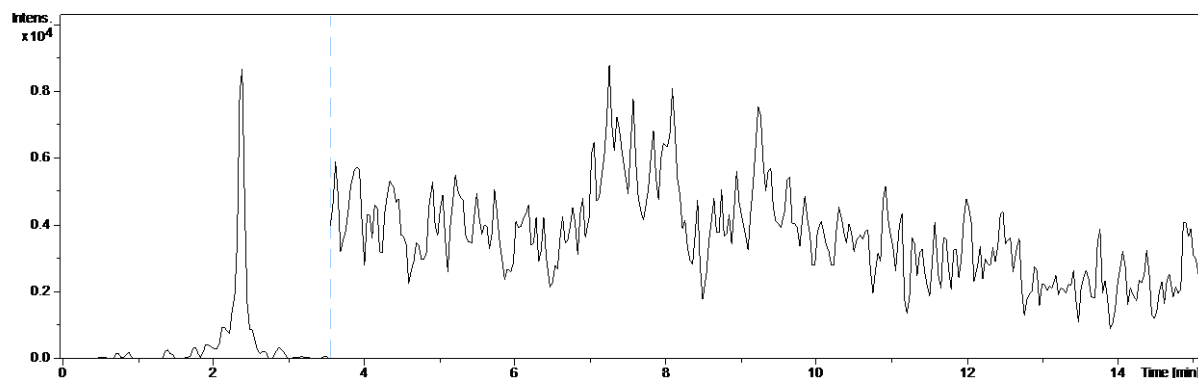


Figura 35 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra de sangue contaminado com Trachylobano-360 (B-T360).

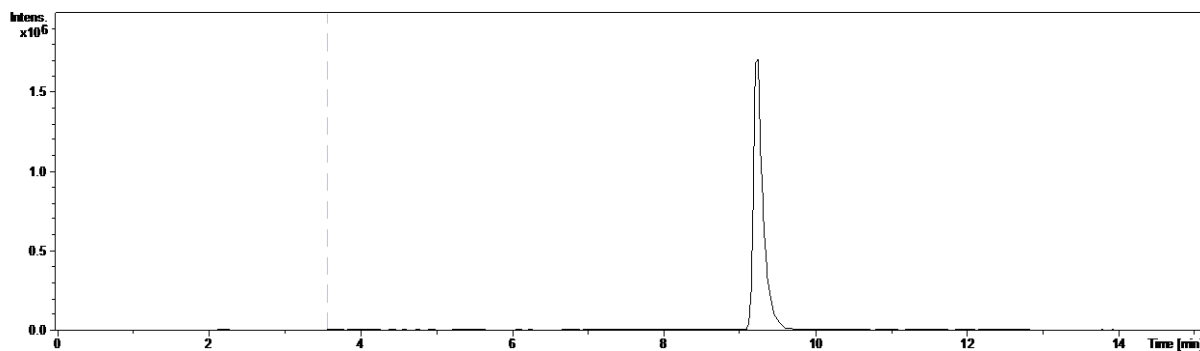


Figura 36 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra de sangue contaminado com Riparina I (B-PI).

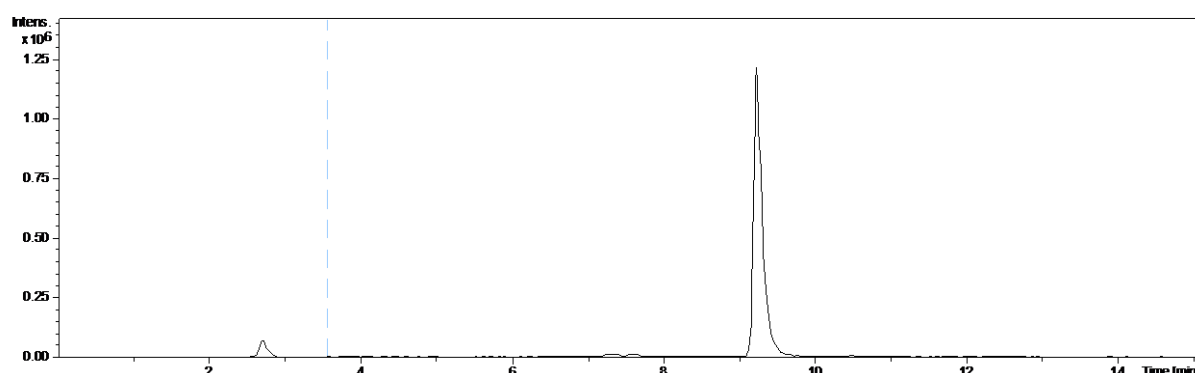


Figura 37 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra de sangue contaminado com Trachylobano-360 e PI (B-T360-PI).

II) Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através de seis concentrações do T-360 diferentes (100, 500, 950, 1.500 e 2.000 ng/mL) em três dias distintos, plotando-se a razão das áreas dos picos do T-360 pelas do PI em função das concentrações do T-360 (Figura 38 e Tabela 9).

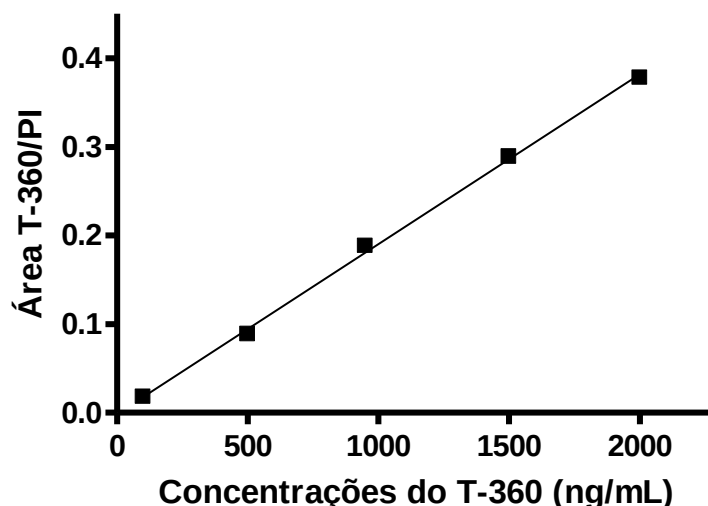


Figura 38 – Linearidade representativa do método analítico de extração do Trachylobano-360 de sangue de camundongos. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média.

Tabela 9 – Equações das regressões lineares e coeficientes de determinação obtidos através do método analítico de extração do Trachylobano-360 em três dias distintos.

y=a + bx	Experimento (dia)		
	1	2	3
a	-0,008765	-0,006898	-0,001320
b	0,000204	0,000199	0,000192
R ²	0,9988	0,9977	0,9957

Esses resultados mostram que o método analítico fornece respostas lineares com coeficientes de determinação $R^2 > 0,99$ para o intervalo de concentração avaliado.

III) Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Analisando amostras de sangue contaminadas com concentrações decrescentes do T-360, observa-se que na concentração de 100 ng/mL do analito foi possível obter precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis. Porém, na concentração de 80 ng/mL não foi mais possível obter análises precisas e exatas, pois o pico referente ao T-360 se encontra próximo ao ruído (Figura 39). Para o LD,

foi possível detectar o T-360 no sangue de camundongos a partir da concentração de 50 ng/mL.

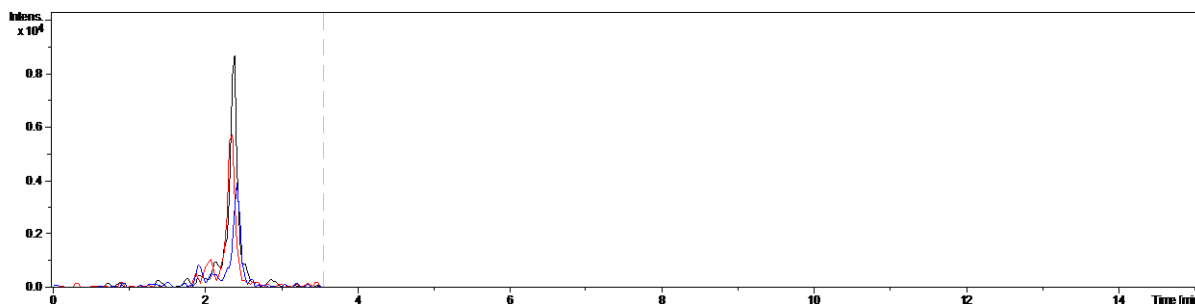


Figura 39 – Cromatograma de íons selecionados (CIS) representativo da amostra de sangue contaminado com Trachylobano-360 nas concentrações de 50 ng/mL (cromatograma azul), 80 ng/mL (cromatograma vermelho) e 100 ng/mL (cromatograma preto).

IV) Exatidão

Para o método analítico de extração do T-360, foi avaliada a exatidão intracorrida e intercorrida, utilizando três concentrações (100, 950 e 2.000 ng/mL) em cinco replicatas e os dados estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 – Exatidão intra e intercorrida do método analítico de extração do Trachylobano-360, em sangue de camundongos, em concentrações baixa, média e alta (n = 5).

Concentração (ng/mL)	Exatidão intracorrida (%)			Exatidão intercorrida (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
100	104,3 ± 3,0	98,5 ± 6,0	97,2 ± 4,5	100,0 ± 5,4
950	102,2 ± 1,3	100,9 ± 2,2	103,4 ± 1,9	102,2 ± 2,0
2.000	103,4 ± 0,5	100,7 ± 3,8	97,1 ± 3,7	100,4 ± 3,9

Dados estão apresentados como média ± desvio padrão da média.

V) Precisão

Da mesma maneira, para o método analítico de extração do T-360, foi avaliada a precisão intracorrida e intercorrida, utilizando três concentrações (100, 950 e 2.000 ng/mL) em cinco replicatas e os dados estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11 – Precisão intra e intercorrida do método analítico de extração do Trachylobano-360, em sangue de camundongos, em concentrações baixa, média e alta (n = 5).

Concentração (ng/mL)	Precisão intracorrida (%)			Precisão intercorrida (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
100	2,90	6,14	4,60	5,38
950	1,27	2,22	1,82	1,97
2.000	0,53	3,76	3,79	3,89

Dados estão apresentados como desvio padrão relativo.

5.5 Aplicação do método para determinação do T-360 em sangue total

As concentrações sanguíneas do T-360 (25 mg/kg) administrado pela via e.v., obtidas por CLAE-EM_n, podem ser observadas na Figura 40.

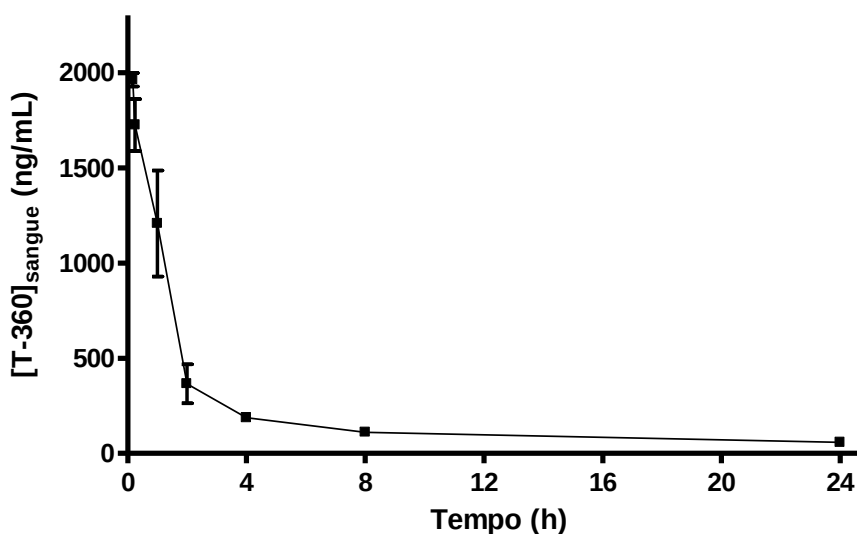


Figura 40 – Perfil da concentração do T-360 no sangue (n = 6) em função do tempo após administração da dose de 25 mg/kg, pela via e.v.. Os valores estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da média.

A partir do perfil da concentração do T-360 no sangue em função do tempo, foram calculados os parâmetros farmacocinéticos utilizando o modelo não-compartimentado (Tabela 12).

Tabela 12 – Parâmetros farmacocinéticos do T-360 após administração de 25 mg/kg e.v. (n = 6).

Parâmetros	Unidades	Valores
$C_{\max}$	$\mu\text{g/mL}$	$321,34 \pm 52,33$
ASC_{0-t}	$\mu\text{g/mL.h}$	$30,09 \pm 5,71$
$t_{1/2}$	min	$3,89 \pm 0,11$
CL_s	mL/h/kg	$830,97 \pm 173,77$
V_d	L/kg	$0,08 \pm 0,01$
K_e	h^{-1}	$10,68 \pm 0,30$

Dados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média.

A concentração sanguínea máxima ($C_{\max}$), no caso da via e.v. é a concentração sanguínea inicial imediatamente após sua administração (C_0). Com isso, extrapolando para o tempo zero a curva do logaritmo da concentração em função do tempo do T-360, obteve-se uma $C_{\max}$ de $321,34 \pm 52,33 \mu\text{g/mL}$.

A exposição total ao fármaco (ASC_{0-t}), obtido pela regra trapezoidal, foi de $30,09 \pm 5,71 \mu\text{g/mL.h}$. O volume de distribuição do T-360 foi calculado como sendo $0,08 \pm 0,01 \text{ L/kg}$. O *clearance* sistêmico (CL_s), ou depuração, foi de $830,97 \pm 173,77 \text{ mL/h/kg}$. Correlacionando juntamente com V_d e CL_s , o $t_{1/2}$ foi obtido, sendo este de $3,89 \pm 0,11 \text{ min}$. A constante de eliminação (K_e), obtida pela razão entre $\ln 2$ e o $t_{1/2}$, foi $10,68 \pm 0,30$ por hora.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A natureza tem sido fonte de inúmeros produtos com diversas atividades farmacológicas importantes. No entanto, apesar de naturais, vários produtos obtidos de plantas apresentam potencial toxicidade, dentre eles podemos citar apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; ZHANG et al., 2012).

Terpenos compõem uma classe de metabólitos secundários que possui atividades farmacológicas bem documentadas, porém outros estudos mostram sua toxicidade (MENDANHA et al., 2013). Diante disso, é evidente a necessidade da avaliação toxicológica das substâncias farmacologicamente ativas oriundas da natureza.

A exposição a fármacos pode resultar em toxicidade crônica, quando utilizada por um longo período, ou aguda, quando uma enorme quantidade da substância é capaz de provocar efeitos tóxicos imediatos que podem ser moderados ou graves, dependendo da natureza da substância. A toxicidade aguda é definida como efeito indesejável ocorrido imediatamente, ou em um curto intervalo de tempo, após a administração de uma única ou múltipla dose de tal substância dentro de 24 h (CHINEDU; AROME; AMEH, 2013).

Estudos de toxicidade aguda estabelecem a relação entre os efeitos adversos apresentados, incluindo a mortalidade, e as doses utilizadas. Segundo a ANVISA, não são necessários estudos para determinação da DL_{50} , porém por ser um parâmetro utilizado para mensurar a toxicidade aguda de novos fármacos, a agência regulamentadora nacional sugere métodos alternativos para a estimativa da dose letal envolvendo um número menor de animais, tais como os preconizados nos guias da OECD (BRASIL, 2013).

Os resultados obtidos para o T-360 mostram que este diterpeno apresentou baixa toxicidade após exposição aguda. Apenas poucas alterações no SNC e no SNA foram observadas utilizando a dose de 300 mg/kg (i.p.). Porém, para a dose de 50 mg/kg, via e.v., não se verificou nenhum destes efeitos (Tabela 6).

Um passo importante para o desenvolvimento de fármacos é a caracterização de sua segurança e eficácia para identificar aqueles que possuem um apropriado balanço eficácia-segurança para uma dada indicação farmacológica. Nesse sentido, o índice terapêutico (IT), que é tipicamente considerado como a razão entre a DL_{50} e

a DE₅₀ (dose que produz 50% do efeito farmacológico), é um importante parâmetro utilizado para avaliar esse balanço (MULLER; MILTON, 2012). A FDA define um baixo IT como sendo inferior a dois. Quanto maior o IT, mais ampla a margem de segurança do fármaco, resultando em maior perfil de segurança e menor a possibilidade de uma sobredose que é associada com um estreito IT (HA et al., 2014). Para o T-360, a dose de 300 mg/kg (i.p.) não produziu morte em nenhum dos animais. Ainda, Pita et al. (2012) mostraram que a dose de 12,5 mg/kg (i.p.) do T-360 inibiu 45,60% do crescimento tumoral do Sarcoma 180. Então, considerando que a DL₅₀, para a via i.p., possa ser maior que 300 mg/kg e que a DE₅₀ seja próxima de 12,5 mg/kg, podemos estimar que o T-360 apresenta um IT maior que 20.

A fim de avaliar mutagenicidade, como lesões cromossômicas, que podem ocorrer devido à exposição a substâncias químicas, o ensaio do micronúcleo em roedores é ampla e frequentemente utilizado (KASAMOTO; MASUMORI; HAYASHI, 2013), possuindo uma boa correlação entre a indução de aberrações cromossômicas e a indução de micronúcleo (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE JR, 1984). Esse ensaio foi desenvolvido na década de 70, utilizando células eritrocitárias medulares de camundongos (HEDDLE, 1973; SCHMID, 1975) e, posteriormente, o uso de sangue periférico ao invés da medula óssea foi iniciado (MACGREGOR; WEHR; GOULD, 1980). Existem várias vantagens associadas ao uso do sangue periférico, como por exemplo, uma pequena quantidade de sangue é suficiente para as análises e, dessa maneira, não é necessário o sacrifício dos animais, bem como amostras podem ser periodicamente obtidas do mesmo animal. Por outro lado, a remoção de eritrócitos micronucleados pelo baço de animais de muitas espécies, como homem, macaco e rato (SCHLEGEL; MACGREGOR, 1984), é uma importante desvantagem para a utilização do sangue periférico, o que não ocorre com camundongos (SILVA et al., 2011; KASAMOTO; MASUMORI; HAYASHI, 2013).

O ensaio do micronúcleo se baseia no princípio de que eritrócitos maduros não contém DNA. Contudo, se aberrações cromossômicas ocorrem em células jovens da linhagem eritrocitária, fragmentos de cromossomos podem ficar retidos nas células maduras. Na divisão celular, fragmentos dos cromossomos danificados (efeito clastogênico) ou cromossomos segregados anormalmente (efeito aneugênico) não acompanham a migração do material genético para os polos opostos da célula, não fazendo parte do núcleo principal. Durante a maturação, o

núcleo é expelido dos eritrócitos maduros, enquanto o núcleo secundário, oriundo dos fragmentos, fica retido como um micronúcleo (KHAN; KESARI; KUMAR, 2013).

A genotoxicidade de drogas antineoplásicas pode resultar em tumores secundários e citotoxicidade em células não tumorais. Um exemplo dessas drogas é a ciclofosfamida, um agente alquilante usado clinicamente para o tratamento de doenças malignas em geral (DELARMELINA; DUTRA; BATITUCCI, 2014). Como sua mutagenicidade e clastogenicidade é amplamente conhecida utiliza-se esta substância para realizar ensaios de micronúcleo como droga padrão (MORALES-RAMÍREZ; VALLARINO-KELLY; CRUZ-VALLEJO, 2014). Corroborando com esses dados, os resultados obtidos mostram que a ciclofosfamida induziu o aumento de eritrócitos micronucleados no sangue periférico. No entanto, os tratamentos com as doses do T-360 não aumentaram a frequência de eritrócitos micronucleados quando comparada ao grupo controle. Dessa forma, o T-360 se mostra, mais uma vez, como uma droga de baixa toxicidade, o que contribui para sua aplicabilidade farmacológica.

Apesar dos produtos naturais serem bastante estudados do ponto de vista farmacodinâmico, perfis farmacocinéticos destes compostos são escassos (NTIE-KANG et al., 2013).

Para avaliar o perfil farmacocinético do T-360, foi necessário, inicialmente, realizar o desenvolvimento de um método analítico para este diterpeno em solução e em sangue de camundongo, após sua extração, utilizando CLAE-EMn. Posteriormente, esse método foi validado, possibilitando assim a administração da droga nos animais e análise de sua concentração em função do tempo, bem como a de outros parâmetros farmacocinéticos.

O desenvolvimento de um método analítico implica na necessidade de garantir a qualidade dos resultados obtidos, assim como sua eficiência (ELOY et al., 2012). Para o presente estudo com o T-360, para o qual não existem relatos de farmacocinética na literatura, foi utilizada a técnica CLAE acoplada à EM. A técnica CLAE ganhou destaque na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas (ZAIDAN et al., 2014). A espectrometria de massas (EM) é uma técnica na qual íons gasosos da amostra são gerados e separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z) (VESSECCHI et al., 2008). De maneira geral, existem três processos químicos principais pelos quais os íons gasosos de uma amostra podem ser gerados em espectrometria de massas: remoção/adição de um

elétron, resultando em íons radicais (M^+ ou $M^\cdot$); protonação/desprotonação (reações ácido-base), formando moléculas protonadas ($[M+H]^+$)/desprotonadas ($[M-H]^-$); e cationização/anionização, que resultam em moléculas cationizadas (por ex., $[M+Na]^+$)/anionizadas (por ex., $[M+Cl]^-$) (CROTTI et al., 2006). Uma maneira para caracterizar compostos presentes em uma amostra é utilizando a EM com ionização por ESI (ESI-EM) que é capaz de detectar substâncias químicas mesmo em baixas concentrações (VASCONCELOS; SILVA JR; LOPES, 2012). Os resultados do desenvolvimento do método analítico para análise do T-360 mostraram que esse diterpeno sofre desprotonação $[M - H]^-$ quando ionizado por ESI em modo negativo, originando o íon molecular 359 m/z e que, por ser um ácido, como esperado, é melhor ionizado em meio básico.

Dentre os vários métodos desenvolvidos para se promover a ativação de íons visando sua fragmentação, a dissociação induzida por colisão (*Collision Induced Dissociation*, CID) é o método de ativação mais empregado em análises por EMn, podendo ser considerado como universal devido à sua fácil implementação. A ativação colisional baseia-se na colisão de um íon precursor selecionado com moléculas de um gás inerte, gás de colisão, geralmente argônio ou hélio. As colisões fazem com que a energia cinética do gás seja transferida ao íon precursor, de maneira que a energia translacional do íon seja convertida em energia interna, aumentando assim a sua tendência para se fragmentar (VESSECCHI et al., 2008). Utilizando esta metodologia de fragmentação, a quebra do T-360 origina dois íons moleculares 299 m/z, devido à perda da acetoxila, e 317 m/z, após a perda de um grupo C_3H_6 .

Posterior à determinação da melhor forma de análise do T-360 no EMn, foi determinada a melhor condição que proporcionasse a melhor resolução do pico no CIS com menor tempo de análise.

Após a escolha da coluna apropriada, isto é fase estacionária (tipo e dimensões), e dos eluentes, incluindo os modificadores do pH, o próximo passo no desenvolvimento do método envolve a seleção do modo de eluição (gradiente ou isocrática) que forneça uma separação adequada dentro de um tempo de análise aceitável (SCHELLINGER; CARR, 2006). Em termos de velocidade de separação, a eluição gradiente é geralmente considerada uma técnica inerentemente mais lenta que a isocrática, já que a coluna deve ser equilibrada com, pelo menos, 10 volumes do eluente inicial antes de uma retenção confiável ser obtida na próxima corrida.

Além disso, a presença de picos fantasmas (WILLIAMS, 2004), ruído da linha de base (BOELEN et al., 2004), dentre outros, associados com eluição gradiente, podem levar a perda da exatidão da área e altura do pico, impedindo a quantificação do analito (SCHELLINGER; CARR, 2006). Sendo assim, foi desenvolvido um método isocrático para análise do T-360 em CLAE-EMn, utilizando H₂O:MeCN (65:35). Essa proporção forneceu o pico no cromatograma como maior intensidade, bem como aumento o tempo de retenção, e, portanto, foi a escolhida para análise do T-360.

Durante o desenvolvimento de um método bioanalítico em matrizes complexas, como por exemplo o sangue, efeito de matriz pode ser encontrado (VU et al., 2014). Efeito de matriz é definido como o efeito em um método analítico causado por todos os componentes presentes na amostra, exceto a molécula específica a ser quantificada (GONZÁLEZ-ANTUÑA et al., 2013). Várias classes de moléculas, tais como fosfolipídios, mono, di e triacilgliceróis, colesterol, ésteres de colesterol e proteínas são os responsáveis por causarem significativo efeito de matriz (ISMAIEL et al., 2010). A ocorrência dessas interações é relevante para análises por CLAE-EMn, particularmente quando ESI é empregada (NIESSEN; MANINI; ANDREOLI, 2006; MALIK; BLASCO; PICÓ, 2010; TRUFELLI et al., 2011; GONZÁLEZ-ANTUÑA et al., 2013). Utilizando CLAE-ESI-EMn, efeito de matriz é considerado como um aumento ou diminuição na resposta do analito no detector, devido à coeluição dos constituintes da matriz. Isso pode ser identificado e estimado por comparação da resposta obtida na análise de uma solução padrão e àquela da amostra biológica (NIESSEN; MANINI; ANDREOLI, 2006; TRUFELLI et al., 2011). De acordo com Dos Santos et al. (2011), variáveis como solvente extrator e força e tempo de centrifugação são importantes na extração de analitos de uma matriz complexa como o sangue. Levando em consideração esses aspectos, após avaliar três diferentes solventes, tempos e forças de centrifugação, a utilização do solvente CHCl₃, com a centrifugação de 14.000 x *g* por 15 min, foi responsável por fornecer maior recuperação do T-360 da matriz sangue (37,02%), sendo estimado o efeito de matriz (-51,23%) na análise por CLAE-EMn.

Vários processos foram propostos para explicar como componentes da matriz podem interferir com a ionização pela fonte ESI e com o transporte do analito através do espectrômetro de massas (TAYLOR, 2005). Os mais descritos na literatura são a possível competição entre os compostos da matriz e o analito,

alterando a viscosidade da solução e modificando as propriedades físicas das gotículas (TAYLOR, 2005) , além de aspectos instrumentais, tais como o mecanismo de ionização (CAPPIELLO et al., 2008), tipo de fonte ESI (GANGL et al., 2001; HUANG; LI; COOKS, 2011) ou até a geometria da fonte (GHOSH; SHINDE; CHAKRABORTY, 2012).

No entanto, muitas abordagens têm sido desenvolvidas para minimizar esses efeito das matrizes, tais como a otimização do processo de extração da amostra e utilização de substâncias que favorecem a ionização da molécula (ISMAIEL et al., 2010). Para o T-360, o método desenvolvido foi otimizado realizando a repetição do método, além da adição de CH_2O_2 . Isso fez com que o efeito de matriz fosse diminuído de -51,23% para -37,60%, aumentando a recuperação do T-360 em sangue de 37,02% para 49,47%. Esses resultados corroboram outros estudos que mostram a influência do pH no efeito de matriz e, conseqüentemente, na recuperação de analitos (DOS SANTOS et al., 2010; PADRÓ et al., 2013) .

A eficiência do processo de extração, uma combinação do efeito de matriz e da recuperação, está relacionada a alterações devido a interferências durante a preparação e análise das amostras, como a ionização e a transmissão dos íons. Uma baixa eficiência pode resultar de três situações: efeito isolado, isto é, um aumento no efeito de matriz ou pequena recuperação do analito; sinergismo devido a um elevado efeito de matriz e baixa recuperação; ou antagonismo resultante de uma pequena recuperação parcialmente compensada pela diminuição no efeito de matriz (MARCHI et al., 2010). Nossos resultados mostram que a otimização do método foi responsável pelo aumento da eficiência do processo de 18,05% para 32,24%, por aumentar a recuperação, de 37,02% para 49,47%, e diminuir o efeito de matriz, de -51,23% para -37,60%.

Já é bem descrito na literatura que apenas um pequeno número de analitos não são influenciados por matrizes biológicas e que o efeito de matriz não precisa, necessariamente, ser reduzido ou eliminado. No entanto, ele precisa ser identificado e quantificado (MARCHI et al., 2010). Foi estabelecido um limite de aceitação para variação do efeito de matriz de 15% para seis análises individuais (VISWANATHAN et al., 2007), como observado em nossos resultados.

Para a validação do método bioanalítico desenvolvido é necessária a utilização de um padrão interno (PI), que é definido como um composto que possui características físico-químicas semelhantes ao analito de interesse, mas que, ao

mesmo tempo, gera uma resposta que pode ser distinguida da resposta do analito (BRONSEMA; BISCHOFF; VAN DE MERBEL, 2012). Porém, estudos têm demonstrado a utilização de PI de classes químicas distintas à do analito (RUZILAWATI et al., 2007; MEI et al., 2008; OTAEGUI et al., 2008; ZHU et al., 2008). Quantidades iguais do PI são adicionadas em todas as amostras a serem analisadas, e, devido à similaridade entre o analito e o PI, é esperado que a razão da resposta dos dois compostos não seja alterada, por sofrerem a mesma perda devido à ineficiência na extração, digestão ou ionização. Com isso, ambos serão analisados e a razão do sinal obtido é calculado. Dessa forma, o PI corrige as variações na resposta do analito causadas pela variabilidade do processo analítico (BRONSEMA; BISCHOFF; VAN DE MERBEL, 2012). Inicialmente, foram testados flavonoides, diterpenos e duas alcanoides, Riparina I e III, para determinar qual composto seria utilizado como PI no processo de validação do método bioanalítico para determinação do T-360 em sangue total. No entanto, o método cromatográfico capaz de analisar o T-360 juntamente com o PI, mesmo com ajustes, evidenciou a Riparina I como substância de escolha.

A validação do método bioanalítico consistiu em avaliar a seletividade/especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (FDA, 2001; BRASIL, 2003). Diante dos resultados obtidos para o T-360, pode-se afirmar que o método utilizado é seletivo e adequado para a validação, já que verifica-se pelo cromatograma que não existem picos interferentes próximos aos tempos de retenção do T-360 (2,63 min) e do PI (9,0 min).

A curva de calibração corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. Geralmente, a regressão linear, o modelo matemático mais simples, é adotada, e os critérios para aceitação da curva de calibração seguem normas estabelecidas por guias de validação publicados por agências reguladoras oficiais (CASSIANO et al., 2009). Dentre esses critérios, o mínimo aceitável do coeficiente de determinação (R^2) deve ser = 0,99 (BRASIL, 2003). Os resultados obtidos mostram que os coeficientes de determinação linear, obtidos nos três dias

de análise, apresentaram valores superiores a 0,99 os quais estão dentro dos parâmetros aceitáveis para a validação do método. Dessa forma, os resultados de linearidade de resposta encontrados servem para a determinação da concentração do T-360 em amostras de sangue de camundongos. Para isso, basta que se tenha a razão da área do T-360 pela do PI no cromatograma, junto com a equação da reta obtida.

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ARAUJO, 2009).

A exatidão de um método bioanalítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro da concentração do analito. A precisão, ou reprodutibilidade, de um método bioanalítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea (FDA, 2001; BRASIL, 2003). Os valores atingidos de exatidão intracorrída e intercorrída, no intervalo de 85 a 115%, e os de precisão, menores que 15%, torna-os aceitáveis. Com isso, o método bioanalítico de extração do T-360 é exato e reprodutível.

Após desenvolver e validar o método de bioanálise do T-360 em sangue de camundongos, o próximo passo foi aplicar este método para o estudo farmacocinético do T-360.

Há anos sabe-se que um composto químico não será um fármaco utilizado na farmacoterapia, não importando o quão ativo ou específico ele seja, senão for administrado adequadamente para sofrer absorção, se distribua para seus alvos no organismo, seja metabolizado em uma via que não remova sua atividade instantaneamente e eliminado de maneira adequada. Assim, a avaliação das propriedades farmacodinâmicas de uma substância química *in vivo*, precisa ser complementada pelo conhecimento de suas propriedades farmacocinéticas para uma aplicabilidade farmacológica ideal (HODGSON, 2001).

O método CLAE-EMn foi aplicado com sucesso para investigar a farmacocinética do T-360 após a administração e.v. (25 mg/kg).

Imediatamente após a sua administração, o T-360 apresentou $C_{\max}$ elevado, pois toda a droga é injetada na própria corrente sanguínea. Observando o gráfico da concentração em função do tempo, pode-se observar que a concentração sanguínea cai rapidamente até duas horas. A partir de então, sua distribuição/eliminação ocorre de maneira mais lenta, atingindo, depois das 8h, concentrações abaixo do LQ do método validado.

O $t_{1/2}$ de um fármaco é o tempo necessário para que sua concentração sanguínea diminua 50%. Este parâmetro está intimamente relacionado com o CL_s e o V_d . Quando o CL_s aumenta, o $t_{1/2}$ diminui. Porém, quando o V_d aumenta, o $t_{1/2}$ também aumenta (FAN; DE LANNOY, 2014). Um significativo resultado deste estudo é que o T-360 possui um $t_{1/2}$ muito curto. Isso pode ser devido à rápida distribuição tecidual acompanhada da rápida biotransformação e/ou acúmulo e excreção renal (WU et al., 2011), já que apresentou elevado CL_s . Como descrito por Evans (2004), o menor $t_{1/2}$ que permite uma única administração diária em um determinado esquema posológico é de 8 h. Assim, para um possível esquema posológico do T-360 é necessária uma frequência de utilização maior que uma dose/dia.

Se uma droga está confinada no plasma, seu V_d será próximo ao volume plasmático. No entanto, se o V_d for maior que o volume plasmático, isto significa que o composto químico se difundiu do plasma para outros tecidos (FAN; DE LANNOY, 2014). Camundongos Swiss machos possuem, em média, um volume sanguíneo total de 7,14 mL para cada 100 g de peso corpóreo (SLUITER et al., 1984). Admitindo-se que os animais utilizados nesses experimentos apresentaram uma média de peso corporal de 30 g, então eles possuíam 2,14 mL de sangue. Ainda, considerando que o hematócrito da mesma espécie e gênero utilizada é 45% (BARONE; FREZZATTI; SILVEIRA, 2014), significa que esses animais possuem apenas 0,96 mL de volume plasmático. Com isso, como o V_d do T-360 (0,08 L/kg) é maior que o volume plasmático dos camundongos, sugere-se distribuição extravascular. Esse resultado corrobora dados da literatura que mostram que compostos com características lipofílicas, como o T-360, conseguem atravessar com mais facilidade as biomembranas (ZHAO; CHEN, 2013).

A constante de eliminação (K_e) define a relação entre o CL e o V_d , e é dependente de ambos, sendo a medida da taxa pela qual o volume está sendo depurado. A significância da relação entre K_e , CL e V_d é importante, pois sugere que, mesmo que o CL_s não seja alterado, já que é uma capacidade fisiológica intrínseca

do corpo eliminar fármacos, se o V_d aumenta, a K_e diminui (BROWN, 2013). Ainda, esta constante se relaciona com o $t_{1/2}$ através da razão do logaritmo natural de dois ($\ln 2$) e este tempo (LARSEN et al., 2010). Diante disto, os resultados apresentados corroboram com Larsen et al. (2010), já que o elevado CL_s para o T-360 diminuiu bastante seu $t_{1/2}$, elevando sua K_e .

Considerando todos os dados apresentados é possível sugerir que o T-360 continua sendo uma molécula promissora do ponto de vista farmacológico, uma vez que mostrou baixa toxicidade em estudos de toxicidade pré-clínica aguda. Entretanto, estudos de doses repetidas são necessários para avaliar possíveis efeitos decorrentes do acúmulo da substância nos animais. Ainda, os resultados obtidos no estudo farmacocinético impulsionam a continuidade da investigação de outros parâmetros após administração do T-360 por outras vias, dentre eles a biodisponibilidade, bem como o estudo de metabólitos possivelmente responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade antitumoral.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados com o diterpeno trachylobano-360, obtido de *Xylopia langsdorffiana*, pode-se concluir que:

- No ensaio de toxicidade pré-clínica aguda, o diterpeno T-360 apresentou baixa toxicidade na dose de 50 mg/kg (e.v.) e 300 mg/kg (i.p.), e alta toxicidade nos animais submetidos ao tratamento com 300 mg/kg, e.v., do T-360;
- O T-360 não apresentou genotoxicidade no modelo experimental avaliado;
- O método CLAE-EM_n desenvolvido para análise do T-360 em solução consistiu em cromatografia em fase reversa (C18), utilizando H₂O:MeCN (65:35), aditivando a fase aquosa com 0,1% de NH₄OH. No EM_n, foi utilizada a ionização por ESI em modo negativo e a fragmentação 359 → 299 m/z;
- O melhor método de extração do T-360 do sangue de camundongos Swiss foi alcançado com o uso do CHCl₃ como solvente extrator e centrifugação a 14.000 x *g* por 15 min. Esse método foi otimizado com a acidificação da matriz e repetição do processamento (extração com solvente e centrifugação);
- O método de extração do T-360 foi validado, utilizando a Riparina I como PI, sendo este seletivo, linear no intervalo de concentrações avaliado, exato e preciso.
- O método validado foi aplicado com sucesso no estudo de farmacocinética do T-360;
- O T-360 apresentou os parâmetros farmacocinéticos: C_{max} de 321,34 µg/mL, t_{1/2} de 3,89 min, CL_s de 830,97 mL/h/kg e V_d 0,08 L/kg demonstrando distribuição para os tecidos.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADARAMOYE, O. A.; POPOOLA, B. O.; FAROMBI, E. O. Effects of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae) fruit methanol extract on gamma-radiation-induced oxidative stress in brain of adult male Wistar rats. **Acta Biol Hung**, v. 61, n. 3, p. 250-261, 2010.
- ADARAMOYE, O. A.; ADEDARA, I. A.; POPOOLA, B.; FAROMBI, E. O. Extract of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae) protects against gamma-radiation induced testicular damage in Wistar rats. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 21, n. 4, p. 295-313, 2010.
- ADARAMOYE, O. A.; SARKAR, J.; SINGH, N.; MEENA, S.; CHANGKIJA, B.; YADAV, P. P.; KANOJIYA, S.; SINHA, S. Antiproliferative action of *Xylopia aethiopica* fruit extract on human cervical cancer cells. **Phytother Res**, v. 25, n. 10, p. 1558-1563, 2011.
- ADEFEGHA, S. A.; OBOH, G. Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes and sodium nitroprusside-induced lipid peroxidation in rat pancreas by water extractable phytochemicals from some tropical spices. **Pharm Biol**, v. 50, n. 7, p. 857-865, 2012.
- ADIGÜZEL, A.; GÜLLÜCE, M.; SENGÜL, M.; ÖGÜTCÜ, H.; SAHIN, F.; KARAMAN, I. Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) Extract. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, n., p. 155-160, 2005.
- ALAANI, H.; ALASHKAR, I.; KARABET, F. Development and validation of stability-indicating RP-HPLC method for the determination of Levocabastine HCl in bulk drug and in ophthalmic suspensions. **Arabian Journal of Chemistry**, v., n. 0, p., 2013.
- ALMEIDA, A. P. M. G.; KOMMERS, G. D.; NOGUEIRA, A. P. A.; JÚNIOR, L. G. B.; MARQUES, B. M. F. P.; LEMOS, R. A. A. Avaliação do efeito tóxico de *Leucaena leucocephala* (Leg. Mimosoideae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n., p. 190-194, 2006.
- ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 73, n. 1–2, p. 53-60, 2000.
- ALMEIDA, R.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; BARBOSA-FILHO, J.; AGRA, M.; ARAÚJO, C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, n., p. 72-76, 1999.
- ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224-2234, 2009.
- ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction**: Wiley, 2003 (Analytical Techniques in the Sciences (AnTs) *)

ASEKUN, O. T.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopia aethiopica* from Nigeria. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 368-370, 2004.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n., p. 992-1000, 2010.

BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of Several New Phenylethylamides of Substituted Benzoic Acids. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 332-334, 1990.

BARONE, J. M.; FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P. F. Effects of N-acetyl-L-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. **Toxicon**, v. 79, n. 0, p. 1-10, 2014.

BIRKETT, D. J. **Pharmacokinetics made easy**. Sidney, Austrália, 2002

BLANCHARD, J. Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. **J. Chromatogr-Biomed**, v. 226, n., p. 455-460, 1981.

BLOCK, S.; STEVIGNY, C.; DE PAUW-GILLET, M. C.; DE HOFFMANN, E.; LLABRES, G.; ADJAKIDJE, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. ent-trachyloban-3beta-ol, a new cytotoxic diterpene from *Croton zambesicus*. **Planta Med**, v. 68, n. 7, p. 647-649, 2002.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; VAN MEERVELT, L.; ROZENBERG, R.; HABIB JIWAN, J. L.; LLABRES, G.; DE PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 8, p. 1165-1171, 2004.

BLOCK, S.; GERKENS, P.; PEULEN, O.; JOLOIS, O.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; DE PAUW-GILLET, M. C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. **Anticancer Res**, v. 25, n. 1A, p. 363-368, 2005.

BOELEN, H. F. M.; DIJKSTRA, R. J.; EILERS, P. H. C.; FITZPATRICK, F.; WESTERHUIS, J. A. New background correction method for liquid chromatography with diode array detection, infrared spectroscopic detection and Raman spectroscopic detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1057, n. 1-2, p. 21-30, 2004.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P. H.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1269-1275, 2003.

BRAGA, F. C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J. A.; DE OLIVEIRA, A. B. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 447-452, 2000.

BRASIL. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**: secondary title. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. **Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012**: secondary title. Brasília, DF, 2012, 12 p.

BRASIL. **GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS**: secondary title, 2013, 48 p.

BRONSEMA, K. J.; BISCHOFF, R.; VAN DE MERBEL, N. C. Internal standards in the quantitative determination of protein biopharmaceuticals using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 893–894, n. 0, p. 1-14, 2012.

BROWN, D. The fish tank model of first-order elimination: An effective pharmacokinetic teaching tool. **Currents in Pharmacy Teaching and Learning**, v. 5, n. 5, p. 402-409, 2013.

BRUMMITT, R. K. **Vascular Plant - Families and Genera**. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, 1992

BRYANT, M. S.; KORFMACHER, W. A.; WANG, S.; NARDO, C.; NOMEIR, A. A.; LIN, C.-C. Pharmacokinetic screening for the selection of new drug discovery candidates is greatly enhanced through the use of liquid chromatography–atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 777, n. 1, p. 61-66, 1997.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, v. 36, n., p. 357-364, 2006.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITO BELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, Supplement 1, n. 0, p. S58-S65, 2000.

CAPPIELLO, A.; FAMIGLINI, G.; PALMA, P.; PIERINI, E.; TERMOPOLI, V.; TRUFELLI, H. Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 80, n. 23, p. 9343-9348, 2008.

CARVALHO, M. D. S. E. Plantas tóxicas: importância para a pecuária: revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**. ISSN 1983-7682; v. 5, n. 2 (2012), v., n., p., 2012.

CASAGRANDE, C.; MEROTTI, G. Studies in aporphine alkaloids. 3. Isolation and synthesis of alkaloids of *Xylopiia brasiliensis* St. Hil. **Farmaco Sci**, v. 25, n. 11, p. 799-808, 1970.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n., p. 1021-1030, 2009.

CASTELLO BRANCO, M. V.; ANAZETTI, M. C.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; DINIZ, M. F.; FRUNGILLO, L.; HAUN, M.; MELO, P. S. Diterpenes from *Xylopia langsdorffiana* inhibit cell growth and induce differentiation in human leukemia cells. **Z Naturforsch C**, v. 64, n. 9-10, p. 650-656, 2009.

CHANG, F.-R.; YANG, P.-Y.; LIN, J.-Y.; LEE, K.-H.; WU, Y.-C. Bioactive Kaurane Diterpenoids from *Annona glabra*. **J Nat Prod**, v. 61, n. 4, p. 437-439, 1998.

CHEN, X.-F.; WU, H.-T.; TAN, G.-G.; ZHU, Z.-Y.; CHAI, Y.-F. Liquid chromatography coupled with time-of-flight and ion trap mass spectrometry for qualitative analysis of herbal medicines. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 1, n. 4, p. 235-245, 2011.

CHINEDU, E.; AROME, D.; AMEH, F. S. A new method for determining acute toxicity in animal models. v. 20, n. 3, p. 224-226, 2013.

CHOUMESSI, A. T.; DANIEL, M.; CHASSAING, S.; TRUCHET, I.; PENLAP, V. B.; PIEME, A. C.; ASONGANYI, T.; DUCOMMUN, B.; VALETTE, A. Characterization of the antiproliferative activity of *Xylopia aethiopica*. **Cell Div**, v. 7, n. 1, p. 8, 2012a.

CHOUMESSI, A. T.; LOUREIRO, R.; SILVA, A. M.; MOREIRA, A. C.; PIEME, A. C.; TAZOACHA, A.; OLIVEIRA, P. J.; PENLAP, V. B. Toxicity evaluation of some traditional African spices on breast cancer cells and isolated rat hepatic mitochondria. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 11, p. 4199-4208, 2012b.

CLARKE, B. L. Introductory Remarks. **Analytical Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 943-943, 1947.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**: Editorada Unicamp, 2006

COLMAN-SAZARBITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N. R.; GU, Z. M.; NG, J. H.; SMITH, D. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica*. **J Nat Prod**, v. 57, n. 4, p. 486-493, 1994.

COLMAN-SAZARBITORIA, T.; GU, Z. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Two new bioactive monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica*. **J Nat Prod**, v. 57, n. 12, p. 1661-1669, 1994.

COLMAN-SAZARBITORIA, T.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J. L. Venezenin: a new bioactive Annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopia aromatica*. **J Nat Prod**, v. 58, n. 4, p. 532-539, 1995.

CORRÊA, M. P.; DE AZEREDO PENNA, L.; INSTITUTO BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO, F. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas: H-L**: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984 (Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas)

COSTA E SILVA, A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 1, n., p. 167-179, 2010.

COUVREUR, T. L. P.; PIRIE, M. D.; CHATROU, L. W.; SAUNDERS, R. M. K.; SU, Y. C. F.; RICHARDSON, J. E.; ERKENS, R. H. J. Early evolutionary history of the flowering plant family Annonaceae: steady diversification and boreotropical geodispersal. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 4, p. 664-680, 2011.

CROMMENTUYN, K. M. L.; ROSING, H.; HILLEBRAND, M. J. X.; HUITEMA, A. D. R.; BEIJNEN, J. H. Simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitors atazanavir and tipranavir in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 804, n. 2, p. 359-367, 2004.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n., p. 287-292, 2006.

DA SILVA, T. B.; MENEZES, L. R.; SAMPAIO, M. F.; MEIRA, C. S.; GUIMARAES, E. T.; SOARES, M. B.; PRATA, A. P.; NOGUEIRA, P. C.; COSTA, E. V. Chemical composition and anti-Trypanosoma cruzi activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). **Nat Prod Commun**, v. 8, n. 3, p. 403-406, 2013.

DAMS, R.; HUESTIS, M. A.; LAMBERT, W. E.; MURPHY, C. M. Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 11, p. 1290-1294, 2003.

DANSIRIKUL, C.; CHOI, M.; B. DUFFULL, S. Estimation of pharmacokinetic parameters from non-compartmental variables using Microsoft Excel®. **Computers in Biology and Medicine**, v. 35, n. 5, p. 389-403, 2005.

DAVIS, E.; CROTEAU, R. Cyclization Enzymes in the Biosynthesis of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. In: Leeper, F. e Vederas, J. (Ed.). **Biosynthesis**: Springer Berlin Heidelberg, 2000. v.209, p.53-95. (Topics in Current Chemistry)

DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**: Wiley, 2007

DE JONGE, M. E.; VAN DAM, S. M.; HILLEBRAND, M. J. X.; ROSING, H.; HUITEMA, A. D. R.; RODENHUIS, S.; BEIJNEN, J. H. Simultaneous quantification of cyclophosphamide, 4-hydroxycyclophosphamide, N,N',N"-triethylenethiophosphoramidate (thiotepa) and N,N',N"-triethylenephosphoramidate (tepa) in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 3, p. 262-271, 2004.

DE MELO, A. C.; COTA, B. B.; DE OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 40-45, 2001.

DELARMELINA, J. M.; DUTRA, J. C. V.; BATITUCCI, M. D. C. P. Antimutagenic activity of ipriflavone against the DNA-damage induced by cyclophosphamide in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, n. 0, p. 140-146, 2014.

DEMMA, J.; ENGIDAWORK, E.; HELLMAN, B. Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 122, n. 1, p. 136-142, 2009.

DOS SANTOS, S. G.; QUEIROGA, K. F.; DE OLIVEIRA, A. M. F.; TAVARES, J. F.; GUTIERREZ, S. J. C.; DINIZ, M. D. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA SILVA, M. S. Blood matrix effects for male and female Wistar rats, in simultaneous HPLC-UV determination of riparin I and III from *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae). **Talanta**, v. 86, n. 0, p. 233-240, 2011.

DOS SANTOS, W. P. C.; HATJE, V.; SANTIL, D. D. S.; FERNANDES, A. P.; KORN, M. G. A.; DE SOUZA, M. M. Optimization of a centrifugation and ultrasound-assisted procedure for the determination of trace and major elements in marine invertebrates by ICP OES. **Microchem. J.**, v. 95, n. 2, p. 169-173, 2010.

ELOY, J. D. O.; OLIVEIRA, E. C. V. D.; MAROTTA-OLIVEIRA, S. S. A.; SARAIVA, J.; MARCHETTI, J. M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Química Nova**, v. 35, n., p. 1036-1040, 2012.

EVANS, G. **A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2004

FALL, D.; BADIANE, M.; BA, D.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic effect of Senegalese Annonaceae used in traditional medicine. **Dakar Med**, v. 48, n. 2, p. 112-116, 2003.

FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 93-120, 2014.

FAULKNER, D. F.; LEBBY, V.; WATERMAN, P. G. Further Diterpenes from Stem Bark of *Xylopi*a aethiopica1. **Planta Med**, v. 51, n. 4, p. 354-355, 1985.

FDA, U. S. F. A. D. A. **Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation**,: secondary title, 2001.

FECHINE, I. M.; LIMA, M. A.; NAVARRO, V. R.; CUNHA, E. V. L. D.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n., p. 17-19, 2002.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FERRAZ, R. P.; CARDOSO, G. M.; DA SILVA, T. B.; FONTES, J. E.; PRATA, A. P.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chem**, v. 141, n. 1, p. 196-200, 2013.

FERREIRA, F. A. P. B. **Avaliação das concentrações plasmáticas e da farmacocinética da cefuroxima administrada profilaticamente em pacientes submetidos à revascularização do miocárdio**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. 153 p.

FISCHMAN, L. A.; SKORUPA, L. A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. The water extract of *Coleus barbatus* Benth decreases gastric secretion in rats. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n., p. 141-143, 1991.

FLEISCHER, T. C.; MENSAH, M. L.; MENSAH, A. Y.; KOMLAGA, G.; GBEDEMA, S. Y.; SKALTSA, H. Antimicrobial activity of essential oils of *Xylopia aethiopica*. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 5, n. 4, p. 391-393, 2008.

FLORIANI, G.; GASPARETTO, J. C.; PONTAROLO, R.; GONÇALVES, A. G. Development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. **Forensic Science International**, v. 235, n. 0, p. 32-39, 2014.

FOSTER, D. M.; VICINI, P. Chapter 8 - Non-Compartmental and Compartmental Approaches to Pharmacokinetic Data Analysis. In: Atkinson, A. J., Huang, S.-M., *et al* (Ed.). **Principles of Clinical Pharmacology (Third Edition)**: Academic Press, 2012, p.97-116.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; CHARLES, B.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Volatile Constituents of *Xylopia nitida* Leaf Oil1. **Planta Med**, v. 59, n. 2, p. 185-186, 1993.

GANGL, E. T.; ANNAN, M.; SPOONER, N.; VOUIROS, P. Reduction of Signal Suppression Effects in ESI-MS Using a Nanosplitting Device. **Anal. Chem.**, v. 73, n. 23, p. 5635-5644, 2001.

GARAVITO, G.; RINCON, J.; ARTEAGA, L.; HATA, Y.; BOURDY, G.; GIMENEZ, A.; PINZON, R.; DEHARO, E. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v. 107, n. 3, p. 460-462, 2006.

GHOSH, C.; SHINDE, C. P.; CHAKRABORTY, B. S. Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. **J. Chromatogr. B**, v. 893-894, n. 0, p. 193-200, 2012.

GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Determination of fungicide residues in baby food by liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. **Food Chem**, v. 135, n. 2, p. 780-786, 2012.

GONZAGA, A. D.; RIBEIRO, J. D. A.; VIEIRA, M. D. F.; ALÉCIO, M. R. Toxidez de Três Concentrações de Erva-de-rato (*Palicourea marcgravii* A. St.-Hill) e Manipueira (*Manihot esculenta* Crantz) em Pulgão Verde dos Citros (*Aphis spiraecola* Patch) em Casa de Vegetação. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n., p. 55-56, 2007.

GONZÁLEZ-ANTUÑA, A.; DOMÍNGUEZ-ROMERO, J. C.; GARCÍA-REYES, J. F.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; CENTINEO, G.; ALONSO, J. I. G.; MOLINA-DÍAZ, A. Overcoming Matrix Effects in Electrospray: Quantitation of β -Agonists in Complex Matrices by Isotope Dilution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Using Singly ^{13}C -Labeled Analogues. **J. Chromatogr. A**, v., n. 0, p., 2013.

GRAIKOU, K.; ALIGIANNIS, N.; SKALTSOUNIS, A. L.; CHINOU, I.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; LITAUDON, M. New diterpenes from *Croton insularis*. **J Nat Prod**, v. 67, n. 4, p. 685-688, 2004.

GRANELL, S.; ANDREU, I.; MARTI, D.; CAVE, A.; ARAGON, R.; ESTORNELL, E.; CORTES, D.; ZAFRA-POLO, M. C. Bisbenzyltetrahydroisoquinolines, a new class of inhibitors of the mitochondrial respiratory chain complex I. **Planta Med**, v. 70, n. 3, p. 266-268, 2004.

HA, S.-W.; SIKORSKI, J. A.; WEITZMANN, M. N.; BECK JR, G. R. Bio-active engineered 50 nm silica nanoparticles with bone anabolic activity: Therapeutic index, effective concentration, and cytotoxicity profile in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 3, p. 354-364, 2014.

HAGER, J. W.; LE BLANC, J. C. Y. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, n. 1, p. 3-9, 2003.

HAMADA, S.; NAKAJIMA, K.; SERIKAWA, T.; HAYASHI, M. The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 273-275, 2003.

HAN, S.-Y.; LIANG, C.; ZOU, K.; QIAO, J.-Q.; LIAN, H.-Z.; GE, X. Influence of variation in mobile phase pH and solute pKa with the change of organic modifier fraction on QSRRs of hydrophobicity and RP-HPLC retention of weakly acidic compounds. **Talanta**, v. 101, n. 0, p. 64-70, 2012.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JR, M. Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 127, n. 2, p. 129-137, 1984.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 187-190, 1973.

HOCAYEN, P. A. S.; CAMPOS, L. A.; POCHAPSKI, M. T.; Malfatti, C. R. M. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Insula**, v. 41, n., p. 23-31, 2012.

HODGSON, J. ADMET turning chemicals into drugs. **Nature Biotechnology**, v. 19, n., p. 722-726, 2001.

HUANG, G.; LI, G.; COOKS, R. G. Induced Nanoelectrospray Ionization for Matrix-Tolerant and High-Throughput Mass Spectrometry. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 50, n. 42, p. 9907-9910, 2011.

HUBER, L. Validation of analytical methods: Review and strategy. **LC-GC Europe**, v. 11, n. 2, p. 96-105, 1998.

IGWE, S. A.; AFONNE, J. C.; GHASI, S. I. Ocular dynamics of systemic aqueous extracts of *Xylopi aethiopica* (African guinea pepper) seeds on visually active volunteers. **J Ethnopharmacol**, v. 86, n. 2-3, p. 139-142, 2003.

ISMAIEL, O. A.; ZHANG, T.; JENKINS, R. G.; KARNES, H. T. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, v. 878, n. 31, p. 3303-3316, 2010.

JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; BIENZLE, U.; GUPTA, M. P.; EICH, E. In vitro antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. **Trop Med Int Health**, v. 4, n. 9, p. 611-615, 1999.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993. 777 p. (Biblioteca universitária. Série 3.a. Ciências puras)

KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L.; FLEISCHER, T. C.; SKALTSA, H. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopi aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 26, p. 8094-8098, 2004.

KASAMOTO, S.; MASUMORI, S.; HAYASHI, M. In Vivo Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow and Peripheral Blood. In: Dhawan, A. e Bajpayee, M. (Ed.). **Genotoxicity Assessment**: Humana Press, 2013. v.1044, p.179-189. (Methods in Molecular Biology)

KAZAKEVICH, Y. V.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**: Wiley, 2007

KERNS, E. H.; DI, L. Chapter 19 - Pharmacokinetics. In: (Ed.). **Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods**. San Diego: Academic Press, 2008, p.228-241.

KHAN, P. K.; KESARI, V. P.; KUMAR, A. Mouse micronucleus assay as a surrogate to assess genotoxic potential of arsenic at its human reference dose. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 993-997, 2013.

KHAZIR, J.; MIR, B. A.; PILCHER, L.; RILEY, D. L. Role of plants in anticancer drug discovery. **Phytochemistry Letters**, v. 7, n. 0, p. 173-181, 2014.

KONNING, G. H.; AGYARE, C.; ENNISON, B. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 65-67, 2004.

KORFMACHER, W. A.; COX, K. A.; NG, K. J.; VEALS, J.; HSIEH, Y.; WAINHAUS, S.; BROSKE, L.; PRELUSKY, D.; NOMEIR, A.; WHITE, R. E. Cassette-accelerated rapid rat screen: a systematic procedure for the dosing and liquid chromatography/atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometric analysis of new chemical entities as part of new drug discovery. **Rapid Commun Mass Spectrom.**, v. 15, n. 5, p. 335-340, 2001.

KORFMACHER, W. A. Bioanalytical assays in a drug discovery environment. In: Press, C. (Ed.). **Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies**. Boca Raton, FL, 2005, p.1-26.

KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; SADAN, S. V. G. S.; JHA, S. R.; UPASANI, S. M.; MAHESHWARI, V. L. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 1, p. 33-37, 2002.

KRISHNAN, K.; WHITE, P. Chapter 2 - Pharmacokinetics and Toxicokinetics. In: Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., *et al* (Ed.). **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)**. Boston: Academic Press, 2013, p.39-59.

KUETE, V.; SANDJO, L. P.; WIENCH, B.; EFFERTH, T. Cytotoxicity and modes of action of four Cameroonian dietary spices ethno-medically used to treat Cancers: *Echinops giganteus*, *Xylopia aethiopica*, *Imperata cylindrica* and *Piper capense*. **J Ethnopharmacol**, v., n., p., 2013.

KWON, Y. **Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists**: Springer, 2002

LANÇAS, F. M. **CROMATOGRAFIA LIQUIDA MODERNA: HPLC/CLAE**. Campinas: ATOMO, 2009

LARINI, L. Avaliação Toxicológica. In: (Ed.). **Toxicologia**. São Paulo: Manole, 1999, p.31.

LARSEN, M.; HOLM, R.; JENSEN, K. G.; SVEIGAARD, C.; BRODIN, B.; NIELSEN, C. U. 5-Hydroxy-l-tryptophan alters gaboxadol pharmacokinetics in rats: Involvement of PAT1 and rOat1 in gaboxadol absorption and elimination. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1–3, p. 68-75, 2010.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1980.

LEVEY, A. S.; INKER, L. A.; CORESH, J. GFR Estimation: From Physiology to Public Health. **American Journal of Kidney Diseases**, v., n. 0, p., 2014.

LI, C.; LEE, D.; GRAF, T. N.; PHIFER, S. S.; NAKANISHI, Y.; BURGESS, J. P.; RISWAN, S.; SETYOWATI, F. M.; SARIBI, A. M.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; FALKINHAM, J. O., 3RD; KROLL, D. J.; KINGHORN, A. D.;

WANI, M. C.; OBERLIES, N. H. A hexacyclic ent-trachylobane diterpenoid possessing an oxetane ring from *Mitrephora glabra*. **Org Lett**, v. 7, n. 25, p. 5709-5712, 2005.

LI, Y.; GAN, L.; LI, G. Q.; DENG, L.; ZHANG, X.; DENG, Y. Pharmacokinetics of plantamajoside and acteoside from *Plantago asiatica* in rats by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, n. 0, p. 251-256, 2014.

LITTLE, J. L.; WEMPE, M. F.; BUCHANAN, C. M. Liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ionization effects in plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 833, n. 2, p. 219-230, 2006.

LIU, L.; PANG, K. S. An integrated approach to model hepatic drug clearance. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3–4, p. 215-230, 2006.

LIU, X.-M.; ZHAO, X.; GAO, E.-Z.; ZHAO, Y.-L.; LIU, Z.; YU, Z.-G. Comparative pharmacokinetics of five saponins after intravenous administration of TSFS injection and TSFS injection plus TFFG in rats under different physiological states. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 53-62, 2014.

LOPEZ, R.; CUCA, L. E.; DELGADO, G. Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Xylopiya discreta*. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 10, p. 623-630, 2009.

LUNGUINHO, D. M. **Estudo dos efeitos antitumorais e toxicológicos do óleo essencial das folhas de *Xylopiya frutescens* Aubl. (ANNONACEAE)**. Universidade Federal da Paraíba, 2012.

LUZ, A. C.; PRETTI, I. R.; DUTRA, J. C. V.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste in vivo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n., p. 635-642, 2012.

MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. **Environmental Mutagenesis**, v. 2, n. 4, p. 509-514, 1980.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n., p. 1559-1568, 2010.

MALIK, A. K.; BLASCO, C.; PICÓ, Y. Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, n. 25, p. 4018-4040, 2010.

MARCH, R. E. Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 200, n. 1–3, p. 285-312, 2000.

MARCHI, I.; VIETTE, V.; BADOUD, F.; FATHI, M.; SAUGY, M.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, n. 25, p. 4071-4078, 2010.

MARIAN, M.; SEGHEZZI, W. Chapter 4 - Novel Biopharmaceuticals: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Bioanalytics. In: Lisa, M. P. e Danuta, J. H. (Ed.). **Nonclinical Development of Novel Biologics, Biosimilars and Specialty Biologics**. San Diego: Academic Press, 2013, p.97-137.

MARTINS, I. R.; DOS SANTOS, R. F.; DE, C. C. A. C.; DE OLIVEIRA, G. A.; MACEDO, C. L.; DE, S. M. F.; DOS SANTOS, P. F.; DE, A. C. F.; TAVARES, J. F.; DA SILVA, B. A. Relaxant effect of Ent-7 α -hydroxytrachyloban-18-oic acid, a trachylobane diterpene from *Xylopia langsdorffiana* A. St-Hil. & Tul., on tracheal smooth muscle. **J Smooth Muscle Res**, v. 49, n. 0, p. 15-25, 2013.

MARTINSEN, A.; BACCELLI, C.; NAVARRO, I.; ABAD, A.; QUETIN-LECLERCQ, J.; MOREL, N. Vascular activity of a natural diterpene isolated from *Croton zambesicus* and of a structurally similar synthetic trachylobane. **Vascul Pharmacol**, v. 52, n. 1-2, p. 63-69, 2010.

MATAR, K. M. Quantification of levetiracetam in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application to therapeutic drug monitoring. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 822-828, 2008.

MATSSON, P.; GIACOMINI, K. M.; CRAIG BRATER, D. Chapter 95 - Renal Disposition of Drugs and Translation to Dosing Strategies. In: Alpern, R. J., Moe, O. W., *et al* (Ed.). **Seldin and Giebisch's The Kidney (Fifth Edition)**: Academic Press, 2013, p.3185-3214.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

MEI, Y.; XU, J.; ZHAO, J.; FENG, N.; LIU, Y.; WEI, L. An HPLC method for determination of oridonin in rabbits using isopsoralen as an internal standard and its application to pharmacokinetic studies for oridonin-loaded nanoparticles. **Journal of Chromatography B**, v. 869, n. 1–2, p. 138-141, 2008.

MENDANHA, S. A.; MOURA, S. S.; ANJOS, J. L. V.; VALADARES, M. C.; ALONSO, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 1, p. 323-329, 2013.

MONTENEGRO, C. D. A. **Atividade gastroprotetora de *Xylopia langsdorffiana* A. St.-Hill & Tul. (Annonaceae) em modelos animais**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2011. 163 p.

MORALES-RAMÍREZ, P.; VALLARINO-KELLY, T.; CRUZ-VALLEJO, V. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents in vivo. **Toxicology Letters**, v. 224, n. 3, p. 319-325, 2014.

MOURA-COSTA, G. F.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F.; MELLO, J. C. P. D.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; TEMPONI, L. G.; UEDA-NAKAMURA, T.

Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 143, n. 2, p. 631-638, 2012.

MOURA, A. P. G. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica do óleo essencial dos frutos de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 2012. 117 p.

MULLER, P. Y.; MILTON, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n., p. 751-761, 2012.

MUNARI, C. C.; ALVES, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 22-28, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. 2.19 - Natural Products of Therapeutic Importance. In: Editors-in-Chief: Iw, M. e Hung-Wen, L. (Ed.). **Comprehensive Natural Products II**. Oxford: Elsevier, 2010, p.623-650.

NGOUELA, S.; NYASSE, B.; TSAMO, E.; BROCHIER, M. C.; MORIN, C. A Trachylobane Diterpenoid from *Xylopia aethiopica*. **J Nat Prod**, v. 61, n. 2, p. 264-266, 1998.

NIESSEN, W. M. A.; MANINI, P.; ANDREOLI, R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 25, n. 6, p. 881-899, 2006.

NIETO, M.; SEVENET, T.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. [Alkaloids of Annonaceae: alkaloids of *Xylopia pancheri* (author's transl)]. **Planta Med**, v. 30, n. 1, p. 48-58, 1976.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; CHALO MUTISO, P. B.; JUMA, F. D. Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 24, p. 2671-2675, 2006.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; CHALO MUTISO, P. B.; JUMA, F. D. Antinociceptive effects of the extracts of *Xylopia parviflora* bark and its alkaloidal components in experimental animals. **J Nat Med**, v. 64, n. 1, p. 9-15, 2010.

NOLIN, T. D.; FRYE, R. F.; MATZKE, G. R. Hepatic drug metabolism and transport in patients with kidney disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, n. 5, p. 906-925, 2003.

NTIE-KANG, F.; LIFONGO, L.; MBAH, J.; OWONO OWONO, L.; MEGNASSAN, E.; MBAZE, L.; JUDSON, P.; SIPPL, W.; EFANGE, S. M. In silico drug metabolism and pharmacokinetic profiles of natural products from medicinal plants in the Congo basin. **In Silico Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 12, 2013.

NWOZO, S. O.; OROJOBI, B. F.; ADARAMOYE, O. A. Hypolipidemic and antioxidant potentials of *Xylopia aethiopica* seed extract in hypercholesterolemic rats. **J Med Food**, v. 14, n. 1-2, p. 114-119, 2011.

OBIRI, D. D.; OSAFO, N. Aqueous ethanol extract of the fruit of *Xylopia aethiopica* (Annonaceae) exhibits anti-anaphylactic and anti-inflammatory actions in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 148, n. 3, p. 940-945, 2013.

OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. v., n., p., 1997.

OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. v., n., p., 2001.

OLIVEIRA, L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA, M. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n., p. 201-207, 2010.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMENEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIERREZ, D.; PACO, M. A.; GIMENEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 3, p. 630-635, 2007.

OTAEGUI, D.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; ZUBIA, A.; COSSÍO, F. P.; PEDRAZ, J. L. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of Kendine 91, a novel histone deacetylase inhibitor, in mice plasma and tissues: Application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 870, n. 1, p. 109-116, 2008.

PADRÓ, J. M.; MARSÓN, M. E.; MASTRANTONIO, G. E.; ALTCHER, J.; GARCÍA-BOURNISSEN, F.; RETA, M. Development of an ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human plasma. **Talanta**, v. 107, n. 0, p. 95-102, 2013.

PAINE, S. W.; BARTON, P.; BIRD, J.; DENTON, R.; MENOCHET, K.; SMITH, A.; TOMKINSON, N. P.; CHOHAN, K. K. A rapid computational filter for predicting the rate of human renal clearance. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 4, p. 529-537, 2010.

PAN, L.; ZHOU, P.; ZHANG, X.; PENG, S.; DING, L.; QIU, S. X. Skeleton-rearranged pentacyclic diterpenoids possessing a cyclobutane ring from *Euphorbia wallichii*. **Org Lett**, v. 8, n. 13, p. 2775-2778, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **INTRODUÇÃO A ESPECTROSCOPIA**: CENGAGE, 2010

PIMENTA, L. P.; MENDONÇA, D. D. Aporphine alkaloids and feruloylamides from the bark of *Xylopia benthamii* R.E. Fries (Annonaceae). **Nat Prod Res**, v. 26, n. 20, p. 1948-1950, 2012.

PINHO, D. S. D.; STURBELLE, R. T.; MARTINO-ROTH, M. D. G.; GARCÍAS, G. L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em

teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n., p. 165-170, 2010.

PITA, J. C.; XAVIER, A. L.; DE SOUSA, T. K.; MANGUEIRA, V. M.; TAVARES, J. F.; DE OLIVEIRA JUNIOR, R. J.; VERAS, R. C.; PESSOA HDE, L.; DA SILVA, M. S.; MORELLI, S.; AVILA VDE, M.; DA SILVA, T. G.; DINIZ MDE, F.; CASTELLO-BRANCO, M. V. In vitro and in vivo antitumor effect of trachylobane-360, a diterpene from *Xylopia langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9573-9589, 2012.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. D. V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n., p. 281-293, 2004.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n., p. 193-210, 2001.

QUEVAUVILLER, A.; FOUSSARD-BLANPIN, O. The properties, especially antispasmodic, of total alkaloids of the roots of *Xylopia quintasii* Engl. and Diels. Annonaceae. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 170, n. 6, p. 1187-1188, 1976.

QUINTANS JDE, S.; SOARES, B. M.; FERRAZ, R. P.; OLIVEIRA, A. C.; DA SILVA, T. B.; MENEZES, L. R.; SAMPAIO, M. F.; PRATA, A. P.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ANTONIOLLI, A. R.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Chemical Constituents and Anticancer Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopia laevigata*. **Planta Med**, v. 79, n. 2, p. 123-130, 2013.

RIBEIRO, L. D. P.; VENDRAMIM, J. D.; BICALHO, K. U.; ANDRADE, M. D. S.; FERNANDES, J. B.; MORAL, R. D. A.; DEMÉTRIO, C. G. B. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 55, n. 0, p. 6-14, 2013.

RIBEIRO, R. L. V.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLS-RP mobile phases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n., p. 300-306, 2004.

RIET-CORREA, F. PLANTAS TÓXICAS E MICOTOXINAS QUE AFETAM A REPRODUÇÃO EM RUMINANTES E EQUÍNOS NO BRASIL. **Biológico**, v. 69, n., p. 63-68, 2007.

RODRIGUES, A. M.; DE PAULA, J. E.; DEGALLIER, N.; MOLEZ, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T. S.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n., p. 359-366, 2011.

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; ANALLA, M.; MUÑOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, Á. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some

traditional medicinal herbs. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, n. 1–2, p. 147-155, 2005.

RUZILAWATI, A. B.; WAHAB, M. S. A.; IMRAN, A.; ISMAIL, Z.; GAN, S. H. Method development and validation of repaglinide in human plasma by HPLC and its application in pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 5, p. 1831-1835, 2007.

SALVADORI, D. M. F. **Mutagênese Ambiental**: ULBRA, 2003
SANTOS, R. F.; MARTINS, I. R.; MONTEIRO FDE, S.; TRAVASSOS RDE, A.; JANEIRO, D. I.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; DA SILVA, B. A. Spasmolytic activity of trachylobanes ent-7alpha-acetoxytrachyloban-18-oic acid and ent-7alpha-hydroxytrachyloban-18-oic acid isolated from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. (Annonaceae). **Nat Prod Res**, v. 26, n. 24, p. 2335-2339, 2012a.

SANTOS, R. F.; MARTINS, I. R.; TRAVASSOS, R. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; PAREDES-GAMERO, E. J.; FERREIRA, A. T.; NOUAILHETAS, V. L.; ABOULAFIA, J.; RIGONI, V. L.; DA SILVA, B. A. Ent-7alpha-acetoxytrachyloban-18-oic acid and ent-7alpha-hydroxytrachyloban-18-oic acid from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. modulate K(+) and Ca(2+) channels to reduce cytosolic calcium concentration on guinea pig ileum. **Eur J Pharmacol**, v. 678, n. 1-3, p. 39-47, 2012b.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n., p. 275-280, 2004.

SCHELLINGER, A. P.; CARR, P. W. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. **Journal of Chromatography A**, v. 1109, n. 2, p. 253-266, 2006.

SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J. T. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: Implications for cytogenetic screening. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 127, n. 2, p. 169-174, 1984.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SCHWARTZ, S.; PATEMAN, T. **Pre-clinical pharmacokinetics**: secondary title. Boca Raton CRC Press, 2004.

SHEN, J. X.; MOTYKA, R. J.; ROACH, J. P.; HAYES, R. N. Minimization of ion suppression in LC–MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX–SPE). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 2, p. 359-367, 2005.

SHITARA, Y.; HORIE, T.; SUGIYAMA, Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 425-446, 2006.

SILVA, F. C.; BARROS, M. A. B.; VIANA, R. R.; ROMÃO, N. F.; OLIVEIRA, M. S.; MENEGUETTI, D. U. O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 13-22, 2011.

SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. D. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. D. S.; SILVA, S. A. S. D. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n., p. 1566-1570, 2009.

SLUITER, W.; OOMENS, L. W. M.; BRAND, A.; VAN FURTH, R. Determination of blood volume in the mouse with ⁵¹Chromium-labelled erythrocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 73, n. 1, p. 221-225, 1984.

SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J. **Practical HPLC method development**: J. Wiley, 1997 (A Wiley-Interscience publication)

SOUFANE, S.; BEDDA, A.; MAHDEB, N.; BOUZIDI, A. Acute Toxicity study on *Citrullus colocynthis* fruit methanol extract in Albino rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 6, p. 088-093, 2013.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 4, p. 913-920, 2004.

SRIVASTAVA, G.; MEHROTRA, R. C. First Fossil Record of *Alphonsea* Hk. f. & T. (Annonaceae) from the Late Oligocene Sediments of Assam, India and Comments on Its Phytogeography. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53177, 2013.

SUFFREDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 223-226, 2007.

TAIRU, A. O.; HOFMANN, T.; SCHIEBERLE, P. Characterization of the key aroma compounds in dried fruits of the West African peppertree *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) using aroma extract dilution analysis. **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 8, p. 3285-3287, 1999.

TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P.; BOAVENTURA, M. A.; SILVA, L. G. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Nat Prod Res**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2006.

TATSADJIEU, L. N.; ESSIA NGANG, J. J.; NGASSOUM, M. B.; ETOA, F. X. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopia aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, n. 5, p. 469-472, 2003.

TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; SILVA, M. V.; DINIZ, M. F.; FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V.; DE SIMONE, C. A.; JUNIOR, J. X.; MELO, P. S.; HAUN, M.; DA SILVA, M. S. ent-Trachylobane diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. **J Nat Prod**, v. 69, n. 6, p. 960-962, 2006.

TAVARES, J. F.; SILVA, M. V. B.; QUEIROGA, K. F.; DINIZ, M. D. F. F. M.; FILHO, J. M. B.; HAUN, M.; MELO, P. S.; SILVA, M. S. D. Xylodiol, a New Atisane Diterpenoid from *Xylopia Langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae). **Z Naturforsch B**, v. 62b, n., p. 742-744, 2007.

TAYLOR, P.; ARSENAK, M.; ABAD, M. J.; FERNANDEZ, A.; MILANO, B.; GONTO, R.; RUIZ, M. C.; FRAILE, S.; TAYLOR, S.; ESTRADA, O.; MICHELANGELI, F. Screening of Venezuelan medicinal plant extracts for cytostatic and cytotoxic activity against tumor cell lines. **Phytother Res**, v. 27, n. 4, p. 530-539, 2013.

TAYLOR, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clin. Biochem.**, v. 38, n. 4, p. 328-334, 2005.

TEPONGNING, R. N.; YERBANGA, S. R.; DORI, G. U.; LUCANTONI, L.; LUPIDI, G.; HABLUETZEL, A. In vivo Efficacy and Toxicity Studies on *Erythrina senegalensis* and *Khaya ivorensis* Used as Herbal Remedies for Malaria Prevention in Cameroon - See more at: <http://www.sciencedomain.org/abstract.php?iid=223&id=13&aid=1500#.UffuUo1vNyV> . **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 3, p. 454-464, 2013.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; DRIEMEIER, D.; COSTA, J. B. D.; CAMARGO, A. J. R. Aborto em vacas na intoxicação experimental pelas favas de *Stryphnodendron obovatum* (Leg. Mimosoideae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n., p. 35-38, 1998.

TOLEDO, M. R. S.; MORELES, L. A.; CONCI, M.; OLIVO, A. M.; SIMPLICIO, T. T.; VALÉRIO, D.; SOUZA, F. P.; VIEIRA, M. D. C.; S.C., B. T.; Z., N. A. H.; SCALON, S. D. P. Q.; LIMA, Z. V. D. Comparação da Fitotoxicidade dos extratos aquosos de *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Mich. em ratas prenhes. **Revista Horticultura Brasileira**, v. 22, n., p. 493, 2004.

TRUFELLI, H.; PALMA, P.; FAMIGLINI, G.; CAPPIELLO, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 30, n. 3, p. 491-509, 2011.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do MUDI**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VAN DE STEENE, J. C.; LAMBERT, W. E. Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters. **J. Am. Soc. Mass. Spectrom.**, v. 19, n. 5, p. 713-718, 2008.

VASCONCELOS, R. S.; SILVA JR, L. F.; LOPES, N. P. Estudo por espectrometria de massas de soluções de hidróxi(tosilóxi)iodobenzeno: propostas para mecanismos de desproporção. **Química Nova**, v. 35, n., p. 1593-1599, 2012.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n., p. 519-528, 2005.

VERARDO, V.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; MARCONI, E.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; CABONI, M. F. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography–electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry (RP-HPLC–ESI-TOF-MS). **Journal of Cereal Science**, v. 52, n. 2, p. 170-176, 2010.

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CROTTI, A. E. M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 31, n., p. 840-853, 2008.

VISWANATHAN, C. T.; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A. J.; ROSE, M. J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V. P.; SKELLY, J. P.; SWANN, P. G.; WEINER, R. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. **Pharm Res**, v. 24, n. 10, p. 1962-1973, 2007.

VU, D. H.; KOSTER, R. A.; BOLHUIS, M. S.; GREIJANUS, B.; ALTENA, R. V.; NGUYEN, D. H.; BROUWERS, J. R. B. J.; UGES, D. R. A.; ALFFENAAR, J. W. C. Simultaneous determination of rifampicin, clarithromycin and their metabolites in dried blood spots using LC–MS/MS. **Talanta**, v. 121, n. 0, p. 9-17, 2014.

WANG, S.; CYRONAK, M.; YANG, E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response?: A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 2, p. 701-707, 2007.

WILLIAMS, S. Ghost peaks in reversed-phase gradient HPLC: a review and update. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, n. 1–2, p. 1-11, 2004.

WONG, P. S. H.; COOKS, R. G. Ion Trap Mass Spectrometry **Currentseparations.com and drug development**, v. 16, n. 3, p., 1997.

WOODE, E.; AMEYAW, E. O.; BOAKYE-GYASI, E.; ABOTSI, W. K. Analgesic effects of an ethanol extract of the fruits of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich (Annonaceae) and the major constituent, xylopic acid in murine models. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 4, n. 4, p. 291-301, 2012.

WU, Y.; ZHENG, Y.; CHEN, N.; LUAN, L.; LIU, X. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution study of physalin D in rats by ultra-pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 5–6, p. 443-448, 2011.

XU, X. 11 HPLC method development for drug discovery LC-MS assays in rapid PK applications. In: Satinder, A. e Henrik, R. (Ed.). **Separation Science and Technology**: Academic Press, 2007. v. Volume 8, p.317-351.

YAP, C. W.; LI, Z. R.; CHEN, Y. Z. Quantitative structure–pharmacokinetic relationships for drug clearance by using statistical learning methods. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 24, n. 5, p. 383-395, 2006.

YAPI, T. A.; BOTI, J. B.; AHIBO, C. A.; BIGHELLI, A.; CASTOLA, V.; CASANOVA, J.; TOMI, F. Chemical variability of the leaf essential oil of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A.Rich. from Cote d'Ivoire. **Chem Biodivers**, v. 9, n. 12, p. 2802-2809, 2012.

ZAIDAN, L. E. M. C.; GUIMARÃES, G.; SANTOS, L. B.; BRANDÃO, Y. B.; BARBOSA, C. M. B. M.; BENACHOUR, M.; SILVA, V. L. Validation of an Analytical Method Using HPLC for Identification and Quantification of Aliphatic Acids Present in Effluents. **International Journal of Environmental Research**, v. 8, n. 1, p. 149-156, 2014.

ZHANG, Q.; MA, Y.-M.; WANG, Z.-T.; WANG, C.-H. Pharmacokinetics difference of multiple active constituents from decoction and maceration of Fuzi Xiexin Tang after oral administration in rat by UPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 92, n. 0, p. 35-46, 2014.

ZHANG, S.; ZHENG, L.; XU, L.; SUN, H.; LI, H.; YAO, J.; LIU, K.; PENG, J. Subchronic toxicity study of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 62, n. 2, p. 221-230, 2012.

ZHAO, H.; CHEN, Z. An HPLC-ESI-MS method for analysis of loureirin A and B in dragon's blood and application in pharmacokinetics and tissue distribution in rats. **Fitoterapia**, v. 86, n. 0, p. 149-158, 2013.

ZHU, X.; SUN, J.; HAO, H.; WANG, G.; HU, X.; LV, H.; GU, S.; WU, X.; XU, J. Simultaneous determination of multiple angiotensin type 1 receptor antagonists and its application to high-throughput pharmacokinetic study: Cassette dosing versus cassette analysis. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 272, n. 2–3, p. 127-136, 2008.

Anexos

ANEXO A – Certidão de aprovação do comitê de ética em uso de animais do CBiotec/UFPB (CEUA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 7 de dezembro de 2012.

CEUA Nº 1009/12

Ilmo(a). Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Departamento Ciências Farmacêuticas - CCS - UFPB

Orientando(a) : João Carlos Lima Rodrigues Pita, (Doutorado)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **15/10/12** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Avaliação da toxicidade, atividade antitumoral e farmacocinética de diterpenos isolados de Xylopia langsdorffiana (Annonaceae).**

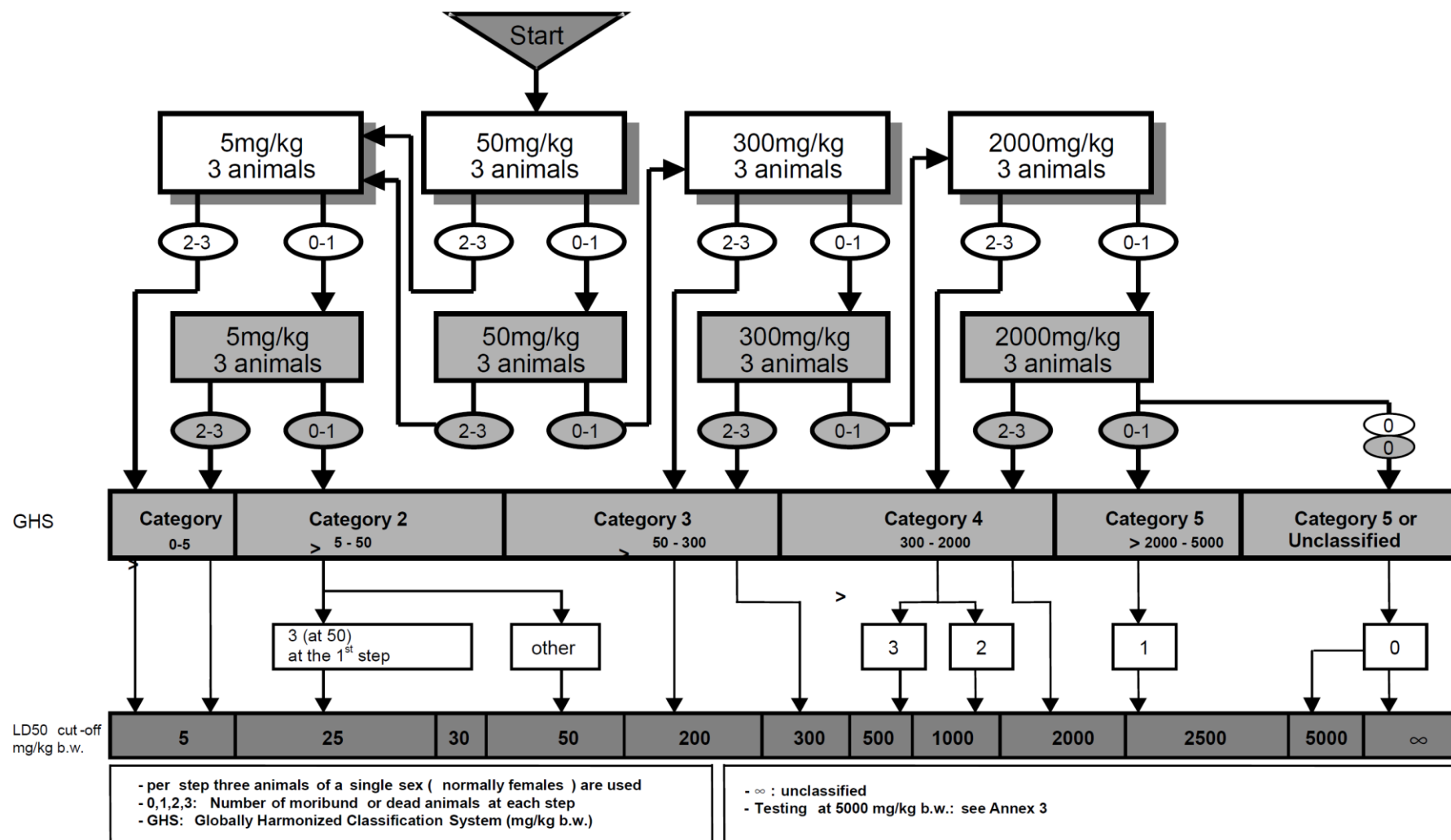
Com previsão de empregar **121 (Camundongos Swiss; ; ; ; ; ; ;)**.

Os .

Para serem utilizados no período de **11/04/2010 a 11/03/2014**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

ANEXO B – Procedimento para início do ensaio toxicidade aguda com a dose de 50 mg/kg.


ANEXO C – Protocolo experimental elaborado pelo Laboratório de Psicofarmacologia do PPgPNSB/CCS/UFPB (ALMEIDA et al., 1999).

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					