UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

PÂMELA RODRIGUES ROSA PEREIRA

Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina

Ribeirão Preto
2018

PÂMELA RODRIGUES ROSA PEREIRA

Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pereira, Pâmela Rodrigues Rosa

Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina. Ribeirão Preto, 2018.

43 p : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. Carambola. 2. Caramboxina. 3. Espectrometria de massas. 4. Metabolismo *in vitro*. 5. Microssomas hepáticos de ratos. 6. Oxidação biomimética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pâmela Rodrigues Rosa Pereira
Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

RESUMO

PEREIRA, P. R. R.. **Estudo do metabolismo *in vitro* da caramboxina**. 2018. 43p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2018.

A carambola (*Avehrroa carambola* L.) é uma rica fonte de vitaminas, sais minerais e antioxidantes. Seu formato de estrela, quando seccionada transversalmente, torna essa fruta muito valorizada na culinária. Contudo, nos últimos anos têm sido relatados alguns casos de intoxicação após ingestão desta fruta, relacionados, principalmente, a pacientes nefropatas. Sintomas como soluços intratáveis, agitação, confusão mental, vômito, convulsão e morte, decorrentes do *status epilepticus* (SE), foram descritos na maioria dos casos de intoxicação. Este quadro pode estar associado a presença de uma neurotoxina, caramboxina (CBX), que tem a capacidade de inibir o sistema de condução GABAérgico, além de atuar sobre os principais receptores glutamatérgicos, levando a ativação do mecanismo de excitotoxicidade neuronal. Há diversos modelos experimentais que buscam estudar os mecanismos ligados ao aparecimento do SE. Uma vez que a caramboxina pode estar relacionada com a indução do SE, estudos para melhor compreender seu metabolismo podem contribuir para sua possível aplicação em modelos experimentais de epilepsia. Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo *in vitro* da caramboxina, utilizando microssomas hepáticos e modelo de oxidação biomimética. Um extrato metanólico foi preparado na proporção de 1:1 (m/v) e em seguida fracionado em coluna contendo sephadex LH-20. A fração contendo CBX foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para seu isolamento. Essa metodologia permitiu um rendimento superior ao descrito na literatura, permitindo que esta neurotoxina possa ser futuramente avaliada em modelos experimentais *in vivo* de epilepsia. Parte da CBX isolada foi avaliada em ensaios de metabolismo *in vitro* com microssomas hepáticos de ratos, no entanto, não foi observado formação de produtos de oxidação nas condições empregadas, o que pode sugerir que não ocorra metabolismo de fase I da CBX, corroborando com a proposta de rápida eliminação pela urina por pessoas saudáveis que ingerem carambola. A avaliação da oxidação da CBX por modelo biomimético, utilizando catalizador de Jacobsen e oxidante e iodosilbenzeno (PhIO), apresentou a formação de um metabólito, o qual poderá ser posteriormente utilizado nos estudos de mecanismo de ação da CBX.

Palavras-chave: Carambola. Caramboxina. Espectrometria de massas. Metabolismo *in vitro*. Microssomas hepáticos de ratos. Oxidação biomimética.

ABSTRACT

PEREIRA, P. R. R.. **In vitro metabolism study of caramboxin**. 2018. 43p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2018.

The Star fruit (*Averrhoa carambola* L.) is a good source of vitamins, minerals and antioxidants. Its star shape, when cross-sectioned, makes this fruit highly prized in cooking. However, in the last years some cases of intoxication after ingestion of this fruit, mainly related to nephropathy patients, have been reported. Symptoms such as intractable hiccups, agitation, mental confusion, vomiting, convulsion, and death, due to *status epilepticus* (SE), have been described in most cases of intoxication. These clinical conditions may be associated with the presence of a neurotoxin, caramboxine (CBX), which has the capacity to inhibit the GABAergic conduction system, in addition to acting on the main glutamatergic receptors, leading to activation of the mechanism of neuronal excitotoxicity. Several experimental models aim to study the mechanisms related to the appearance of the SE. Since caramboxin may be related to the induction of ES, studies to better understand its metabolism may contribute to its possible application in experimental models of epilepsy. Therefore, this work aimed to study the in vitro metabolism of caramboxin, using hepatic microsomes and biomimetic oxidation model. A methanolic extract was prepared in the ratio of 1: 1 (m / v) and then fractionated on a column containing LH-20 sephadex. The fraction containing CBX was submitted to high performance liquid chromatography (HPLC) for its isolation. This methodology allowed a higher yield than described in the literature, allowing this neurotoxin to be evaluated in vivo in experimental models of epilepsy. Part of the isolated CBX was evaluated in in vitro metabolism assays with hepatic microsomes of rats, however, no oxidation product formation was observed under the conditions employed, which may suggest that CBX phase I metabolism does not occur, corroborating with a proposal for rapid urinary elimination by healthy people who eat carambola. The evaluation of CBX oxidation by biomimetic model, using Jacobsen's catalyst and oxidant and iodosilbenzene (PhIO), presented the formation of a metabolite, which could be used in future CBX action mechanism studies.

Keywords: Biomimetic oxidation. Caramboxin. In vitro metabolism. Mass spectrometry. Rat liver microsomes. Star fruit.

1 INTRODUÇÃO

A caramboleira (*Averrhoa carambola* L.), pertence à família Oxalidaceae, é originária do sudeste asiático e tem ampla distribuição mundial, especialmente em países tropicais como Índia, Malásia, Indonésia, Filipinas, Estados Unidos, Austrália e Brasil. A caramboleira pertence ao gênero *Averrhoa*, o qual contém 5 espécies – *A. bilimbi*, *A. dolichocarpa*, *A. lucopetala*, *A. microphylla* e *A. carambola*. Entretanto, entre elas, apenas *A. carambola* é cultivada em escala comercial, possuindo 27 variedades registradas e comercializadas. Seus frutos são bastante valorizados por seu formato e aparência pouco usuais, em geral apresentam cinco saliências longitudinais e quando fatiados transversalmente apresentam o formato de estrela, podendo ser amarelados ou esverdeados, com sabor variando do azedo ao doce (ARAÚJO; MINAMI, 2001; MUTHU et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2011; PRATI et al., 2002).

A carambola é uma rica fonte de minerais e vitaminas, como magnésio, potássio, fósforo, cálcio, vitamina C e vitaminas B1 e B2. As carambolas são também uma rica fonte natural de antioxidantes como ácido gálico, β -caroteno, minerais antioxidantes (ferro, zinco e manganês) e flavonoides [(+)-catequina e (-)-epicatequina] (MUTHU et al., 2016; SHUI; LEONG, 2004). Apesar de ser utilizada na medicina popular como antitérmico, tônico digestivo, antiescorbútico, antioxidante e adstringente, assim como para o aumento da secreção salivar e para o alívio de problemas oculares, (THOMAS et al., 2008), a carambola é cultivada principalmente para fins alimentícios (MUTHU et al., 2016; PRATI et al., 2002) e, apesar de seu uso consagrado, existem relatos de intoxicação ligados ao seu consumo (CHUA et al., 2017), como apresentados a seguir.

1.1 HISTÓRICO DE INTOXICAÇÕES POR CARAMBOLA

Os efeitos tóxicos da carambola foram descritos pela primeira vez em 1980, em um trabalho experimental realizado por Muir e Lam, no qual demonstraram que a administração intraperitoneal do extrato de carambola em ratos, em doses acima de 8 g/kg, causou convulsões seguidas de morte, alguns minutos após a administração nos animais. A partir disso, sugeriu-se a presença de uma neurotoxina excitatória, mas de natureza ainda desconhecida. Em 1993, foi descrito o primeiro surto de neurotoxicidade por carambola em pacientes com doença renal crônica (DRC),

quando, após a ingestão de carambola, oito pacientes desenvolveram soluços (MARTIN et al.¹ apud OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Em 1998, Moyses-Neto, Robl e Coutinho-Netto descreveram seis casos de intoxicação por carambola como manifestações clínicas como insônia, soluços, agitação psicomotora e morte. Entre 2002 e 2014, foram publicados trabalhos mostrando que tanto pacientes com DRC submetidos a hemodiálise quanto pacientes sem necessidade de diálise apresentaram sintomas de intoxicação após ingestão de carambola (OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Há ainda, o relato de pessoas com função renal anteriormente normal, que após o consumo de carambola apresentaram sintomas de intoxicação, além de apresentarem insuficiência renal aguda (IRA). Estudos posteriores mostraram que a IRA foi provocada pela formação de cristais de oxalato, devido à alta concentração de ácido oxálico presente na carambola (ABEYSEKERA et al., 2015; FANG et al., 2008; MOYSES-NETO et al., 2009; SCARANELLO et al., 2014).

Dentre os sintomas apresentados na intoxicação por carambola, o mais comumente relatado foi o soluço, que em geral não respondia às medicações convencionais. Outros sintomas como agitação, confusão mental, vômito, convulsão e morte, decorrentes do *status epilepticus* (SE), também foram descritos. Sendo as crises convulsivas relacionadas com o mau prognóstico do paciente (GARCIA-CAIRASCO et al., 2013; MOYSES NETO et al., 1998; MOYSES NETO et al., 2003 OLIVEIRA; AGUIAR, 2015).

Em decorrência dos relatos acerca da intoxicação por carambola, buscou-se uma correlação entre a ingestão de carambola, neurotoxicidade e lesão renal. Para tal, utilizaram-se modelos experimentais com administração do extrato bruto ou de solução de oxalato por gavagem em ratos, demonstrando a importante contribuição do oxalato no desenvolvimento de lesão renal aguda, chegando a ser sugerido que o ácido oxálico fosse o responsável pela toxicidade da fruta (FANG et al., 2001; FANG et al., 2008; OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Contudo, Carolino e colaboradores (2005), após o isolamento de uma fração ativa do extrato de carambola e sua comparação com um padrão do ácido oxálico excluíram essa possibilidade. Somente em 2013, Garcia-Cairasco e colaboradores isolaram da carambola e caracterizaram a neurotoxina capaz de causar distúrbios neurológicos em pacientes com problemas

¹ Martin LC, Caramori JST, Barretti P, Soares VA. Soluço intratável desencadeado por ingestão de carambola ("Averrhoa carambola") em portadores de insuficiência renal crônica. J Bras Nefrol, v. 15, p. 92-94, 1993.

renais. A substância, que apresenta similaridades com o aminoácido fenilalanina, foi chamada pelos pesquisadores de caramboxina – CBX (Figura 1). Essa molécula apresenta potentes propriedades excitatória, convulsivante e neurodegenerativa, como foi observado no mesmo estudo. Contudo, se por um lado a substância apresenta alta toxicidade, por outro sua concentração nos frutos é extremamente reduzida, o que permite pacientes sem DRC utilizarem seus frutos na dieta de maneira segura.

Figura 1 - Estrutura química da caramboxina (CBX)

Fonte: GARCIA-CAIRASCO et al., 2013.

Recentemente, houve o relato de um caso de intoxicação por bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) em um paciente com DRC em hemodiálise com sintomatologia semelhante a apresentada nas intoxicações por carambola. O bilimbi pertence ao mesmo gênero que a carambola, este fato indica que a CBX ou algum análogo pode estar presente em outras espécies do gênero *Averrhoa* (CAETANO et al., 2017).

1.2 NEUROTOXICIDADE DA CARAMBOXINA

Neurotransmissores, tanto inibitórios quanto excitatórios, são capazes de regular diversos processos do comportamento, incluindo aprendizagem, memória, sono e sensação de dor. Alguns aminoácidos estão presentes em altas concentrações no sistema nervoso central (SNC), principalmente glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA), e podem alterar a descarga neuronal. Os aminoácidos dicarboxílicos, como glutamato e aspartato, produzem excitação, ao passo que os aminoácidos monocarboxílicos, como GABA e glicina, causam inibição (Figura 2). Processos patológicos como a epilepsia e a neurotoxicidade podem ter como causa alterações de neurotransmissores excitatórios e inibitórios. A base molecular desses

processos é constituída pelas interações, no SNC, entre os canais iônicos, os receptores que regulam esses canais e os neurotransmissores de aminoácidos (FORMAN et al., 2009; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015) .

Figura 2 – Principais aminoácidos neurotransmissores excitatórios e inibitórios

Fonte: HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015.

Estudos apontam que a CBX atua inibindo discretamente a captação de glutamato pelos transportadores presentes nos astrócitos adjacentes à sinapse, além de alterar a ligação de GABA aos seus receptores, inibindo especificamente o sistema de condução GABAérgico. A CBX também atua sobre o ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e o N-metil-D-aspartato (NMDA), principais receptores glutamatérgicos do mecanismo da excitotoxicidade neuronal, sendo capaz de ativá-los (CAROLINO et al., 2005; GARCIA-CAIRASCO et al., 2013). A ativação do receptor AMPA facilita a despolarização neuronal, o que favorece a entrada de íons cálcio no neurônio pós-sináptico tanto pela atuação do glutamato no receptor NMDA como por canais específicos. O excesso de glutamato na fenda sináptica ocasiona uma superestimulação de seus receptores e a consequente entrada excessiva de íons cálcio no terminal pós-sináptico, a qual ativa

os mecanismos intracelulares de excitotoxicidade, que levam a morte celular (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015; OLIVEIRA; AGUIAR, 2015).

Quando o íon cálcio está presente em elevadas concentrações no espaço intracelular promove a ativação de uma série de enzimas, como fosfolipases, endonucleases, proteases e óxido-nítrico sintetase, que no decorrer de uma atividade epiléptica prolongada determinam o desacoplamento da fosforilação oxidativa – lesão direta ao esqueleto celular –, somado a formação de radicais livres, os quais aceleram esse processo. Com a lesão do neurônio há a liberação de mais glutamato para o espaço extracelular, levando a lesão dos neurônios vizinhos (HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015; OLIVEIRA; AGUIAR, 2015). Estes mecanismos podem explicar a relevância da CBX no desenvolvimento e evolução dos quadros de intoxicação pela ingestão de carambola.

1.3 ESTUDOS DE METABOLISMO *IN VITRO*

Após o processo de absorção, substâncias tidas como exógenas ao organismo – fármacos, toxinas, contaminantes ambientais e outras substâncias – passam por biotransformações, levando à formação de metabólitos de maior polaridade, e visando sua eliminação através da urina ou outros fluidos biológicos. Este mecanismo tem papel importante na cinética de compostos químicos absorvidos pelo organismo, seja para sua excreção ou para sua ativação (MOHUTSKY et al., 2008).

O metabolismo compreende processos catalisados por enzimas, podendo ser dividido em duas fases, responsáveis por diferentes reações: reações de fase I – oxidação, redução e hidrólise – e reações de fase II – conjugação de grupos polares diretamente ao composto absorvido ou a um produto de reações de fase I. Estudos de metabolismo *in vitro* podem fornecer dados sobre as vias metabólicas de fase I e fase II, os sítios moleculares mais vulneráveis à metabolização, os metabólitos que poderão ser formados *in vivo*, a toxicidade dos metabólitos formados e os efeitos da inibição e/ou indução enzimática no metabolismo (COLEMAN², 2010 apud FERNANDES, 2013; NASSAR; TALAAT, 2004; MOREIRA et al., 2017).

A oxidação é uma relevante rota da fase I do metabolismo de xenobióticos e moléculas endógenas, catalisada geralmente por enzimas da superfamília citocromo

² COLEMAN, M. Human drug metabolism: an introduction. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2010.

P450 (CYP). As CYP são classificadas como monooxigenases por transferir apenas um átomo do oxigênio elementar para um substrato enquanto outro átomo de oxigênio é reduzido à água. O centro ativo das CYP contém um resíduo de ferroprotoporfirina IX com um resíduo de cisteína presente no quinto ligante e o sexto ligante livre, o qual servirá como sítio para o oxigênio molecular (Figura 3) (LOHMANN; KARST, 2008).

Figura 3 - Protoporfirina IX, o sítio ativo do citocromo P450.

Fonte: LOHMANN; KARST, 2008

A partir do conhecimento disponível acerca da família de enzimas CYP, foram desenvolvidos modelos com a intenção de reproduzir *in vitro* as reações de biotransformação ocorridas no organismo. A utilização de metaloporfirinas como métodos biomiméticos se justifica pela presença do grupo heme em sua estrutura, que também é encontrado nas enzimas CYP e atua como grupo prostético na catálise das reações. Como no centro ativo das CYP é observada a presença de ferro, para o desenvolvimento de um modelo biomimético utilizando metaloporfirinas também é necessário a presença de um catalisador porfirínico que contenha um metal, podendo ser ferro, manganês ou rutênio. Outro componente que será necessário ao modelo é um doador de oxigênio, como o hipoclorito de sódio (NaOCl), o iodosilbenzeno (PhIO), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o terc-butil hidroperóxido (*t*-BuOOH) e ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*CPBA) (FERNANDES, 2013; LOHMANN; KARST, 2008).

Uma alternativa para o estudo *in vitro* do perfil metabólico de xenobióticos são os microssomas hepáticos, utilizados para determinar de forma qualitativa a identidade do metabólito e obter informações sobre a estabilidade metabólica. Este

modelo é o mais empregado para avaliação de reações de oxidação na fase I e de conjugações na fase II (enzimas do CYP e do sistema UGT – uridina-difosfato-glucoronil transferase –, respectivamente). O modelo microsomal possibilita observar a influência de isoenzimas específicas frente a inibidores específicos. Microsomas hepáticos são uma fração sub-celular do retículo endoplasmático liso e podem ser obtidos através de centrifugação diferencial. Para suprir a demanda energética do CYP, faz-se necessário o emprego do sistema NADPH (Fosfato de dinucleotídeo de nicotina e adenina). Este modelo tem como vantagens o baixo custo e a simplicidade de uso, sendo um dos modelos mais bem caracterizados e que possibilita a avaliação da variação interindividual, além de manter a atividade enzimática quando armazenada em temperaturas inferiores a -70 °C por longo período (BRANDON et al., 2003; MARQUES, 2013; PIGATTO, 2011).

Neste contexto, diversos modelos experimentais de epilepsia utilizam-se da injeção de substâncias neuroativas, seja de forma sistêmica ou local, para produzir *status epilepticus* (SE) (DIVINEY et al., 2015; IVANOVA et al., 2015; JAGIRDAR et al., 2015; Turski et al., 1986). Esses modelos buscam estudar os mecanismos ligados ao aparecimento do SE. Uma vez que a caramboxina foi descrita como uma substância capaz de induzir o SE, estudos mais detalhados sobre sua farmacocinética e metabolismo podem contribuir para sua possível utilização em modelos experimentais de epilepsia e entender qual a contribuição de seus possíveis metabólitos na neurotoxicidade. Além disso, mesmo com a caracterização estrutural da caramboxina e o apontamento da ação de antagonismo em receptores ionotrópicos GABAérgico e glutamatérgico com propriedades excitatória, convulsivante e neurodegenerativa (GARCIA-CAIRASCO et al., 2013), ainda merece ser investigado com maiores detalhes, uma vez que existe uma lacuna relacionada a estudos que indiquem o possível metabolismo desta neurotoxina para uma melhor compressão do seu comportamento no organismo.

5 CONCLUSÃO

Em resumo podemos concluir que o protocolo final de isolamento apresentou um aumento considerável no rendimento do método de isolamento da CBX, possibilitando assim desenvolver os estudos de metabolismo *in vitro*. O desenvolvimento deste método de isolamento da CBX permite que esta neurotoxina avaliada futuramente em modelos experimentais *in vivo* de epilepsia.

O modelo biomimético empregando catalisador de Jacobsen utilizando PhIO como agente oxidante demonstrou ser um modelo mais adequado para os estudos de metabolismo *in vitro* da CBX, tendo em vista que houve a formação de um metabólito putativo, o qual poderá ser posteriormente utilizado nos estudos de mecanismo de ação da CBX. Por outro lado, o uso do *m*CPBA, como agente oxidante, neste mesmo modelo biomimético não proporcionou a formação de metabólitos nas condições empregadas.

O ensaio com modelo microsomal hepático de ratos não possibilitou a formação de produtos de oxidação nas condições empregadas, podendo sugerir que não ocorra o metabolismo de fase I da caramboxina e corroborando com a proposta de rápida eliminação pela urina, por pacientes saudáveis que ingerem frutos de carambola.

REFERÊNCIAS

- ABEYSEKERA, R. A. et al. Star fruit toxicity: a cause of both acute kidney injury and chronic kidney disease: a report of two cases. **BMC Res Notes**, v. 8 n. 796, p. 1-4 2015.
- ARAÚJO, P. S. R; MINAMI, K. Seleção de caramboleiras pelas características biométricas e físico-químicas dos frutos. **Sci Agric**, v.58, n.1, p.91-99, 2001.
- BARROS, V. P. D. **Uso de metaloporfirinas como modelos do citocromo P450 no metabolismo de corantes azo**. Tese - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- BENTO XVI. Discurso do Papa Bento XVI na visita à Universidade Católica do Sagrado Coração no 50º aniversário da fundação da Faculdade de Medicina e Cirurgia da policlínica Agostino Gemelli. **Libreria Editrice Vaticana**, Vaticano, 3 mai. 2012. Disponível em: < http://w2.vatican.va/content/benedict-xvi/pt/speeches/2012/may/documents/hf_ben-xvi_spe_20120503_gemelli.html>. Acesso em: 4 fev. 2018.
- BRANDON, E. F. A. et al. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 189, p. 233-246, 2003.
- CAETANO, C. P. et al. Neurotoxicity following the ingestio of bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi*) in an end-stage renal disease patient on hemodialysis. **Case Rep Nephrol Dial**, v. 7, p. 6-12, 2017.
- CAROLINO, R. O. G. et al. Convulsant activity and neurochemical alterations induced by a fraction obtained from fruit Averrhoa carambola (Oxalidaceae: Geraniales). **Neurochem Int**, v. 46, p. 523-531, 2005.
- CECCHI, T. Application of Ion Pairing Chromatography to the Analysis of Inorganic Analytes: Review. **J Liq Chromatogr Relat Technol**, v. 30, p. 1205-1225, 2007.
- CECCHI, T. Ion Pairing Chromatography. **Crit Rev Anal Chem**, v. 38, p. 161-213, 2008.
- CHUA, C. B et al. Association of renal function and symptoms with mortality in star fruit (*Averrhoa carambola*) intoxication. **Clinical Toxicology**, v. 55, n. 7, p. 624–628, 2017.
- COLLINS, C. H. et al. Fundamentos de cromatografia. Campinas: UNICAMP, 2009.
- DIVINEY, M.; REYNOLDS, J. P.; HENSHALL, D. C. Comparison of short-term effects of midazolam and lorazepam in the intra-amygdala kainic acid model of status epilepticus in mice. **E&B**, v. 51, p. 191-198, 2015.

FANG, H. C. et al. Acute Oxalate Nephropathy Induced by Star Fruit in Rats. **Am J Kidney Dis**, v. 38, n. 4, p. 876-880, 2001.

FANG, H. C. et al. Mechanisms of star fruit-induced acute renal failure. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p.1744–1752, 2008.

FARIA, A. L. **Complexos salen e metaloporfirínicos como catalisadores na oxidação de hidrocarbonetos e fármacos em meio homogêneo e heterogêneo**. Tese - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

FERNANDES, E. F. A. **Estudo do metabolismo in vitro do diterpeno ácido caurenoico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

FORMAN, S. A. et al. Farmacologia da neurotransmissão GABAérgica e glutamatérgica. In: GOLAN, D. E., et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 11, p. 146-165.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. A video-EEG study of the neurotoxic effects of star fruit (Averrhoa carambola) juice ingestion in animals with renal failure. In: **39 ERA-EDTA Congress**, Copenhagen, 2002.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Elucidating the neurotoxicity of the Star Fruit. **Angew Chem Int Ed**, v. 52, p. 13067-13070, 2013.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOBBO-NETO, L. et al. Spatial and temporal variations in secondary metabolites content of the Brazilian Arnica leaves (*Lychnophora ericoides* Mart., Asteraceae). **J Braz Chem Soc**, v. 28, n. 12, p. 2382-2390, 2017.

HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. L. (Org.). **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman**. 2 ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. p. 219-237.

IVANOVA, N. M. et al. Long-term intracerebroventricular infusion of angiotensin II after kainate-induced status epilepticus: effects on epileptogenesis, brain damage, and diurnal behavioral changes. **E&B**, v. 51, p. 1-12, 2015.

JAGIRDAR, R. et al. Rapid changes in expression of class I and IV histone deacetylases during epileptogenesis in mouse models of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v. 273, p. 92-104, 2015.

LOHMAN, W.; KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism: strategies, advantages and limitations. **Anal Bioanal Chem**, v. 391, p. 79-96, 2008.

MANNUR, V. S. et al. Selection of buffers in LC-MS/MS: an overview. **Int. J Pharm Sci Rev Res**, v. 6, n. 1, p. 34-37, 2011.

MARQUES, L. M. M. **Estudo de metabolismo in vitro do alcaloide piplartina empregando microssomas hepáticos de ratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

MARQUES, L. M. M. et al. In vitro metabolism of the alkaloid piplartine by rat liver microsomes. **J Pharm Biomed Anal**, v. 95, p. 113-120, 2014.

MAURIN, A. J. M. et al. LC-MS-MS identification of drug metabolites obtained by metalloporphyrin mediated oxidation. **J Braz Chem Soc**, v. 14, n. 2, p. 322-328, 2003.

MOHUTSKY, M. A.; WRIGHTON, S. A.; RING, B. J. In vitro metabolism: subcellular fractions. In: PEARSON, P. G.; WIENKERS, L. C. **Handbook of drug metabolism**. 2nd. ed. New York: Informa Healthcare, v. 186, 2008. Cap. 17, p. 445-458.

MOREIRA, F. L. In vitro metabolism studies of natural products are crucial in the early development of medicines. **Phytochem Rev**, v. 16, p. 355-373, 2017.

MOYSES NETO, M. et al. Intoxication by star fruit (*Averrhoa carambola*) in 32 uraemic patients: treatment and outcome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 120-125, 2003.

MOYSES NETO, M.; ROBL, F.; COUTINHO NETTO, J. Intoxication by starr fruit (*Averrhoa carambola*) in six dialysis patients? (Preliminary report). **Nephrol Dial Transplant**, v. 13, p. 570-572, 1998.

MOYSES-NETO, M. et al. Star fruit: simultaneous neurotoxic and nephrotoxic effects in people with previously normal renal function. **NDT Plus** v. 2, p. 485-488, 2009.

MUIR, C. K.; LAM, C. K. Depressant action of *Averrhoa carambola*. **Med J Malaysia**, v. 34, n. 3, p. 279-280, Mar. 1980.

MUTHU, N. et al. Nutritional, Medicinal and Toxicological Attributes of Star-Fruits (*Averrhoa carambola* L.): A Review. **Bioinformation** v. 12, n.12, p. 420-424, 2016.

NASSAR, A.E. F.; TALAAT, R. E. Strategies for dealing with metabolite elucidation in drug discovery and development. **DDT**, v. 9, n. 7, p. 317-327, 2004.

OLIVEIRA, E. S. M. D.; AGUIAR, A. S. D. Por que a ingestão de carambola é proibida para pacientes com doença renal crônica? **J Bras Nefrol**, v. 37, n. 2, p. 241-247, 2015.

OLIVEIRA, M. T. R. et al. Características biométricas e físico-químicas do fruto, morfologia da semente e da plântula de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). **Rev Bras Sementes**, v. 33, n. 2, p. 251-260, 2011.

PAVARINI, D. P. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Anim Feed Sci Technol**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PIGATTO, M. C. **Avaliação farmacocinética e do metabolismmo in vivo e in vitro do candidato a antitumoral AC04**. Dissertação - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

PIGATTO, M. C. et al. Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. **Eur J Med Chem**, v. 46, p. 4245-4251, 2011.

PRATI, P.; NOGUEIRA, J. N.; DIAS, T. S. Avaliação de carambola L. dos tipos doce e ácido para o processamento de fruta em calda. **B CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 221-246, 2002.

QUINTILIANO, S. A. P. **Reações de álcoois homoalílicos com tálio (III), iodo e iodo hipervalente, dicloração de cetonas e estudos visando à síntese total da caramboxina**. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

ROCHA, B. A. et al. In vitro metabolism of monensin A: microbial and human liver microsomes models. **Xenobiotica**, v. 44, n. 4, p. 326-335, 2014.

SANTOS NETO, A. J. A importância do volume do misturador de solventes em HPLC gradiente. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 327-338, 2011.

SCARANELLO, K. L. et al. Carambola como causa de lesão renal aguda. **J Bras Nefrol**, v. 36, n. 2, p. 246-249, 2014.

SHUI, G.; LEONG, L. P. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. **J Chromatog A**, v. 1022, p. 67-75, 2004.

SILVA Jr, L. F.; VASCONCELOS, R. S.; LOPES, N. P. Application of high-resolution electrospray mass spectrometry for the elucidation of the disproportionation reaction of iodobenzene diacetate. **Int J of Mass Spectrom**, v. 276, n. 1, p. 24-30, 2008.

SIMAS, E. R. **Síntese, caracterização e estudo das propriedades fotofísicas de um copolímero derivado de quinolina**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

STOCK, R. I. **Síntese de (e)-4-(estiril)fenóis nitro-substituídos e aplicações como sondas na investigação da polaridade de solventes puros, de misturas binárias de solventes e da micropolaridade de ciclodextrinas**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 2014)

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Nat Prod Rep**, v. 33, p. 1044-1092, 2016.

THOMAS, S. et al. Pharmaconostic evaluation and physicochemical analysis of Averrhoa carambola L. fruit. **J Herb Med Toxicol**, v. 2, n.2, p. 51-54, 2008.

TURSKI, L. et al. Seizures produced by pilocarpine: neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain. **Brain Res**, v. 398, p. 37-48, 1986.

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. **Quim Nova**, v. 35, n. 8, p. 1593-1599, 2012

WU, C. C. et al. Star fruit induced neurotoxicity in two patients with chronic renal failure. **J Med Sci**, v. 22, p. 75-78, 2002.

ZHANG, J. et al. Remarkable fluorescence change based on the protonation–deprotonation control in organic crystals. **Chem Commun**, v. 49, p. 3878-3880, 2013.