

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo*

Ivanildes Vasconcelos Rodrigues

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia
Orientado (a): Ivanildes Vasconcelos Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 11/08/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2014

FICHA CATALOGRAFICA

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.

Rodrigues, Ivanildes Vasconcelos

Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo*. Ribeirão Preto, 2014.

122p.: il; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine

1. Produtos naturais. 2. Triterpenos. 3. α , β -amirinas. 4. Validação bioanalítica. 5. Farmacocinética. 6. Nanoemulsões. 7. Eliminação biliar

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ivanildes Vasconcelos Rodrigues

Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia
Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais José Pinto Brandão e Maria Iris de Vasconcelos Brandão que desde muito cedo me ensinaram o valor do conhecimento;

Ao meu marido Antônio José da Cunha Rodrigues, meu porto seguro em todos os momentos;

Aos meus mestres Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos e Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira com quem muito aprendi durante esses anos de orientação;

Com amor e admiração, dedico.

AGRADECIMENTOS

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão.”
Jean de La Bruyère

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida por conceder-me saúde e graça para realizar os propósitos que me foram designados. E ao Espírito Santo de Deus pelos dons da fortaleza, da sabedoria, da ciência, do entendimento, da piedade e do temor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, com grande admiração e orgulho, que além da amizade me proporcionou durante esses anos condições plenas para o desenvolvimento desse trabalho. Tê-lo como orientador e mestre foi o melhor presente que poderia ter recebido e ter o privilégio de conviver com você não teve preço e valeu todo o sacrifício. Espero ter conseguido alcançar suas expectativas. E sempre levarei comigo seu exemplo de pessoa, pesquisador e professor.

Ao amigo e co-orientador Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza e família, com quem muito aprendi desde os tempos do mestrado. Pela amizade, pela torcida, pelas orientações, pelas conversas e em especial pela confiança de que eu era capaz e por ter me dado de presente um orientador como eu tive neste trabalho.

Aos colaboradores deste projeto: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos por me permitir caminhar por caminhos antes desconhecidos e com quem muito aprendi sobre a nanotecnologia e ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira por sempre estar disposto a me ajudar em todos os momentos necessários para o desenvolvimento e validação dos métodos e que me ensinou que o trabalho de validação era árduo mas era preciso ter paciência pois iria dar certo.

Aos funcionários, alunos e professores do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos, com quem muito aprendi durante minha permanência em Ribeirão Preto. À Izabel Cristina Casanova Turatti, meu maior e eterno agradecimento! Cris, sem você nada deste trabalho teria sido possível! Obrigada por acompanhar com cuidado e zelo todas as análises em CG-EM realizadas neste trabalho e pela atenção em ajudar-me sempre que necessário. Sua dedicação é um exemplo para todos nós! Obrigada pelos ensinamentos, pelas discussões, pela orientação, pela amizade, pela torcida!

Aos amigos que fiz em Ribeirão Preto, em especial a Leandro de Santis Ferreira, Maria Elvira Polleti Martucci, Dayana Rúbio Gouvea, Gabriela Amaral Buqui, Thamara Oliveira Araújo, Maria Juliana Ferreira Caliman, Sandra Mara Burin e Aline Akemi Ishikawa. Também ao grupo “Amigos da fotografia USP” em especial a Luiza da Costa Venâncio que tornaram meus últimos meses em Ribeirão Preto muito mais agradáveis. Agradeço também aos amigos que reencontrei em Ribeirão Preto: Naira Rezende Maciel, Rodrigo Moreira da Silva, Patrícia Leme Goto, Juliana Neves de Paula e Souza por não me deixarem esquecer que a amizade que nasce em Ouro Preto não morre jamais!

À Lorena Rocha Ayres, pela hospedagem durante meus primeiros meses em Ribeirão Preto e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (CiPharma), em especial aos Laboratório de Farmacognosia, Laboratório de Pesquisas Clínicas e ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanobiotecnologia por permitirem a utilização das instalações para que parte deste trabalho fosse desenvolvido.

À Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro, como coordenadora do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto e a todos os funcionários, em especial a Erika Cristina da Silva Oliveira e Renata Alves de Oliveira Castro por disponibilizarem os animais para realização deste trabalho. Agradeço também à Profa. Cláudia pela atenção em ajudar sempre que necessário, permitindo a utilização do Laboratório de Pesquisas Clínicas.

Ao Prof. MSc. Aureliano Claret da Cunha por disponibilizar o Laboratório de Bromatologia da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto para que as análises de caracterização da formulação fossem realizadas.

Às amigas que auxiliaram na realização do isolamento das substâncias Tatiane Roquete Amparo e Ana Cláudia Gonçalves Silva (vocês foram essenciais e são minhas pupilas!), no desenvolvimento da formulação Simone Pinto Carneiro e na realização dos experimentos em animal Janaína Brandão Seibert. Aliás, Jana, à você tenho que agradecer pela ajuda em todos os momentos! Obrigada pela companhia, pela amizade, pelas conversas, pelas risadas e pelo trabalho duro até pelas madrugadas! Além daqueles que auxiliaram sempre que foi necessário, em especial a Carolina Morais Araújo e Luísa Helena Perin de Melo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da FCFRP-USP pelo papel que desempenharam no meu doutoramento, em especial aos professores João Luís Callegari Lopes e Leonardo Gobbo Neto por permitirem a realização do estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

Aos meus pais José Pinto Brandão e Maria Iris de Vasconcelos Brandão que sempre estiveram presentes e sempre me incentivaram a estudar dizendo sempre que a única coisa que não poderiam me tomar era o conhecimento! Sei que se orgulham do que me tornei! E nem com minha vida seria possível pagar a gratidão que sinto por tê-los como pais! Obrigada por me ensinarem a ser quem eu sou e por se esforçarem tanto para que eu pudesse ter “estudado”.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, em especial ao meu padrinho Carlos Alberto Silva e família pelas orações e pela torcida. Ao meu pai-irmão Ricardo Vasconcelos Brandão e à minha irmã Magda Vilma Vasconcelos Brandão e suas famílias. Obrigada por cuidarem da mamãe em um momento tão difícil e por aceitarem o fato de eu não poder estar por perto.

À minha família de coração República Querubim: ex-alunas, moradoras e homenageados.

A Antônio Rodrigues e Maria das Graças da Cunha Rodrigues e família. Que me acolheram como filha, que aceitaram minha distância, que torceram para que tudo ocorresse da melhor forma possível. Obrigada pelas orações, pelo carinho e apoio. Em especial a minha cunhada Ana Rita Faria, que me permitiu mesmo de longe acompanhar o crescimento da sua pequena, enviando-me fotos e vídeos que preenchiam muitos momentos de desânimo e tristeza.

Ao meu marido e melhor amigo, Antônio José da Cunha Rodrigues, que sempre esteve comigo, mesmo com a distância. Obrigada por ter suportado três anos de ausência, estresse e desespero e por me acalmar quando preciso. Obrigada por confiar em mim, por me acompanhar no laboratório, mesmo nos fins de semana e feriados. Obrigada por permitir que eu faça parte de sua vida. Sem você não teria suportado todas as tempestades, e sabemos que foram tantas. Mas na graça de Deus estamos colhendo os frutos de muito esforço. Amo você plenamente! Esta conquista também é sua!

Ao CNPq (CNPq 143465/2011-2) pela bolsa concedida.

À CAPES, FAPESP (2009/51812-0) e INCT-If pelo suporte financeiro.

“Science can be mastered from books only at the most elementary level. For the journey to the frontiers of knowledge, an experienced and willing master needed as a guide”

***Ernest Borek
1912-1986***

RESUMO

RODRIGUES, I. V. Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo*. 2014. 122f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A mistura triterpênica α e β -amirinas é comumente encontrada em quantidades significativas em espécies do gênero *Protium* (Burseraceae) e possuem reconhecidas atividades anti-inflamatória, hepatoprotetora, gastroprotetora e analgésica, dentre outras. Entretanto, pouco se sabe sobre sua farmacocinética e metabolismo. Neste sentido, esta tese teve o objetivo de desenvolver metodologias bioanalíticas para determinar a farmacocinética e a eliminação de α e β -amirinas isoladas de *P. spruceanum* bem como avaliar o metabolismo *in vitro* destes triterpenos. A mistura de α e β -amirinas foi isolada em grau de pureza cromatográfica acima de 99%. Foi desenvolvida e caracterizada uma nanoemulsão do tipo O/A contendo α e β -amirinas a fim de viabilizar a administração por vias oral e endovenosa e realizar os estudos de disposição cinética dessas substâncias em camundongos. O tamanho médio das partículas da nanoemulsão foi de $103,5 \pm 0,44$ nm, com porcentagem de encapsulação de acima de 99%. Os estudos de liberação *in vitro* mostraram baixa taxa de liberação após 24 horas. A avaliação da disposição cinética de α e β -amirinas em camundongos mostrou que após administração oral a suspensão de CMC não foi absorvida, entretanto a nanoemulsão contendo as substâncias foi absorvida e a biodisponibilidade oral de α e β -amirinas foi de $1,03 \pm 0,08$ e $1,56 \pm 0,24\%$, respectivamente. O V_d foi elevado e a $T_{1/2}$ foi de $2,61 \pm 0,15$ e $2,57 \pm 0,07$ horas, respectivamente. O Cl_B mostrou-se elevado, comparado ao Cl_R . Após administração oral da nanoemulsão, praticamente toda a mistura foi eliminada inalterada nas fezes devido a baixa absorção. Entretanto, após administração endovenosa cerca de 50% da mistura foi eliminada inalterada pela via biliar. Estudos de eliminação renal de α e β -amirinas mostraram que apenas cerca de 0,2% das substâncias foram eliminadas por via renal após administração endovenosa. O fenômeno Flip-Flop ocorreu para a via extravascular utilizada. Os resultados da eliminação parcial e de baixa liberação *in vitro* sugerem que após administração endovenosa da nanoemulsão pode ocorrer acúmulo extravascular dos compostos, corroborando com altos V_d . As reações biomiméticas de oxidação de α e β -amirinas mostraram baixa taxa de degradação. Apenas um metabólito putativo foi encontrado, entretanto, não foi possível observá-lo nas matrizes biológicas analisadas.

Palavras-chave: produtos naturais; triterpenos; α , β -amirinas; validação bioanalítica; farmacocinética; nanoemulsões; eliminação biliar

ABSTRACT

RODRIGUES, I. V. Developmnet and validation of bioanalytical method for pharmacokinetic disposition of a binary mixture of pentacyclic triterpenes and their metabolites *in vivo*. 2014. 122f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The triterpene mixture of α and β -amyryns is generally found in significant amounts in *Protium* species (Burseraceae). They have known biological activities as anti-inflammatory, hepatoprotective, gastroprotective and antinociceptive effects among others. However, their pharmacokinetics and metabolism are practically unknown. The purpose of this thesis was to develop bioanalytical methodologies to perform pharmacokinetic and elimination studies of α and β -amyryns from *P. spruceanum* as well as to evaluate *in vitro* metabolism of these triterpenes. The mixture of α and β -amyryns was isolated with chromatography purity above 99%. One α and β -amyryns loaded O/W nanoemulsion was developed and characterized to enable the intravenous and oral administration and to performed pharmacokinetic studies of these compounds in mice. The average particle size was 103.5 ± 0.44 nm and the encapsulation efficiency was higher than 99%. *In vitro* release study demonstrated low release rater after 24 hours. The pharmacokinetics studies of α and β -amyryns indicated CMC suspension was not absorbed, however α and β -amyryns loaded O/W nanoemulsion was poorly absorbed and bioavailability was 1.03 ± 0.08 and $1.56 \pm 0.24\%$ respectively. The V_d was high and $T_{1/2}$ was 2.61 ± 0.15 e 2.57 ± 0.07 hours respectively. The Cl_B was high compared to Cl_R . After oral administration almost all α and β -amyryns were eliminated unchanged in faeces due to low absorption. However, after intravenous administration about 50% was excluded unchanged by biliar excretion pathway. Studies of α and β -amyryns renal elimination directed only 0.2 % were removed unchanged by renal pathway after intravenous administration. The Flip-Flop phenomenon was happen when α and β -amyryns was dispensed by extravascular via. The partial biliar excretion *in vivo* and low release rate *in vitro* suggests α and β -amyryns could be stored after nanoemulsion intravenous administration confirming high V_d . The biomimetic reactions of oxidation of α and β -amyryns showed low degradation rate and only one metabolite was found however it was not detected in biological samples.

Keywords: natural products; triterpenes; α , β -amyryns; bioanalytical validation; pharmacokinetic; nanoemulsion; biliar excretion

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Protium spruceanum</i> Benth. Engler. À esquerda folhas e frutos; à direita árvore	3
Figura 2: Somatório do número de artigos no período de 10, 5 anos e de 2013 a 2014 para os termos “pharmacokinetic”, “ <i>in vivo</i> metabolism” e “ <i>in vitro</i> metabolismo”	4
Figura 3: Resultados de número de artigos encontrados para pesquisa no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed para a cada subclasse dos terpenos.	5
Figura 4: Resultados do somatório do número de artigos encontrados para pesquisa no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed da classe dos terpenos.....	6
Figura 5: Estruturas químicas de alguns monoterpênicos	8
Figura 6. Estruturas químicas de alguns sesquiterpênicos.....	10
Figura 7: Estruturas químicas de dois diterpênicos importantes e amplamente estudados.....	11
Figura 8: Saponinas triterpênicas relatadas por Tao e colaboradores	12
Figura 9: Estruturas químicas de alguns triterpênicos e saponinas	14
Figura 10: Estruturas químicas de α (A) e β (B) amirinas.....	19
Figura 11: Análise por CG-EM da mistura de α e β -amirinas isolada a partir de folhas de <i>P. spruceanum</i>	22
Figura 12: Cromatogramas obtidos para o método de quantificação de α e β -amirina em fezes de camundongos.	46
Figura 13: Cromatogramas obtidos para o método de quantificação de α e β -amirina em plasma de camundongos.	51
Figura 14: A – Cromatogramas obtidos para o método de quantificação de α e β -amirina em urina de camundongos	53
Figura 15: Fórmula estrutural de metaloporfirinas.....	57
Figura 16: Resultados das análises em CG-DIC para o ensaio de reações biomiméticas de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e <i>m</i> -CPBA como oxidante.	60
Figura 17: Análises em CG-EM para o ensaio de reações biomiméticas de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e <i>m</i> -CPBA como oxidante.	60
Figura 18: Resultados das análises em CG-EM para os controles do monitoramento das reações biomiméticas de oxidação de amirinas	62

Figura 19: Análises em CG-EM para o ensaio de reações biomiméticas de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e <i>m</i> -CPBA como oxidante	62
Figura 20: Análises em CG-EM para o ensaio de reações biomiméticas de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e <i>m</i> -CPBA como oxidante	63
Figura 21: Resultados de disposição cinética e eliminação biliar e renal para α -amirina após administração oral (v.o.) ou endovenosa (v.iv.) em camundongos.....	73
Figura 22: Resultados de disposição cinética e eliminação biliar e renal para β -amirina após administração oral (v.o.) ou endovenosa (v.iv.) em camundongos.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tamanho médio de partículas e índice de polidispersão para as duas proporções de óleo de soja avaliadas.	29
Tabela 2: Tamanho médio de partículas e índice de polidispersão para a formulação contendo ativo 0, 7, 14 e 365 dias após o preparo.....	31
Tabela 3: Resultados de Precisão, Exatidão intraensaio para Análise de α e β -amirina por CLAE-DAD	32
Tabela 4: Resultados de Precisão, Exatidão interensaio para Análise de α e β -amirina por CLAE-DAD	32
Tabela 5: Porcentagem de Encapsulação para α e β Amirina	32
Tabela 6: Média da solubilidade em porcentagem (%) para os meios testados	33
Tabela 7: Resultados em porcentagem de ativo remanescente no ensaio de liberação após 24 horas.	35
Tabela 8: Métodos de extração dos analitos testados para a matriz biológica plasma.	41
Tabela 9: Otimização do método de análise de α e β -amirinas em plasma de camundongos.....	42
Tabela 10: Resultados de Linearidade para Análise das α - e β -amirina em fezes de camundongos.....	47
Tabela 11: Resultados de Precisão, Exatidão intraensaio para Análise das α e β -amirina em fezes de camundongos.....	47
Tabela 12: Resultados de Precisão, Exatidão interensaio para Análise das α - e β -amirina em fezes de camundongos.....	47
Tabela 13: Resultados de Estabilidade para Análise das α e β -amirina em fezes de camundongos.....	48
Tabela 14: Resultados de Linearidade para Análise de α e β -amirina em plasma de camundongos.....	51
Tabela 15: Resultados de Precisão, Exatidão intraensaio para Análise de α e β -amirina em plasma de camundongos.....	51
Tabela 16: Resultados de Precisão, Exatidão interensaio para Análise de α e β -amirina em plasma de camundongos.....	52
Tabela 17: Resultados de Estabilidade para Análise das α e β -amirina em fezes de camundongos.....	52

Tabela 18: Resultados de Precisão, Exatidão intraensaio para Análise das α e β -amirina em urina de camundongos	54
Tabela 19: Possíveis produtos formados pela reação biomimética de metabolismo de amirinas com catalisador FeTFPP e oxidante <i>m</i> -CPBA	61
Tabela 20: Características dos sinais cromatográficos na reação biomimética de metabolismo de amirinas com catalisador FeTFPP e oxidante <i>m</i> -CPBA após 24 horas	63
Tabela 21: Características dos sinais cromatográficos na solução de amirinas	63
Tabela 22: Parâmetros de Disposição Cinética para α e β -amirinas em camundongos	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Protocolo de Extração das Amostras de Fezes.....	45
Quadro 2: Protocolo de Extração das Amostras de Plasma	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

®	Marca Registrada
Δ	delta
α	alfa
β	beta
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
AG	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
ASC	Área Sob a Curva
ASC _{0-24h}	Área Sob a Curva de 0 a 24 horas
ASC _{0-inf}	Área Sob a Curva de 0 a infinito
BSTFA	N, O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CG-DIC	Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CiPharma	Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
Cl _B	<i>Clearance</i> Biliar
Cl _R	<i>Clearance</i> Renal
Cl _T	<i>Clearance</i> Total
C _{max}	Concentração Máxima Alcançada
CMC	Carboximetilcelulose
C _p	Concentração Plasmática
CQA	Controle de Qualidade em Alta Concentração
CQB	Controle de Qualidade em Baixa Concentração
CQM	Controle de Qualidade em Média Concentração
CYP450	Citocromo P450
DPR	Desvio Padrão Relativo
EF/UFOP	Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto
EFS	Extração em Fase Sólida
ELL	Extração Líquido Líquido
EPR	Erro Padrão Relativo
F	Biodisponibilidade
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FeTFPP	meso tetraquis (pentafluorofenil) porfirina de ferro III
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
<i>g</i>	Aceleração Gravitacional
g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
K ₂ CO ₃	Carbonato de Potássio
K _a	Constante de Absorção
kDa	Quilodalton
K _{el}	Constante de Eliminação
kg	Quilogramas
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
Ln	Logaritmo Natural

LSQ	Limite Superior de Quantificação
m	Metro
<i>m/z</i>	Razão Massa Carga
<i>m</i> -CPBA	Ácido 3-cloroperoxibenzóico
mg	Miligramas
MG	Minas Gerais
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRT	Tempo de Residência Médio (do inglês <i>Media Residence Time</i>)
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
ng	Nanograma
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
nm	Nanômetro
O/A	Óleo em Água
°C	Graus Celsius
<i>p/p</i>	Peso por Peso
PhIO	Iodosilbenzeno
PI	Padrão Interno
rpm	Rotações por Minuto
SE	Solução Estoque
$T_{1/2}$	Meia Vida de Eliminação
$T_{1/2a}$	Meia Vida de Absorção
$T_{1/2el}$	Meia Vida de Eliminação
<i>t</i> -BuOOH	Terc-butil-hidroperóxido
T_{max}	Tempo para Concentração Máxima
TMCS	Trimetilclorosilano
TR	Tempo de Retenção
USP	Universidade de São Paulo
v.iv.	Via Endovenosa
v.o.	Via Oral
<i>v/v</i>	Volume por Volume
V_d	Volume de Distribuição
vs	<i>versus</i>

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS	viii
Capítulo 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Introdução.....	2
1.2 Protium spruceanum.....	2
1.3 O Estado da Arte da Farmacocinética e Metabolismo de Terpenos.....	4
1.3.1 Monoterpenos.....	6
1.3.2 Sesquiterpenos.....	8
1.3.3 Diterpenos.....	10
1.3.4 Triterpenos.....	11
Capítulo 2 - OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
Capítulo 3 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MISTURA BINÁRIA DE ALFA E BETA AMIRINAS	17
3.1 Introdução.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	20
3.3 Materiais e Métodos.....	20
3.4 Resultados e Discussão.....	21
3.5 Conclusões.....	23
Capítulo 4 - DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO ALFA E BETA-AMIRINAS	24
4.1 Introdução.....	25
4.2 Objetivos Específicos.....	26
4.3 Materiais e Métodos.....	26
4.3.1 Desenvolvimento da Nanoemulsão.....	26
4.3.2 Caracterização da Nanoemulsão.....	27
4.4 Resultados e Discussão.....	29

4.4.1 Desenvolvimento e Caracterização da Nanoemulsão.....	29
4.5 Conclusões.....	36
Capítulo 5 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALFA E BETA-AMIRINAS.....	37
5.1 Introdução	38
5.2 Objetivos Específicos	38
5.3 Materiais e Métodos	39
5.3.1 Protocolo de Coleta das Matrizes Biológicas	39
5.3.2 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Fezes de Camundongos.....	39
5.3.3 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Plasma de Camundongos	40
5.3.4 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Plasma de Camundongos	43
5.4 Resultados e Discussão.....	44
5.4.1 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Fezes de Camundongos.....	44
5.4.2 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Plasma de Camundongos	48
5.4.3 Desenvolvimento e Validação do Método de Quantificação de α e β -amirinas em Urina de Camundongos	53
5.5 Conclusões.....	54
Capítulo 6 - REAÇÕES BIOMIMÉTICAS DE OXIDAÇÃO DE ALFA E BETA AMIRINAS USANDO METALOPORFIRINAS.....	55
6.1 Introdução	56
6.2 Objetivos Específicos	58
6.3 Materiais e Métodos	58
6.3.1 Reações Preliminares de Metabolismo in vitro	58
6.3.2 Monitoramento da Reação.....	59
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
6.4.1 Reações Biomiméticas Preliminares de Metabolismo in vitro	59
6.4.2 Monitoramento da Reação.....	61
6.5 Conclusões.....	64

Capítulo 7 - DISPOSIÇÃO CINÉTICA E ELIMINAÇÃO DE ALFA E BETA AMIRINAS	65
7.1 Introdução	66
7.2 Objetivos Específicos	68
7.3 Materiais e Métodos	68
7.3.1 Animais experimentais	68
7.3.2 Administração e coleta de amostras	69
7.3.3 Preparo das amostras para análise	70
7.3.3 Cálculo dos Parâmetros Farmacocinéticos	70
7.3.4 Análises Estatísticas	71
7.4 Resultados e Discussão	71
7.4.1 Disposição Cinética da Nanoemulsão contendo α e β -amirinas	71
7.5 Conclusões.....	78
Capítulo 8 - CONCLUSÕES.....	79
Capítulo 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS	99

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

Nesta tese são apresentados os resultados obtidos durante desenvolvimento do projeto de doutorado intitulado “Desenvolvimento e Validação de um Método Bioanalítico para Avaliação Farmacocinética de uma Mistura Binária de Triterpenos Pentacíclicos e de seus Metabólitos *in vivo*” desenvolvido no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob orientação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Ela está dividido em capítulos segundo a cronologia dos experimentos realizados.

Neste primeiro capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica geral sobre o material vegetal utilizado e sobre o estado da arte da farmacocinética e do metabolismo *in vivo* e *in vitro* de terpenos.

No segundo capítulo serão apresentados os objetivos desta tese. No terceiro capítulo, intitulado “Isolamento e Identificação da Mistura Binária de Alfa e Beta Amirinas” serão descritos metodologia e resultados obtidos para o isolamento dos terpenos foco desta tese. No quarto capítulo serão apresentado o desenvolvimento e a caracterização da formulação que foi utilizada nos ensaios *in vivo*. No quinto capítulo serão descritos o desenvolvimento e a validação de métodos para quantificação de α e β -amirinas nas matrizes biológicas fezes, plasma e urina. Em seguida será relatada a etapa de reações biomiméticas preliminares de oxidação utilizando metaloporfirinas. No sétimo capítulo, serão apresentados os resultados de disposição cinética e eliminação de α e β -amirinas em camundongos.

Para finalizar, serão apresentadas as conclusões deste trabalho, seguida das Referências Bibliográficas e dos Anexos.

1.2 *Protium spruceanum*

A espécie *Protium spruceanum* Benth. Engler (Fig. 1), pertencente à família Burseraceae (tribo Protieae) é encontrada em florestas tropicais úmidas como a Atlântica e Amazônica principalmente no interior de matas ciliares ou em solos encharcados. É uma espécie arbórea semidecídua conhecida popularmente como almécega de casca lisa ou breu. Sua floração ocorre entre os meses de setembro e outubro e a frutificação inicia-se geralmente em setembro. As flores são dispostas

em inflorescências unissexuadas do tipo panículos ramosas axilares e os frutos são compostos por baga subglobosa de superfície lisa e brilhante, de cor vermelha contendo até 2 sementes envoltas por um arilo fino e adocicado que é apreciado pela avifauna (LOBO-FARIA, 1998; VIEIRA, 2005).



Figura 1. Exemplar de *Protium spruceanum* Benth. Engler. À esquerda folhas e frutos; à direita árvore. (Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza)

Existem poucos relatos na literatura sobre a espécie. A maioria deles relata relações de ecologia com o ecossistema nas regiões de Itumirim-MG (LOSCHI *et al.*, 2013), de Lavras-MG (VIEIRA, DE CARVALHO, 2008) na Mata Atlântica (VIERA *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2009) e no Sudeste brasileiro (VAN-DER-BERG, *et al.*, 2012).

Com relação aos estudos fitoquímicos e farmacológicos da espécie, apenas foram realizados três estudos. O componente majoritário dos óleos essenciais de folhas, ramos, casca, frutos e resina de *P. spruceanum* foram sabineno em folhas, ramos e cascas, embora limoneno tenha sido encontrado em maior quantidade nos frutos (ZOGHBI *et al.*, 2002). Estudos de variação sazonal de óleos essenciais de diferentes partes da planta evidenciaram variações sazonais de composição e rendimento de óleo essencial ao decorrer do período analisado (MACHADO *et al.*, 2003). Recentemente foi relatada atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em camundongos de extrato bruto e frações hexânica e metanólica de *P. spruceanum* em doses acima de 200 mg/kg. As atividades do extrato e da fração hexânica foram atribuídas à mistura triterpênica α e β -amirinas. Também foi relatada baixa toxicidade aguda para o extrato em doses até 6g/kg (RODRIGUES *et al.*, 2013).

1.3 O Estado da Arte da Farmacocinética e Metabolismo de Terpenos

Os terpenos são compostos pertencentes a uma importante classe de metabólitos secundários produzidos principalmente por plantas e são bastante importantes e comumente encontrados. Podem ser formados por duas vias biossintéticas, a saber, a via clássica do Mevalonato ou a via da DOXP/MEP ou Rohmer (SCHMIDT *et al.* 2012, GONZALÉZ-BURGOS & GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012). Ambas as vias conduzem a união de unidades de isoprênicas (C5) para construção das subclasses terpênicas (SCHMIDT *et al.* 2012).

Este grupo de Produtos Naturais possuem mais de 40 mil compostos e várias atividades biológicas tem sido relatadas para esta classe como antineoplásica, antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, antialérgica, antiespasmódica, hipolipêmica, anti-inflamatória, imunomoduladora dentre outra (TROPPI & BISHAYEE, 2011).

Baseado no número de unidades isoprênicas que os compõem, os terpenos podem ser divididos em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos > (C45). (GONZALÉZ-BURGOS & GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Na Figura 2 estão representados o somatório do número de artigos encontrados realizando uma pesquisa na literatura através do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> com os termos “pharmacokinetic”, “*in vitro* metabolism” e “*in vivo* metabolism”.

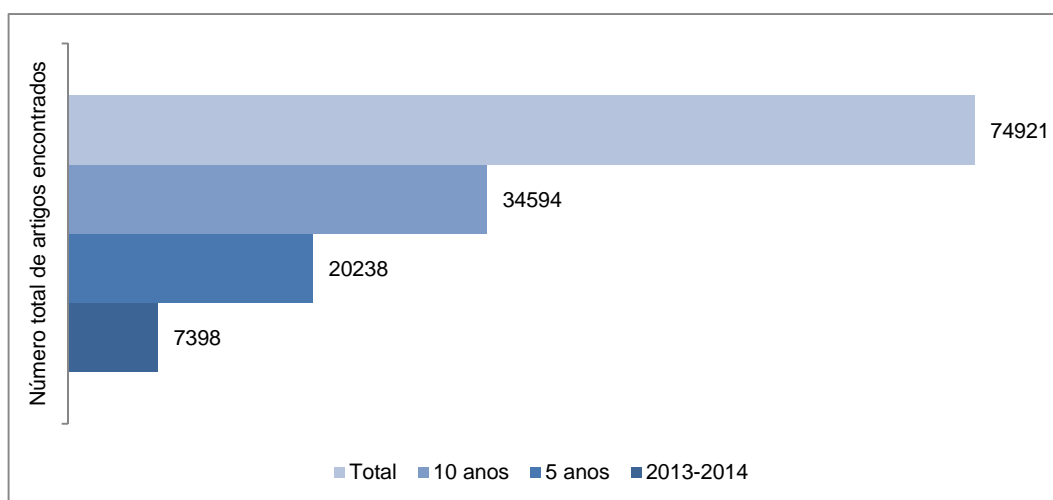


Figura 2: Somatório do número de artigos no período de 10, 5 anos e de 2013 a 2014 para os termos “pharmacokinetic”, “*in vivo* metabolism” e “*in vitro* metabolism”. Data da pesquisa: 26 de junho de 2014.

Já na Figura 3 estão representados os resultados de busca utilizando como termos ["subclasse" AND "pharmacokinetic"] ou ["subclasse" AND "*in vitro* metabolism"] ou ["subclasse" AND "*in vivo* metabolism"] e algumas variações.

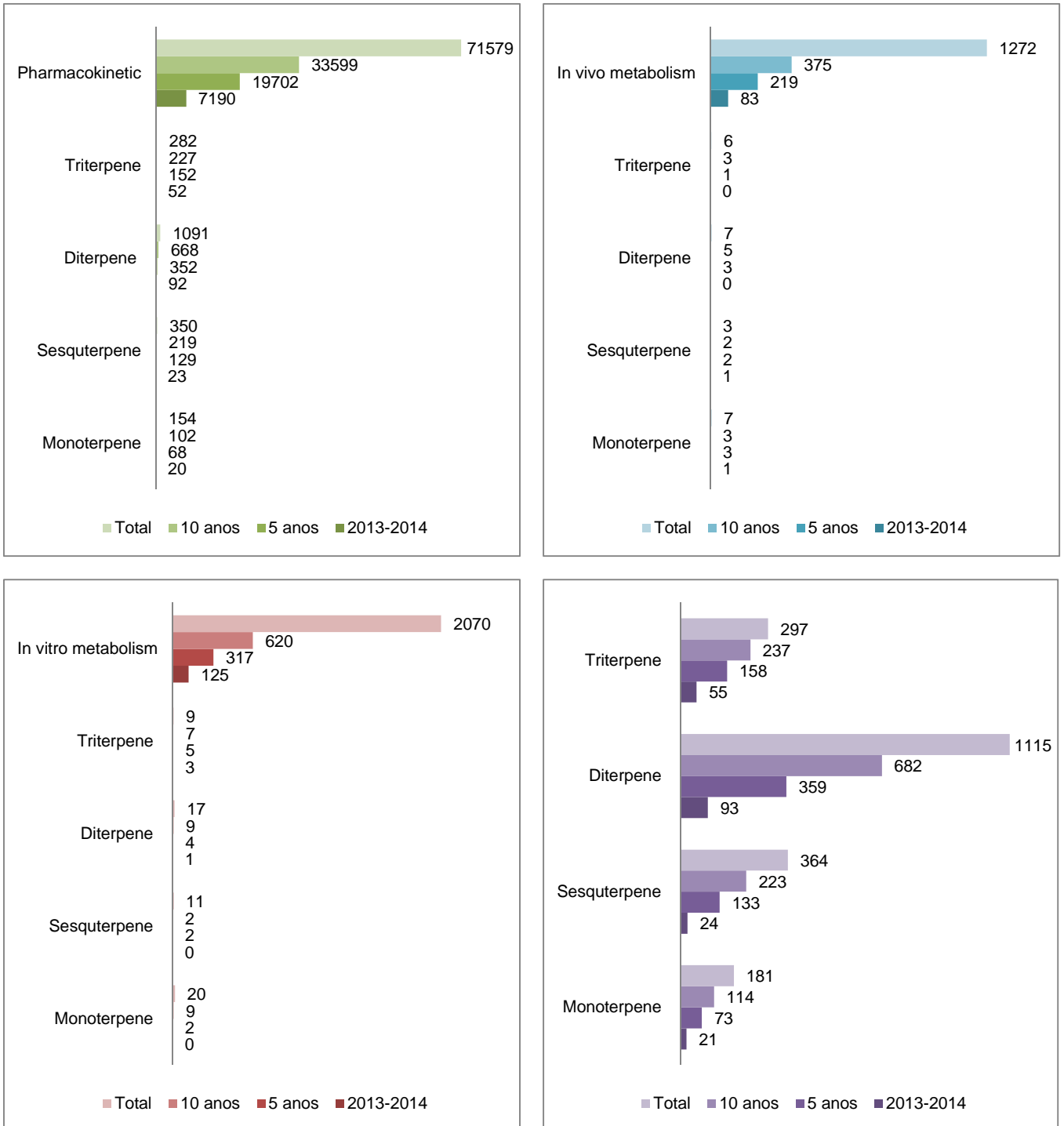


Figura 3: Resultados de número de artigos encontrados para pesquisa no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> para a cada subclasse dos terpenos. Número total de artigos e no período de 10, 5 anos e de 2013 a 2014. A - ["subclasse" AND "pharmacokinetic"]; B - ["subclasse" AND "*in vivo* metabolism"]; C - ["subclasse" AND "*in vitro* metabolism"]; D - Somatório dos artigos encontrados. Data da pesquisa: 26 de junho de 2014.

Os diterpenos são a subclasse com maior número de estudos relacionados ao seu metabolismo e farmacocinética (Fig 3-D). Apesar de não ser a maior subclasse ela é amplamente estudada especialmente pelo seu interesse farmacológico e pela disponibilização de alguns desses compostos já na terapia clínica (MIN, 2011).

Entretanto, como pode ser visualizado na Figura abaixo, menos de 3% dos estudos de farmacocinética, metabolismo *in vitro* ou *in vivo* estão relacionados a terpenos embora os produtos naturais tenham sido considerados a principal fonte de substâncias ativas na terapêutica nos últimos 30 anos uma vez que mais de 50% dos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration se relacionam com Produtos Naturais e caso sejam considerados os biológicos esse percentual passa de 65% (NEWMAN, CRAGG; 2012)

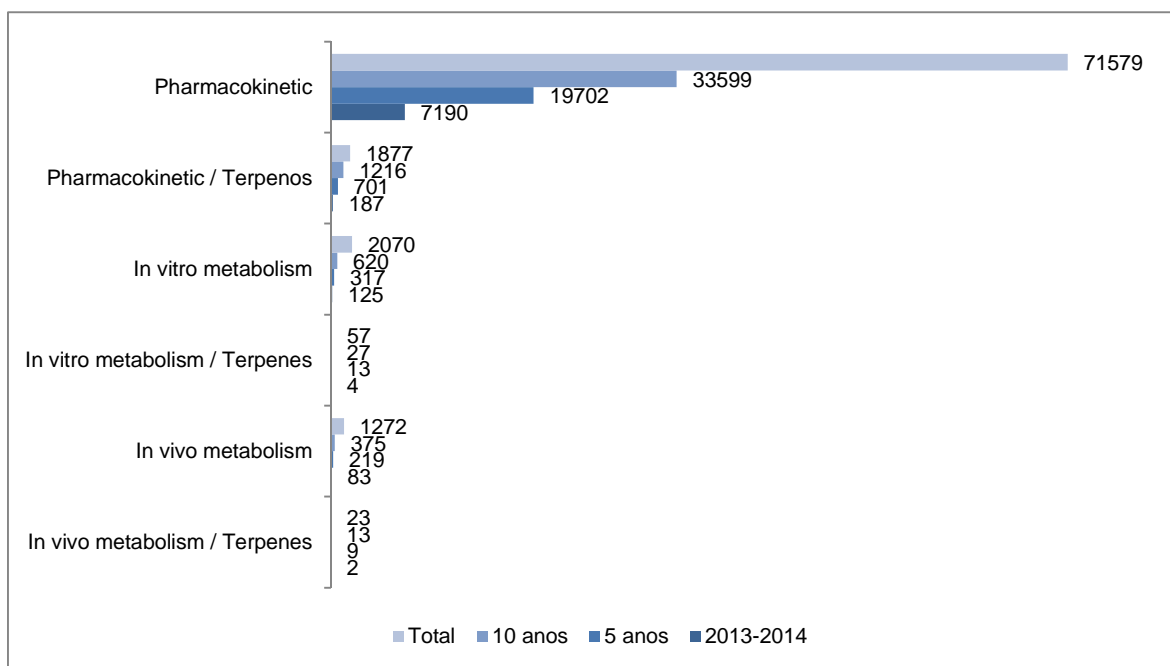


Figura 4: Resultados do somatório do número de artigos encontrados para pesquisa no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> da classe dos terpenos. Número total de artigos e no período de 10, 5 anos e de 2013 a 2014. Comparação entre os termos ["pharmacokinetic"] vs ["terpenes" AND "pharmacokinetic"]; ["*in vivo* metabolism"] vs ["terpenes" AND "*in vivo* metabolism"] e ["*in vitro* metabolismo"] vs ["terpenes" AND "*in vitro* metabolismo"]. Data da pesquisa: 26 de junho de 2014.

1.3.1 Monoterpenos

Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e possuem várias atividades biológicas como antimicrobiana, sedativa, antitumoral, citotóxica, anti-inflamatória dentre outras. Eles são comumente usados na produção

de medicamentos e cosméticos e perfumes devido ao seu odor agradável (ZHANG *et al.* [201-]).

Considerando a farmacocinética de monoterpenos, recentemente métodos foram desenvolvidos para quantificar borneol (1), isoborneol (2), canfora (3) em ratos (CHENG *et al.*, 2013) entretanto não foram realizados estudos farmacocinéticos detalhados dos compostos. Também existem relatos que condições patológicas aumentam o transporte de borneol pela barreira hematoencefálica (XU *et al.*, 2013) e que a presença deste composto aumenta a biodisponibilidade ocular de geniposideo (4) (SONG *et al.*, 2013). Outros estudos revelam que alterações patológicas também alteram os parâmetros farmacocinéticos após administração oral de paeoniflorina (5) (SUE *et al.*, 2013). Ervas contendo mentol (6) nas mesmas concentrações apresentaram o mesmo perfil farmacocinético, entretanto, em concentrações diferentes há diferença significativas nos parâmetros farmacocinéticos sugerindo cinética não linear (YANG *et al.*, 2013).

Os mais recentes relatos de metabolismo *in vivo* de monoterpenos referem-se a metabolismo de Δ^3 -careno (7) que mostram metabólitos *in vivo* de oxidações de carbonos alílicos (SCHMIDT *et al.*, 2014) e de verprosideo (8) relatando principalmente produtos de hidrólise e glucuronidação (KIM *et al.*, 2012).

Os últimos estudos publicados sobre metabolismo *in vitro* de monoterpenos relatam hidroxilações nas posições C6 ou C10 pelas isoformas CYP2A6 e CYP2B6 de (+)-fenchona (9) (MIYAZAWA, GYOUBU; 2006) e de (-)-fenchona (10) (MIYAZAWA, GYOUBU; 2007a) além da metabolização de (+)-fenchol (11) pelas isoformas CYP2A6 e CYP2B (MIYAZAWA, GYOUBU; 2007b). CYP2A6 mostrou-se a principal isoforma responsável pela hidroxilação de (-)-cânfora na posição C5 (GYOUBU, MIYAZAWA; 2007) assim como na hidroxilação de (+) e (-)-mentol (MIYAZAWA *et al.*, 2011).

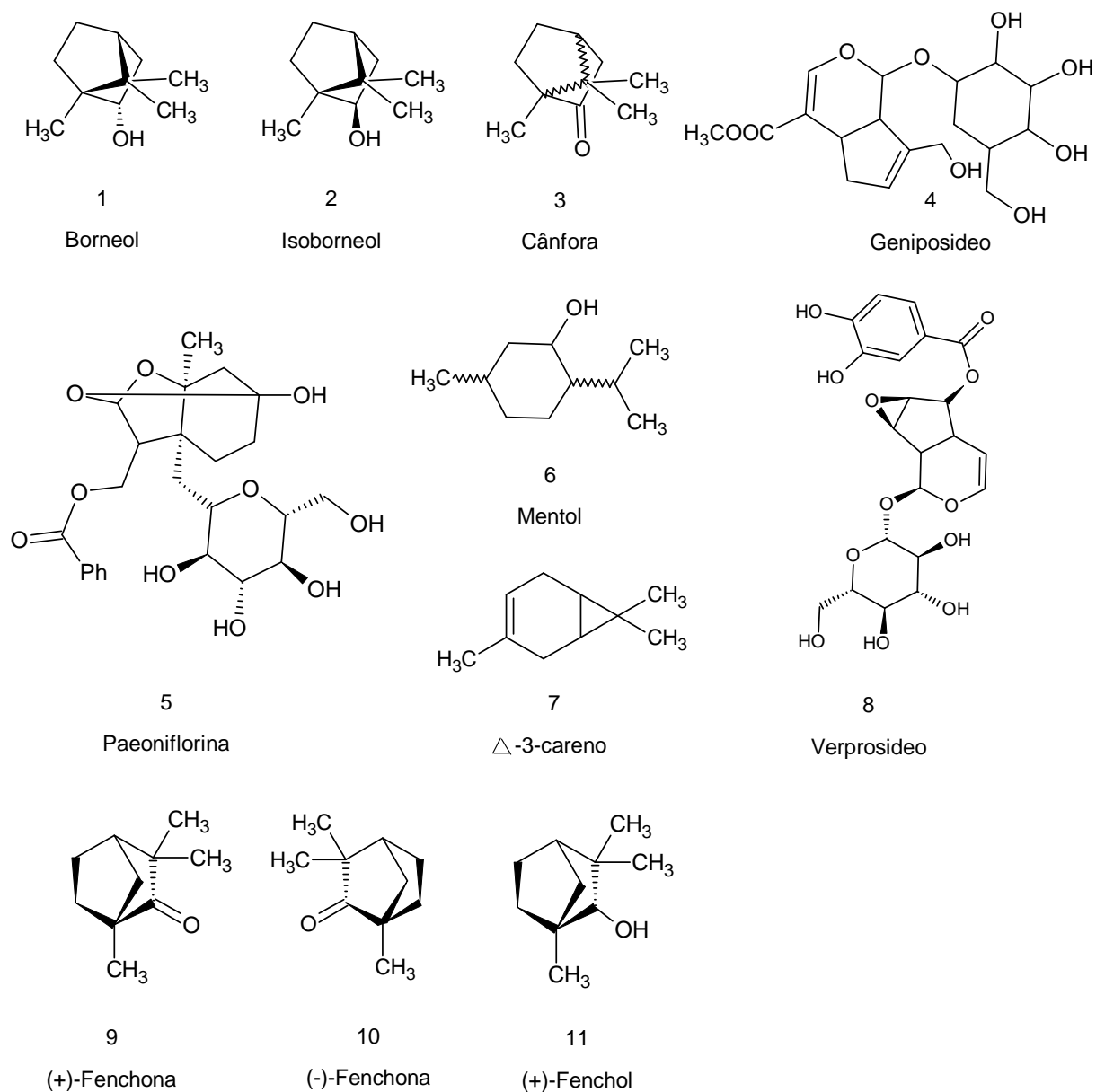


Figura 5: Estruturas químicas de alguns monoterpenos

1.3.2 Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos compõem a menor subclasse dos terpenos e possuem menos de mil compostos conhecidos. Possuem atividades como anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e podem ser encontrados em plantas superiores, fungos, insetos e esponjas. Esses compostos também possuem importante função ecológica de interação planta (HOG *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2011).

As duas classes de sesquiterpenos mais estudados com relação a farmacocinética e metabolismo são a toxina T-2 (12) e os derivados de artemisinina (13), este último especialmente pela utilização contra malária desde 1985 (LESKOVAC, THEOHARIDES; 1991).

Os parâmetros farmacocinéticos em grávidas de artemeter (14) e dihidroartemisinina (15) foram numericamente menores, comparados aos de pacientes não grávidas, entretanto, não houve diferença significativa entre a idade gestacional e estes parâmetros para dihidroartemisinina e artemeter (TARNING *et al.*, 2013). Recentemente dois artigos foram publicados com desenvolvimento de métodos para quantificação de lactonas sesquiterpênicas e aplicação em farmacocinética. Os resultados obtidos para xantatina (16) mostraram meia vida e eliminação curta sem diferenças significativas quando diferentes doses foram utilizadas demonstrando uma cinética de correlação linear por via endovenosa (YAN *et al.*, 2014).

Guo e colaboradores (2014) relataram a quantificação simultânea de isoalantolactona (17) e alantolactona (18) em ratos após administração pela via endovenosa evidenciando que as substâncias são distribuídas e eliminadas rapidamente e possuem meia vida de eliminação curta (GUO *et al.*, 2014).

Com relação a metabolismo de sesquiterpenos, recentemente Wu e colaboradores relataram que a hidroxilação de T-2 está relacionada à atividade de CYP3A29 e a hidrólise à carboxilesterases (WU *et al.*, 2011). A metabolização *in vitro* de artemisinina está relacionada a atividade de CYP2B6 (ASIMUS, ASHTON, 2009).

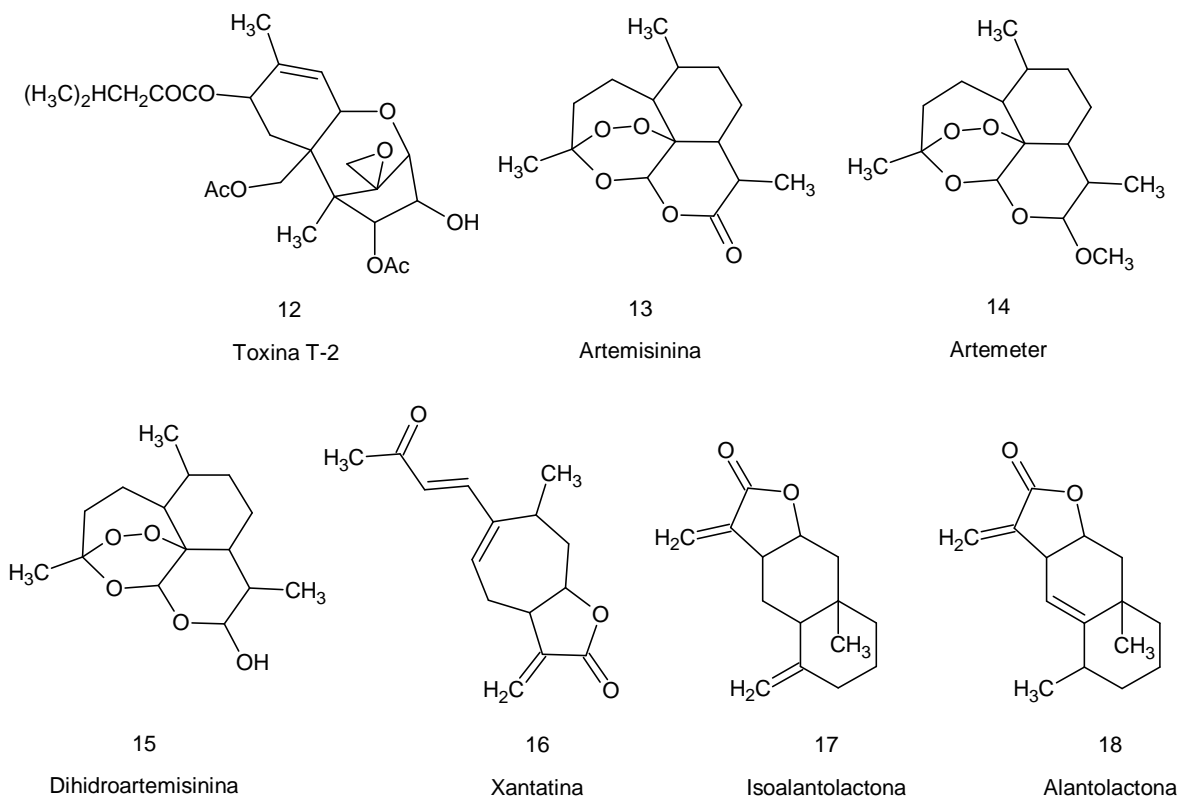


Figura 6. Estruturas químicas de alguns sesquiterpenos

1.3.3 Diterpenos

Os Diterpenos compreendem mais de 12 mil compostos (PETERS, 2010) e são amplamente distribuídos, principalmente nos gêneros *Rhododentron* e *Taxus*, entretanto podem ser encontrados nas famílias Labiatae, Verbenaceae, Celastraceae, Euphorbiaceae e Thymelaeaceae (MIN, 2011). A principal atividade biológica dos diterpenos são antineoplásica contra câncer de ovário, mama e pulmão além das atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (GHOSH *et al.*, 2013; MIN, 2011; YANG *et al.*, 2012). Taxol e seus derivados são os mais estudados diterpenos e tem sido amplamente prescritos como medicamentos no tratamento de câncer (MIN, 2011).

A farmacocinética de diterpenos, principalmente Taxol® e derivados, tem sido amplamente estudada, especialmente pela aplicação clínica no tratamento de neoplasias. Os estudos mais recentes sobre docetaxel (19), paclitaxel (20) e derivados relacionam-se com o interesse em alternativas farmacotécnicas para melhorar os parâmetros farmacocinéticos dessas substâncias (MA *et al.*, 2013; ATTILI-QADRI *et al.*, 2013; SAREMI *et al.*, 2013; WANG *et al.* 2013; CHO *et al.*,

2014). A biodisponibilidade de docetaxel em ratos sofreu uma considerável melhora quando o ativo foi veiculado em microemulsão (MA *et al.*, 2013) e quando veiculado em nanocápsulas a biodisponibilidade em minipigs da substância encapsulada aumentou 10 vezes, comparado à substância livre (ATTILI-QADRI *et al.*, 2013). Já nanopartículas preparadas com quitosana contendo docetaxel promoveram aumento em mais de 60% da biodisponibilidade deste diterpeno em ratos (SAREMI *et al.*, 2013). Outra estratégia farmacotécnica para melhorar os parâmetros farmacocinéticos de terpenos foi veicular paclitaxel em lipossomas o que melhorou a biodistribuição deste fármaco em vários órgãos, especialmente no fígado e baço (WANG *et al.* 2013). Estudos comparativos de parâmetros farmacocinéticos de docetaxel e derivados mostraram que não houve diferenças entre os parâmetros calculados para as substâncias testadas em humanos com câncer (CHO *et al.*, 2014).

Existem poucos relatos sobre metabolização de taxol e derivados. Sabe-se que as isoformas CYP3A e CYP2B são responsáveis pela formação de metabólitos hidroxilados desses compostos (KOMOROSKI *et al.*, 2005; GUT *et al.*, 2006)

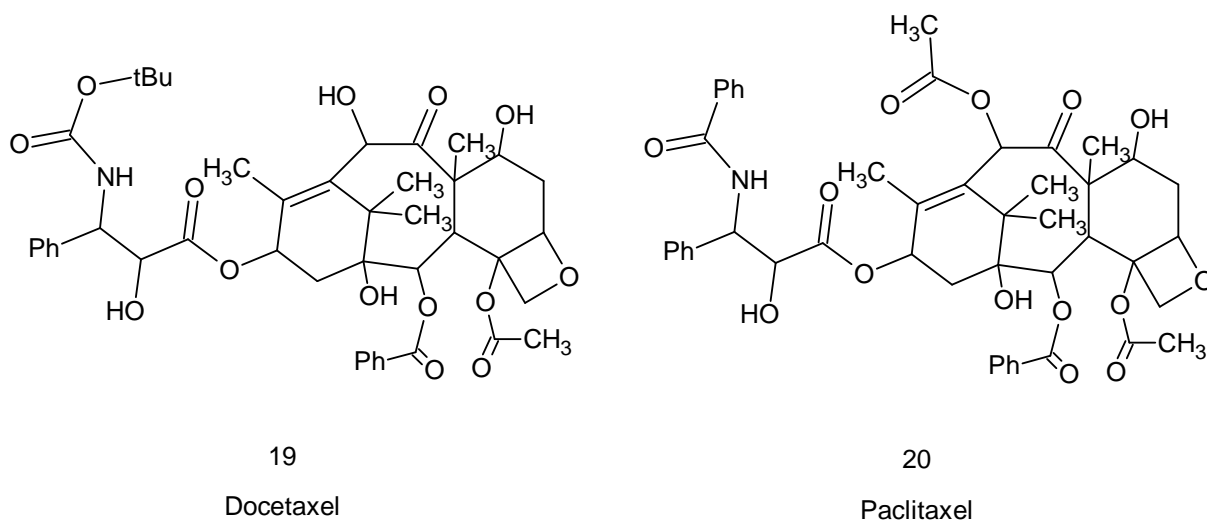


Figura 7: Estruturas químicas de dois diterpenos importantes e amplamente estudados

1.3.4 Triterpenos

Os triterpenos compreendem um grande grupo da classe dos terpenos com diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, antinociceptiva, hepatoprotetora, antialérgica, gastroprotetora, antimicótica, antimicrobiana, antiviral,

imunomodulatória dentre outros (DZUBAK *et al.*, 2006, RHOURE-FRIH *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2013, MUFFER *et al.*, 2011). Esta subclasse possui aproximadamente 20 mil compostos identificados e são sintetizados a partir da ciclização do esqualeno (SHENG & SUN, 2011; DZUBAK *et al.*, 2006). Os triterpenos podem ser encontrados na forma livre ou ligados a porções glicosídicas formando Saponinas Triterpênicas (SCHMIDT *et al.*, 2012). As Saponinas também possuem atividades biológicas como antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e anti-leishmanicida, dentre outras (LAMBERT *et al.*, 2011).

Existem vários relatos sobre farmacocinética de triterpenos. Entretanto, a grande maioria deles relata a análise de compostos após administração de extratos de plantas como no caso da administração de licorina e determinação simultânea das saponinas uralsaponina C (21) e F (22), 22 β -acetoxil-glicirrizina (23), 24-hidroxicorina E2 (24), licorinas G2 (25), E2 (26) e J2 (28) e glicirrizina (27) em plasma de cachorros (TAO *et al.*, 2013).

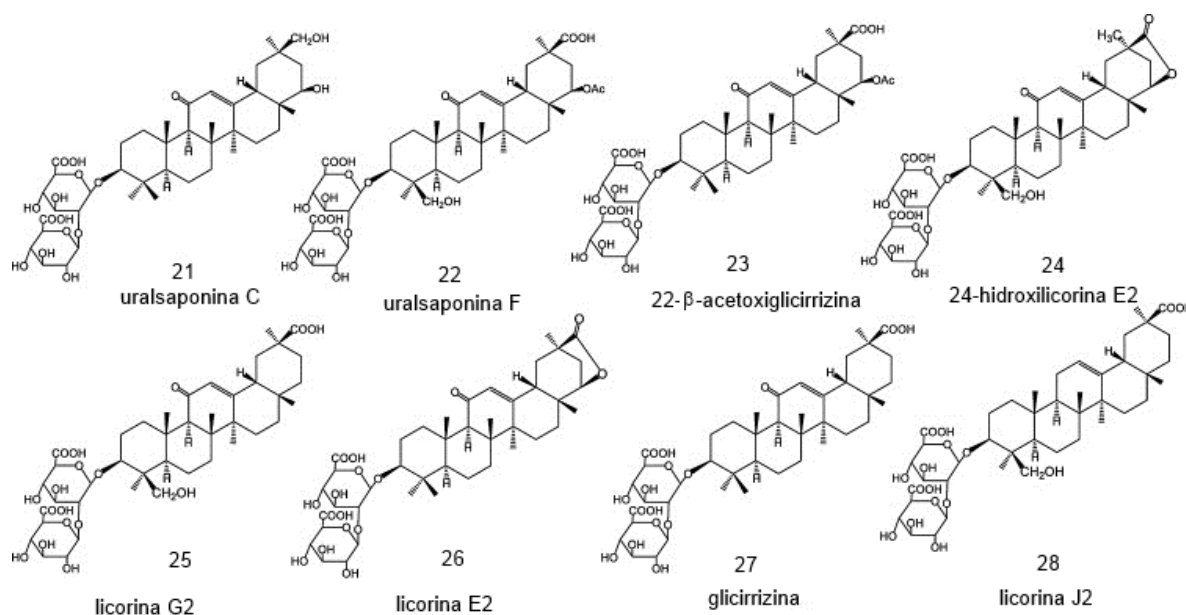


Figura 8: Saponinas triterpênicas relacionadas por Tao e colaboradores. Fonte: TAO *et al.*, 2013

Os parâmetros farmacocinéticos do triterpeno cicloastragenol (29) juntamente com outros 5 compostos não triterpênicos foram calculados após administração oral de 3 doses de *Yu Ping Feng San*, planta comumente utilizada na medicina chinesa (LI *et al.*, 2013). Outra saponina quantificada em plasma de ratos foi gimnemagenina (30) após administração de 400 mg/kg de extrato de *Gymnema sylvestre* por via oral. Esta substância provavelmente está presente no plasma devido à hidrólise de

ácidos gimnêmicos após metabolismo de primeira passagem (KAMBLE *et al.*, 2013). Entretanto a farmacocinética destes compostos não foi amplamente discutida pelos autores.

Após administração oral de 5 mg/kg via intraperitoneal, a saponina cucumariosideo A₂-2 (31) foi rapidamente absorvida e detectada no baço de camundongos sem sofrer transformações metabólicas após 24 horas da injeção via intraperitoneal (PILSLYAGIN *et al.*, 2013).

Em estudos de detecção simultânea dos epímeros 25-metoxidamarano-3 β ,12 β ,20-triol (32) em plasma de ratos após administração endovenosa não foi possível verificar diferenças entre ASC, MRT e T_{1/2} dos dois epímeros, entretanto houve diferenças entre o CI para os dois isômeros (SHI *et al.*, 2013).

Os estudos de farmacocinética de 20(S)-protopanaxadiol (33) mostraram que a utilização de nanopartículas líquidas cristalinas autoemulsionadas (JIN *et al.*, 2013) ou de nanoestruturas cristalinas líquidas (JIN *et al.*, 2013b) contendo o composto aumentaram em mais de 150% a biodisponibilidade relativa comparada à da substância livre.

Poucos estudos de metabolismo de triterpenos foram realizados. Estudos de metabolismo *in vitro* de ácidos α e β -boswelicos (34) mostraram que esses ácidos foram intensivamente metabolizados por microssomas hepáticos de ratos e de humanos entretanto, ácidos ceto- e acetilboswelicos não foram metabolizados (GERBETH *et al.*, 2013). A mistura binária de α e β -amirinas (35 e 36) também não foram metabolizados por microssomas hepáticos de ratos (MOREIRA *et al.*, 2013).

Saponinas do tipo ginsenosídeos (37), ao serem metabolizadas pela via oral, produzem metabólitos principalmente de hidrólise da porção glicosídica das saponinas ou formação de oxidações de cadeias laterais (YANG *et al.*, 2009; QIAN *et al.*, 2006; QIAN *et al.*, 2005).

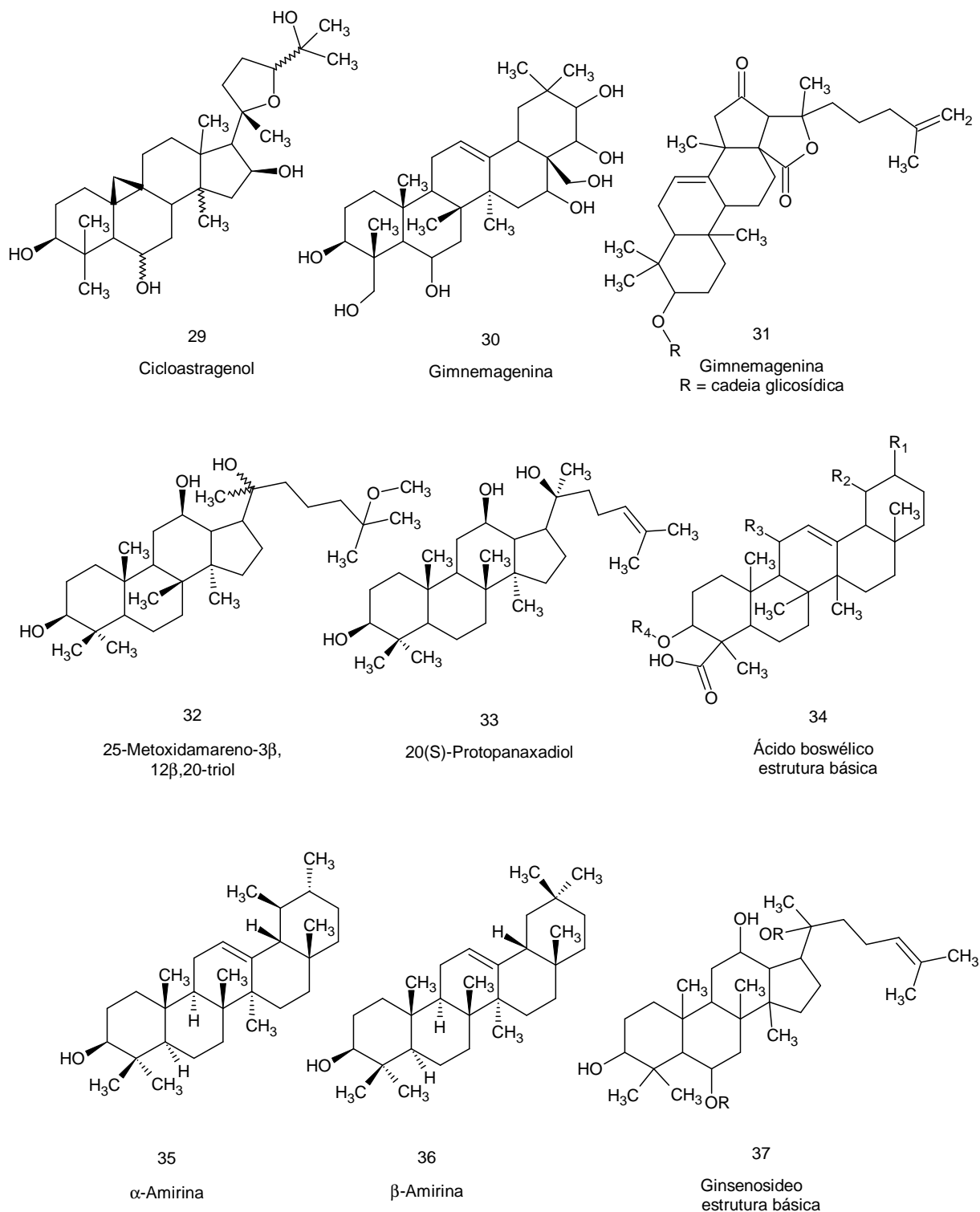


Figura 9: Estruturas químicas de alguns triterpenos e saponinas

Assim, estudar a farmacocinética e a eliminação de substâncias terpênicas bem como buscar estratégias para melhorar a biodisponibilidade de substâncias dessa importante classe se faz necessário para que possam ser inseridas novas substâncias nos testes clínicos de atividade biológica e disposição.

Capítulo 2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar estudos de disposição cinética de α e β -amirinas

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar α e β -amirinas a partir de folhas e cascas de *P. spruceanum*;
- ✓ Desenvolver uma nanoemulsão que permita administrar α e β -amirinas pela via endovenosa;
- ✓ Caracterizar a nanoemulsão desenvolvida;
- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para quantificação de α e β -amirinas em plasma de camundongos;
- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia bioanalítica para quantificação de α e β -amirinas em fezes de camundongos;
- ✓ Realizar reações biomiméticas de oxidação de α e β -amirinas utilizando metaloporfirinas;
- ✓ Realizar estudos de disposição cinética e eliminação α e β -amirinas.

***Capítulo 3 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA
MISTURA BINÁRIA DE ALFA E BETA AMIRINAS***

3.1 Introdução

Muitas são as substâncias produzidas por vegetais e microrganismos com atividades biológicas de interesse e farmacologicamente importantes. Essas substâncias, principalmente os metabólitos secundários, de certa forma, garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie (SIMÕES *et al.*, 2004). Diante da biodiversidade do planeta, as fontes de metabólitos secundários parecem inesgotáveis, considerando as enormes possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância medicinal e comercial (YUNES & CALIXTO, 2001).

Grande é a importância da pesquisa na área de produtos naturais, uma vez que diversos medicamentos no mercado são provenientes direta ou indiretamente de substâncias obtidas a partir de plantas e microrganismos. Estima-se que aproximadamente 34% das entidades químicas registradas até meados da década de 2000 sejam provenientes de produtos naturais. Das entidades registradas de 1981 a 2006, 12% mimetizam substâncias dessa classe e 17% possuem grupos farmacofóricos derivados de metabólitos secundários (ROLLINGER, 2009). Além disso, mais da metade dos anticancerígenos e antibióticos estão relacionados com a pesquisa em produtos naturais (MCCHESENEY, VENKATARAMAN & HENRI, 2007).

Uma importante classe de metabólitos secundários são os terpenos que se distribuem amplamente na natureza e representam a maior classe de metabólitos secundários com mais de 20 mil compostos conhecidos (PHILLIPS *et al.*, 2006). São constituídos de unidades isoprênicas e podem ser divididos em subclasses de acordo com o número dessas unidades.

Os triterpenos, foco de nosso interesse, são constituídos de seis unidades isoprênicas e sintetizados a partir da ciclização do esqualeno (SHENG & SUN, 2011). Apresentam uma variedade de atividades farmacológicas e por isso o interesse nessa subclasse tem sido bastante crescente. Dentre as atividades farmacológicas dos triterpenos destacam-se a anti-inflamatória e antinociceptiva (CHICCA, *et al.*, 2012; MATOS *et al.*, 2013; PASSOS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2005b; OTUKI *et al.*, 2005; HOLANDA PINTO *et al.*, 2008), antipruriginosa (OLIVEIRA *et al.*, 2004b), hepatoprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2005a), antimicrobiana e antiviral (JOSHI *et al.*, 2013; RHOORRI-FRIH *et al.*, 2013, GAO *et al.*, 2010).

Vários são os triterpenos com atividade anti-inflamatória comprovada, principalmente da classe dos ursanos, oleananos e lupanos tais como ácido ursólico (MÁÑEZ *et al.*, 1997; BARICEVIC *et al.*, 2001), α - e β - amirinas (OLIVEIRA *et al.*, 2004a,b; VILLASEÑOR *et al.*, 2004; OTUKI *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2007; HOLANDA PINTO *et al.*, 2008; SOLDI *et al.*, 2008), ácido boswélico (AMMON, 2002; KIELA *et al.*, 2005), ácido 23-hidroxiursólico (TOPONDJOU *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2004), lupeol (NIKIEMA *et al.*, 2001); breína (YASUKAWA *et al.*, 1996).

Acredita-se que, devido à semelhança estrutural dos triterpenóides com os compostos esteroidais, exista uma semelhança também com relação ao mecanismo de ação dessas substâncias.

É de grande importância a comprovação de atividade anti-inflamatória de triterpenos, uma vez que os medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento de inflamações provocam vários efeitos adversos tanto pelo uso esporádico quanto pelo uso contínuo (DE FRANCISCHI, 2005). Entretanto, apesar de diversas comprovações científicas da atividade biológica, em especial anti-inflamatória de triterpenos, pouco se sabe sobre a farmacocinética e sobre o metabolismo dessas substâncias.

As substâncias α e β -amirinas (Fig. 10) são triterpenos pentacíclicos que se diferem pela posição de um grupo metila na posição C19 e C20, respectivamente (BISKUP *et al.*, 2012). Além de serem encontradas em resinas das espécies dos gêneros *Protium* e *Bursera*, essa mistura é comumente encontrada em outras espécies como *Anemone rivulgaris* (ZHAO *et al.*, 2012) e *Manilkara bidentata* (RHOURRI-FRIH *et al.*, 2013; HERNANDEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2013)

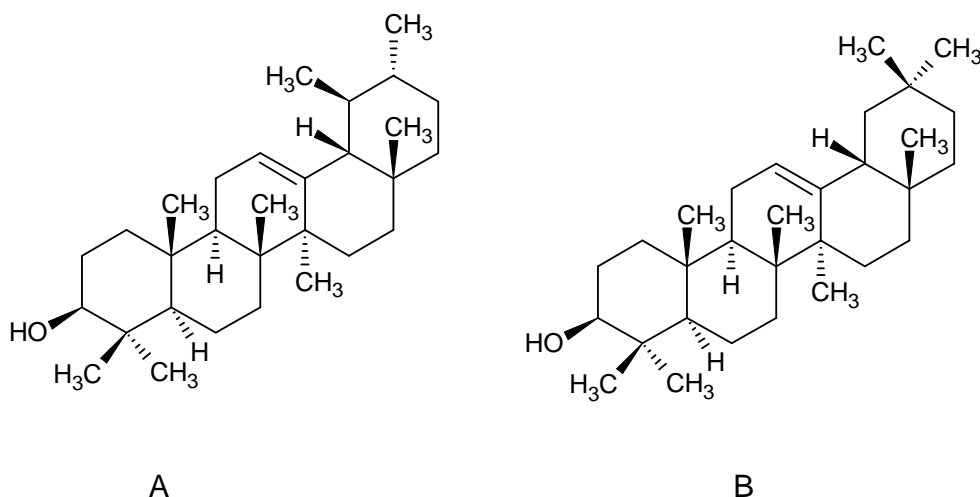


Figura 10: Estruturas químicas de α (A) e β (B) amirinas

A α -amirina é também encontrada em quantidades significativas em *Cassia obtusifolia*, e *Commiphora holtzian* (HERNANDEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2010; SOB *et al.*, 2010; MANGURO *et al.*, 2009)

A principal fonte de β -amirina são *Nelumbo nucifera* e na raiz “cuachalalate” (*Amphipterygium adstringens*) (HERNANDEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2012; ROSAS-ACEVEDO *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011). Varias atividades biológicas tem sido reportadas para essa mistura ao longo dos anos, dentre elas anti-inflamatória, analgésica, hepatoprotetora e gastroprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2004a,b; 2005 a,b; OTUKI *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2007; HOLANDA PINTO *et al.*, 2008; SOLDI *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2013; CHICCA, *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012).

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Coletar folhas e galhos de *P. spruceanum*;
- ✓ Preparar extratos hexânicos a partir de folhas e cascas trituradas da planta;
- ✓ Isolar α e β -amirinas, conforme metodologia descrita previamente.

3.3 Materiais e Métodos

O isolamento de amirinas foi realizado no Laboratório de Farmacognosia do CiPharma (EF/UFOP), sob coordenação do Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza. O material vegetal, galhos de *P. spruceanum* contendo folhas, foi coletado em Lavras-MG, e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Lavras sob o número 16399 HESAL.

As folhas foram separadas dos galhos e foram secas separadamente em estufa de ar circulante a temperatura constante (50 °C) e trituradas também separadamente em moinho de facas.

O extrato hexânico foi obtido por extração em ultrassom em ciclos de 30 minutos até esgotamento do material vegetal. Posteriormente o solvente foi recuperado em evaporador rotatório e o extrato obtido sofreu processos de cromatografia em coluna clássica sequenciais até a purificação das frações tendo como fase estacionária sílica gel 60 (40-230 mesh) e como fase móvel os solventes

hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol promovendo uma eluição por gradiente de polaridade segundo Rodrigues *et al.* (2013) com modificações.

As amostras foram identificadas e comparadas com padrão anteriormente isolado no mesmo laboratório (RODRIGUES *et al.*, 2013) por CG-EM em coluna DB-5 Agilent® (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espessura do filme), injeção de 1 µL, modo *split* na razão de 1:10, tendo como fase móvel gás hélio na vazão 1mL/min. A temperatura do injetor foi de 250 °C, a temperatura inicial da coluna foi de 200 °C, a taxa de aquecimento foi de 10 °C por minuto até 290 °C. O detector utilizado foi espectrômetro de massas do tipo quadrupolo e a ionização por elétrons a 70 eV. A detecção foi realizada no modo SCAN e o tempo de análise 56 minutos.

3.4 Resultados e Discussão

Para a obtenção do extrato hexânico de folhas foram utilizados 917,0 g desse material seco e triturado e para a obtenção do extrato hexânico das cascas e caule foram utilizados 1243,0 g de material vegetal.

A partir das folhas foi possível obter uma massa total de aproximadamente 418 mg de mistura de α e β -amirinas cuja proporção ponderada foi de aproximadamente 37,14% e 62,83%, respectivamente. A partir das cascas e caules foram obtidos aproximadamente 761 mg da mistura de α e β -amirinas cuja proporção ponderada foi de aproximadamente 58,47% e 41,53%, respectivamente. A pureza cromatográfica das amostras isoladas foi acima de 99%.

O processo de isolamento mostrou-se rápido e eficiente para se obter a mistura triterpênica em estudo com pureza cromatográfica acima de 99% e o rendimento de obtenção de amirinas a partir das folhas foi consideravelmente menor (0,05%) que o rendimento obtido a partir do isolamento de cascas e caules (0,32%). Este resultado pode estar relacionado com a presença da resina nas cascas e caules que possui esses triterpenos em grandes quantidades (VIEIRA-JUNIOR *et al.*, 2005).

A análise das amostras de amirinas por CG-EM provenientes de folhas são apresentadas na Figura 11.

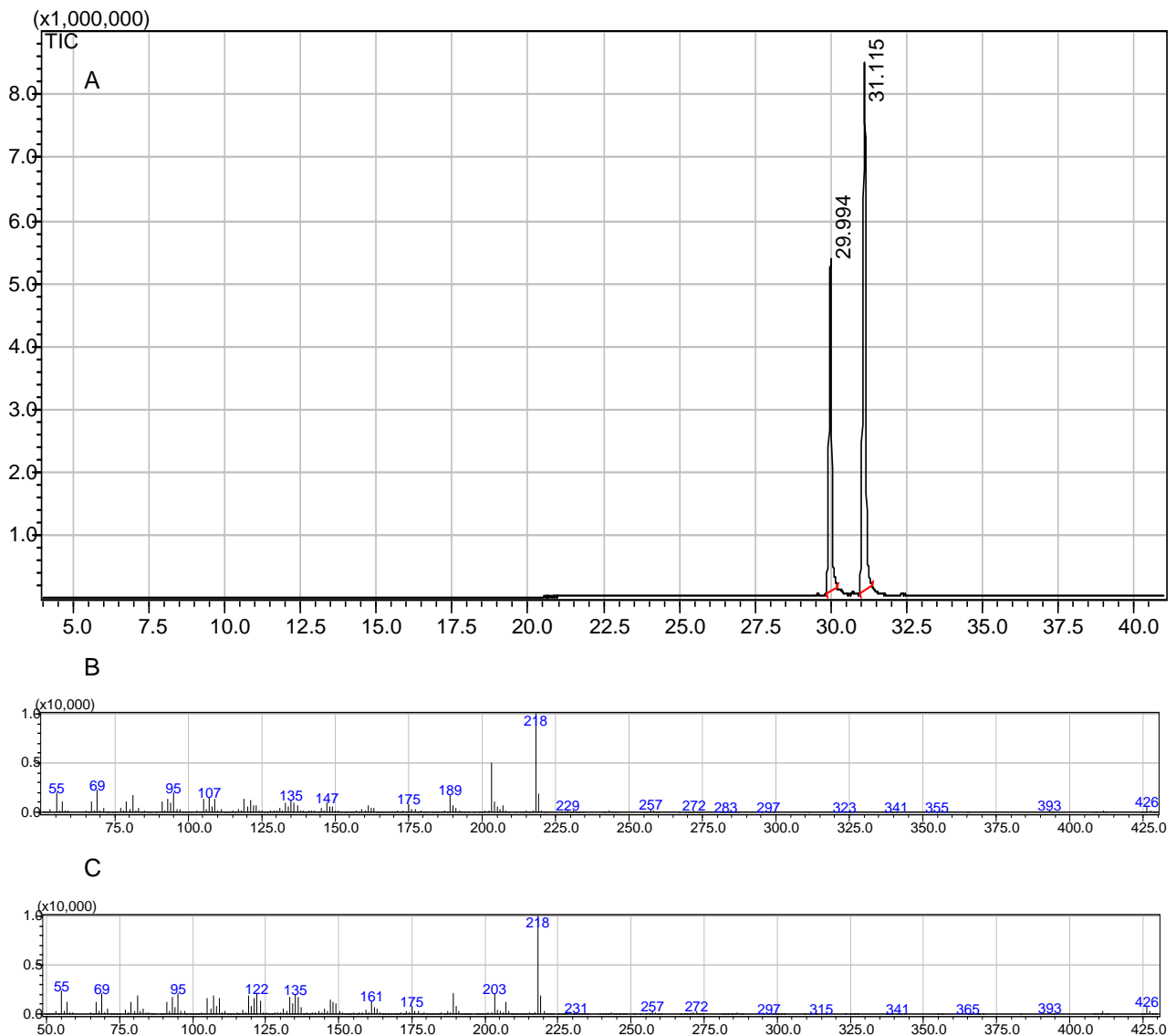


Figura 11: A – Análise por CG-EM da mistura de α e β -amirinas isolada a partir de folhas de *P. spruceanum*. Sinais em 29,99 min e 31,11 min correspondem a β e α -amirinas respectivamente (95 % de similaridade – dados comparados com biblioteca NIST presente no aparelho e com padrões anteriormente isolados e identificados). B e C – Espectro de massas de β e α -amirinas respectivamente.

Resultados idênticos quanto ao tempo de retenção e similaridade foram observados para a mistura isolada das cascas e caule. Entretanto, a diferença está na proporção de α e β -amirinas que pode estar relacionada com a perda de material durante as etapas cromatográficas ou pela presença de proporções diferentes em partes distintas da planta, como já relatado para outras plantas (LUPE, 2007).

3.5 Conclusões

Foi possível isolar α e β -amirinas a partir de folhas, cascas e caule de *P. spruceanum* com alto grau de pureza e em quantidades suficientes para a realização dos ensaios proposto neste trabalho.

**Capítulo 4 - DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO
ALFA E BETA-AMIRINAS**

4.1 Introdução

Mais de 40% das novas entidades químicas com atividade biológica descobertas possuem baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral. Este fato torna necessária a utilização de alguma estratégia farmacotécnica para melhorar essas propriedades a fim de que essas entidades sejam viáveis para utilização como medicamentos. Preparar nanoemulsões tem sido uma estratégia importante para administrar substâncias de baixa solubilidade com eficiência no organismo (GONG, *et al.*, 2012; KOTTA *et al.*, 2012).

O termo nanoemulsão é utilizado para definir emulsões com partículas menores que 1000 nanômetros (nm) que podem ser chamadas de emulsões ultrafinas ou miniemulsões (KOROLEVA & YURTOV, 2012). Esse tipo de emulsão é composto por gotas em escala nanométrica de um líquido imiscível dispersas em outro líquido e tem sido foco de pesquisa, pois, além de melhorar as propriedades dos fármacos insolúveis em água, possuem a capacidade de transporte de compostos ativos variados com propriedades únicas (LIU, QI & WU, 2012).

Surfactantes etoxilados iônicos ou não-iônicos são frequentemente utilizados para estabilizar nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) (KOROLEVA & YURTOV, 2012).

Recentemente, *Food and Drug Administration* tem aprovado algumas nanoemulsões de fármacos insolúveis como Estrasorb[®], Flexogan[®] e Restasis[®] para aplicações clínicas (GONG *et al.*, 2012).

Existem relatos de que a taxa de absorção de medicamentos nanoemulsionados é superior quando comparado com outras formas farmacêuticas (KOROLEVA & YURTOV, 2012).

Estudos comparativos entre nanoemulsão lipídica e suspensão de ceforoxima, um antibiótico da classe das cefalosporinas, mostraram que a biodisponibilidade da nanoemulsão é quase duas vezes maior e que as concentrações plasmáticas máximas atingidas para nanoemulsão também foram consideravelmente maiores (PATEL, PODDAR & SAWANT, 2012). A biodisponibilidade e a atividade antioxidante de vitamina E foi consideravelmente maior para nanoemulsões comparada a de cápsulas gelatinosas desse composto, ambos administrados por via oral (GONG *et al.*, 2012).

Estudos com o flavonoide fisetina mostraram que não houve diferença na biodisponibilidade para a nanoemulsão comparada a do flavonoide livre em exposição sistêmica, ou seja, quando administrada por via endovenosa. Entretanto, quando administrado intraperitonealmente, a biodisponibilidade da nanoemulsão foi 24 vezes maior, comparada a do flavonoide livre. Além disso, a dose antitumoral para a nanoemulsão foi consideravelmente menor (36,6 mg/kg) comparada a da substância livre (223 mg/kg) (RAGELLE *et al.*, 2012).

Considerando que a mistura de α e β -amirinas possui caráter lipofílico bastante pronunciado, e que estudos de disposição cinética de β -amirina em ratos mostraram baixa biodisponibilidade para o composto puro e no extrato (0,86% vs 3,83%) (CHING, 2011), torna-se importante o desenvolvimento de uma formulação que permita a administração endovenosa, bem como possa promover a melhoria nos parâmetros farmacocinéticos da mistura.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver uma nanoemulsão que permita administrar α e β -amirinas pela via endovenosa;
- ✓ Caracterizar a nanoemulsão desenvolvida com relação a parâmetros de tamanho de partícula, índice de polidispersão e porcentagem de encapsulação;
- ✓ Realizar estudos de liberação *in vitro* de α e β -amirinas contidas na nanoemulsão.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Desenvolvimento da Nanoemulsão

O desenvolvimento e a caracterização das nanoemulsões foram realizados sob coordenação do Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos (DEFAR/EF/UFOP).

A nanoemulsão foi preparada pelo método de emulsificação direta descrito por Morais e colaboradores (2006) com modificações utilizando-se Croduret 50

Special[®] (PEG-40 hydrogenated Castor oil) como surfactante hidrofílico não iônico na concentração de 6% e SPAN 80[®] (Sorbitan Monooleate) como surfactante lipofílico não iônico na concentração de 4%. Óleo de soja foi utilizado como excipiente da fase oleosa e água ultra pura como excipiente da fase aquosa. As α e β -amirinas foram solubilizadas na fase oleosa contendo o par de surfactantes. Duas temperaturas foram utilizadas durante o preparo das nanoemulsões: 75 ± 2 °C e 78 ± 2 °C. As fases oleosa e aquosa foram aquecidas e a fase aquosa foi vertida lentamente sobre a fase oleosa sobre agitação magnética constante (100 rpm). A formulação foi mantida em agitação constante até resfriar à temperatura ambiente.

4.3.2 Caracterização da Nanoemulsão

4.3.2.1 Determinação do Tamanho de Partícula e do Índice de Polidispersividade

As análises de tamanho de partícula e de índice de polidispersão foram realizadas em analisador de tamanho de partículas Nanosize[®]N5 Submicrom Particle Size Analyzer (temperatura 20 °C; ângulo 90,0 °). As amostras (20 μ L) foram diluídas em 9980 μ L de água ultrapura antes das análises.

4.3.2.3 Método de Analítico de Quantificação de α e β -amirinas

Todas as análises cromatográficas da caracterização da nanoemulsão foram realizadas em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE com detector por arranjo de diodos. Como fase estacionária foi utilizada coluna de fase reversa Luna C-18 4,6 mm x 250 mm x 5 μ m (Phenomenex[®]). Como fase móvel foi utilizado metanol:isopropanol (70:30 v/v) vazão 0,7 mL/min, tempo de análise 20 min. e detecção no comprimento de onda selecionado de 210 nm. Antes da realização das análises de caracterização da formulação o método foi validado e os parâmetros de precisão, exatidão e linearidade foram calculados conforme estipulado pela ANVISA (2003).

4.3.2.4 Porcentagem de Encapsulação

A porcentagem de encapsulação da formulação foi realizada conforme o método descrito por Fontana *et al.* (2009) com modificações. A quantidade de α e β -amirinas total na nanoemulsão foi determinada após a dissolução de 250 μ L de nanoemulsão em 750 μ L de metanol seguida de sonicação em ultrassom por 5 minutos. A amostra foi filtrada em filtro de 0,45 μ m (Milipore®) e posteriormente quantificada. O teor de α e β -amirinas livre (não associada com as nanoestruturas) foi determinado no ultrafiltrado após separação das nanopartículas pela técnica de ultrafiltração/centrifugação utilizando filtro de 10 kDa (Amicon – Millipore®) a 12000 rpm durante 10 min. A quantidade encapsulada foi calculada pela diferença entre o total de α e β -amirinas e a fração livre. A eficiência de encapsulação foi determinada pelo quociente da quantidade encapsulada e da quantidade total de α e β -amirinas.

4.3.2.5 Ensaio de Solubilidade

Os ensaios de solubilidade de α e β -amirinas foram realizados utilizando-se 10 mg de mistura de α e β -amirinas adicionadas a 1mL de meio e deixadas em agitação magnética constante a 37 °C \pm 2 °C durante 36 horas. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas após 24 e 36 horas, filtradas em filtro de 0,45 μ m (Milipore®), diluídas e quantificadas. Foram testados como meios para solubilidade, tampão acetato com 5% Labrasol® (PEG-8 Caprylic/CapricGlycerides), tampão fosfato com 5% de Labrasol®, mistura de tampão fosfato (5% Labrasol®) com 30% de metanol, mistura de tampão fosfato (5% Tween 80®) com 30% de metanol.

4.3.2.6 Ensaio de Liberação *in vitro*

O perfil de liberação *in vitro* foi realizado pelo método de diálise normal usando o meio selecionado após experimentos de solubilidade. Foram adicionados 500 μ L de nanoemulsão (8,33 mg/mL) em membrana de diálise que foi fechada e colocada em 100 mL de meio (tampão fosfato (5% Labrasol®) com 30% metanol ou tampão fosfato (5% Tween 80®) com 30% metanol). A nanoemulsão foi deixada em contato com o meio sob agitação a 37 °C \pm 2 °C durante 24 horas. Foram coletadas amostras de 1 mL nos tempos 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 e 24 h, filtradas em filtro 0,45

μm (Milipore®) e quantificadas. Após cada coleta houve reposição do meio retirado. O total remanescente na formulação foi quantificado pela adição 50 μL de amostra a 150 μL de metanol, seguido de agitação e filtração em filtro 0,45 μm (Milipore®).

4.3.2.7 Análises Estatísticas

Os ensaios foram conduzidos em triplicatas e os resultados foram expressos pela média \pm DP (desvio padrão). O teste t de análises não-pareadas foi empregado para comparar a influência da concentração de óleo e da temperatura nas formulações. Para os estudos de estabilidade os dados foram registrados aos 0, 7, 14 e 365 dias sendo empregada a análise de variância (ANOVA). O teste de Dunn's foi utilizado como pós-teste de comparações múltiplas. Todas os testes foram realizados com nível de significância de $p \leq 0,05$.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Desenvolvimento e Caracterização da Nanoemulsão

4.4.1.1 Determinação do Tamanho de Partícula e do Índice de Polidispersividade

Uma vez que o ativo utilizado possui natureza lipofílica, foram avaliadas as concentrações de 5 e 10% de óleo de soja como excipiente da fase oleosa. As temperaturas avaliadas para o preparo das formulações foram $75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $78\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os resultados de tamanho de partículas e índice de polidispersão para as formulações contendo 5 e 10% de óleo de soja, estão representados na Tabela 01.

Tabela 1: Tamanho médio de partículas e índice de polidispersão para as duas proporções de óleo de soja avaliadas.

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Óleo de Soja (%)	Tamanho médio das partículas (nm)	Índice de polidispersão
75 ± 2	5	$42,9 \pm 1,15$	$0,26 \pm 0,179$
75 ± 2	10	$107,7 \pm 1,19^*$	$0,30 \pm 0,038$
78 ± 2	5	$82,2 \pm 5,27^*$	$0,15 \pm 0,103$
78 ± 2	10	$88,3 \pm 0,45^*$	$0,19 \pm 0,024$

* $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo, teste t.

Todas as condições avaliadas promoveram a formação de nanoemulsões de índices de polidispersão aceitáveis. Foi possível perceber que houve um aumento no tamanho de partículas e no índice de polidispersão com o aumento da concentração de óleo, principalmente pela impossibilidade da mesma quantidade de agente emulsionante realizar a cobertura de todas as gotículas de óleo (HADNADEV *et al.*, 2013). Apesar de os resultados com menor concentração de óleo de soja apresentarem uma formulação com menor tamanho médio de partículas e menor índice de polidispersão comparado a utilização de 10% de óleo de soja, foi definido que a maior concentração de óleo de soja seria utilizada para o preparo da nanoemulsão contendo amirinas, uma vez que foi obtida uma formulação em escala nanométrica e que as amirinas possuem características lipofílicas marcantes. Desta maneira, uma maior concentração de óleo facilitaria a solubilização delas.

A temperatura é um parâmetro importante no processo de preparo de nanoemulsões pelo método de inversão de fases e geralmente essa inversão ocorre em uma faixa de temperaturas onde ocorre a formação da nanoemulsão. A mudança na temperatura da inversão de fases acarretará a alteração do tamanho das partículas e para emulsões do tipo Óleo em Água (O/A) a temperatura de inversão está entre 70 e 80°C (FÖRSTER *et al.*, 1990). Ocorreu uma diminuição significativa tanto do tamanho de partículas quanto do índice de polidispersão com o aumento da temperatura e foi definido que a temperatura a ser utilizada para o preparo da nanoemulsão contendo o ativo seria de $78 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Assim, a formulação contendo amirinas foi preparada conforme temperatura e proporção de óleo de soja definidas e contendo 0,83% de mistura das amirinas, 6% de Croduret 50 Special® e 4% de Span 80®.

Os resultados de média de tamanho das partículas e de índice de polidispersão para a formulação contendo o ativo preparada nas condições definidas, analisados no dia do preparo e após 7, 14 e 365 dias do preparo estão representados na Tabela 02.

Tabela 2: Tamanho médio de partículas e índice de polidispersão para a formulação contendo ativo 0, 7, 14 e 365 dias após o preparo.

Tempo (dias)	Tamanho médio das partículas (nm)	Índice de polidispersão
0	103,5 ± 0,44	0,16 ± 0,022
7	105,3 ± 0,58	0,26 ± 0,012
14	104,3 ± 0,72	0,19 ± 0,051
365	94,4 ± 2,16	0,08 ± 0,005

* $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo, Kruskal-Wallis – Comparações Múltiplas de Dunn.

O tamanho das partículas da nanoemulsão contendo o ativo sofreu um ligeiro aumento (de $88,3 \pm 0,45$ nm para $103,5 \pm 0,44$ nm) comparado ao da nanoemulsão branca, que já era esperado, uma vez que, devido às características lipofílicas do ativo, ocorreu um aumento no montante de fase oleosa, e conseqüentemente um aumento do tamanho de partículas (HADNADEV *et al.*, 2013) entretanto, este aumento não foi significativo.

As análises de tamanho de partícula da nanoemulsão contendo o ativo até 365 dias após a produção mostram que não há diferenças significativas no tamanho de partícula com o passar do tempo.

O índice de polidispersão indica o número de partículas fora do intervalo definido pelo equipamento e está relacionado com a homogeneidade do tamanho das partículas. Formulações homogêneas possuem índice de polidispersão entre 0 e 0,7 e índices inferiores a 0,3 sugerem formulações monodispersas (GOTO *et al.*, 2012). Formulações nanoemulsionadas e monodispersas podem ser administradas via endovenosa sem risco de embolia pulmonar.

Apesar de o valor de índice de polidispersão ser maior para a avaliação em 7 dias, não houve diferença significativa comparado aos demais dias. Além disso, esse número ainda é abaixo dos indicados para formulações monodispersas e apenas indica uma variabilidade maior no tamanho de partículas neste ensaio. Uma vez que o tamanho médio das partículas não se alterou e que não houve aumento nos valores de índice de polidispersão os tempos analisados, podemos sugerir que a nanoemulsão preparada permaneceu estável quanto ao tamanho de partículas e quanto ao índice de polidispersão.

4.4.1.2 Método de Analítico de Quantificação de α e β -amirinas

Segundo a legislação vigente (ANVISA, 2003) para testes de dissolução e liberação de ativos, a precisão e a exatidão dos métodos devem ser calculados. Sendo assim para o método de quantificação das α e β -amirinas por CLAE-DAD foram obtidos os resultados apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Resultados de Precisão, Exatidão intraensaio para Análise de α e β -amirina por CLAE-DAD

Analito	Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão ^a (%)	Exatidão ^b (%)
β -Amirina	0,26	0,27	10,8	2,2
	1049,75	1033,66	1,2	-0,8
α -Amirina	0,23	0,24	4,7	-0,5
	950,25	931,15	1,0	-1,3

^a precisão expressa como desvio padrão relativo

^b exatidão expressa como erro relativo em porcentagem

Tabela 4: Resultados de Precisão, Exatidão interensaio para Análise de α e β -amirina por CLAE-DAD

Analito	Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Obtida ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão ^a (%)	Exatidão ^b (%)
β -Amirina	0,26	0,26	9,2	0,0
	1049,75	1042,04	1,2	-0,7
α -Amirina	0,23	0,23	7,8	-2,1
	950,25	940,31	1,2	-1,0

^a precisão expressa como desvio padrão relativo

^b exatidão expressa como erro relativo em porcentagem

4.4.1.3 Porcentagem de Encapsulação Método de Analítico de Quantificação de α e β -amirinas

Foram realizados ensaios de encapsulação em triplicata para duas formulações preparadas num mesmo dia. Os resultados de porcentagem de encapsulação estão representados na Tabela 05.

Tabela 5: Porcentagem de Encapsulação para α e β Amirina

Analito	Formulação 1 * (%)	Formulação 2 * (%)	Média	DPR ^a
β -Amirina	101,34	98,60	99,97	1,86
α -Amirina	101,41	97,27	99,34	2,88

* Dados realizados em triplicata para cada formulação.

^a Desvio padrão relativo

A porcentagem de encapsulação está relacionada geralmente à solubilidade do fármaco na fase interna da emulsão, onde fármacos mais lipofílicos tendem a se

localizar na fase oleosa enquanto aqueles mais hidrofílicos tendem a estar solubilizados na fase aquosa (BRUXEL *et al.*, 2012; KOTTA *et al.*, 2012). Para os analitos testados foram encontradas taxas de encapsulação de 99,97% e 99,34% para β e α -amirinas, respectivamente. As nanoemulsões do tipo O/A preparadas neste estudo possuem o interior lipofílico. Este núcleo oleoso permitiu uma boa solubilidade das α e β -amirinas e favoreceu a alta taxa de encapsulação. Além disso, a baixa solubilidade em fase aquosa faz com que a substância permaneça no interior dos glóbulos na formulação. Estes resultados evidenciam uma excelente taxa de encapsulação e juntamente com os resultados de tamanho de partícula sugerem que mais de 99% das α e β -amirinas adicionadas na formulação encontram-se nas partículas de escala nanométrica.

4.4.1.4 Ensaio de Solubilidade

Os resultados de solubilidade para os meios testados estão representados na Tabela 6.

Tabela 6: Média da solubilidade em porcentagem (%) para os meios testados

Analito	Tempo (h)	Tampão acetato + 5% Labrasol [®]	Tampão fosfato + 5% Labrasol [®]	Tampão Fosfato (5% Labrasol [®]) + 30% MeOH	Tampão Fosfato (5% Tween [®]) + 30% MeOH
β -Amirina	24	1,24	1,71	3,68	6,07
	36	3,30	3,04	4,05	6,30
α -Amirina	24	1,21	1,77	4,22	6,79
	36	3,19	2,94	4,57	6,80

* Ensaio realizado utilizando 10mg de mistura de α e β -amirinas em 1 mL de meio.

As solubilidades encontradas para ambos os analitos foram baixas em todos os meios testados. Inicialmente foram realizados os ensaios de solubilidade em tampão fosfato ou tampão acetato adicionados do tensoativo Labrasol[®] a fim de melhorar a solubilidade dos analitos, uma vez que eles possuem características lipofílicas e já era esperado que não se solubilizassem em solventes aquosos. Entretanto, apenas a adição do tensoativo não promoveu uma solubilização eficiente.

Diante de solubilidades abaixo de 2% em 24 horas para ambos os analitos em meios biocompatíveis, optou-se pela mistura de solventes orgânicos na fase aquosa

a fim de tentar melhorar a solubilidade. Uma vez que a solubilidade em tampão fosfato foi maior que em tampão acetato, foi escolhido realizar um novo teste de solubilidade adicionando-se 30% de metanol à solução inicial testada. Foi possível perceber que apesar de ter ocorrido melhora considerável nas solubilidades de ambos os analitos (aproximadamente 4% de solubilidade), esta ainda foi baixa o que dificultaria os ensaios de liberação. Mesmo com esta baixa solubilidade foi realizado o ensaio de liberação utilizando tampão fosfato (5% Labrasol[®]) e 30% metanol (resultados serão mostrados posteriormente). Entretanto, não houve liberação da formulação e um novo solvente foi testado [Tampão Fosfato (5% Tween 80[®]) e 30% metanol]. Foi possível perceber novamente uma considerável melhora na solubilidade (acima de 6%), entretanto essas solubilidades ainda foram consideravelmente baixas.

Os ensaios de solubilidade devem ser realizados a fim de definir um meio que consiga dissolver os analitos de forma a recebê-los durante os ensaios de liberação da formulação obedecendo ao que chamamos de condições *sink*. Desta maneira, no meio de liberação deve ser gerada uma situação de diluição infinita onde não haverá saturação do fármaco neste meio e assim a solubilidade não atuará como fator limitante da liberação. Assim sendo, a concentração máxima do fármaco deve ser 10% de sua concentração de saturação (WASHINGTON, 1990; PRISTA *et al.*, 1995).

4.4.1.5 Ensaio de Liberação *in vitro*

Meios de liberação biocompatíveis são de interesse nesses ensaios, pois o perfil de liberação *in vitro* a partir de meios biocompatíveis com a via de administração pretendida pode auxiliar na predição do comportamento do sistema nanoemulsionado *in vivo* (SARTORI, 2007).

Os resultados da porcentagem média de ativo remanescente na formulação após 24 horas do estudo de liberação para as duas formulações nos dois meios testados estão representados na Tabela 7:

Tabela 7: Resultados em porcentagem de ativo remanescente no ensaio de liberação após 24 horas.

Solvente	Tampão Fosfato (5% Labrasol®) com 30% metanol		Tampão Fosfato (5% Tween 80®) com 30% metanol	
	Ativo	Média *(%)	DPR ^a (%)	Média *(%)
β-Amirina	98,89	0,10	68,65	0,18
α-Amirina	98,82	0,06	70,62	0,15

* Média das triplicata.

^a Desvio padrão relativo

No meio tampão fosfato (5% Labrasol®) contendo 30% de metanol praticamente não houve liberação dos ativos da formulação. Entretanto, apesar ter ocorrido a liberação de aproximadamente 30% dos ativos utilizando-se o meio tampão fosfato (5% Tween 80®) contendo 30% de metanol, não foi possível quantificar α e β-amirinas em nenhum dos tempos coletados durante o estudo.

Foram adicionados 500 µL de formulação em uma concentração de 8,33 mg/mL da mistura de α e β-amirinas e a solubilidade da mistura no tampão fosfato (5% Tween®) contendo 30% de metanol obtida foi de 0,6 mg/mL, aproximadamente.

Nas condições do estudo de liberação, onde foram adicionados 100 mL de meio, foram obedecidas as condições *sink*, uma vez que 10% da solubilidade de saturação corresponderia a aproximadamente 6 mg de ativos e foram adicionados aproximadamente 4,16 mg de ativos. Entretanto, não foi possível visualizar um perfil de liberação ao decorrer do tempo e a quantidade de ativo liberada em 24 horas foi baixa.

É sabido que fármacos menos lipofílicos são liberados mais rapidamente das nanoemulsões, enquanto aqueles mais lipofílicos tendem a ter sua liberação prolongada (BRUXEL, 2012).

Os coeficientes de partição Octanol/Água médios (log P) calculados no programa ALOGPS (<http://vcclab.org/lab/alogps>) para α e β-amirina são $8,25 \pm 1,17$ e $8,00 \pm 1,07$, respectivamente e sabe-se que após administração endovenosa, fármacos com log P próximos a 9,5 tendem a ser seletivamente acumulados no fígado, baço e pulmões. Este fato provavelmente ocorre devido à retenção do fármaco nas nanopartículas oleosas que podem ser captadas pelo sistema fagocitário mononuclear e posteriormente dirigidas a esses órgãos (BRUXEL, 2012).

Apesar de o método de diálise reversa representar melhor as condições de liberação *in vivo*, neste estudo não foi possível utilizá-lo uma vez que a presença de

solventes orgânicos com a nanoemulsão promoveria a desintegração das nanoestruturas desta.

4.5 Conclusões

A nanoemulsão desenvolvida apresentou tamanho de partículas e índice de polidispersão satisfatórios para a administração endovenosa. Além disso, foi possível observar alta porcentagem de encapsulação. Os estudos de liberação *in vitro* evidenciam que, em meios biocompatíveis, α e β -amirinas não são liberadas em 24 horas sugerindo que podem se acumular em algum órgão.

**Capítulo 5 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ALFA E BETA-AMIRINAS**

5.1 Introdução

Com o avanço das técnicas cromatográficas e espectroscópicas, inúmeros procedimentos para medições analíticas e bioanalíticas são realizados ao redor do mundo e a validação desses procedimentos se faz necessária para que os resultados obtidos sejam confiáveis e adequados ao que o método se propõe (DE BARROS, 2002).

Segundo a RDC N° 27, de 17 de maio de 2012, validação é a confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ANVISA, 2012).

A fim de demonstrar o desempenho de métodos analíticos e bioanalíticos (onde se usam matrizes biológicas) é necessário investigar algumas características realizando ensaios de seletividade, efeito residual, efeito de matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade para que o método possa ser utilizado com confiabilidade e segurança (ANVISA, 2012).

5.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver metodologia de extração e quantificação de α e β -amirinas contidas no plasma de camundongos;
- ✓ Validar metodologia desenvolvida para quantificação de α e β -amirinas contidas no plasma de camundongos;
- ✓ Desenvolver metodologia de extração e quantificação de α e β -amirinas contidas nas fezes de camundongos;
- ✓ Validar metodologia desenvolvida para quantificação de α e β -amirinas contidas nas fezes de camundongos.
- ✓ Desenvolver metodologia de extração e quantificação de α e β -amirinas contidas na urina de camundongos;
- ✓ Validar metodologia desenvolvida para quantificação de α e β -amirinas contidas na urina de camundongos.

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Protocolo de Coleta das Matrizes Biológicas

O protocolo de utilização de Animais foi aprovado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (N° 11.1.1087.53.6). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da UFOP e todos os experimentos *in vivo* foram realizados no mesmo local. Para a coleta de material biológico para validação do método bioanalítico, os animais (camundongos Swiss sadios e adultos, pesando 25 ± 5 g) foram mantidos em gaiolas metabólicas em grupos de 2 animais do mesmo sexo, em temperatura controlada de 22 °C a 24 °C, em ciclos claro escuro de 12 horas, tratados com ração e água *ad libitum* e as fezes foram coletadas a cada 24 horas. Após a coleta de quantidade suficiente de fezes e urina, foi realizada a coleta de sangue pelo plexo ocular para a obtenção do plasma para validação do método de quantificação de α e β -amirinas em plasma. Após a coleta do sangue para validação, os animais foram eutanasiados por descolamento cervical. O sangue, previamente heparinizado, foi centrifugado a 9500 g por 10 min e o plasma foi coletado. As amostras foram armazenadas em *freezer* -80 °C a fim de preservar a integridade da matriz. As fezes foram liofilizadas por período de 24 horas e armazenadas também em *freezer* -80 °C.

Todos os ensaios de validação bioanalítica para quantificação de α e β -amirinas tanto em fezes quanto em plasma foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira, da FFCLRP.

5.3.2 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Fezes de Camundongos

5.3.2.1 Extração da Matriz Biológica

Para o desenvolvimento da metodologia de extração foram utilizados 50 mg de fezes contaminadas com a mistura de α e β -amirinas (Concentração final = 50 $\mu\text{g/mL}$). Três substâncias foram avaliadas como padrão interno: friedelina, β -

friedelanol e 5- α -colestano (Concentração final = 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para a extração foram empregados vários solventes de extração sólido-líquido (hexano, acetato de etila, diclorometano, isopropanol ou misturas desses solventes) seguida de outros procedimentos (derivatização, extração em fase sólida - EFS, extração líquido-líquido - ELL).

5.3.2.2 Protocolo de Validação

Para os ensaios de validação, soluções estoque (SE) de padrão interno e analitos foram preparadas em metanol e as curvas de calibração extraídas foram preparadas nas concentrações de 9,6 a 3200,0 $\mu\text{g}/\text{g}$ (p/p , α e β -amirinas/fezes), que posteriormente foram corrigidas para a proporção de cada um dos analitos na amostra, todas contendo 50 μL de solução 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI (5- α -colestano). Foram também definidos para este método os limites inferior (LIQ) e superior (LSQ) de quantificação com o sendo o menor e o maior ponto da curva analítica que foi quantificado com precisão e exatidão, bem como as concentrações de controle de qualidade baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA), correspondendo a aproximadamente duas vezes o LIQ, a concentração média da curva e cerca de 75% do LSQ, respectivamente. Dados de precisão e exatidão intradia foram calculados, bem como foram realizados ensaios de estabilidade, seletividade, efeito matriz e efeito residual para o método, conforme legislação brasileira vigente (ANVISA, 2012).

Todas as análises do desenvolvimento de método e validação foram realizadas em CG-EM como descritos anteriormente. Nesse sistema o detector de massas foi programado para operar em modo de sistema de monitoramento de íons, utilizando os íons diagnósticos de 5- α -colestano de 4 a 24 min (203 m/z , 217 m/z e 372 m/z) e de α e β -amirinas de 24 a 56 min (203 m/z , 218 m/z e 426 m/z).

5.3.3 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Plasma de Camundongos

5.3.3.1 Extração da Matriz Biológica

Diante das dificuldades encontradas na extração de α e β -amirinas das fezes e na tentativa de aperfeiçoar o preparo de amostra para a quantificação dos analitos em plasma, inicialmente foram realizados ensaios para otimização do método de extração. A extração de 50 μ L de plasma foi realizada conforme escrito na Tabela 8 abaixo e quando necessário as amostras foram seguidas de derivatização como descrito para o desenvolvimento do método para quantificação dos analitos em fezes. A segunda partição foi realizada utilizando-se solução hidrometanólica a 70% saturada com K_2CO_3 . O metanol basificado foi preparado pela saturação com o mesmo sal.

Tabela 8: Métodos de extração dos analitos testados para a matriz biológica plasma.

Solvente	Proporção	Derivatização	2ª Partição
Hexano	3x 500 μ L	Sim	Não
Acetato de Etila	3x 500 μ L	Sim	Não
Metanol	3x 500 μ L	Sim	Não
Isopropanol	3x 500 μ L	Sim	Não
Acetonitrila	3x 500 μ L	Sim	Não
Hexano:Metanol	(1:1)3x 500 μ L	Sim	Não
Hexano:Metanol (K_2CO_3)	(1:1) 3x500 μ L	Sim	Não
Hexano:Metanol (K_2CO_3)	500 μ L:3x500 μ L	Sim	Não
Hexano:Metanol (K_2CO_3)	3x500 μ L:500 μ L	Sim	Não
Hexano:Metanol (K_2CO_3)	1000 μ L:3x500 μ L	Sim	Não
Hexano:Metanol (K_2CO_3)	3x500 μ L:1000 μ L	Sim	Não
Hexano	2x500 μ L	Não	1x500 μ L
Hexano	2x500 μ L	Não	2x500 μ L
Hexano	2x500 μ L	Não	3x500 μ L
Hexano	2x500 μ L	Não	1x1000 μ L
Hexano	2x500 μ L	Não	2x1000 μ L
Hexano	3x500 μ L	Não	1x500 μ L
Hexano	3x500 μ L	Não	2x500 μ L
Hexano	3x500 μ L	Não	3x500 μ L
Hexano	3x500 μ L	Não	1x1000 μ L
Hexano	3x500 μ L	Não	2x1000 μ L

* Todas amostras foram agitadas por 5 min em vortex e centrifugadas por 2 min, 9500 g, 4 °C.

Todas as análises do descritas na Tabela acima foram realizadas em CG-EM no mesmo método utilizado para quantificação nas fezes.

5.3.3.2 Otimização do Método de Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

Uma vez que o tempo de análise utilizado no método para quantificação de α e β -amirinas nas fezes foi bastante longo devido a uma matriz bastante complexa e que a matriz biológica plasma apresentava uma quantidade consideravelmente menor de interferentes, foram realizados experimentos na tentativa de reduzir o

tempo de análise para quantificação desses analitos em plasma. Foram testados os métodos descritos na Tabela abaixo:

Tabela 9: Otimização do método de análise de α e β -amirinas em plasma de camundongos

Método	Temperatura inicial da coluna (°C)	Tempo (min)	Aquecimento da coluna (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de análise (min)
Método 1	250	5	10	300	25
Método 2	250	5	15	300	25
Método 3	250	5	20	300	25
Método 4	250	5	25	300	25
Método 5	210	5	20	300	25
Método 6	210	5	25	300	25

5.3.3.3 Protocolo de Validação

Para os ensaios de validação, soluções estoque (SE) do PI (2 $\mu\text{g/mL}$) e analitos (0,08 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$ e 8,0 $\mu\text{g/mL}$) foram preparadas em metanol. As curvas analíticas em plasma foram preparadas fortificando 50 μL de plasma nas concentrações de 80 a 16000 ng/mL de plasma contendo a mistura das α e β -amirinas, que posteriormente foram corrigidas para a proporção de cada um dos analitos na amostra, todas contendo 10 μL de solução 2 $\mu\text{g/mL}$ de PI (5- α -colestano). Foram também definidos para este método os limites inferior (LIQ) e superior (LSQ) de quantificação com o sendo o menor e o maior ponto da curva analítica quantificados com precisão e exatidão, bem como as concentrações de controle de qualidade baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA), correspondendo a aproximadamente duas vezes o LIQ, a concentração média da curva e cerca de 75% do LSQ, respectivamente. Dados de precisão e exatidão intra- e interensaio foram calculados, assim como foram realizados ensaios de estabilidade, seletividade, efeito matriz e efeito residual para o método, conforme legislação brasileira vigente (ANVISA, 2012).

Todas as análises foram realizadas em CG-EM. Inicialmente, na etapa do desenvolvimento de método de extração as análises foram realizadas nas mesmas condições empregadas para análise das fezes. Para a definição do novo método de análise, foi realizado o monitoramento de íons diagnóstico para o PI (203 m/z , 217 m/z e 372 m/z) e para os analitos (203 m/z , 218 m/z e 426 m/z). Para os ensaios de validação todas as análises foram realizadas em modo *splitless* e o monitoramento

de íons de 5- α -colestano foi realizado de 4 a 10 minutos (203 m/z , 217 m/z e 372 m/z) e das α - e β -amirinas de 10 a 23,3 minutos (203 m/z , 218 m/z e 426 m/z).

5.3.4 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Plasma de Camundongos

5.3.4.1 Extração da Matriz Biológica

As amostras de urina (250 μL) foram fortificadas com 50 μL de solução de PI 5- α -colestano (200 $\mu\text{g/mL}$) e extraídas com 1000 μL de hexano sob agitação em vortex por 2 min. Após centrifugação por 30 segundos a 10000 rpm, 20 °C, a fração hexânica foi coletada e levada a secar até resíduo. Posteriormente, foi ressuspensa em 250 μL de metanol.

5.3.4.2 Protocolo de Validação

A curva de calibração para as amostras de urina foi obtida pela preparação de soluções contendo 50 μL (200 $\mu\text{g/mL}$) e α e β -amirinas nas concentrações de 1,92 a 640,0 $\mu\text{g/mL}$ que foram corrigidas para a proporção de α e β -amirinas na amostra. Foram também definidos para este método os limites inferior (LIQ) e superior (LSQ) de quantificação com o sendo o menor e o maior ponto da curva analítica quantificados com precisão e exatidão, bem como as concentrações de controle de qualidade baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA), correspondendo a aproximadamente duas vezes o LIQ, a concentração média da curva e cerca de 75% do LSQ, respectivamente. Dados de precisão e exatidão intra- e interensaio foram calculados, conforme legislação brasileira vigente (ANVISA, 2012).

As amostras de urina foram analisadas pelo mesmo método descrito para a análise de plasma monitorando os mesmos íons diagnóstico descritos nos mesmo tempos, entretanto, utilizando-se o modo *split* ou de divisão na razão de 1:10.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Fezes de Camundongos

5.4.1.1 Extração da Matriz Biológica

Foram avaliadas três substâncias como PI (friedelina, β -friedelanol e 5- α -colestano), vários solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila, isopropanol) e duas técnicas de extração usando extração líquido-líquido (ELL) ou extração em fase sólida (EFS).

Vários problemas foram encontrados nos métodos de extração para os analitos e padrões. Ora, a metodologia extraía o padrão, mas não os analitos, ora o inverso acontecia. Para a primeira extração das fezes foram testados os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila e isopropanol. As extrações com isopropanol pareceram mais efetivas para os analitos, para friedelina e β -friedelanol entretanto, as extrações utilizando hexano resultaram em cromatogramas mais limpos e também foram efetivas para extrair todos os padrões. As análises iniciais foram seguidas de derivatização utilizando 100 μ L de piridina como solvente e 100 μ L de solução de agente derivatizante contendo BSTFA [N, O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida] com 1% de TMCS (trimetilclorosilano) que foram aquecidas a 75 °C por 1 hora. A derivatização foi realizada para manter a integridade da coluna cromatográfica e garantir que ela não seria contaminada com ácidos graxos de cadeia longa (AG) ou com outras substâncias não voláteis ou de alta polaridade presentes na matriz, bem como para não danificar o injetor do cromatógrafo. As análises diretas da extração, pós derivatização, mostraram elevado teor de AG e saturação do detector. Assim foi avaliado um segundo procedimento de extração (EFS e ELL) a fim de eliminar principalmente os AG antes da injeção no equipamento. Para a EFS foram testados cartuchos de sílica de fase normal e de fase reversa que foram eluídos com água e/ou solventes orgânicos disponíveis no laboratório. Os cartuchos de fase normal foram mais promissores, entretanto, diante dos diversos gradientes testados, não foi possível encontrar condições que promovessem uma extração eficiente dos analitos e do PI assim como eliminação completa dos AG. Desta maneira, caso este procedimento fosse

utilizado, seria necessário realizar a derivatização antes da injeção, o que dificultaria o processo de validação envolvendo uma nova etapa com muitas variáveis a serem controladas.

Assim, após a extração das fezes com hexano, novos procedimentos de ELL utilizando-se soluções hidrometanólicas acidificada ou basificada e hexano foram testados a fim de eliminar os AG da fração a ser injetada no cromatógrafo. A utilização de solução acidificada não promoveu a eliminação de AG, entretanto, quando realizado o procedimento com solução metanol:água (7:3 v/v) saturada com carbonato de potássio (K_2CO_3) observou-se eficiente eliminação dos AG e sem promover problemas na recuperação do PI escolhido, 5- α -colestano, e dos analitos na fração hexânica.

O padrão 5- α -colestano foi o PI de escolha devido às características semelhantes às dos analitos e também pela facilidade de compra e custo. Os demais padrões testados são extensivamente caros e vendidos em frascos com quantidades muito pequenas, o que dificulta a aquisição de quantidades suficientes para a validação de dois métodos cromatográficos.

Várias foram as proporções de solução hidrometanólica avaliadas. Apesar de não haver grande diferença nos perfis de recuperação dos analitos e do PI nas diferentes proporções, a solução metanol:água (7:3 v/v) saturada com K_2CO_3 foi escolhida pois promovia melhor limpeza na região de eluição dos AG. O protocolo para extração dos analitos e do PI definidos no método está detalhado no Quadro 1.

- 1) Adicionar em 50 mg de fezes 400 μ L de hexano, agitar em vórtex por 5 minutos, centrifugar a 9500g/10 minutos. Recolher a fase líquida orgânica. Repetir este procedimento mais 2 vezes.
- 2) Secar a fase orgânica até resíduo e ressuspender em 700 μ L de hexano.
- 3) Adicionar 500 μ L de solução metanol:água (7:3 v/v) saturada com K_2CO_3 , agitar em vórtex por 1 minuto, centrifugar a 9500g/30 segundos. Retirar a fase aquosa e repetir o procedimento mais 3 vezes.
- 4) Evaporar a fase orgânica até resíduo e ressuspender em 200 μ L de metanol.

Quadro 1: Protocolo de Extração das Amostras de Fezes.

5.4.1.2 Validação do Método

A curva analítica contemplou o intervalo de concentrações de 9,6 a 3200 μ g/g de fezes correspondente à mistura de isômeros que foram corrigidas para 6,32 a

2107,96 $\mu\text{g/g}$ de fezes para β -amirina e 3,28 a 1092,04 $\mu\text{g/g}$ de fezes para α -amirina.

Assim, na Figura 12 e nas Tabelas 10 – 13 estão representados os resultados de validação bioanalítica para o método de quantificação das amirinas em fezes de camundongos.

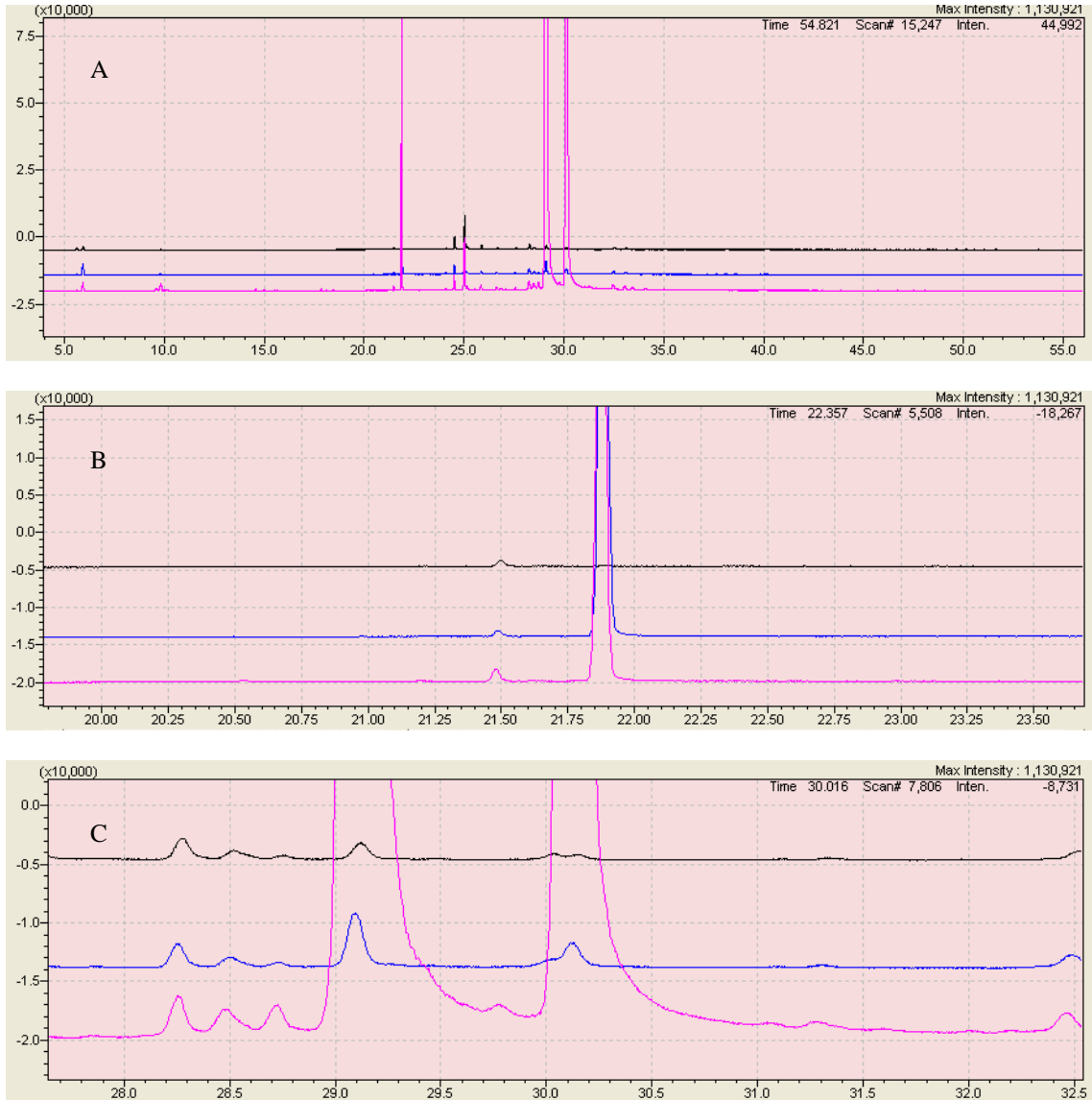


Figura 12: A – Cromatogramas obtidos para o método de quantificação de α e β -amirina em fezes de camundongos LIQ (azul), LSQ (rosa) e Branco (preto). B – Ampliação da região do PI. C – Ampliação da região dos analitos. Tempo de retenção do PI, α - e β -amirina 21,87; 30,15 e 29,15 min, respectivamente.

Tabela 10: Resultados de Linearidade para Análise das α - e β -amirina em fezes de camundongos*

Analito	Linearidade		Lack of fit		
	Faixa de Linearidade ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	Equação Linear	r	F	P
β -Amirina	6,32 - 2107,96	$y = 0,290 + 0,00432 x$	0,994	0,53	0,717
α -Amirina	3,28– 1092,04	$y = 0,101 + 0,00236 x$	0,998	3,05	0,059

* Cálculos realizados utilizando a ponderação estatística $1/x$.
 $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Tabela 11: Resultados de Precisão, Exatidão intraensaio para Análise das α e β -amirina em fezes de camundongos

Analito	Concentração Nominal ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	Concentração Obtida ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	Precisão ^a (%)	Exatidão ^b (%)
β -Amirina	6,32	6,92	3,5	9,5
	2107,96	2129,86	6,4	1,0
	21,08	19,06	6,9	-9,6
	1053,96	981,55	10,7	-6,9
	1686,36	1739,37	3,6	3,1
α -Amirina	3,28	3,51	4,4	7,2
	1092,04	1079,53	7,5	-1,1
	10,92	10,00	5,3	-10,4
	546,04	519,72	9,6	-4,8
	873,64	910,63	4,3	4,9

^a precisão expressa como desvio padrão relativo

^b exatidão expressa como erro relativo em porcentagem

Tabela 12: Resultados de Precisão, Exatidão interensaio para Análise das α - e β -amirina em fezes de camundongos

Analito	Concentração Nominal ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	Concentração Obtida ($\mu\text{g/g}$ de fezes)	Precisão (%) ^a	Exatidão (%) ^b
β -Amirina	6,32	6,57	11,8	3,9
	2107,96	2117,07	3,8	0,4
	21,08	20,05	7,4	-4,9
	1053,96	1035,50	11,2	-1,7
	1686,36	1703,90	6,1	1,0
α -Amirina	3,28	3,44	10,6	5,2
	1092,04	1091,94	4,6	0,0
	10,92	10,24	6,3	-6,1
	546,04	536,60	10,5	-1,7
	873,64	886,05	6,5	1,4

^a precisão expressa como desvio padrão relativo

^b exatidão expressa como erro relativo em porcentagem

Tabela 13: Resultados de Estabilidade para Análise das α e β -amirina em fezes de camundongos *

Estabilidade	β -Amirina				α -Amirina			
	Concentração nominal ($\mu\text{g/g}$ de fezes)				Concentração nominal ($\mu\text{g/g}$ de fezes)			
	21,08		1686,36		10,92		873,64	
	EPR ^a (%)	DPR ^b (%)	EPR ^a (%)	DPR ^b (%)	EPR ^a (%)	DPR ^b (%)	EPR ^a (%)	DPR ^b (%)
1º etapa de extração	-5,7	9,2	3,9	0,6	-7,4	6,2	3,8	0,9
Bancada	4,6	12,5	-2,5	9,3	0,7	8,4	-2,0	9,9
Autoinjeter	-9,8	2,9	-13,7	2,2	-12,3	4,2	-14,7	2,4
1º ciclo cong/descong	-4,6	6,2	-13,5	3,3	-4,1	5,8	-13,5	5,1
2º ciclo cong/descong	0,02	2,6	2,6	3,0	-1,2	6,1	-11,3	10,2
3º ciclo cong/descong	-10,2	6,4	-1,2	8,3	-10,2	4,6	-3,4	8,0
Longa duração 9 meses	-2,9	-11,6	-5,5	-4,3	-4,5	-4,8	-4,7	-4,5

^b erro relativo em porcentagem (exatidão)

^a desvio padrão relativo (precisão)

Não houve interferentes no tempo de retenção do PI, mas no cromatograma da Figura 12-C é possível visualizar interferentes nos tempos de retenção dos analitos. Apesar de possuir interferentes, eles apresentaram respostas inferiores a 20% da resposta do LIQ (ANVISA 2012) e o método mostrou-se seletivo para quantificar os analitos. Os resultados de efeito de matriz mostraram variações nos fatores de matriz normalizados nas CQB e CQA inferiores a 15% para ambos os analitos e não foi verificado efeito residual para o PI ou para os analitos. Os resultados de estabilidade mostraram que, apesar de os tempos de preparo da amostra e corrida cromatográfica serem longos, os analitos e o PI permaneceram estáveis nas fezes em todas as fases do preparo, bem como no auto injetor do equipamento. Além disso, as amostras permaneceram estáveis após 3 ciclos de congelamento e descongelamento bem como após 9 meses de armazenamento em *freezer* a temperatura de -80°C . Todas as análises foram realizadas conforme a legislação vigente (ANVISA, 2012). Os resultados de validação mostraram que o método foi seletivo, linear, preciso e exato para quantificação da mistura triterpênica em fezes de camundongos nas concentrações acima citadas.

5.4.2 Desenvolvimento e Validação do Método para Quantificação de Alfa e Beta amirinas em Plasma de Camundongos

5.4.2.1 Extração da Matriz Biológica

Durante o processo de otimização da extração dos analitos e do PI foi possível observar que isopropanol promovia a extração significativa de aminoácidos e ácidos graxos das amostras de plasma. Por outro lado, com acetonitrila e metanol ocorria um aumento na quantidade de ácidos graxos e açúcares extraídos do plasma. Além disso, não ocorriam extrações eficientes de analitos e PI. Desta maneira, além de dificultar a quantificação dos analitos no plasma, para se realizar a injeção dessas amostras no equipamento seria necessário um novo processo para limpeza da amostra ou de derivatização, o que poderia reduzir ainda mais a recuperação dos analitos. As extrações com hexano e acetato de etila promoviam perfis de extração semelhantes, entretanto a recuperação dos analitos e do PI foi melhor com a utilização de hexano. Porém, o uso de hexano extrai com muita eficiência ácidos graxos e triglicerídeos o que obrigatoriamente exigiria a uma nova etapa de limpeza da amostra para evitar a danificação do injetor e da coluna cromatográfica.

Na tentativa de realizar as duas partições simultaneamente, foram realizados ensaios utilizando-se hexano e metanol basificado ou solução hidrometanólica 70% basificada. Entretanto, esta estratégia não foi eficiente em eliminar os ácidos graxos presentes na matriz biológica. Já as extrações com hexano, seguidas de partição com solução hidrometanólica a 70% basificada com K_2CO_3 apresentaram perfil de eliminação dos ácidos graxos e de recuperação dos analitos e do PI satisfatórios para as análises posteriores.

Desta maneira, devido à extração significativa tanto de analitos quanto de PI bem como a expressiva eliminação de ácidos graxos o método de extração escolhido está descrito no Quadro 2:

- 1) Adicionar em 50 μ L de plasma 500 μ L de hexano, agitar em vórtex por 5 minutos, centrifugar a 9500g/2 minutos. Recolher a fase orgânica. Repetir este procedimento.
- 2) Adicionar na fase orgânica 1000 μ L de solução metanol:água (7:3 v/v) saturada com K_2CO_3 , agitar em vórtex por 1 minuto, centrifugar a 9500g/30 segundos. Recolher a fase hexânica
- 4) Evaporar a fase hexânica até resíduo e ressuspender em 250 μ L de hexano.

Quadro 2: Protocolo de Extração das Amostras de Plasma

5.4.2.2 Otimização do Método

Todos os métodos testados não apresentaram interferentes nos tempos de retenção dos analitos ou do PI, entretanto o método 2 (Tab. 9) foi escolhido pois, além de promover um aquecimento mais brando na coluna e apresentar uma separação analítica eficiente para os analitos, apresentou tempos de retenção menores, tanto para os analitos quanto para o PI e desta maneira foi o método escolhido para a quantificação das α - e β -amirinas em plasma de camundongos.

5.4.2.3 Validação do Método

As amostras de plasma foram fortificadas com as soluções estoque de amirinas contemplando as concentrações de 80 ng/mL; 160 ng/mL; 480 ng/mL; 1600 ng/mL; 4800 ng/mL; 8000 ng/mL; 9600 ng/mL 12800 ng/mL e 16000 ng/mL de plasma da mistura de isômeros que foram corrigidas para 52,7 ng/mL; 105,4 ng/mL; 316,2 ng/mL; 1054,0 ng/mL; 3161,9 ng/mL; 5269,9 ng/mL; 6323,9 ng/mL; 8431,8 ng/mL e 10530,8 ng/mL de plasma para β -amirina e 27,3 ng/mL; 54,6 ng/mL; 163,8 ng/mL; 546,0 ng/mL; 1638,1 ng/mL; 2730,1 ng/mL; 3276,1 ng/mL 4368,2 ng/mL e 5460,2 ng/mL de plasma para α -amirina.

Assim, na Figura 13 e nas Tabelas 14 – 17 estão representados os resultados de validação bioanalítica para o método de quantificação das amirinas em plasma de camundongos.



Figura 13: A – Cromatogramas obtidos para o método de quantificação de α e β -amirina em plasma de camundongos LIQ (rosa), LSQ (azul) e Branco (preto). B – Ampliação da região do PI. C – Ampliação da região dos analitos. Tempo de retenção do PI, α - e β -amirina 9,95; 15,15 e 14,30 min, respectivamente.

Tabela 14: Resultados de Linearidade para Análise de α e β -amirina em plasma de camundongos*

Analito	Faixa de Linearidade (ng/mL de plasma)	Linearidade		Lack of fit	
		Equação Linear	r	F	p
β -Amirina	52,70 – 10539,80	$y = -0,0290 + 0,00112x$	0,999	2,26	0,064
α -Amirina	27,30 – 5460,20	$y = 0,0929 + 0,000577x$	0,997	1,59	0,194

* Cálculos realizados utilizando a ponderação estatística $1/x$.
 $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Tabela 15: Resultados de Precisão, Exatidão intraensaio para Análise de α e β -amirina em plasma de camundongos*

Analito	Concentração Nominal (ng/mL)	Concentração Obtida (ng/mL)	Precisão ^a (%)	Exatidão ^b (%)
β -Amirina	52,7	58,5	6,6	11,0
	105,4	111,2	5,6	5,5
	5269,9	5031,1	6,0	-4,5
	8431,8	8693,2	1,4	3,1
	10539,8	10704,7	1,6	1,6
α -Amirina	27,3	30,1	7,8	10,1
	54,6	56,2	6,4	3,0
	2730,1	2559,4	6,3	-6,3
	5460,2	5534,7	2,2	1,4

^a precisão expressa como desvio padrão relativo

^b exatidão expressa como erro relativo em porcentagem

Tabela 16: Resultados de Precisão, Exatidão interensaio para Análise de α e β -amirina em plasma de camundongos*

Analito	Concentração Nominal (ng/mL de plasma)	Concentração Obtida (ng/mL de plasma)	Precisão ^a (%)	Exatidão ^b (%)
β -Amirina	52,7	57,9	5,9	9,9
	105,4	112,1	4,9	6,3
	5269,9	4832,5	6,1	-8,3
	8431,8	8639,7	5,2	0,0
	10539,8	11077,9	4,3	-4,1
α -Amirina	27,3	29,4	6,5	7,6
	54,6	57,1	6,2	4,6
	2730,1	2520,8	5,7	-7,7
	4368,2	4463,1	5,7	0,6
	5460,2	5705,7	4,6	-3,6

^a precisão expressa como desvio padrão relativo

^b exatidão expressa como erro relativo em porcentagem

Tabela 17: Resultados de Estabilidade para Análise das α e β -amirina em fezes de camundongos

	β -Amirina				α -Amirina			
	Concentração nominal (μ g/mL de plasma)				Concentração nominal (μ g/mL de plasma)			
	105,4		8431,8		54,6		4368,2	
Estabilidade	EPR ^a (%)	DPR ^b (%)	EPR ^a (%)	DPR ^b (%)	EPR ^a (%)	DPR ^b (%)	EPR ^a (%)	DPR ^b (%)
1 ^o etapa de extração	-9,8	3,3	-5,5	3,5	-10,5	3,1	-7,1	5,43
Autoinjeter	-9,8	4,8	6,3	-5,6	-4,3	7,1	10,2	-3,2
Longa duração 4 meses	-10,7	2,4	-4,6	0,7	3,8	-8,8	3,2	-1,6
3 ^o ciclo cong/descong	-13,7	1,4	-6,05	-3,25	1,6	-7,9	6,7	-2,4

^b erro relativo em porcentagem (exatidão)

^a desvio padrão relativo (precisão)

A resposta do interferente no tempo de retenção do PI não atingiu 5% das concentrações utilizadas nas amostras e não foi possível verificar interferentes com respostas acima de 15% daquelas para LIQ dos analitos. Os resultados de efeito de matriz mostraram variações nos fatores de matriz normalizados nas CQB e CQA inferiores a 10% para ambos os analitos e não foi verificado efeito residual para o PI nem para os analitos.

Os resultados de estabilidade mostraram que os analitos e o PI permaneceram estáveis no plasma na primeira etapa do preparo, no autoinjeter e após 4 meses de armazenamento em *freezer* a temperatura de -80°C . A matriz mostrou-se estável também após 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Todas as análises foram realizadas conforme a legislação vigente (ANVISA, 2012). Os resultados de validação mostraram que o método foi seletivo, linear, preciso e exato para quantificação da mistura triterpênica em plasma de camundongos na faixa de concentração descrita.

5.4.3 Desenvolvimento e Validação do Método de Quantificação de α e β -amirinas em Urina de Camundongos

Os resultados da validação do método de quantificação de α e β -amirinas em urina de camundongos estão representados na Figura 14 e na Tabela 18.

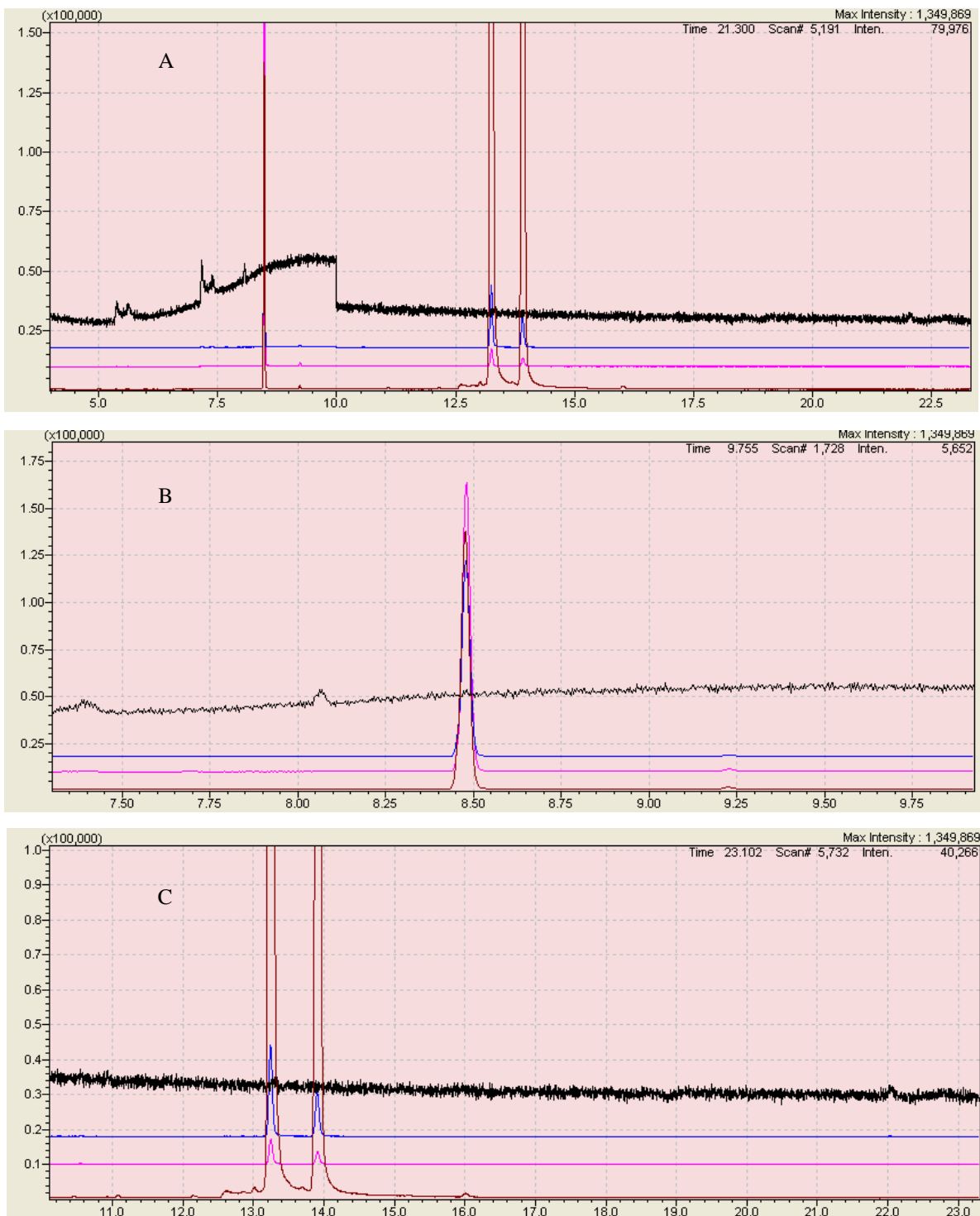


Figura 14: A – Cromatogramas obtidos para o método de quantificação de α e β -amirina em urina de camundongos LIQ (rosa), CQB (azul), CQM (marrom), Branco (preto). B – Ampliação da região do PI. C – Ampliação da região dos analitos. Tempo de retenção do PI, α - e β -amirina 8,49; 13,91 e 13,25 min, respectivamente.

Tabela 18: Resultados de Precisão, Exatidão intraensaio para Análise das α e β -amirina em urina de camundongos

Analito	Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$ de urina)	Concentração Obtida ($\mu\text{g/mL}$ de urina)	Precisão ^a (%)	Exatidão ^b (%)
β -Amirina	1,15	1,16	3,0	1,0
	3,84	3,94	2,7	2,4
	192,00	190,68	2,1	-0,7
	307,20	331,43	1,5	7,3
	384,00	442,34	2,6	13,1
α -Amirina	0,77	0,78	5,1	1,5
	2,56	2,58	3,8	0,7
	128,00	126,80	1,4	-1,0
	204,80	226,30	2,8	9,4
	256,00	294,41	3,0	13,0

^a precisão expressa como desvio padrão relativo

^b exatidão expressa como erro relativo em porcentagem

Apenas a validação parcial foi realizada, pois apenas uma vez foi realizada a análise dos dados de urina após perceber que toda a quantidade administrada dos isômeros não foi eliminada nas fezes, era necessário identificar se o restante estava sendo eliminado na urina. Assim, um novo experimento foi realizado.

O método mostrou-se linear na faixa de 1,15 a 384,00 $\mu\text{g/mL}$ de urina para β -amirina e de 0,77 a 256,00 $\mu\text{g/mL}$ para α -amirina. Também se mostrou seletivo, preciso e exato.

Com os resultados obtidos para quantificação de α e β -amirinas na urina por este método foi possível quantificar os isômeros e calcular os parâmetros de Cl_R para ambos, após administração endovenosa.

5.5 Conclusões

Os métodos de quantificação de amirinas em plasma e fezes desenvolvidos foram validados e apresentaram seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão e estabilidade satisfatórios para quantificação de α e β -amirinas em plasma e fezes de camundongos. O método de quantificação de α e β -amirinas em urina foi parcialmente validado e mostrou-se seletivo, preciso e exato para as análises.

**Capítulo 6 - REAÇÕES BIOMIMÉTICAS DE OXIDAÇÃO
DE ALFA E BETA AMIRINAS USANDO
METALOPORFIRINAS**

6.1 Introdução

Monooxigenases do citocromo P450 (CYP450) são um tipo de hemoproteínas possuidoras de porfirina de ferro como centro ativo, estão amplamente distribuídas nos organismos e são responsáveis por catalisar hidroxilações em ligações C-H inertes utilizando oxigênio em condições suaves (GIANG & CANCHENG, 2012). Nessas reações ocorre a incorporação de um átomo de oxigênio em um substrato enquanto outro átomo de oxigênio é reduzido por dois elétrons gerando água (LOHMANN & KARST, 2008).

Com o surgimento de novas entidades químicas é de extremo interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos que sejam realizados estudos de metabolismo *in vitro* a fim de direcionar o estudo de biotransformação de maneira rápida já nos primeiros estágios de pesquisa a fim de definir a viabilidade do uso desse candidato (LOHMANN & KARST, 2008).

Alguns testes de biotransformação *in vitro* podem ser realizados utilizando matrizes contendo CYP450. Dentre eles podem ser citados os modelos de fígado isolado perfundido, pedaços de fígado, utilização de hepatócitos isolados, homogenato de fígado ou frações desse homogenato (LOHMANN & KARST, 2008).

Entretanto, utilizar diretamente CYP450 como catalizador de oxidações na indústria torna-se difícil uma vez que as hidroxilações que ocorrem no organismo por essa via envolvem múltiplas etapas de processos complicados de transferência de elétrons (GIANG & CANCHENG, 2012).

Dentre esses métodos o de mais fácil obtenção e manuseio é o de frações de homogenato de fígado que são obtidas por centrifugação diferencial desse homogenato. Cada fração é composta por um tipo de enzimas: a fração microssomal contém enzimas do CYP450, a fração citosólica contém enzimas de fase II e a fração S9 contém ambas as enzimas de fase I e II e oferece a mais completa representação de enzimas do perfil metabólico. A fração microssomal é bastante popular, entretanto exigem adição de cofatores e possuem a desvantagem de impossibilidade de modelação enzimática e limitações das medições quantitativas (LOHMANN & KARST, 2008)

Em 1979 foi relatada pela primeira vez a utilização de um sistema empregando uma metaloporfirina sintética (clorotetrafenilporfirina de ferro III)

utilizando iodosilbenzeno como oxidante a fim de realizar reações biomiméticas de oxidação de ligações C-H inertes. Este sistema que mimetiza a ação de enzimas do CYP450 tem sido amplamente utilizado como modelo para estudos de hidroxilações sob condições ambientes (GIANG & CANCHENG, 2012; DE FARIA *et al.*, 2011) e desde então tem sido amplamente utilizadas na geração de moléculas para aplicação na química fina e na indústria farmacêutica (DE FARIA *et al.*, 2011).

Atualmente, as metaloporfirinas de ferro são as mais comumente utilizadas para estes estudos pois são capazes de catalisar oxidações orgânicas de maneira bastante semelhante ao que ocorre com a enzima biológica (DE FARIA *et al.*, 2011), entretanto podem ser utilizadas estruturas contendo manganês e zinco por exemplo como metais de coordenação. Já como oxidantes podem ser utilizados hipoclorito de sódio (NaOCl), iodosilbenzeno (PhIO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), terc-butil-hidroperóxido (*t*-BuOOH) ou ácidos peroxicarboxílicos como o ácido 3-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA) (LOHMANN & KARST, 2008).

Vários sistemas porfirínicos tem sido reportados na literatura e tem sido preparados catalizadores de 3 gerações diferentes, como exemplificado na Figura 15.

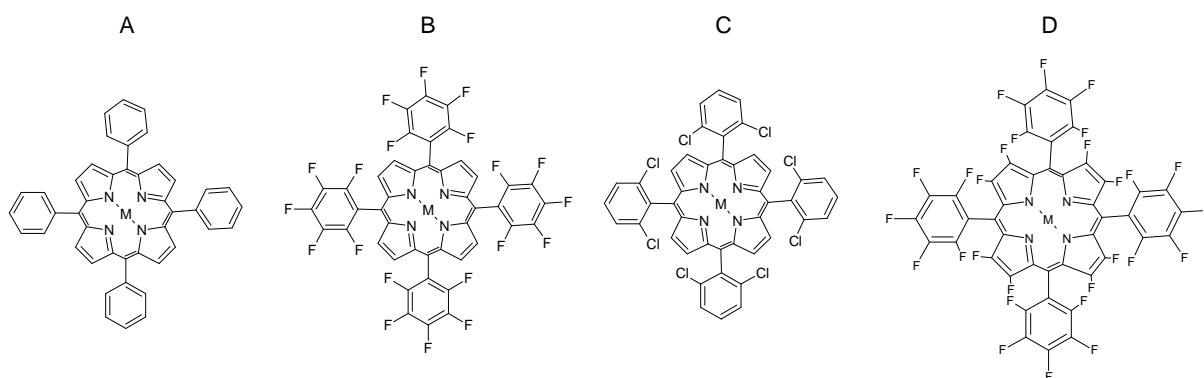


Figura 15: Fórmula estrutural de metaloporfirinas de 1^a geração (A) 2^a geração (B-C) 3^a geração (D). M corresponde ao metal (Fe ou Mn)

A aplicação de reações catalíticas biomiméticas utilizando metaloporfirinas na oxidação de produtos naturais é bastante promissora, uma vez que pode auxiliar no descobrimento de novas drogas para utilização clínica e tem sido realizada para algumas classes de compostos naturais como lignanas e óleos essenciais (DE FARIA *et al.*, 2011). Outro composto de origem natural que teve sua metabolização *in vitro* recentemente publicada foi o lapachol cuja metabolização com catalizador de

Jacobsen produziu onze derivados de oxidação (NIEHUES *et al.*, 2012). Já as reações biomiméticas utilizando metaloporfirinas para metabolização de grandisina produziu apenas um metabólito putativo (FERREIRA *et al.*, 2012). Entretanto, diante da diversidade de classes e substâncias naturais, muito ainda deve ser feito a fim de elucidar os processos de metabolismo *in vitro* e *in vivo* de diversas substâncias.

6.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar reações biomiméticas preliminares de oxidação de α e β -amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e H₂O₂, *m*-CPBA ou PhIO como oxidantes;
- ✓ Realizar o monitoramento da reação utilizando um oxidante de escolha.

6.3 Materiais e Métodos

6.3.1 Reações Preliminares de Metabolismo *in vitro*

As reações biomiméticas preliminares de metabolismo *in vitro* foram realizadas por Dra. Valéria Priscila de Barros, da FFCLRP/USP sob coordenação da Profa. Dra. Marilda das Dores Assis da mesma instituição. As reações foram feitas utilizando FeTFPP (meso tetraquis (pentafluorofenil) porfirina de ferro III) como catalisador e como oxidantes H₂O₂, *m*-CPBA ou PhIO nas proporções 1:40:40 (catalisador:substrato:oxidante) durante 4 horas de reação à temperatura ambiente e sob agitação magnética. As análises das frações e escolha do oxidante para preparação das reações para isolamento foram definidas pela Dra. Valéria e foi recebido um frasco contendo a reação final a partir de 40 mg de amostra, bem como os padrões. As amostras foram analisadas em CG-EM nas condições já mencionadas no item 3.3 ou em CG-DIC (cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama) em coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de espessura do filme), injeção de 1,5 μ L, modo *split* na razão de 1:20, tendo como fase móvel hélio na vazão 1,41 mL/min. Programação de temperatura de 200 a 290 °C, 10 °C/min, tempo de análise 56 min e detector de chamas a 290 °C.

6.3.2 Monitoramento da Reação

Soluções estoque de mistura de α e β -amirinas (5 mg/mL), FeTFPP (2 mg/mL) e *m*-CPBA (2 mg/mL) foram preparadas em CH₂Cl₂. Para a reação foram adicionados 23,4 μ L de solução de FeTFPP, 150 μ L de solução de amirinas e 151,7 μ L solução de *m*-CPBA. O volume final foi ajustado para 1500 μ L a fim de obter proporções de 1:40:40 (catalisador:substrato:oxidante). Foram realizados três controles de reação contendo apenas catalisador e substrato, catalisador e oxidante ou substrato e oxidante. Reações contendo apenas oxidante ou catalisador ou substrato também foram realizadas. As reações foram mantidas por 24 horas e foram retiradas alíquotas de 100 μ L nos tempos 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 16 e 24 horas que foram analisadas em CG-EM segundo o método descrito na seção 3.3.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Reações Biomiméticas Preliminares de Metabolismo *in vitro*

As análises de CG-DIC da reação biomimética preliminar de metabolismo *in vitro* utilizando FeTFPP como catalisador e como oxidantes *m*-CPBA nas condições citadas no item 6.3.1 bem como dos padrões estão representadas na Figura 16.

É possível perceber que a reação forneceu produtos e as análises sugerem seletividade ocorrendo apenas reação com uma das amirinas (β -amirina) (Fig.16-B). As análises de CG-EM apresentadas na Figura 17 corroboram com os dados da Figura 16. É possível sugerir que os produtos formados podem estar relacionados com as alterações mostradas na Tabela 19. Entretanto, os resultados não foram conclusivos.

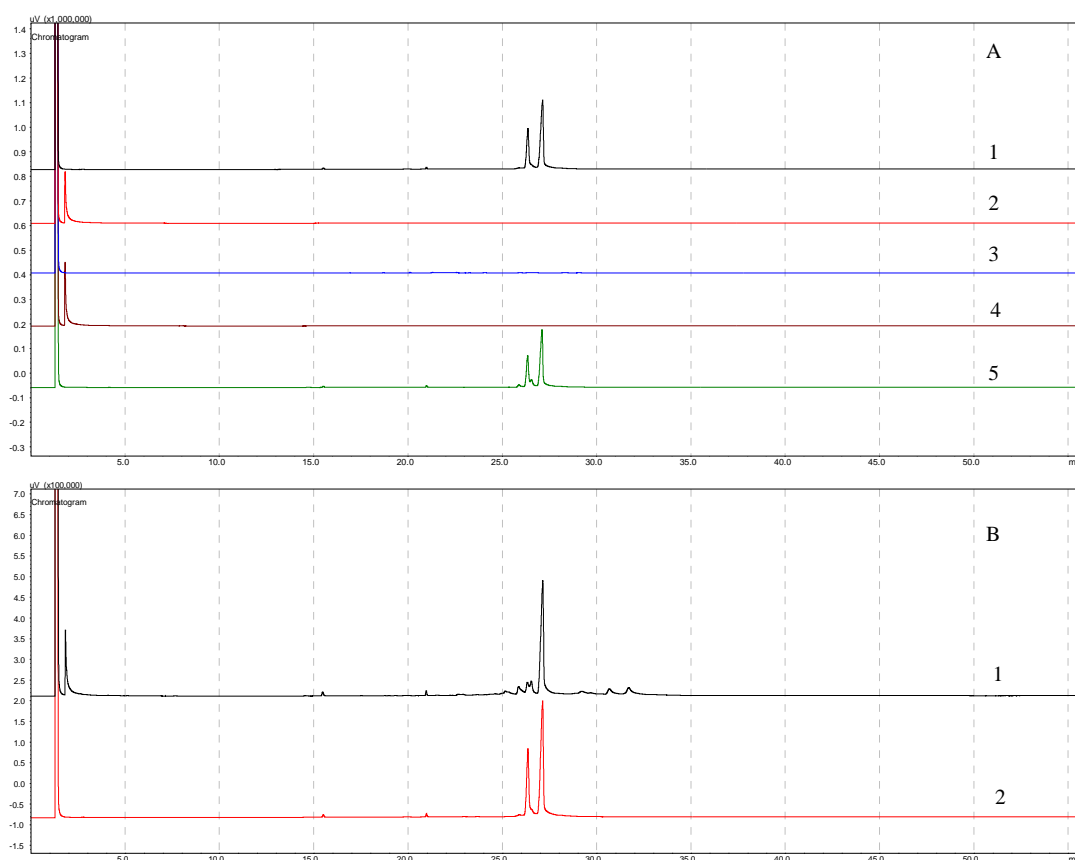


Figura 16: Resultados das análises em CG-DIC para o ensaio de reações biomiméticas de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e *m*-CPBA como oxidante. Em (A) análises dos controles de reação: 1 - padrão de α,β -amirina; 2 - padrão de *m*-CPBA; 3 - padrão de FeTFPP; 4 - FeTFPP + *m*-CPBA; 5 - FeTFPP + α,β -amirina. Em (B) 1 - reação contendo FeTFPP + *m*-CPBA + α e β -amirina. Proporção 1:40:40, 4 horas de reação sob agitação magnética constante e 2 - padrão α,β -amirina.

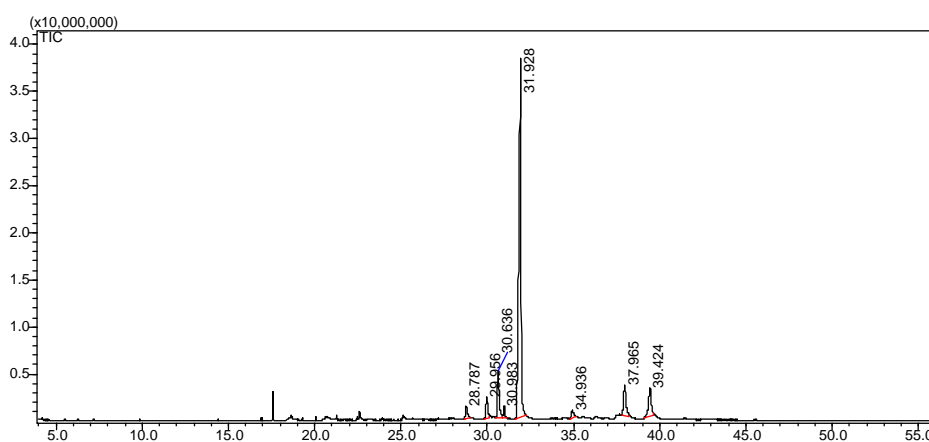


Figura 17: Análises em CG-EM para o ensaio de reações biomiméticas de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e *m*-CPBA como oxidante.

Tabela 19: Possíveis produtos formados pela reação biomimética de metabolismo de amirinas com catalisador FeTFPP e oxidante *m*-CPBA

TR (min)	<i>m/z</i> – íon molecular	Diferença para MM amirinas	Possibilidade de oxidação
28,787	424	- 2	Desidrogenação ou oxidação da hidroxila
29,956	424	- 2	Desidrogenação ou oxidação da hidroxila
30,983	424	- 2	Desidrogenação ou oxidação da hidroxila
34,936	476	+ 50	Epoxidação seguida de abertura e Oxidação
37,965	442	+ 16	Oxidação de carbono inerte
39,424	442	+ 16	Oxidação de carbono inerte.

É sabido que os catalizadores metaloporfirínicos utilizados podem apresentar seletividade para substratos (LOHMANN & KARST, 2008; GIANG & CANCHENG, 2012; DE FARIA *et al.*, 2011) e os resultados das análises sugerem uma seletividade para a β -amirina. Contudo, estas amostras foram injetadas no cromatógrafo imediatamente após o preparo e quando analisados imediatamente após a reação não é observado o mesmo perfil. Em outras reações realizadas no laboratório foi possível observar que mesmo após a secagem das reações utilizando oxidantes, os substratos continuam a ser degradados. Podemos sugerir que a ação do oxidante, em grandes proporções no meio, mesmo após secagem da reação continua promovendo a degradação seletiva de um dos substratos.

6.4.2 Monitoramento da Reação

Nas Figuras 18 – 20 e nas Tabelas 20 e 21 estão representados os resultados para o monitoramento da reação biomimética de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalisador e *m*-CPBA como oxidante.

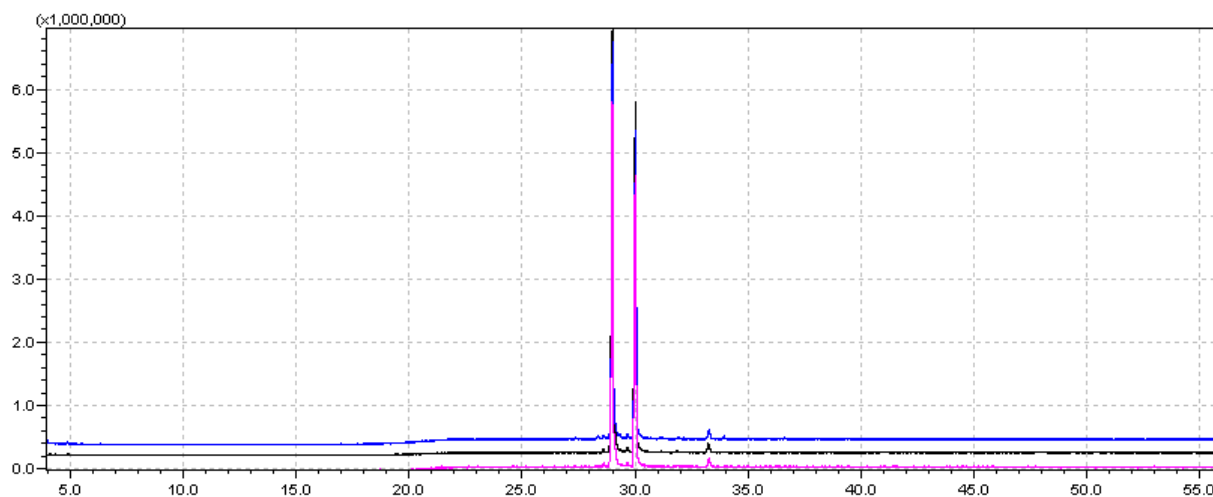


Figura 18: Resultados das análises em CG-EM para os controles do monitoramento das reações biomiméticas de oxidação de amirinas. Em rosa solução de amirinas, em preto solução de amirinas + catalizador e em azul, solução de amirinas + oxidante.

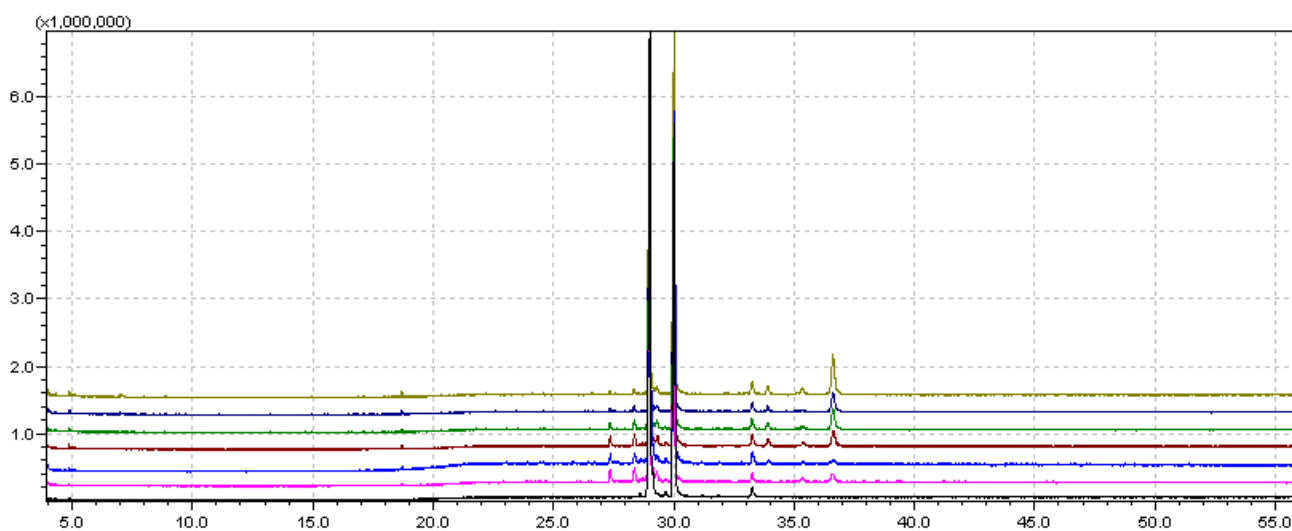


Figura 19: Análises em CG-EM para o ensaio de reações biomiméticas de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e *m*-CPBA como oxidante. Resultados obtidos para do inferior para o posterior: amirinas (inferior, em preto) e reações nos tempos 0; 0,5; 1; 4; 8; 16 e 24 horas após reação (de rosa à verde).

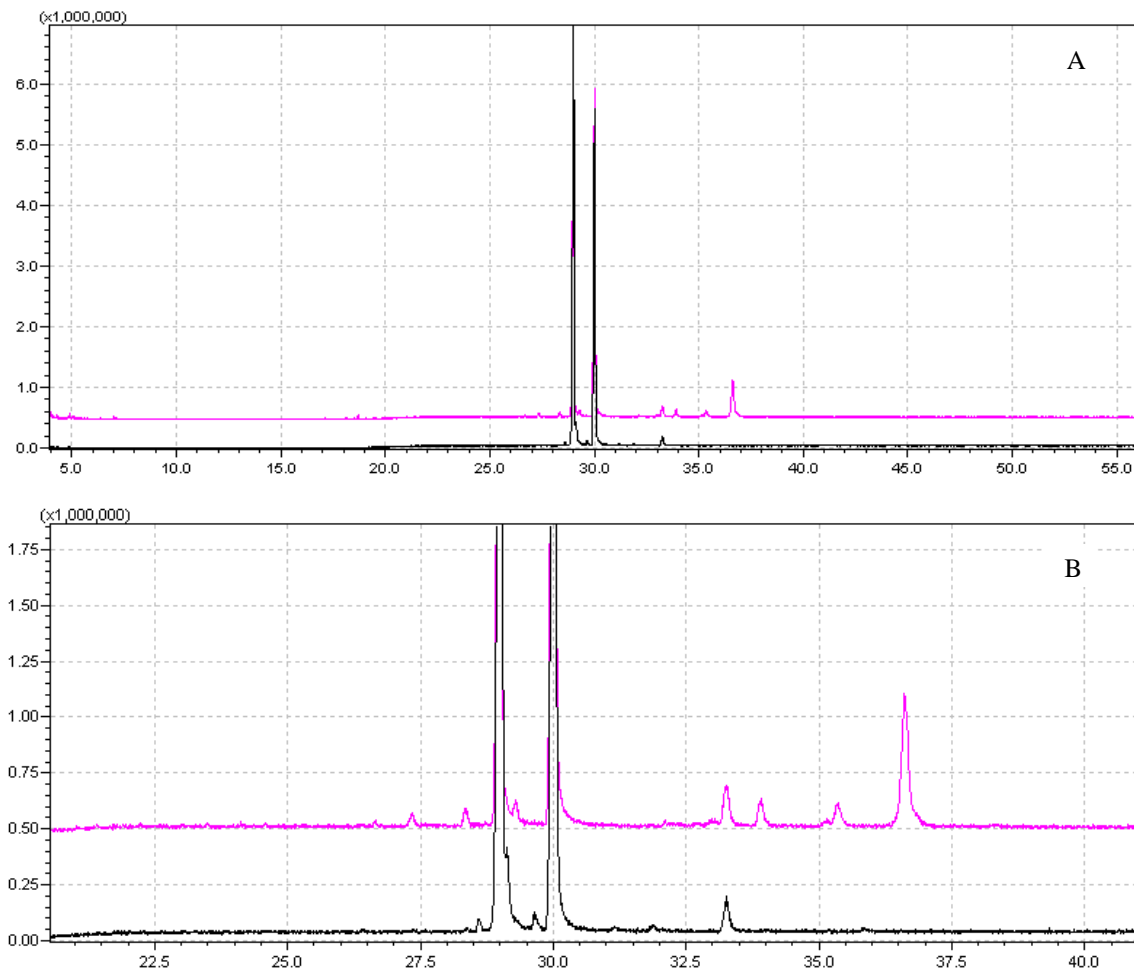


Figura 20: Análises em CG-EM para o ensaio de reações biomiméticas de oxidação de amirinas utilizando FeTFPP como catalizador e *m*-CPBA como oxidante. Em preto, solução de amirinas e em rosa reação após 24 horas. Em (B) região de interesse ampliada.

Tabela 20: Características dos sinais cromatográficos na reação biomimética de metabolismo de amirinas com catalisador FeTFPP e oxidante *m*-CPBA após 24 horas

TR (min)	<i>m/z</i> – íon molecular	Diferença para MM amirinas	Possibilidade de oxidação	% Área
27,34	424	-2	Oxidação de hidroxila	0,30
28,33	424	-2	Oxidação de hidroxila	0,47
28,99	426	-	Beta-amirina	42,14
30,02	426	-	Alfa-amirina	47,36
33,92	442	+ 16	Oxidação de carbono inerte	1,04
35,36		*		0,70
36,01	442	+ 16	Oxidação de carbono inerte	7,99

* Biblioteca não apresenta nenhum sinal possível. Provavelmente um artefato de reação

Tabela 21: Características dos sinais cromatográficos na solução de amirinas

TR (min)	<i>m/z</i> – íon molecular	Diferença para MM amirinas	Possibilidade de oxidação	% Área
29,00	426	-	β -amirina	54,34
30,01	426	-	α -amirina	44,37
33,26			Contaminante	1,3

Foi possível verificar que, diferente das reações preliminares realizadas anteriormente, a reação não se mostrou completamente seletiva para β -amirina. Foi possível perceber também que, embora produzindo apenas 8% do metabólito mais significativo após 24 horas, a reação mostrou-se tempo-dependente uma vez que a quantidade desse metabólito aumentou com o avanço da reação.

Os resultados indicam que, comparando o percentual da área de β -amirina na solução (54,34%) e após 24 horas (42,14%), é provável que a reação ocorra preferencialmente com este isômero. Este fato pode ser corroborado pela razão entre as áreas de β - e α -amirinas antes e depois da reação que se alterou de 1,22 para 0,89. Esta razão indica que, na solução a proporção de β -amirina era maior enquanto que após a reação essa proporção se inverteu indicando assim uma seletividade parcial por este isômero. Estudos recentes de metabolismo *in vitro* utilizando microssomas hepáticos de ratos mostraram que α e β -amirinas são pouco metabolizadas por CYP450 e que não houve formação de metabólitos para estas substâncias *in vitro* (MOREIRA *et al.*, 2013). Outros estudos de metabolismo *in vitro* de triterpenos mostram que os produtos mais comuns são aqueles de produção de geninas para saponinas triterpênicas ou produtos de redução de carbonilas (ZHAO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2010). Com base na baixa metabolização de triterpenos pentacíclicos relatados na literatura e nos resultados de metabolismo *in vitro* de α e β -amirinas utilizando microssomas hepáticos de ratos bem como diante de resultados que serão mostrados no próximo capítulo, a produção em maior escala e isolamento para identificação do metabólito não se mostrou viável, posto que não foi possível detectá-lo nas matrizes biológicas analisadas.

6.5 Conclusões

As reações biomiméticas preliminares de oxidação de α e β -amirinas evidenciaram baixa taxa de metabolização *in vitro* e corroboram com resultados obtidos previamente de metabolização *in vitro* utilizando microssomas hepáticos de ratos.

***Capítulo 7 - DISPOSIÇÃO CINÉTICA E ELIMINAÇÃO
DE ALFA E BETA AMIRINAS***

7.1 Introdução

Ao entrar no organismo, as diversas substâncias exógenas seguem um curso para que possam ocorrer os processos de absorção, distribuição, metabolismo ou biotransformação e excreção, com a finalidade de serem eliminadas após exercerem seu papel. A farmacocinética é a ciência que estuda esta transferência de moléculas através do sistema biológico e é de extrema importância para que os processos de passagem das substâncias pelo organismo possam ser entendidos (STORPIRTIS *et al.*, 2011).

Existem muitos relatos sobre a farmacodinâmica de α - e β -amirina na literatura, entretanto pouco se sabe sobre sua farmacocinética e metabolismo.

Atividades anti-inflamatória e analgésica de extratos ou frações de plantas ricas em α - e β -amirina foram relatados quando houve administração desses extratos por via intraperitoneal de doses acima de 5 mg/kg ou por via oral acima de 100 mg/kg (OTUKI *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2013). Também foram relatadas atividades gastroprotetoras de resinas ricas em α - e β -amirinas, em doses acima de 200 mg/kg por via oral em camundongos por mecanismo diferente daquele da N-acetil-cisteína. Em doses maiores a resina também diminuiu a permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos. Já em ratos, a resina reduziu a acidez total sem mudança no volume de secreção gástrica além de exercer efeito inibitório na formação de colágeno, mas não reduziu o edema agudo (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

Estudos da mistura triterpênica α e β -amirina em camundongos mostraram que nas doses de 100 e 200 mg/kg por via oral elas possuem efeito antialérgico pelo mecanismo de estabilização da membrana do mastócito, entretanto sem efeitos sedativos (OLIVEIRA *et al.*, 2004). O tratamento com doses intraperitoneais de 50 e 100 mg/kg de α e β -amirinas promove efeito hepatoprotetor (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em doses de 10 a 50 mg/kg, por vias oral ou intraperitoneal, α e β -amirinas promovem efeitos ansiolíticos e antidepressivos (ARAGÃO *et al.*, 2006) e são capazes de reduzir a dor visceral e o edema nas doses de 30 e 100 mg/kg por via oral pelo mecanismo de bloqueio de liberação de substância P ou agindo sobre seu receptor (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2007). A aplicação tópica de α -amirina em camundongos nas doses de 0,1 a 1 mg/orelha exerce atividade anti-inflamatória

forte e rápida dose-dependente sobre a pele diminuindo os níveis de prostaglandinas (OTUKI, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2007). Quando administradas oralmente na dose de 30 mg/kg reduzem significativamente a inflamação e a dor neuropática persistente em camundongos por ativação e receptores canabinóides (DA SILVA *et al.*, 2011) além de reduzir o edema pancreático em camundongos e suprimir a infiltração de células inflamatórias, de células de necrose e a produção de mediadores da inflamação quando administrada por via oral em doses de 10 a 100 mg/kg (MELO *et al.*, 2011).

Poucos estudos são relatados para atividades biológicas de α e β -amirina em ratos. Na fase aguda de periodontite em ratos, α e β -amirinas possuem atividade na dose de 5 mg/kg (HOLANDA PINTO, *et al.*, 2008) e nas doses de 30 e 100 mg/kg por via intraperitoneal, reduzem a dor orofacial pelo mecanismo opióide periférico (HOLANDA PINTO, *et al.*, 2008b).

O único relato sobre disposição cinética desses compostos mostrou que β -amirina possui $T_{1/2}$ longa e baixo Cl. A biodisponibilidade de β -amirina quando administrada na dose de 3 mg/kg pura mostrou-se consideravelmente menor que quando administrada em dose equivalente no extrato bruto de *Ardisia elliptica* (CHING *et al.*, 2011).

Sobre metabolismo, existe apenas um relato recente da ação de CYP450 de microsomas de ratos sobre α e β -amirinas *in vitro* evidenciando baixa taxa de metabolismo para esses compostos (MOREIRA *et al.*, 2013).

Pouco se sabe sobre a toxicidade desta mistura. Sabe-se em especial que a mistura de α e β -amirinas em doses de até 2g/kg não promovem efeitos tóxicos agudos (OLIVEIRA, 2005).

Uma vez que a maioria dos relatos na literatura referem-se a atividades em camundongos e que nada se sabe sobre a farmacocinética dessas substâncias em camundongos faz-se necessário estender os conhecimentos sobre esses animais, uma vez que existem diferenças fisiológicas e metabólicas consideráveis entre esses dois roedores (NEERVANNAN, 2006).

7.2 Objetivos Específicos

- ✓ Administrar a nanoemulsão desenvolvida em camundongos a fim de coletar matrizes biológicas para determinar os parâmetros farmacocinéticos de α e β -amirinas;
- ✓ Processar as amostras de plasma, fezes e urina coletadas e quantificar os analitos nessas matrizes biológicas;
- ✓ Calcular os parâmetros farmacocinéticos após administração endovenosa e oral de α e β -amirinas
- ✓ Determinar as vias de eliminação de α e β -amirinas após administração endovenosa com base nos resultados de quantificação desses analitos em fezes e urina.

7.3 Materiais e Métodos

7.3.1 Animais experimentais

O protocolo de utilização de Animais foi aprovado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (Nº 11.1.1087.53.6). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da UFOP e todos os experimentos *in vivo* foram realizados no mesmo local. Para a realização do experimento de disposição cinética e eliminação de α e β -amirinas os animais (camundongos Swiss sadios e adultos, pesando 25 ± 5 g) foram mantidos em gaiolas metabólicas em grupos de 2 animais do mesmo sexo, para a coleta de 24 horas, ou para os demais tempos em caixas contendo 4 animais por caixa. Foram ambientalizados por pelo menos 24 horas nas gaiolas metabólicas ou nas caixas, em temperatura controlada de $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, em ciclos claro escuro de 12 horas, tratados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em jejum de 8 horas antes da administração das substâncias.

7.3.2 Administração e coleta de amostras

Para a realização dos experimentos os animais (n=96) foram divididos em grupos de 4 animais. Foram preparadas a nanoemulsão, conforme descrito no capítulo 4, na concentração de 8,33 mg/mL e a suspensão na mesma concentração de α e β -amirinas contendo 0,5% de carboximetilcelulose (CMC) (p/p) em água. O volume foi ajustado pelo peso dos animais para que a dose administrada fosse de 50 mg/kg da mistura, de modo que nenhuma administração oral ou endovenosa fosse acima de 200 μ L. Considerando que a proporção na nanoemulsão correspondia a 40:60 (p/p) de α e β -amirinas, respectivamente e que a média de peso dos animais, foi administrado aproximadamente 1,25 mg da mistura sendo 0,75 mg de β -amirina e 0,5 mg de α -amirina.

A nanoemulsão foi administrada pelas vias oral por meio de gavagem e por via endovenosa pela veia caudal. A suspensão foi administrada pela via oral por meio de gavagem. Para o experimento de farmacocinética de dose única por via endovenosa, o sangue dos animais foi coletado pelo plexo ocular nos tempos 5 min, 20 min, 1h, 3h, 5h, 8h, 16h e 24 h e para o experimento de farmacocinética de dose única com absorção oral, o sangue foi coletado pelo plexo ocular em tubos heparinizados nos tempos 20 min, 1h, 2h, 3h, 5h, 8h, 16h, 24h. Foi utilizado um grupo de 4 animais para cada tempo de coleta perfazendo 32 animais para o experimento de administração da nanoemulsão pela via oral, 32 animais para administração da nanoemulsão pela via endovenosa e 32 animais para administração da suspensão de CMC pela via oral.

Para o grupo de coleta em 24 horas os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e tiveram as fezes e urina coletadas nos tempos de 0 a 3 horas, 3 a 6 horas, 6 a 9 horas, 9 a 15 horas e 15 a 24 horas. O sangue, previamente heparinado, foi centrifugado a 9500 g por 10 min e o plasma coletado. As amostras foram armazenadas em *freezer* -80°C a fim de preservar a integridade das matrizes até o momento da análise. As fezes foram liofilizadas por período de 24 horas e armazenadas também em *freezer* -80°C até o momento da análise.

Após a coleta do material biológico, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foram coletados os órgãos coração, pulmão, fígado e rim para análises posteriores de biodistribuição que não foram realizadas neste trabalho.

7.3.3 Preparo das amostras para análise

As amostras de plasma, fezes e urina foram preparadas conforme descrito no capítulo 5 e foram analisadas contra as curvas de calibração também descritas no mesmo capítulo.

7.3.3 Cálculo dos Parâmetros Farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos para administração endovenosa da nanoemulsão contendo α e β -amirinas foram calculados utilizando-se o *software* Microsoft Excel 2010[®], através do modelo monocompartimental de cinética de primeira ordem, com base nas concentrações plasmáticas em até 24 horas após a administração.

A área sob a curva (ASC) foi calculada pelo método dos trapezoides de 0 a 24 horas e a área de 24 horas ao infinito foi calculada pela razão entre a última concentração plasmática e a constante de eliminação (K_{el}). A K_{el} foi calculada pela inclinação da reta obtida pela plotagem do gráfico Concentração plasmática vs Tempo. A meia vida de eliminação ($T_{1/2}$) foi obtida pela equação $T_{1/2}=0,693/K_{el}$. O *Clearance* Total (Cl_T) foi calculado pela fórmula $Cl_T=(Dose \times F)/ASC_{0-inf}$ onde F corresponde a biodisponibilidade (1,0 para administração endovenosa). O volume aparente de distribuição (V_d) foi calculado pela fórmula $V_d= Cl_T/K_{el}$.

Para o cálculo da biodisponibilidade oral da nanoemulsão contendo α e β -amirinas a área sob a curva de 0 a 24 horas (ASC_{0-24h}) foi calculada pelo método dos trapezoides de 0 a 24 horas com base nas concentrações plasmáticas em até 24 horas após a administração. A biodisponibilidade foi calculada pela razão das áreas sob as curvas da administração oral pela administração endovenosa da nanoemulsão de 0 a 24 horas. Para a administração oral, a constante de absorção (K_a) foi calculada pela inclinação dos três últimos pontos da reta obtida pela plotagem do gráfico Concentração plasmática vs Tempo e K_{el} foi calculada pela inclinação da reta de resíduos entre as retas de absorção e eliminação. As $T_{1/2}$ de absorção e eliminação foram calculadas pela mesma fórmula utilizada para o cálculo da $T_{1/2}$ de eliminação pela via endovenosa, assim como os dados de Cl_T e V_d . A C_{max} e T_{max} foram calculadas conforme as fórmulas abaixo:

$$C_{\max} = (\text{Dose} \cdot F \cdot K_a) / (V_d(K_a - K_{el})) \cdot (e^{-k_{el} \cdot t_{\max}} - e^{-K_a \cdot t_{\max}})$$

$$T_{\max} = \ln(k_a/k_{el}) / (K_a - k_{el})$$

As eliminações biliar e renal de α e β -amirina foram calculadas em porcentagem média acumulada nos tempos coletados, tanto para administração oral quanto endovenosa da formulação contendo os isômeros. O *Clarence* Biliar (Cl_B) e o *Clarence* Renal (Cl_R) foram calculados segundo a fórmula: quantidade eliminada após 24h/ASC_{0-24h}.

7.3.4 Análises Estatísticas

Todos os dados foram expressos como Média \pm Erro Padrão Relativo (EPR). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste t de *Student* seguido pelo teste de comparações Mann-Whitney com nível de significância $p < 0,05$.

7.4 Resultados e Discussão

7.4.1 Disposição Cinética da Nanoemulsão contendo α e β -amirinas

Os resultados da disposição cinética da nanoemulsão contendo α e β -amirinas por via endovenosa e oral estão apresentados na Tabela 22.

Não foi possível observar a presença de α e β -amirinas quando a suspensão de CMC contendo a mistura de isômeros foi administrada por v.o. Após 24 horas da administração oral da nanoemulsão também não foi possível observar a presença dos isômeros em níveis detectáveis. Nas Figuras 21 e 22 estão representados os gráficos obtidos para a disposição cinética e eliminação biliar e renal de α e β -amirina, respectivamente.

Tabela 22: Parâmetros de Disposição Cinética para α e β -amirinas em camundongos

Parâmetro	Via Endovenosa		Via Oral	
	α -Amirina	β - Amina	α -Amirina	β - Amina
Kel (h^{-1})	0,268 \pm 0,014	0,270 \pm 0,007*	0,551 \pm 0,146	0,591 \pm 0,065
T _{1/2el} (h)	2,61 \pm 0,15	2,57 \pm 0,07*	1,77 \pm 0,69	1,23 \pm 0,17
Ka (h^{-1})			0,032 \pm 0,015#	0,083 \pm 0,050#
T _{1/2a} (h)			34,75 \pm 11,13	18,17 \pm 6,43
AUC _{0-24h}	116376,8 \pm 12184,0	185401,7 \pm 15136,4	1446,0 \pm 107,1	3348,9 \pm 520,5
AUC _{0-inf}	116388,6 \pm 12184,7	185422,7 \pm 15136,5		
Vd (mL)	16,95 \pm 2,70	15,31 \pm 1,38*	9,12 \pm 3,56	6,17 \pm 0,83
MRT (h)	3,28 \pm 0,05*	3,46 \pm 0,22*	8,87 \pm 0,46	8,20 \pm 0,83
Cl _T (mL/min/kg)	2,96 \pm 0,30	2,74 \pm 0,19	2,38 \pm 5,73E-16	2,32 \pm 1,81E-16
Cl _R (mL/min/kg)	6,67E-03 \pm 1,34E-03	5,90E-03 \pm 1,14E-03		
Cl _B (mL/min/kg)	1,54 \pm 0,16	1,46 \pm 0,10		
Cmax (ng/mL)			30,39 \pm 7,44	131,44 \pm 27,94
% Razão Cl _T /50% do DC	1,63 \pm 0,17	1,51 \pm 0,11		
% Razão Cl _R /Cl _T	0,22 \pm 0,03	0,21 \pm 0,03		
% Razão Cl _B /Cl _T	52,19 \pm 0,01	53,10 \pm 0,01		
Tmax (h)			6,51 \pm 0,99	4,47 \pm 0,49
F (%)			1,03 \pm 0,08	1,56 \pm 0,24

* $p < 0,05$ para teste t seguido de teste de comparações de Mann-Whitney. Comparações realizadas entre valores para a mesma substância por vias diferentes.

$p < 0,05$ para teste t seguido de teste de comparações de Mann-Whitney. Comparações realizadas entre valores de inclinação final das retas de disposição cinética oral e endovenosa.

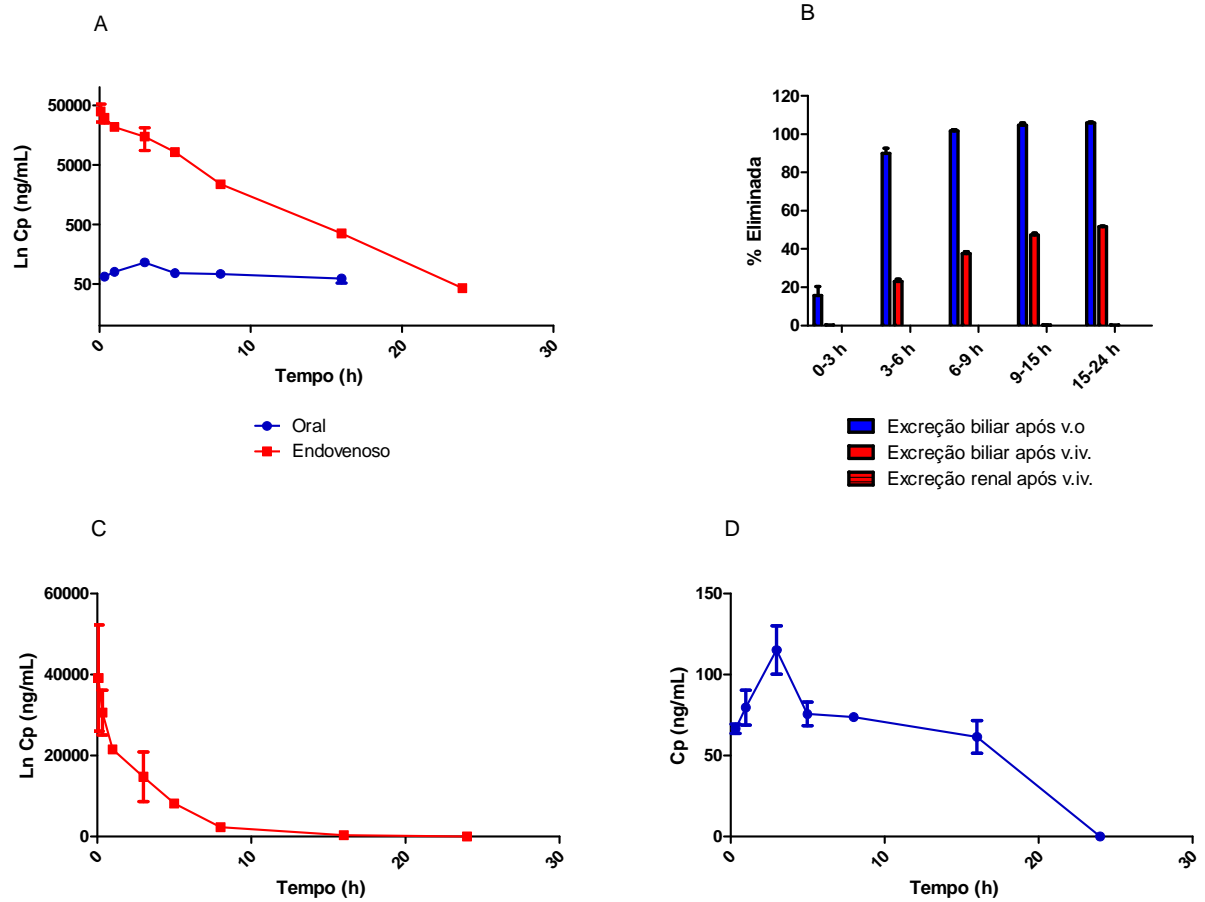


Figura 21: Resultados de disposição cinética (A, C e D) e eliminação biliar e renal (B) para α -amirina após administração oral (v.o.) ou endovenosa (v.iv.) em camundongos. A – Curva Ln Cp vs Tempo para administração v.o e v.iv. de α -amirina. B – Porcentagem acumulada eliminada de α -amirina nas fezes após administração por v.o. e v.iv. da nanoemulsão e na urina após administração v.iv. C – Curva Cp vs Tempo após administração v.iv. D - Curva Cp vs Tempo após administração v.o.

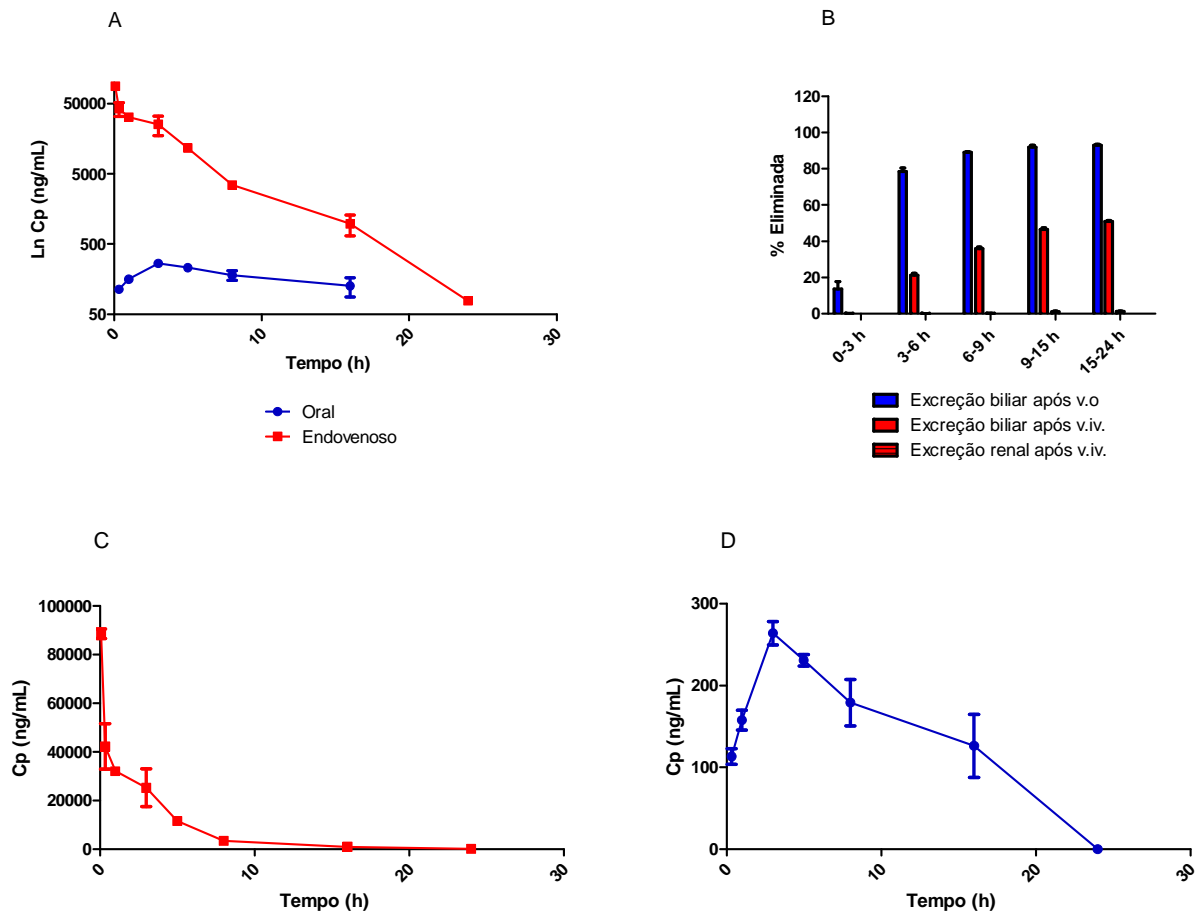


Figura 22: Resultados de disposição cinética (A, C e D) e eliminação biliar e renal (B) para β -amirina após administração oral (v.o.) ou endovenosa (v.iv.) em camundongos. A – Curva Ln Cp vs Tempo para administração v.o e v.iv. de β -amirina. B – Porcentagem acumulada eliminada de β -amirina nas fezes após administração por v.o. e v.iv. da nanoemulsão e na urina após administração v.iv. C – Curva Cp vs Tempo após administração v.iv. D - Curva Cp vs Tempo após administração v.o.

Os resultados obtidos para disposição cinética oral de α e β -amirina sugerem um comportamento *Flip-Flop*, evidenciada por K_a muito menores que K_{el} sugerindo que a absorção é a etapa limitante da eliminação dessas substâncias (STORPIRTS *et al.*, 2011; CUSATO *et al.*, 2011). Este modelo pode ser identificado pela comparação das inclinações das retas para vias oral e endovenosa na fase final da avaliação das concentrações plasmáticas (ZORNOZA *et al.*, 2006). É de extrema importância reconhecer a presença deste fenômeno quando ocorre administração extravascular, para que cálculos dos parâmetros farmacocinéticos sejam corretamente interpretados (YÁÑEZ *et al.*, 2011).

Comparando-se os resultados obtidos para α e β -amirina é possível observar que as inclinações na fase terminal para administração oral ($0,032 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$ e

$0,083 \pm 0,050 \text{ h}^{-1}$) são significativamente diferentes daquelas encontradas para administração endovenosa ($0,268 \pm 0,014 \text{ h}^{-1}$ e $0,270 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$), o que caracteriza o comportamento *Flip-Flop* da administração oral de α e β -amirina.

O fenômeno *Flip-Flop* pode estar relacionado com baixa solubilidade das substâncias em meios biocompatíveis, ou com a presença de formulações de liberação prolongada (ZORNOZA *et al.*, 2006), entretanto pode também estar relacionado com as características físico-químicas das substâncias analisadas, com a superfície de contato da região de absorção, com o tempo de residência no trato gastrointestinal ou com os excipientes utilizados para preparar as soluções para administração (YÁÑEZ *et al.*, 2011).

Após administração oral, também foram observados T_{\max} (3 a 6 h) e MRT semelhantes para os dois modelos ($8,5 \pm 1,4 \text{ h}$ e $9,2 \pm 1,1 \text{ h}$ vs $8,20 \pm 0,83 \text{ h}$ e $8,87 \pm 0,46 \text{ h}$, para β e α -amirinas, respectivamente). Entretanto, foi possível observar $T_{1/2}$ e V_d menores que os reportados por Ching e colaboradores para a administração endovenosa de β -amirina (2011).

Considerando que um camundongo tem em torno de 1,6 mL de sangue, podemos afirmar que o V_d de 16 mL após administração endovenosa e de 9 mL após administração oral pode ser considerado elevado para este modelo animal sugerindo acúmulo extravascular das substâncias.

A biodisponibilidade de β -amirina calculada para a suspensão de CMC em ratos foi de aproximadamente 0,86%. Já em camundongos, a nanoemulsão promoveu uma biodisponibilidade de $1,56 \pm 0,24\%$ e $1,03 \pm 0,08\%$ para β e α -amirinas, respectivamente. Estes resultados de biodisponibilidade parecem baixos, entretanto, corroboram com outros resultados de biodisponibilidade encontrados para outros triterpenos já reportados como daphnetina (ZHANG *et al.*, 2014), escina e isoescina (WU *et al.*, 2014), ginsenosideo Rc (CHU *et al.*, 2013) e ácido corosólico (LIU *et al.*, 2011)

Vale ressaltar que, a maioria dos estudos farmacológicos com essa mistura de isômeros utilizam soluções ou suspensões em meio hidroalcoólico ou contendo Tween[®], o que pode alterar a solubilidade dos compostos além de alterar os parâmetros farmacocinéticos (BUGGINS *et al.*, 2007).

A nanoemulsão promoveu uma melhora na biodisponibilidade dos isômeros uma vez que quando administrados por via oral em suspensão eles não foram absorvidos. Este fato já era esperado, uma vez que existem relatos de melhora na

biodisponibilidade de substâncias veiculadas por meio de nanoemulsões (KOROLEVA *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2012; RAGELLE *et al.*, 2012).

Sun e colaboradores (2012) relataram que houve diferenças entre os parâmetros farmacocinéticos para administração conjunta de α e β epímeros de ácido glicirrético, entretanto, quando administrados isoladamente não ocorreu diferenças significativas entre os parâmetros (SUN *et al.*, 2012). Uma vez que as atividades biológicas para α e β -amirinas são relatadas em sua grande maioria para a mistura, e diante do isolamento dos isômeros ser dificultado, todos os experimentos foram realizados com a mistura de isômeros. Assim, é importante ressaltar que pode existir diferenças entre resultados para os isômeros isoladamente.

Numerosas diferenças entre resultados de parâmetros farmacocinéticos entre as diversas espécies podem ocorrer principalmente devido à diferença entre a fisiologia dos organismos. Estas diferenças são algumas vezes imprevisíveis é necessário evitar generalizações mesmo com o uso e extrapolação alométrica. Assim, é importante investigar os parâmetros farmacocinéticos em diferentes espécies (NEERVANNAN, 2006; JI *et al.*, 2009; TOUTAIN *et al.*, 2010).

Embora possam existir diferenças interespecies, comparando os resultados obtidos neste trabalho com aqueles publicados por Ching e colaboradores (2011), foi possível observar valores de CI semelhantes aos observados para β -amirina por v.iv ($2,04 \pm 0,24$ mL/min.Kg vs $2,74 \pm 0,20$ mL/min.Kg) para ratos e camundongos, respectivamente. Estes valores correspondem a aproximadamente 1,74 e 1,51% do débito cardíaco disponível para a eliminação pela via renal de ratos e camundongos respectivamente, disponível para eliminação da substância, mostrando valores semelhantes e embora numericamente menores, proporcionalmente maiores ratos.

Foi possível observar que após administração oral da nanoemulsão quase toda a mistura de isômeros foi quantificada nas fezes (Figuras 21-B e 22-B) entretanto, após a administração endovenosa, apenas aproximadamente 52% foi eliminada inalterada pela via biliar. Já a porcentagem de excreção renal após administração endovenosa da nanoemulsão foi cerca de 0,2% e ao realizar a pesquisa no concentrado das amostras de fezes, urina e plasma por algum dos metabólitos formados pelas reações biomiméticas descritas no capítulo 6, não foi possível visualizar a formação de metabólitos.

O Cl_r observado foi cerca de 1,5% do débito cardíaco disponível para os sistemas renal e hepáticos e pode ser considerado baixo permitindo inferir que alterações cardíacas não alterariam a capacidade de excreção dos compostos. Entretanto, considerando a importância do Cl_b para a eliminação de α e β -amirinas podemos dizer que uma obstrução biliar ou acometimento hepático pode ter influencia significativa sobre a eliminação dos compostos.

Já era esperado que os compostos fossem eliminados inalterados nas fezes devido as suas características lipofílicas além de corroborar com estudos de metabolismo *in vitro* utilizando microssomas hepáticos de ratos que evidenciam baixo metabolismo hepático (MOREIRA *et al.*, 2013). Esta baixa taxa de metabolismo *in vitro* juntamente com a ausência de compostos no plasma, nas fezes e na urina semelhantes àqueles identificados no metabolismo *in vitro* com metaloporfirinas sugerem que os compostos que não foram eliminados permaneceram armazenados no organismo em algum órgão, o que pode ser suportado por relatos de que substâncias com elevado log P podem ser captadas pelo sistema fagocitário mononuclear e se alojar em órgãos como pulmões, fígado e baço (BRUXEL, 2012).

Alguns estudos revelam que após administração oral de 10 mg/kg em ratos, o ácido ursólico acumula-se preferencialmente no pulmão, baço, fígado e cérebro, nesta ordem de preferência. Menores concentrações são encontradas no coração e no rim (CHEN *et al.*, 2011). Já o ácido glicirrético após administração endovenosa de 25 mg/kg em camundongos acumula-se preferencialmente no fígado embora seja possível observar baixas concentrações também nos rins, pulmões, baço e coração. Neste estudo também foram relatadas concentrações maiores nos órgãos para o composto quando veiculado em lipossomas (LI *et al.*, 2010).

É provável que não ocorra metabolização de α e β -amirinas devido a ausência de sítios ativos para oxidações. Em monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos a metabolização é mais frequente (ABASS *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2003; VACLAVIKOVA *et al.*, 2004; SHAFFER *et al.*, 2007) entretanto, em triterpenos a metabolização é menos frequente ocorrendo usualmente pela liberação de geninas em saponinas ou por reações em carbonilas de cetonas, ésteres ou ácidos (LIRONG *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2012).

Embora a biodisponibilidade seja baixa, α e β -amirinas parecem substâncias promissoras para utilização na terapêutica, pois as atividades biológicas reportadas

para a mistura de isômeros são bastante significativas, mesmo após administração oral. Entretanto, é necessário pesquisar alternativas para melhorar a biodisponibilidade destes isômeros, seja pela utilização de outras vias de administração, como a intramuscular, por exemplo, ou por meio de desenvolvimento de pró-drogas que possam ser melhor absorvidas e metabolizadas em substâncias ativas pós-absorção.

7.5 Conclusões

Os estudos de disposição cinética via endovenosa sugerem alto volume de distribuição que em conjunto com resultados de eliminação exclusivamente, embora parcial, de α e β -amirinas nas fezes sugerem a ocorrência de acúmulo extravascular dos analitos.

Os estudos de disposição cinética via oral evidenciaram a ocorrência do fenômeno *Flip-Flop*, com $T_{1/2a}$ elevados, comparada à $T_{1/2el}$.

A nanoemulsão promoveu melhora da biodisponibilidade oral de α e β -amirinas comparada com a suspensão contendo os analitos.

Capítulo 8 - CONCLUSÕES

- 1) A mistura triterpênica de α e β -amirinas foi isolada com alto grau de pureza.
- 2) Foi desenvolvida e caracterizada uma nanoemulsão com alta taxa de encapsulação, com tamanho de partícula e índices de polidispersão estáveis preparadas com excipientes comerciais que podem garantir seguramente a administração nos animais tanto via oral quanto endovenosa.
- 3) A reação biomimética de oxidação de α e β -amirinas produziu metabólitos em baixa quantidade e foi parcialmente seletiva para β -amirina. Entretanto, não foi viável produzir estes metabólitos em larga escala para a identificação, pois nos estudos de disposição cinética e eliminação biliar e renal não foi possível encontrar nenhum dos metabólitos formados o que confirmou a baixa taxa de metabolização *in vitro* de α e β -amirinas por microsomas hepáticos, já reportada previamente.
- 4) Os estudos de disposição cinética via endovenosa mostraram alto V_d . O Cl_R baixo e Cl_B elevado. A maior parte das α e β -amirinas foram eliminadas inalteradas nas fezes após 24 horas da administração endovenosa e as substâncias praticamente não foram eliminadas na urina. A disposição cinética oral comportou-se segundo o modelo *Flip-Flop* comumente encontrado em substâncias de alta polaridade e em formulações de liberação controlada.
- 5) A biodisponibilidade oral de α e β -amirina foi baixa, entretanto, a formulação desenvolvida promoveu a absorção de α e β -amirinas, enquanto a suspensão não foi absorvida, comprovando que nanoemulsões promovem o aumento da biodisponibilidade de substâncias de baixa solubilidade.
- 6) A ausência de metabólitos, o alto V_d , a eliminação parcial nas fezes e a praticamente nula eliminação renal corroboram com os estudos de liberação *in vitro* e sugerem que α e β -amirinas permanecem armazenadas em órgãos como pulmão, fígado, baço e rins após administração endovenosa, entretanto estudos de biodistribuição são necessários para confirmação desse fato.
- 7) Embora os resultados de biodisponibilidade oral sejam baixos, α e β -amirinas parecem substâncias promissoras para utilização na terapêutica, uma vez que possuem atividade biológica em doses baixas. Entretanto, é necessário pesquisar alternativas para melhorar a biodisponibilidade destes isômeros.

Capítulo 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASS, K.; REPONEN, P.; MATTILA, S.; PELKONEN, O. Metabolism of α -thujone in human hepatic preparations *in vitro*. *Xenobiotica*, 2011, 41 (2), 101-111.
- AMMON, H. P. Boswellic acids (components of frankincense) as the active principle in treatment of chronic inflammatory diseases. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 152(15-16), 373-378, 2002.
- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Brasília, DF, 2012. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html
- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Brasília, DF, 2003. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>
- ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 85, 827-834, 2006.
- ASIMUS, S.; ASHTON, M. Artemisinin – A possible CYP2B6 probe substrate? *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 30, 265-275, 2009.
- ATTILI-QADRI, S.; KARRA, N.; NEMIROVSKI, A.; SCHWOB, O.; TALMON, Y.; NASSAR, T.; BENITA, S. Oral delivery system prolongs blood circulation of docetaxel nanocapsules via lymphatic absorption. *Proceedings of the Natrual Academy of Sciences fo the USA* 110(43):17498-17503, 2013.
- BARICEVIC, D.; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SIMONOVOSKA, B.; KRASNA, A.; ZUPANCIC, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 75 (2-3), 125-132, 2001.
- BISKUP, E. GOLEBIOWSKI, M.; GNIADDECKI, R.; STEPNOWSKI, P. Triterpenoid α -amyrin stimulates proliferation of human keratnocytes but does not protect them against UVB damage. *Acta Biochimica Polonica* 59 (2), 255-260, 2012.
- BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsoes como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Quimica Nova*, 35 (9), 1827-1840, 2012.
- BUGGINS, T. R.; DICKINSON, P. A.; TAYLOR, G. The effect of pharmaceutical

excipients on drug disposition. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1482-1503, 2007.

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*, 32 (4), 2009.

CHEN, Q. F.; LIU, Z. P.; WANG, F. P. Natural sesquiterpenoids as cytotoxic anticancer agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 11, 1153-1164, 2011.

CHEN, Q.; LUO, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Z. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (8), 2877-2884, 2011.

CHENG, C.; LIU, X. W.; DU, F. F.; LI, M. J.; XU, F.; WANG, F. Q.; LIU, Y.; LI, C.; SUN, Y. Sensitive assay for measurement of volatile borneol, isoborneol, and the metabolite camphor in rat pharmacokinetic study of *Borneolum* (Bingpian) and *Borneolum syntheticum* (synthetic Bingpian). *Acta Pharmacologica Sinica* 34(10), 1337-48, 2013.

CHICCA, A.; MARAZZI, J.; GERTSCH, J. The antinociceptive triterpene beta-amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol(2-AG) hydrolysis without directly targeting CB receptors. *British Journal of Pharmacology* 167, 1596–1608, 2012.

CHING, J., LIN, H.-S., TAN, C.-H. AND KOH, H.-L. Quantification of α - and β -amyrin in rat plasma by gas chromatography–mass spectrometry: application to preclinical pharmacokinetic study. *Journal of Mass Spectrometry*, 46, 457–464, 2011.

CHO, E. K.; PARK, J. Y.; LEE, K. H.; SONG, H. S.; MIN, Y. J.; KIM, Y. H.; KANG, J. H. Open-label, randomized, single-dose, crossover study to evaluate the pharmacokinetics and safety differences between two docetaxel products, CKD-810 and Taxotere injection, in patients with advanced solid cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 73(1), 9-16, 2014.

CHU, Y.; ZHANG, H. C.; LI, S. M.; WANG, J. M.; WANG, X. Y.; LI, W.; ZHANG, L. L.; MA, X. H.; ZHOU, S. P.; ZHU, Y. H.; LIU, C. X. Determination of ginsenoside R_c in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*.75(8), 919-920, 2013.

CUSATO, M.; ALLEGRI, M. NIEBEL, T.; INGELMO, P.; BOGLIA, M.; BRASCHI, A.; REGAZZI, M. *Flip-flop* kinetics of ropivacaine during continuous epidural infusion

influences its accumulation rate. *European Journal of Clinical Pharmacology* 67, 399-406, 2011.

DA SILVA, K. A. B.; PASZCUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain* 152, 1872-1887, 2011.

DE BARROS, C. B. Validação de Metodos Analiticos. *Biológico*, 64 (2), 175-177, 2002.

DE FARIA, E. H.; RICCI, G. P.; LEMOS, F. M.; E SILVA, M. L. A.; DA SILVA FILHO, A. A.; CALEFI, P. S.; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J. Green oxidation reactions of drugs catalysed by bio-inspired complexes as an Efficient methodology to obtain active molecules, biomimetic based applications. *In: Biomimetic based applications*. CAVRAK, M (Ed.). Editora In Tech. 2011.

DE FRANCISCHI, J. N. *A Farmacologia em Nossa Vida* Editora UFMG, p. 140, Belo Horizonte, 2005.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKIVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* 23, 394-411, 2006.

FERREIRA, L. S.; CALLEJON, D. R.; ENGEMANN, A.; CRAMER, B.; HUMPF, H. U.; DE BARROS, V. P.; ASSIS, M. D.; DA SILVA, D. B.; DE ALBUQUERQUE, S.; OKANO, L. T.; KATO, M. J.; LOPES, N. P. *In vitro* metabolism of grandisin, a lignan with anti-chagasic activity. *Planta Medica* 78 (18), 1939-1941, 2012.

FONTANA, M.C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5 (3), 254-263, 2009.

FÖRSTER, T. H.; SCHAMBIL, F.; TESMANN, H. Emulsification by the phase inversion temperature method: the role of self-bodying agents and the influence of oil polarity. *International Journal of Cosmetic Science* 12, 217-227, 1990.

GAO, Y.; JIN, S.; JIA, J.; WANG, J; SUN, X. New 3-O-caffeic acyl oleanane type pentacyclictriterpene ester derivative used in medicinal composition to produce medicines, such as anti-inflammatory medicines, antiallergic medicines, hepatoprotective medicines, and antiviral medicines, China. Patent CN102344481-A, 2010.

- GERBETH, K.; HÜSCH, J.; FRICKER, G.; WERZ, O.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; ABDEL-TAWAB, M. *In vitro* metabolism, permeation, and brain availability of six major boswellic acids from *Boswellia serrata* gum resins. *Fitoterapia* 84, 99-106, 2013.
- GHOSH, S.; INDUKURI, K.; BONDALAPATI, S.; SAIKIA, A. K.; RANGAN, L. Unveiling the mode of action of antibacterial labdane diterpenes from *Alpinia nigra* (Gaertn.) B. L. Burtt seeds. *European Journal of Medicinal Chemistry* 66, 101-105, 2013.
- GIANG, L.; CANCHENG, G. Theoretical studies and industrial applications of oxidative activation of inert C-H Bond by metalloporphyrin-based biomimetic catalysis. *Science China Chemistry*, 55 (10), 2036-2053, 2012.
- GONG, Y.; WU, Y.; ZHENG, C.; FAN, L.; XIONG, F.; ZHU, J. An excellent delivery system for improving the oral bioavailability of natural vitamin E in rats. *AAPS PharmSciTech*, 13(3), 961-966, 2012.
- GONZÁLEZ-BURGOS, E. & GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry* 19, 5319-5341, 2012.
- GOTO, P. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; SANTOS, O. D. H. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in situ polymerization from nanoemulsions produced by direct emulsification. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 34 (2), 228-233, 2013.
- GUO, C.; ZHANG, S.; TENG, S.; NIU, K. Simultaneous determination of sesquiterpene lactones isoalantolactone and alantolactone isomers in rat plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study. *Journal of Separation Science* 37(8), 950-6, 2014.
- GYOUBU, K.; MIYAZAWA M. *In Vitro* Metabolism of (-)-Camphor Using Human Liver Microsomes and CYP2A6. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30 (2), 230-233, 2007.
- HADNADEV, T. D.; DOKIC, P.; KRSOTNOSIC, V.; HADNADEV, M. Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 313-321, 2013.
- HERNANDEZ-VÁZQUEZ, L., MANGAS, S., PALAZÓN, J., NAVARRO-OCAÑA, A. Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products* 31, 476-480, 2010.

- HERNANDEZ-VÁZQUEZ, L.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. *The Pentacyclic Triterpenes α,β -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities, Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshewer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech, 2012. <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/the-pentacyclic-triterpenes-amyryns-a-review-of-sources-and-biological-activities> (acessado: 29 de agosto de 2013)
- HOG, D . T.; WEBSTER, R.; TRAUNER, D. Synthetic approaches toward sesterpenoids. *Natural Product Reports* 29, 752-779, 2012.
- HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M. S.; GUEDES, M. A.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antinociceptive effect of triterpenoid α,β -Amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*, 15, 630-634, 2008b.
- HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 16(1), 48-52, 2008.
- HUANG, Y.; JIANG, B.; NUNTANAKORN, P.; KENNELLY, E. J.; SHORD, S.; LAWAL, T. O.; MAHADY, G. B. Fukinolic Acid Derivatives and Triterpene Glycosides from Black Cohosh Inhibit CYP Isozymes, but are not Cytotoxic to Hep-G2 Cells *in Vitro*. *Current Drug Safety* 5 (2), 118-124, 2010.
- JI, H. Y.; SHIN, B. S.; JEONG, D. W.; PARK, E. J.; PARK, E. S.; YOO, S. D.; LEE, H. S. Interspecies scaling of oleanolic acid in mice, rats, rabbits and dogs and prediction of human pharmacokinetics. *Archives of Pharmacal Research* 32 (2), 251-257, 2009.
- JIN, X.; ZHANG, Z. H.; LI, S. L.; SUN, E.; TAN, X. B.; SONG, J.; JIA, X. B. A nanostructured liquid crystalline formulation of 20(S)-protopanaxadiol with improved oral absorption. *Fitoterapia*. 84, 64-71,2013b.
- JIN, X.; ZHANG, Z. H.; SUN, E.; TAN, X. B.; LI, S. L.; CHENG, X. D.; YOU, M. JIA, X. B. Enhanced oral absorption of 20(S)-protopanaxadiol by self-assembled liquid crystalline nanoparticles containing piperine: *in vitro* and *in vivo* studies. *International Journal of Nanomedicine*. 8, 641-52, 2013.
- JOSHI, R.; SOOD, S.; DOGRA, P.; MAHENDRU, M.; KUMAR, D.; BHANGALIA, S.; PAL, H.C.; KUMAR, N.; BHUSHAN, S.; GULATI, A.; SAXENA, A.K.; GULATI, A. *In vitro* cytotoxicity, antimicrobial, and metal-chelating activity of

triterpenessaponins from tea seed grown in Kangra valley, India. *Medicinal Chemistry Research* 22 (8), 4030-4038, 2013.

- KAMBLE, B.; GUPTA, A.; PATIL, D.; KHATAL, L.; JANRAO, S.; MOOTHEDATH, I.; DURAISWAMY, B. Determination of gymnemagenin in rat plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetics after oral administration of *Gymnema sylvestre* extract. *Biomedical Chromatography* 27(5), 669-75, 2013.
- KIELA, P. R.; MIDURA, A. J.; KUSCUOGLU, N.; JOLAD, S. D.; SOLYOM, A. M.; BESSELSSEN, D. G.; TIMMERMANN, B. N.; GHISHAN, F. K. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 288 (4), 798-808, 2005.
- KIM, M. G.; HWANG, D. K.; JEONG, H. U.; JI, H. Y.; OH, S. R.; LEE, Y.; YOO, J. S.; SHIN, D. H.; LEE, H. S. *In vitro* and *in vivo* metabolism of verproside in rats. *Molecules* 17 (10) 1990-2002, 2012.
- KOROLEVA, M. YU; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, 81(1), 21-43, 2012.
- KOTTA, S., KHAN, A. W.; PRAMOD, K.; ANSARI, S. H.; SHARMA, R. K.; ALI, J. Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion Drug Delivery* 9(5), 585-598, 2012.
- LAMBERT, E.; FAIZAL, A.; GEELLEN, D. Modulation of Triterpene Saponin Production: *In Vitro* Cultures, Elicitation, and Metabolic Engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164, 220-237, 2011.
- LESKOVAC, V.; THEOHARIDES, A. D. Hepatic metabolism of artemisinin drugs – I. Drug metabolism in rat liver microsomes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99C (3), 382-390, 1991.
- LI, J.; YU, H.; LI, S.; WANG, G. J. Enhanced distribution and extended elimination of glycyrrhetic acid in mice liver by mPEG-PLA modified (mPEGylated) liposome. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (5), 1147-1153, 2010.
- LI, S-Q.; BJÖRKMAN, A.; ANDERSON, T. B.; GUSTAFSSON, L. L.; MASIMIREMBWA, C. M. Identification of human cytochrome P450s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of *in vivo* drug hepatic clearance from *in vitro* data. *European Journal of Clinical Pharmacology* 59, 429-442, 2003.

- LI, T.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIANG, R.; ZHANG, D.; ZHANG, H.; CHEN, L.; YANG, W. Development of an SPE-HPLC-MS method for simultaneous determination and pharmacokinetic study of bioactive constituents of Yu Ping Feng San in rat plasma after oral administration. *Journal of Ethnopharmacology* 145(3), 784-792, 2013b.
- LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SOUSA, D. I. M.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α , β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachikinin NK₁-receptors, and K⁺_{ATP} channels. *Inflammation Research* 56, 487-494, 2007.
- LIRONG, F.; HAIMING, S.; XIAOBO, L. Advances in studies on metabolism and biotransformation of ginsenosides *in vitro*. *China Journal of Chinese Materia Medica* 36 (15), 2021-2026, 2011.
- LIU, L.; XIAO, J.; PENG, Z-H.; CHEN, Y. *In vitro* metabolism of glycyrrhetic acid by human cytochrome P450. *Acta Pharmaceutica Sinica* 46 (1), 81-87, 2011.
- LIU, L.; XIAO, J.; PENG, Z-H.; WU, W.-H.; DU, P.; CHEN, Y. *In vitro* metabolism of strychnine by human cytochrome P450 and its interaction with glycyrrhetic acid. *Chinese Herbal Medicines*, 4 (2), 118-125, 2012.
- LIU, Q.; ZHAO, D.; CHEN, X.; LI, Z.; LI, N.; HAN, D.; TALBI, A.; BIWOELE, T. Determination of corosolic acid, a natural potential anti-diabetes compound, in rat plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application to pharmacokinetic and bioavailability studies. *Planta Medica* 77 (15), 1707-1711, 2011.
- LOBO-FARIA, P. C. Estratégias adaptativas de espécies arbóreas típicas de ambiente com solo hidricamente saturado: uma abordagem morfológica, bioquímica e ecofisiológica. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- LOHMANN, W.; KARST, U.. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 79-96, 2008.
- LOSCHI, R. A.; PEREIRA, J. A. A.; MACHADO, E. L. M.; CARLOS, L.; GONZAGA, A. P. D.; CARMO, I. P.; GOMES, D. J. S. Structural and environmental variations in a continuum of gallery Forest/Savana stricto sensu in Itumirim, MG. *Cerne* 19 (2), 213-227, 2013.
- LU, Y.; QI, J.; WU, W. Absorption, disposition and pharmacokinetics of nanoemulsions. *Current Drug Metabolism*, 13(4), 396-417, 2012.

- LUPE, F. A. Estudo da comparação química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazonia. *Dissertação de mestrado*. Campinas, SP. 2007.
- MA, S.; CHEN, F.; YE, X.; DONG, Y.; XUE, Y.; XU, H.; ZHANG, W.; SONG, S.; AI, L.; ZHANG, N.; PAN, W. Intravenous microemulsion of docetaxel containing an anti-tumor synergistic ingredient (*Brucea javanica* oil): formulation and pharmacokinetics. *International Journal of Nanomedicine* 8, 4045-4052, 2013.
- MACHADO, L. B.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Flavour and Fragrance Journal* 18 (4), 338-341, 2003.
- MÁÑEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; RÍOS, J. L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 334, 103-105, 1997.
- MANGURO, L.O.A., OPIYO, S.A., HERDTWECK, E., LEMMEN, P. Triterpenes of *Commiphora holtziana* oleo-gum resin. *Canadian Journal of Chemistry* 87, 1173-1179, 2009.
- MATOS, I.; BENTO, A.F.; MARCON, R.; CLAUDINO, R.F.; CALIXTO, J.B. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclitriterpene α , β -amyirin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. *Molecular Immunology* 54 (3-4), 482-492, 2013.
- MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68 (14), 2015-2022, 2007.
- MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic tripterene α -amyirin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology* 559, 227-235, 2007.
- MELO, C. M.; MORAIS, T. C.; TOMÉ, A. R.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Anti-inflammatory effect of α , β -amyirin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation Research* 60, 673-681, 2011.
- MIN, Z.-D. Diterpenes. In: *Introduction to Natural Products Chemistry*. Editor: Zhao, W. CRC Press, 101-123, 2011.

- MIYAZAWA, M. & GYOUBU, K. Metabolism of (-)-fenchone by CYP 2A6 and CYP 2B6 in human liver microsomes. *Xenobiotica* 37 (2), 194-204, 2007.
- MIYAZAWA, M. & GYOUBU, K. Metabolism of (+)-fenchone by CYP 2A6 and CYP 2B6 in human liver microsomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (12), 2354-2358, 2006.
- MIYAZAWA, M. & GYOUBU, K. Roles of human CYP2A6 and rat CYP2B1 in the oxidation of (+)-fenchol liver microsomes. *Xenobiotica* 37 (9), 943-953 b, 2007b.
- MIYAZAWA, M.; MARUMOTO, S.; TAKAHASHI, T. NAKAHASHI, H.; HAIGOU, R.; NAKANISHI, K. Metabolism of (+)- and (-)-menthols by CYP2A6 in human liver microsomes. *Journal of Oleo Science* 60 (3), 127-132, 2011.
- MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola Oil/Water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 27, 109–115, 2006.
- MOREIRA, F. L.; SOUZA, G, H. B.; RODRIGUES, I. V.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, A. R. M. A non-michaelian behavior of the *in vitro* metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyryn by employing rat liver microsomes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84, 14-19, 2013.
- MUFFER, K.; LEIPOLD, D.; SHELLER, M.-C.; HAAS, C.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; NEUHAUS, H. E.; MIRATA, M. A.; SCHRADER, J.; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* 46, 1-15, 2011.
- NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2(5), 715-731, 2006.
- NEWMAN, J. D; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75, 311-335, 2012.
- NIEHUES, M.; BARROS, V. P.; EMERY, F. S.; DIAS-BARUFFI, M.; ASSIS, M. D.; LOPES, N. P. Biomimetic *in vitro* oxidation of lapachol: a model to predict and analyse the *in vivo* phase I metabolism of bioactive compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 804-812, 2012.
- NIKIEMA, J.B.; VANHAELEN-FASTRE, R.; VANHAELEN, M.; FONTAINE, J.; DE GRAEF, C.; HEENEN, M. Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from

Leptadenia hastata látex on keratinocyte proliferation. *Phytotherapy Research*, 15 (2), 131-134, 2001.

- OLIVEIRA, F. A. Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. e de seus principais constituintes, mistura de α - e β -amirina. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; LIMA JR.; R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 103-108, 2005a.
- OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; CAVALCANTE, I. J. M.; LIMA, A. F.; LIMA JR., R. C. P.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sciences*, 77(23), 2942-2952, 2005b.
- OLIVEIRA, F. A.; LIMA JUNIOR.; R. C. P.; CORDEIRO, W. M.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Pentacyclic triterpenoids, α , β -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78, 719-725, 2004a.
- OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA JUNIOR.; R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective and antiinflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research* 49, 105-111, 2004b.
- OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life Sciences* 69, 2225-2236, 2001.
- OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium Kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* 507, 253-259, 2005.
- PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; MARCON, R.; NASCIMENTO, A.F.Z.; CALIXTO, J.B.; PIANOWSKI, L.F. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-

inflammatory effect of tetracyclitriterpeneeuphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology* 698 (1-5), 413-420, 2013.

PATEL, Y.; PODDAR, A.; SAWANT, K. Formulation and characterization of Cefuroxime Axetil nanoemulsion for improved bioavailability. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 4(1), S4-S5, 2012.

PETERS, R. J. Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. *Natural Product Reports* 27, 1521-1530, 2010.

PHILLIPS, D. R.; RASBERY J. M.; BARTEL, B.; MATSUDA, S. P. T. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 305–314, 2006.

PISLYAGIN, E. A.; DMITRENOK, P. S.; GORPENCHENKO, T. Y.; AVILOV, S. A.; SILCHENKO, A. S.; AMININ, D. L. Determination of cucumarioside A₂-2 in mouse spleen by radiospectroscopy, MALDI-MS and MALDI-IMS. *European Journal Pharmaceutical Sciences* 49(4), 461-467, 2013.

PRISTA, N. L.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

QIAN, T.; CAI, Z.; WONG, R. N.; JIANG, Z. H. Liquid chromatography/mass spectrometric analysis of rat samples for *in vivo* metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rh₂. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19(23), 3549-3554, 2005.

QIAN, T.; JIANG, Z. H.; CAI, Z. High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applied for metabolic study of ginsenoside Rb₁ on rat. *Analytical Biochemistry* 352(1), 87-96, 2006.

RAGELLE, H.; CRAUSTE-MANCIET, S.; SEGUIN, J.; BROSSARD, D.; SCHERMAN, D.; ARNAUD, P.; CHABOT, G. G. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumor activity in mice. *International Journal of Pharmaceutics* 427 (2), 452-459, 2012.

RHOORRI-FRIH, B.; RENIMEL, I.; CHAIMBAULT, P.; ANDRÉ, P.; HERBETTE, G.; LAFOSSE, M. Pentacyclitriterpenes from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties. *Fitoterapia* 88, 101-108, 2013.

RODRIGUES, I. V.; SOUZA, J. N. P.; SILVA, A. C. G.; CHIBLI, L. A.; CABRAL, V. A. R.; VIEIRA FILHO, S. A.; PERAZZO, F. F.; GUIMARAES, A. G.; SOUZA, G.; H.

- B. (2013) Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth (Engler.). *Pharmacognosy Journal* 5, 6-12, 2013.
- ROLLINGER, J. M. Accessing target information by virtual parallel screening – The impact on natural product research. *Phytochemistry Letters* 2 (2), 53-58, 2009.
- ROSAS-ACEVEDO, H., TERRAZAS, T., GONZÁLEZ-TRUJANO M.E., GUZMÁN, Y., SOTO-HERNÁNDEZ, M. Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 67-73, 2011.
- SANTOS, F.A., FROTA, J.T.; ARRUDA, B.R.; MELO, T.S.; SILVA, A.A.C.A., BRITO, G.A.C.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids Health Disease* 11-98, 2012.
- SAREMI, S.; DINARVAND, R.; KEBRIAEEZADEH, A.; OSTAD, S. N.; ATYABI, F. Enhanced oral delivery of docetaxel using thiolated *chitosan nanoparticles*: preparation, *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomed Research Internatinal* 1-8, 2013.
- SARTORI, T. Preparação e caracterização de nanopartículas contendo metotrexato. Avaliação da estabilidade e viabilidade do tecido corneal após administração tópica ocular. *Dissecação de mestrado*. Florianópolis, SC. 2007.
- SCHMIDT, L.; BELOV, V. N.; GÖEN, T. Human metabolism of Δ^3 - carene and renal elimination of Δ^3 - caren-10-carboxylic acid (chaminic acid) after oral administration. *Archives of Toxicology* May, 2014.
- SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIN, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The potencial of secondary metabolites from plants as drugs or leads against neglected diseases – part I. *Current Medicinal Chemistry* 19, 2128-2175, 2012.
- SHAFFER, S. A.; BAKER-LEE, C.; KENNEDY, J.; LAI, M. S.; DE VRIES, P.; BUHLER, K.; SINGER, J. W. *In vitro* and *in vivo* metabolism of paclitaxel poliglumex: identification of metabolites and active proteases. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 59, 537-548, 2007.
- SHENG, H., SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclitriterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of

metabolic and vascular diseases. *Natural Products Reports* 28, 543–593, 2011.

- SHI, C.H.; ZHANG, X.; SUO, H.; YIN, T.; XU, H.; YUAN, B.; ZHAO, Y. Simultaneous determination by LC-MS/MS of 25-methoxydammarane-3 β ,12 β ,20-triol epimers and active metabolites in rat plasma after intravenous administration. *Xenobiotica*. 43(10), 868-874, 2013.
- SHIN, K. M.; KIM, R. K.; AZEFACK, T. L.; DAVID, L.; LUC, S. B.; CHOUDHARY, M. I.; PARK, H. J.; CHOI, J. W.; LEE, K. T.; *In vitro* anti-inflammatory activity of 23-hydroxyursolic acid isolated from *Cussonia bancoensis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Planta Medica*, 70 (9), 803-807, 2004.
- SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 5a edição, Editora da UFRGS, Florianópolis, Porto Alegre, 1102p., 2004.
- SOB, S.V.T., K. WABBO, H.K., TCHINDA, A.T., TANE, P., NGADJU, B.T., YE, Y. Anthraquinones, sterols, triterpenoids and xanthenes from *Cassia obtusifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 342-345, 2010.
- SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L. A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(6), 3377-3386, 2008.
- SONG, J.; BI, H.; XIE, X.; GUO, J.; WANG, X.; LIU, D. Natural borneol enhances geniposide ophthalmic absorption in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* 445(1-2), 163-70, 2013.
- STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; DE CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. *Farmacocinética Básica e Aplicada*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2011.
- SU, S.; CUI, W.; DUAN, J. A.; HUA, Y.; GUO, J.; SHANG, E.; LIU, P.; TANG, Y. UHPLC-MS simultaneous determination and pharmacokinetic study of three aromatic acids and one monoterpene in rat plasma after oral administration of Shaofu Zhuyu decoction. *American Journal of Chinese Medicine* 41(3), 697-715, 2013.
- SUN, H.Y.; LI, Q.; CHEN, W.; GENG, L. L.; LI, X.; CHEN, X. H.; BI, K. S. Pharmacokinetic analysis of alpha and beta epimers of glycyrrhetic acid in rat plasma: differences in singly and combined administrations. *Yao Xue Xue Bao* 47 (1), 94-100, 2012.

- TAO, W.; DUAN, J.; GUO, J.; LI, J.; TANG, Y.; LIU, P.; YANG, N. Simultaneous determination of triterpenoid saponins in dog plasma by a validated UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after administration of total saponin of licorice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 75, 248-255, 2013.
- TARNING, J.; KLOPROGGE, F.; DHORDA, M.; JULLIEN, V.; NOSTEN, F.; WHITE, N. J.; GUERIN, P. J.; PIOLA, P. Pharmacokinetic properties of artemether, dihydroartemisinin, lumefantrine, and quinine in pregnant women with uncomplicated plasmodium falciparum malaria in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57(10):5096-103, 2013.
- TOPONDJOU, L. A.; LONTSI, D.; SONDEGAM, B. L.; CHOI, J.; LEE, K. T.; JUNG, H. J.; PARK, H. J. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxylursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Archives of Pharmacal Research*, 26 (2), 143-146, 2003.
- TOUTAIN, P. L.; FERRAN, A.; BOUSQUET-MÉLOU, A. SPECIES differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handbook of Experimental Pharmacology* 199, 19-48, 2010.
- TROPPII, R.J. & BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology* 3 (9), 228-249, 2011.
- VACLAVIKOVA, R.; SOUCEK, P.; SVOBODOVA, L.; ANZENBACHER, P.; SIMEK, P.; GUENGERICH, F. P.; GUT, I. Different *in vitro* metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs, and minipigs. *Drug Metabolism and Disposition* 32 (6), 666-674, 2004.
- VAN-DEN-BERG, E.; CHAZDON, R.; CORREA, B. S. Tree growth and death in a tropical gallery forest in Brazil: understanding the relationships among size, growth, and survivorship for understory and canopy dominant species. *Plant Ecology* 213 (7), 1081-1092, 2012.
- VIEIRA, F. A. Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande – MG. 2005.
- VIEIRA, F. A.; DE CARVALHO, D. Genetic differentiation of the neotropical tree species *Protium spruceanum* (Benth.) Engler (Burseraceae) between fragments and vegetation corridors in Brazilian Atlantic forest. *Acta Botanica Brasilica* 23 (4), 1180-1185, 2009.

- VIEIRA, F. A.; DE CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 17 (10), 2305-2321, 2008.
- VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; DE SOUZA, A. M.; REIS, C. A. F.; CARVALHO, D. Fine-scale genetic dynamics of a dominant neotropical tree in the threatened Brazilian Atlantic Rainforest. *Tree Genetics and Genomes* 8 (6), 1191-1201, 2012.
- VIEIRA-JUNIOR, G. M.; DE SOUZA, C. M. L. & CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova* 28 (2) 2005.
- WANG, X.; SONG, L.; LI, N.; QIU, Z.; ZHOU, S.; LI, C.; ZHAO, J.; SONG, H.; CHEN, X. Pharmacokinetics and biodistribution study of paclitaxel liposome in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Research (Stuttg)* 63 (11), 603-6, 2013.
- WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics* 58, 1-12, 1990.
- WU, Q.; HUANG, L.; LIU, Z.; YAO, M.; WANG, Y.; DAI, M.; YUAN, Z. A comparison of hepatic *in vitro* metabolism of T-2 toxin in rats, pigs, chickens, and carp. *Xenobiotica* 41 (10), 863-873, 2011.
- WU, X.J.; ZHANG, M. L.; CUI, X.Y.; PAUL FAWCETT, J.; GU, J. K. Comparative pharmacokinetics and the bioavailability of escin Ib and isoescin Ib following the administration of escin, pure escin Ib and isoescin Ib in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151 (2), 839-845, 2014.
- XU, P.; DU, S. Y.; LI, Y.; LU, Y.; BAI, J.; GUO, Q. L.; Comparative pharmacokinetic studies of borneol in brain and plasma of stroke or sham-operated rats after administration of Xingnaojing. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 38(21), 3763-7, 2013.
- XU, X., DONG, J., MU, X., SUN, L. Supercritical CO₂ extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) bee pollen. *Food and Bioproducts Processing* 89(1), 47-52, 2011.
- YAN, C.; LI, H.; WU, Y.; XIE, D.; WENG, Z.; CAI, B.; LIU, X.; LI, W.; CHEN, Z. Determination of xanthatin by ultra high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of xanthatin in rat plasma. *Journal of Chromatography B* (1), 947-948:57-61, 2014.

- YÁÑEZ, J. A.; REMSBERG, C. M.; SAYRE, C. L.; FORREST, M. L.; DAVIES, N. M. *Flip-flop pharmacokinetics – delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. Therapy Delivery* 2 (5), 643-672, 2011.
- YANG, B.; ZHOU, X.-F.; LIN, X.-P.; LIU, J.; PENG, Y.; YANG, X.-W.; LIU, Y. *Cembrane Diterpenes Chemistry and Biological Properties. Current Organic Chemistry* 16, 1512-1539, 2012.
- YANG, B.; LIU, D.; DU, C.; WANG, J. L.; WANG, L. F.; WANG, Y.; LIU, J. J. Study on pharmacokinetics and in vitro/in vivo correlation of menthol in Zhike Chuanbei Pipa dropping pills in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 38(9), 1421-5, 2013.
- YANG, L.; XU, S.; LIU, C.; SU, Z. *In vivo* metabolism study of ginsenoside Re in rat using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(5), 1441-51, 2009.
- YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; YAMANOUCHI, S.; KUMARI, K.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of compositae on 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetat-induced inflammation in mice. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 19(10), 1329-1331, 1996.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*, 501p., Chapecó, Argos, 2001.
- ZHANG, H.; QIU, M.; CHEN, Y.; CHEN, J.; SUN, Y.; WANG, C.; FONG, H. H. S. Plant Terpenes. In: *Phytochemistry and Pharmacognosy. EOLSS – UNESCO*. Disponível em <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C06/E6-151-05-00.pdf>, [201-].
- ZHANG, W.; DI, L. Q.; LI, S. J.; SHAN, J. J.; KANG, A.; QIAN, S.; CHEN, L. T. The effects of *Glycyrrhizae uralenis* and its major bioactive components on pharmacokinetics of daphnetin in Cortex daphnes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 154 (3), 584-592, 2014.
- ZHAO, C.; SHAO, J.; FAN, J. A new triterpenoid with antimicrobial activity from *Anemone rivularis*. *Chemical Natural Compounds* 48 (5), 803-805, 2012.
- ZHAO, K.; DING, M.; CAO, H.; CAO, Z.-X. *In vitro* metabolism of glycyrrhetic acid by human and rat liver microsomes and its interactions with six CYP substrates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 64, 1445-1451, 2012b.
- ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Composition of the essential

oils from leaves, wood, fruits and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Journal of Essential Oil Research* 14 (3), 169-171, 2002.

ZORNOZA, T.; CANO-CEBRIÁN, M. J.; HIPÓLITO, L.; GRANERO, L.; POLACHE, A. Evidence of a *flip-flop* phenomenon in acamprosate pharmacokinetics: na *in vivo* study in rats. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 27, 305-311, 2006.

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.1087.53.6), intitulado "Determinação e Validação de um Método Bioanalítico para Avaliação Farmacocinética de uma Mistura Binária de Triterpenos Pentacíclicos e de seus Metabolitos *in vivo*", de autoria de **Ivanildes Vasconcelos Rodrigues**, e de **Norberto Peporine Lopes** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 06/10/2011.

Colaboradores: Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira;
 Gustavo Henrique Bianco de Souza;
 Orlando David Henrique dos Santos

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1087.53.6), entitled: "Determination and Validation of a Bioanalytical Method for Pharmacokinetic Evaluation of Binary Mixture of Pentacyclic Triterpenes and their Metabolites *in vivo*", by **Ivanildes Vasconcelos Rodrigues** and **Norberto Peporine Lopes**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October 06, 2011.

Ribeirão Preto, 11 de outubro de 2011.


 Presidente da CEUA

Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi


 Secretária da CEUA
 Maria Angélica Depiro

29/6/2014

Gmail - [FWD] Acceptance to your manuscript submitted to Current Pharmaceutical Biotechnology



Ivanildes Vasconcelos Rodrigues <ivanildes@gmail.com>

[FWD] Acceptance to your manuscript submitted to Current Pharmaceutical Biotechnology

ORLANDO DAVID HENRIQUE DOS SANTOS

7 de janeiro de 2014 08:34

Para: ivanildes

Bom dia a todos,

Encaminho a resposta do artigo, após as correções feitas em dezembro. Parabens a todos. Aproveito para desejar Feliz 2014, com muita Paz, Saúde e Sucesso. Abraços, Orlando

Obs. Encamonhe ao Norberto, por favor.

-----mensagem original-----

De: "biswajit mukherjee"

Para: "orlando@

"CPB"

Data: Tue, 7 Jan 2014 18:04:08 +0800 (SGT)

Dear Dr. Orlando David Henrique dos Santos,
Your manuscript entitled "Preparation and In Vitro Evaluation of α and β -Amyrins Loaded Nanoemulsions" has now been accepted for publication in Current Pharmaceutical Biotechnology.
Regards,
Biswajit Mukherjee

Biswajit Mukherjee, PhD. F.I.C., F.I.C.S., W.B.C.S.

Former DAAD Fellow (Germany) and Ex-Guest Scientist, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany

Ex-visiting Fellow, School of Pharmacy, University of London, London

Former Indo-Hungarian Education Exchange Fellow, National Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene, Budapest, Hungary

Professor and Coordinator, Quality Improvement Programme (All India Council of Technical Education, Govt. of India) Nodal Cell (Pharmacy), Joint Coordinator, Center for Advance Research in Pharmaceutical Sciences

Department of Pharmaceutical Technology

Jadavpur University

Kolkata (Calcutta) 700 032, I N D I A

Phone: +91-33-24146677 ; Fax: +91-33-24146677



Santos ODH Text corrections.doc

301K