UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento de uma metodologia analítica por LC-MS/MS
para determinação de meta-clorofenilpiperazina em plasma de
camundongos submetidos à privação de sono paradoxal

Daniel Ninello Polesel

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora
Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento de uma metodologia analítica por LC-MS/MS
para determinação de meta-clorofenilpiperazina em plasma de
camundongos submetidos à privação de sono paradoxal

Daniel Ninello Polesel

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora
Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P765d Polesel, Daniel Ninello
Desenvolvimento de uma metodologia analítica por LC- MS/
MS para determinação de meta-clorofenilpiperazina em plasma de
camundongos submetidos à privação de sono paradoxal / Daniel
Ninello Polesel. -- São Paulo, 2012.
105p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. Cromatografia em líquido de alta eficiência : Análise
toxicológica I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi , orientador.

615.907 CDD

Daniel Ninello Polesel

Desenvolvimento de uma metodologia analítica por LC-MS/MS
para determinação de meta-clorofenilpiperazina em plasma de
camundongos submetidos à privação de sono paradoxal

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares
Orientador / Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo
2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Edinaldo e Helena, e minha irmã, Débora, que sempre iluminaram o caminho da minha vida. O meu sentimento é de profundo amor, admiração e gratidão pelo carinho, compreensão e incansável apoio de vocês ao longo do período de elaboração deste trabalho. Valeu a pena porque eu tinha vocês ao meu lado.

Além da minha família, dedico a conclusão deste trabalho a três pessoas que me fizeram crescer muito profissionalmente, e estas pessoas são: Profa. Dra. Monica Andersen, Prof. Dr. José Luiz da Costa e Prof. Dra. Marina Tavares. O meu sentimento não é de uma simples gratidão, é algo mais profundo que isso. Vocês me forneceram as melhores ferramentas existentes para que eu pudesse me aprimorar como pesquisador e crescer como ser humano.

Vocês fizeram parte fundamental na conclusão desta etapa da minha carreira.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter me proporcionado a vida e as condições pessoais para poder chegar até este momento. Em segundo lugar, está o meu imenso agradecimento aos meus pais e minha irmã, pelo apoio e pela compreensão em todos os momentos da minha vida. No meu agradecimento à família que resumidamente é o começo de tudo e são as pessoas que podem nos ajudar e fortalecer nos momentos de maior fraqueza.

Agradeço à Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares pela orientação acadêmica essencial ao longo de todo o desenvolvimento do meu projeto de mestrado. O agradecimento se estende aos seus orientados e ex-orientados, que me ajudaram em diversos momentos: Aline Klassen, Aline Vitor, Claudinei Alves, Grazielle Anaia, Karina Trevisan, Lucas Lobo, Maryane Bertelli e Tatiana Fukuji. O apoio do técnico Daniel Oliveira também foi de grande valia em diversos momentos. Não me esquecendo do Prof. Dr. João Pedro Simon Farah que com bom humor do seu dia-a-dia e sua preciosa ajuda prestada ao final do trabalho. Agradeço a amizade e o companherismo da theca Jitka Široká, enquanto trabalhamos juntos durante o tempo que em ela estive no Brasil.

Agradeço aos Prof. Dr. José Luiz da Costa e Prof. M.Sc. Rafael Lanaro, pesquisadores da toxicologia analítica / clínica no Brasil, pelos valiosos conselhos, paciência e por todo apoio oferecido para que eu conduzisse bem o estudo e com sugestões que aprimoraram ainda mais este projeto. Além da amizade e o companheirismo que nunca irei me esquecer. Agradeço também aos amigos José Antônio (Pernambuco) e Eduardo Lanaro pelos momentos de descontração.

À Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky pelo incentivo na escolha da área da Toxicologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP e orientação prestada no início da minha caminhada científica.

Um agradecimento especial aos membros da banca de qualificação: Prof. Dr. Claudimir Lago, Prof. Dr. Maurício Yonamine e Profa. Dra. Monica Andersen pelas sugestões importantes citadas durante o exame de qualificação que melhoraram o desenho experimental proposto inicialmente.

Um agradecimento especial à Elaine e ao Jorge pelos diversos momentos em que eles gentilmente sanaram minhas dúvidas junto à secretaria de Pós-Graduação da FCF. Também à Sueli, Ana Dantas e a Samantha pelo apoio junto à secretaria do Programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas. Aos amigos e colegas da Faculdade

de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP) e do Instituto de Química (IQ/USP) que auxiliaram nos momentos de estudos e nas diversões dos momentos de lazer.

O meu agradecimento se estende aos amigos feitos durante o período em que fiquei na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em especial nos Departamento de Psicobiologia e Farmacologia. No Departamento de Psicobiologia agradeço a Camila Hirotsu, Cristiano de Lima, Gabriel Pires, Gabriela Matos, Karen Nozoe, Flávia Egydio, Guilherme Julian, Paula Araújo, Rachel Albuquerque, Renato Oliveira e Tathiana Alvarenga. Também agradeço a Daniela Fukushima, Luís Saito, Elisa Kawamoto, Teótila Amaral e ao Cleomar Ferreira, ligados diretamente com o Prof. Dr. Roberto Frussa-Filho e ao Departamento de Farmacologia da mesma instituição. O pesquisador Dr. Fábio Ramos e a Profa. Dra. Denise Freitas colaboraram diretamente para a conclusão deste estudo. Um agradecimento especial ao Prof. Sérgio Tufik que disponibilizou a estrutura para realizar os experimentos e o financiamento de material de uso rotineiro no laboratório. E aos funcionários da AFIP e UNIFESP: Andréia Bezerra (Déinha), Claudete (Flor), Dagny, Waldemarks (Dunga), Eli, Gilberto, Júlio, Luciléia (Léia), Mara, Valéria, Vinícius e a toda equipe dos bioteristas.

Aos meus grandes amigos Diego Decleva e Fredson Torres (Fred) que foram amigos muito especiais que participaram muito com o apoio nos momentos mais difíceis e da diversão nos momentos de lazer.

Agradeço ainda aos meus amigos de São José do Rio Preto: Bruno Macri, Diego Terzariol, Janaína e Iara Dal Rovere, Kelton Reis, Marcus Fávaro, Pedro (Scanta) e Vinícius Vieira pelo companheirismo e pela amizade de longa data. Também agradeço o amigo Geverson Bertoche e família pela amizade desde os tempos da faculdade.

Ao povo brasileiro, que mediante as agências de fomento públicas Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e da instituição privada Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) que apoiaram e investiram financeiramente afim de que fosse colocada em prática a viabilização deste projeto de pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para nas conclusões dos créditos das disciplinas e na obtenção dos primeiros resultados analíticos deste trabalho.

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota"*
(Mãre Tereza de Calcutá)

*"Conhecimento não é aquilo que você sabe,
mas o que você faz com aquilo que você sabe"*
(Aldous Huxley)

"Seja a mudança que você quer ver no mundo"
(Mahatma Gandhi)

RESUMO

POLESEL, D. N. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica por LC-MS/MS para determinação de meta-clorofenilpiperazina em plasma de camundongos submetidos à privação de sono paradoxal**. 2012. 126 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O aumento no uso abusivo e nas apreensões de comprimidos contendo 1-(3-clorofenil)piperazina (*mCPP*) têm sido observado na Europa desde o final do século 20. A *mCPP* promove efeitos semelhantes a metilenodioximetanfetamina (ecstasy) e surgiu como uma alternativa menos neurotóxica. Os principais efeitos descritos pelos usuários são sensação de bem-estar, euforia e empatia. Os efeitos adversos observados em casos de intoxicação aguda são a ansiedade, confusão, insônia, ataques de pânico, estados convulsivos, taquicardia e até mesmo a morte. A *mCPP* frequentemente tem seu uso associado com a privação de sono dos usuários em ambientes noturnos (festas e danceterias). Além disso, o fármaco provoca insônia no usuário, agravando ainda mais as consequências ao sono do indivíduo. O sono *REM*, em humanos, ou chamado de sono paradoxal nos animais, é uma fase importante do sono, por ser ela a fase de retorno da homeostasia comportamental e bioquímica. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos comportamentais dos isômeros da clorofenilpiperazina e desenvolver um método analítico para identificar e quantificar a *mCPP* em amostras de plasma de camundongos submetidos à privação de sono paradoxal (PSP) por 24 e 48 horas. A ferramenta analítica empregada para identificar e quantificar a *mCPP* foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). As análises comportamentais de ansiedade e atividade locomotora dos camundongos utilizaram os testes do Labirinto em Cruz Elevado e o teste do Campo Aberto, respectivamente. Os resultados mostraram que a associação da PSP com o uso da *mCPP* acarretou mudanças comportamentais que voltaram ao nível homeostático somente após 48 horas de rebote de sono. Além disso, observou-se um aumento significativo na concentração circulante de *mCPP* nos animais PSP por 48 horas em relação ao grupo controle. Por fim, concluiu-se que a privação de sono paradoxal associada com a administração da *mCPP* produziu graves consequências comportamentais em camundongos e que a concentração do fármaco encontrado no plasma foi maior nos animais submetidos à privação de sono paradoxal.

Palavras-chaves: *mCPP*, clorofenilpiperazinas, privação de sono, rebote de sono, LC-MS/MS.

ABSTRACT

POLESEL, D. N. **Development of an analytical methodology by LC-MS/MS for determination of meta-chlorophenylpiperazine in plasma of mice submitted to paradoxical sleep deprivation.** 2012. 126 p. Dissertation (Master Science) - Department of Toxicology and Toxicological Analysis. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo.

The increase on abusive use and seizures of tablets containing 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) have been seen in Europe since the late 20th century. The *mCPP* promotes effects similar to methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and emerged as a less neurotoxic alternative. The main effects described by users are sense of well-being, euphoria and empathy. The adverse events observed in acute poisoning cases are anxiety, confusion, insomnia, panic attacks, convulsive states, tachycardia and even death. mCPP is often associated with sleep deprivation by their users and on night scenery (parties and discos). In addition, the drug causes insomnia on user, further aggravating the consequences to the individual sleep. REM sleep in humans or referred as to paradoxical sleep, in animals, is an important sleep phase, because it was the phase which promote the return of behavioral and biochemical homeostasis. The aim of this study was to evaluate the behavioral effects of the isomers of chlorophenylpiperazine and develop an analytical method to identify and quantify the mCPP in plasma samples from mice subjected to paradoxical sleep deprivation (PSD) for 24 and 48 hours. The analytical tool used to identify and quantify the mCPP was liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). The behavioral analysis of anxiety and locomotor activity of mice used the Elevated Plus Maze and Open Field tests, respectively. The results showed that association of PSD with the use of mCPP led to behavioral changes that back to the homeostatic level only after 48 hours of rebound sleep. Furthermore, there was a significant increase in circulating concentration of mCPP in animals paradoxical sleep deprived for 48 hours compared to control group. Finally, it is concluded that paradoxical sleep deprivation associated with administration of mCPP produced severe behavioral effects in mice and concentration of drug found in plasma was greater in animals submitted to paradoxical sleep deprivation than control group.

Key-words: mCPP, chlorophenylpiperazines, sleep deprivation, sleep rebound, LC-MS/MS.

Lista de Figuras

Figura 1.	Comprimidos e cápsula apreendidos por forças policiais, identificados com a presença da <i>mCPP</i>	2
Figura 2.	Estrutura química da piperina e piperidina.....	6
Figura 3.	Estrutura molecular da piperazina e seus derivados <i>oCPP</i> , <i>mCPP</i> e <i>pCPP</i>	8
Figura 4.	Representação esquemática do metabolismo da <i>mCPP</i> em ratos.....	11
Figura 5.	Esquema ilustrativo do procedimento de extração líquido-líquido.....	21
Figura 6.	Esquema do mecanismo de ionização da molécula através da <i>ESI</i> com evaporação do solvente solvatador e com a explosão coulômbica.....	23
Figura 7.	Ilustração do funcionamento do ion trap e o modo de detecção pelo monitoramento de reações selecionadas.....	24
Figura 8.	Representação do Labirinto em Cruz Elevado e suas dimensões.....	31
Figura 9.	Ilustração de um equipamento de Campo Aberto.....	32
Figura 10.	Desenho experimental para determinação da melhor dose de <i>mCPP</i>	34
Figura 11.	Desenho experimental para determinação do melhor tempo pós-administração de <i>mCPP</i>	35
Figura 12.	Camundongos colocados em plataformas dentro de um tanque próprio para privação de sono paradoxal.....	36
Figura 13.	Desenho experimental da avaliação dos isômeros da <i>CPP</i> associados ou não à privação de sono paradoxal.....	36
Figura 14.	Desenho experimental da avaliação do rebote de sono.....	37
Figura 15.	Fluxograma do procedimento para extração do <i>mCPP</i> em plasma.....	43
Figura 16.	Parâmetro do percentual do tempo de permanência no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para avaliar o efeito da dose administrada.....	48
Figura 17.	Parâmetro do percentual de entradas no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para avaliar o efeito da dose administrada.....	49
Figura 18.	Parâmetro da quantidade de quadrantes percorridos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito da dose administrada.....	50
Figura 19.	Parâmetro da quantidade de levantares produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito da dose administrada.....	51
Figura 20.	Parâmetro do tempo de reflexo de auto-limpeza produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito da dose administrada.....	52
Figura 21.	Parâmetro do percentual do tempo de permanência no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para determinar o tempo pós-administração do fármaco para exposição comportamental.....	54

Figura 22.	Parâmetro do percentual de entradas no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para determinar o tempo pós-administração do fármaco para exposição comportamental.....	55
Figura 23.	Parâmetro de quadrantes percorridos produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito do tempo pós-administração da <i>mCPP</i> nos camundongos.....	56
Figura 24.	Parâmetro da quantidade de levantares produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito do tempo pós-administração da <i>mCPP</i> nos camundongos.....	57
Figura 25.	Parâmetro do tempo de reflexo de auto-limpeza produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito do tempo pós-administração da <i>mCPP</i> nos camundongos.....	57
Figura 26.	Parâmetro do percentual do tempo de permanência no braço aberto durante o teste do Labirinto em Cruz Elevado comparando o efeito das <i>CPP</i> com efeito da PSP.....	60
Figura 27.	Parâmetro do percentual de entradas no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado comparando o efeito das <i>CPP</i> com efeito da PSP.....	61
Figura 28.	Parâmetro da quantidade de quadrantes percorridos pelos animais durante o teste do Campo Aberto comparando o efeito das <i>CPP</i> com efeito da PSP.....	62
Figura 29.	Parâmetro da quantidade de levantares observados durante o teste do Campo Aberto comparando o efeito das <i>CPP</i> com efeito da PSP.....	63
Figura 30.	Parâmetro do tempo de reflexo de auto-limpeza produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto comparando o efeito das <i>CPP</i> com efeito da PSP.....	64
Figura 31.	Parâmetro do percentual do tempo de permanência no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para determinar o efeito comportamental da <i>mCPP</i> no rebote de sono paradoxal.....	68
Figura 32.	Parâmetro do percentual de entradas no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para avaliar o efeito comportamental da <i>mCPP</i> no rebote de sono paradoxal.....	69
Figura 33.	Parâmetro da quantidade de quadrantes percorridos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito comportamental da <i>mCPP</i> no rebote de sono paradoxal.....	70
Figura 34.	Parâmetro da quantidade de levantares produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito comportamental da <i>mCPP</i> no rebote de sono paradoxal.....	71
Figura 35.	Parâmetro de tempo do reflexo de auto-limpeza mensurado no teste do Campo Aberto para avaliar o efeito comportamental da <i>mCPP</i> no rebote de sono paradoxal.....	72
Figura 36.	Cromatograma obtido de uma amostra de plasma enriquecido com <i>mCPP</i> e o padrão interno (<i>oCPP</i>) a 500 ng.mL ⁻¹	75
Figura 37.	Comparação dos cromatogramas (LC-MS) sob a porcentagem de acetonitrila (ACN) presente na fase móvel na separação do isômero <i>oCPP</i> e <i>mCPP</i> na concentração de 50 ng.mL ⁻¹	76

Figura 38. Espectro de massas (<i>MS</i>) da análise da <i>mCPP</i> obtido no modo <i>full scan</i>	76
Figura 39. Espectro de massas (<i>MS</i>) da <i>mCPP</i> no modo <i>zoom scan</i> para identificação da distribuição isotópica.....	78
Figura 40. Espectro de massas (<i>MS</i> ²) do íon de <i>m/z</i> 197,10.....	79
Figura 41. Espectro de massas (<i>MS</i> ²) do composto de <i>m/z</i> 199,10.....	79
Figura 42. Espectro de massas (<i>MS</i> ³) do composto 197,1 através do fragmento 154,05.....	80
Figura 43. Espectro de massas (<i>MS</i> ³) do composto 199,1 através do fragmento 156,05.....	80
Figura 44. Principais íons moleculares da <i>CPP</i>	81
Figura 45. Representação da curva analítica para a determinação de <i>mCPP</i> nas concentrações plasmáticas de 20 a 2000 ng.mL ⁻¹	83
Figura 46. Boxplot das concentrações de <i>mCPP</i> correlacionadas com os grupos experimentais de sono.....	87

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Estrutura química das drogas de abuso relacionadas com as piperazinas.....	7
Tabela 2.	Reunião dos dados encontrados na literatura científica para detecção de <i>mCPP</i>	25
Tabela 3.	Reunião dos dados bibliográficos de estudos científicos com a <i>mCPP</i> ..	33
Tabela 4.	Teste de hipótese e as suas possibilidades experimentais.....	40
Tabela 5.	Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento para definição da dose...	52
Tabela 6.	Reunião dos dados referentes ao experimento para definição da dose, com a identificação do grupo experimental observado em relação ao grupo controle (veículo).....	53
Tabela 7.	Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento para determinação do tempo para exposição comportamental.....	58
Tabela 8.	Reunião dos dados referentes ao experimento para determinação do tempo pós-administração do fármaco, com a identificação do grupo experimental observado em relação ao grupo controle (veículo).....	59
Tabela 9.	Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento de PSP avaliando apenas o efeito da condição do sono.....	65
Tabela 10.	Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento de PSP avaliando apenas o efeito dos fármacos.....	65
Tabela 11.	Reunião dos dados referentes ao experimento de privação de sono, com a identificação do grupo experimental observado em relação ao grupo controle (veículo).....	66
Tabela 12.	Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento de rebote de sono paradoxal avaliando o efeito da condição do sono.....	72
Tabela 13.	Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento de rebote de sono paradoxal avaliando o efeito da <i>mCPP</i>	73
Tabela 14.	Reunião dos dados referentes ao experimento de rebote de sono paradoxal, com a identificação do grupo experimental observado em relação ao grupo não privado de sono (controle).....	73
Tabela 15.	Massa molecular e abundância relativa dos isótopos da <i>CPP</i>	77
Tabela 16.	Valor de recuperação obtido com a aplicação do método proposto em plasma.....	82
Tabela 17.	Valores de precisão intra-ensaio e interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de plasma.....	84
Tabela 18.	Valores de recuperação obtido com o método proposto em amostras de plasma.....	84
Tabela 19.	Resultados da concentração da amostra plasmática de cada indivíduo e o seu respectivo grupo experimental do sono.....	85
Tabela 20.	Resultados da ANOVA realizada após a determinação da concentração nos indivíduos dos grupos experimentais.....	86
Tabela 21.	Dados descritivos da concentração de <i>mCPP</i> nos grupos experimentais de sono.....	87

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN	Acetonitrila
A-CA	Tempo observado de reflexo de auto-limpeza (Campo Aberto)
BZP	Benzilpiperazina
CE	<i>Capillary Eletrophoresis</i> – Eletroforese capilar
CPP	<i>Chlorophenylpiperazine</i> – clorofenilpiperazina
CQ	Controle de qualidade
CTRL	Controle (grupo experimental)
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DP	Desvio padrão
ECD	<i>Eletrochemical detector</i> – Detector eletroquímico
EEG	Eletroencefalograma
EPD	<i>Etoferidone</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> – ionização por <i>electrospray</i>
E-LCE	% do número de entradas nos braços abertos (Labirinto em Cruz Elevado)
GC	<i>Gas Chromatography</i> – Cromatografia gasosa
LC	<i>Liquid Chromatography</i> – Cromatografia líquida
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> – Extração líquido-líquido
L-CA	Quantidade de levantares (Campo Aberto)
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDEA	3,4-metilenodioxietilamfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetamfetamina
MeOPP	<i>1-(4-methoxyphenyl)piperazine</i> – 1-(4-metoxifenil)piperazina
MS	<i>Mass spectrometry</i> – Espectrometria de massas
MS/MS	<i>Mass spectrometry in tandem</i> – Espectrometria de massas em sequencial
MTBE	Metil Terc-Butil Éter
mCPP	<i>1-(3-chlorophenyl)piperazine</i> – 1-(3-clorofenil)piperazina
NEF	Nefazodona
NPD	<i>Nitrogen Phosphorus Detector</i> – Detector de nitrogênio e fósforo
NREM	Fase do sono Não-REM
OH-NEF	Hidroxinefazodona
oCPP	<i>1-(2-chlorophenyl)piperazine</i> – 1-(2-clorofenil)piperazina
PHN	p-hidroxinefazodona
PSP	Privação de sono paradoxal

PSP24	Privação de sono paradoxal por 24 horas (grupo experimental)
PSP48	Privação de sono paradoxal por 48 horas (grupo experimental)
pCPP	<i>1-(4-chlorophenyl)piperazine</i> – 1-(4-clorofenil)piperazina
Q-CA	Quantidade de quadrantes percorridos (Campo Aberto)
RBT	Rebote (grupo experimental)
REM	<i>Rapid Eyes Movement</i> - Fase do sono com movimento rápido de olhos
rpm	Rotações por minuto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> – Extração em fase sólida
MEPS	<i>Micro Extraction by Packed Sorbent</i> – Microextração em fase sólida
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i> – Monitoramento seletivo de reações
TFMPP	<i>1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine</i> – 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina
THC	Tetra-hidrocanabinol
TZD	Trazodona
T-LCE	% de tempo de permanência nos braços abertos (Labirinto em Cruz Elevado)
UV	Detector de ultravioleta-visível
VD	Volume de distribuição

Lista de Símbolos e Unidades

5-HT	Serotonina
cm	Centímetro(s)
C_{aqu}	Concentração de um determinado composto na fase aquosa
C_{max}	Concentração plasmática máxima
C_{org}	Concentração de um determinado composto na fase orgânica
CYP2D6	Citocromo P-450 isoforma 2D6
h	Horas
Hg	Mercúrio
K_d	Coeficiente de partição
MeOH	Metanol
min	Minutos
ppb	Parte por bilhão (1:1.000.000.000) ou ng.mL ⁻¹
ppm	Parte por milhão (1:1.000.000) ou µg.mL ⁻¹
s	Segundos
T_{max}	Tempo necessário para atingir a concentração plasmática máxima
t_{1/2}	Meia-vida de eliminação

SUMÁRIO

	Resumo	i
	Abstract	ii
	Lista de Figuras	iii
	Lista de Tabelas	iv
	Lista de Abreviaturas e Siglas	v
	Lista de Símbolos e Unidades	vi
1	INTRODUÇÃO	1
2	GENERALIDADES	6
2.1	Drogas de abuso sintéticas e os derivados das piperazinas	6
2.2	Toxicocinética da meta-clorfenilpiperazina	8
2.3	Toxicodinâmica da meta-clorfenilpiperazina	11
2.4	Estudo do sono	15
3	ASPECTOS ANALÍTICOS	20
3.1	Extração líquido-líquido	20
3.2	Técnicas de separação e identificação	21
4	OBJETIVOS	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	Seção Experimental	28
5.1.1	Animais	28
5.1.2	Fármacos e a administração	29
5.1.3	Testes comportamentais	29
5.1.3.1	Labirinto em Cruz Elevado	30
5.1.3.2	Campo Aberto	32
5.1.4	Delineamentos experimentais	33
5.1.4.1	Determinação da melhor dosagem	33
5.1.4.2	Determinação do melhor tempo pós-administração do fármaco	34
5.1.4.3	Método de privação de sono paradoxal e administração dos fármacos	35
5.1.4.4	Avaliação do efeito do sono rebote de sono paradoxal	37
5.1.5	Eutanásia	38
5.1.6	Análise Estatística	38
5.2	Procedimentos para análise por LC-MS/MS	40
5.2.1	Condições cromatográficas e espectrométricas	40
5.2.2	Soluções-padrão	41
5.2.3	Escolha do solvente	42
5.2.4	Procedimentos de extração	42
5.3	Validação analítica	44
5.3.1	Linearidade	44
5.3.2	Limite de quantificação	45

5.3.3	Precisão intra-ensaio e interensaio.....	45
5.3.4	Recuperação.....	45
5.3.5	Quantificação das amostras.....	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
6.1	Estudos experimentais.....	47
6.1.1	Escolha da dose.....	47
6.1.2	Escolha do tempo pós-administração.....	53
6.1.3	Avaliação dos isômeros no comportamento de camundongos com padrão de sono normal e privados de sono paradoxal.....	59
6.1.4	Avaliação do rebote de sono paradoxal.....	67
6.2	Dados da separação cromatográfica e espectrométricos.....	74
6.3	Validações dos métodos para determinação de <i>mCPP</i> em amostras de plasma	81
6.3.1	Escolha do solvente.....	81
6.3.2	Limite de quantificação.....	82
6.3.3	Linearidade.....	82
6.3.4	Precisão intra-ensaio e interensaio.....	83
6.3.5	Recuperação.....	84
6.3.6	Análise das amostras de animais PSP.....	85
7	CONCLUSÕES.....	88
8	PERSPECTIVAS.....	89
9	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXOS.....	100
	Anexo 1 – Parecer final do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP..	100
	Anexo 2 – Recebimento da aprovação do CEP pela USP.....	102
	Anexo 3 – Adendo enviado ao CEP da UNIFESP.....	103
	Anexo 4 – Aprovação do adendo pelo CEP da UNIFESP.....	105

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um notório acréscimo no consumo de drogas de abuso de origem sintética (OEDT, 2004). Fármacos sintéticos referem-se às substâncias psicoativas obtidas por síntese química, não encontradas na natureza, com uma estrutura molecular análoga a alguns fármacos que são ou que já foram utilizados na terapêutica. Frequentemente, esses compostos sintéticos são obtidos através de alterações da estrutura molecular de uma substância ilícita, tendo como objetivo a obtenção dos efeitos psicoativos, mas evitando as consequentes sanções penais (BECK; MORGAN, 1986; KALANT, 2001; OEDT, 2001).

Os termos droga e fármaco serão definidos a seguir, uma vez que existe uma diferença fundamental entre estas designações. Droga é toda substância capaz de modificar ou explorar o sistema fisiológico ou estado patológico, utilizada com ou sem intenção de benefício do organismo receptor. Por outro lado, fármaco é definido como toda substância de estrutura química definida, responsável por desencadear um efeito benéfico ao organismo receptor, caso seja usado de modo correto e em uma dose dentro da faixa de concentração terapêutica. Dessa forma, o exemplo clássico é o caso da *Cannabis sativa* (maconha) que é considerada uma droga e o seu principal constituinte, o Δ^9 -tetraidrocanabinol, um fármaco (OGA, CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Neste sentido, vale destacar que droga de abuso é qualquer substância ou preparação, com pouco ou nenhum uso médico, usado primariamente em busca dos efeitos prazerosos, exóticos ou estimulantes. O abuso de drogas ocorre quando um indivíduo usa repetidamente uma droga, apesar de ter ciência saber do problema social, ocupacional ou de saúde gerado pelo uso da substância. O uso frequente de drogas em situações perigosas, como dirigir ou operar máquinas quando intoxicado também caracteriza abuso de drogas.

De acordo com o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência, as apreensões de drogas de abuso são geralmente consideradas como indicadores indiretos da oferta e da disponibilidade das mesmas. O número de apreensões constitui geralmente um indicador mais útil das tendências gerais ao nível do consumidor (OEDT, 2001).

A 1-(3-clorofenil)piperazina (*mCPP*) é conhecida por diversos nomes dependendo do país em questão, como “X4” (Holanda e Suécia), “*regenboogies*”

(Bélgica), “*arlequin*” e “*arc-en-ciel*” (França), “*rainbow*” (Eslovênia), “*smarties*” e “*Rolls Royce*” (Suíça) (EMCDDA, 2007). Esta substância foi identificada pela primeira vez na Suécia em 2004, e desde então já foi apreendida por forças policiais de 26 países europeus. Durante o ano de 2006, aproximadamente 823.000 comprimidos de clorofenilpiperazinas foram apreendidos em países membros da União Europeia (EMCDDA, 2007; KOVALEVA *et al.*, 2008). Curiosamente, na Internet é possível encontrar a venda de uma mistura de piperazinas, rotulada como “X4”, composta pela mistura de 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (*TFMPP*), 1-(4-metoxifenil)piperazina (*MeOPP*), *mCPP* e 1-(4-clorofenil)piperazina (*pCPP*) (EMCDDA, 2007).

As clorofenilpiperazinas são encontradas na forma de pó, soluções ou comprimidos. Essas piperazinas têm ganhado popularidade e são frequentemente encontradas por autoridades policiais por si só ou em combinação com 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) ou com metanfetaminas (VORCE *et al.*, 2008).

A *mCPP* é vendida principalmente em discotecas, festas particulares e *raves*, essencialmente na forma de comprimidos (**Figura 1**), sendo os efeitos subjetivos da *mCPP* e da 3,4-metilenodioximetanfetamina, parcialmente comparáveis (BOSSONG, VAN DIJK; NIESINK, 2005). O uso da *mCPP* é tipicamente associado aos jovens de 15 a 24 anos de idade, sendo proporcionalmente mais usado por homens do que mulheres e ocorrendo predominantemente em áreas urbanas (EMCDDA, 2007). Estes comprimidos são quase sempre, desenhados de modo a assemelhar-se e, presumivelmente, a serem comercializados como *ecstasy* (EUROPOL, 2007). A quantidade da *mCPP* nestes comprimidos pode variar entre 22 e 80 mg (KOVALEVA *et al.*, 2008; EMCDDA, 2007).

Figura 1. Comprimidos apreendidos por forças policiais, identificados com a presença da *mCPP*. Fonte: Adaptado de EMCDDA (2007); ESCADA (2007); ROMÃO *et al.* (2011).

Com frequência a venda do comprimido ao usuário é realizada via Internet, e o preço do comprimido apresenta uma grande variação entre os países do continente europeu. Foi relatado o menor preço na Lituânia (a € 2,30 quando a compra é em atacado, e no preço de € 3,20 quando comprado em poucas unidades), mas há outros valores, como na Hungria, a € 5,00, na Eslovênia, a € 6,25, e na Suécia com o custo de € 10,00 (150 mg do comprimido *X4*). O valor mais caro de cada comprimido foi encontrado na França, quando no final do ano de 2004, cada comprimido custava € 15,00 em Bayonne, no sudoeste do país. Em média o preço do comprimido com *mCPP* é um pouco maior do que o comprimido com *ecstasy*, isso se deve ao fato de ser um fármaco mais recente (EMCDDA, 2007). Além disso, a *mCPP* é frequentemente encontrada em combinação com a MDMA em comprimidos apreendidos (OEDT, 2006). Pode ocorrer adição de outras substâncias no comprimido com o fármaco principal, no caso *mCPP*, sendo substâncias diversas, lícitas e ilícitas, sintéticas ou não. Alguns autores relatam que os comprimidos de *mCPP* podem conter diversos diluentes e adulterantes, como MDMA ou cocaína (BOSSONG, VAN DIJK; NIESINK, 2005; STAACK *et al.*, 2007; KOVALEVA *et al.*, 2008; EMCDDA, 2007). A *mCPP*, como princípio ativo, não apresenta qualquer aplicação médica legalizada, e também tem sido incluída em listas de substâncias psicotrópicas controladas em diversos países, principalmente devido à sua toxicidade e pelos recentes achados da *mCPP* em comprimidos de *ecstasy* (ROMÃO *et al.*, 2011).

Uma das razões da rápida difusão dos comprimidos de *mCPP* é a percepção de segurança pelo usuário. Comprimidos coloridos e brilhantes, com logotipos atrativos e a ausência dos problemas relacionados com os fármacos injetáveis (como por exemplo, as doenças infecciosas), promovem uma aparente característica inofensiva. O seu baixo custo, facilidade de transporte, aquisição e consumo podem ser outros fatores importantes para a sua popularização. Os símbolos, gravados nos comprimidos, transmitem ao consumidor a idéia de que os comprimidos provêm de um mesmo fabricante e assim, irão proporcionar o mesmo efeito. No entanto, a composição e a concentração podem diferir bastante entre comprimidos (ESCADA, 2007).

Através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº79, publicada no Diário Oficial da União em 04/11/2008, a *mCPP* e seus isômeros foram adicionadas à lista F2 da Portaria nº 344/98 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), lista que elenca as substâncias psicotrópicas de uso proscrito no Brasil e onde se

encontram substâncias como a MDMA (*ecstasy*) e o tetra-hidrocanabinol (THC), princípio ativo da maconha (BRASIL, 2003).

Entre os meses de janeiro e maio de 2008, o Laboratório de Toxicologia Forense do Núcleo de Perícias Criminalísticas de Campinas (Superintendência da Polícia Técnico-Científica do Estado de São Paulo), recebeu para exame pericial 112 comprimidos de diferentes cores, tamanhos e formatos, oriundos de apreensões realizadas em Campinas e cidades adjacentes. Os exames químico-periciais realizados nestes comprimidos apresentaram resultados inesperados, diferentes daqueles obtidos quando a substância analisada é a MDMA – principal fármaco de abuso consumido na forma de comprimidos no Brasil (LANARO *et al.*, 2010).

A *mCPP* é muito usada em ambientes noturnos festivos e os usuários estão frequentemente em estado de privação de sono. Falta de atenção e distúrbios de sono são problemas muito comuns relatados por usuário de drogas (JOHANSON *et al.*, 1999). Em ratos, a privação de sono resulta em sintomas generalizados conduzidos por alterações comportamentais, hormonais e diversas catecolaminas (ANDERSEN *et al.*, 2005). A privação seletiva de sono é conhecida cientificamente por potencializar algumas respostas comportamentais, em particular agressividade e comportamento estereotipado na resposta a agonistas dopaminérgicos e fármacos psicoestimulantes (TUFIK *et al.*, 1978; TUFIK, 1981; ANDERSEN *et al.*, 2003, 2005, 2010).

Diversos estudos observaram que a privação de sono (ANDERSEN *et al.*, 2009; KAHAN *et al.*, 2010) potencializa os efeitos decorrentes do uso de drogas ilícitas (como cocaína ou MDMA) (ALVARENGA *et al.*, 2010), e que também ela induz danos genéticos em múltiplos órgãos em roedores (ALVARENGA *et al.*, 2011). Além disso, observou-se também que a perda de sono pode aumentar o risco de crises convulsivas causado por fármacos psicoestimulantes (ANDERSEN; TUFIK, 2003). Como além do fato que a privação de sono também atua em receptores dopaminérgicos e a *mCPP* promove a estimulação da liberação e inibição da receptação de alguns neurotransmissores. Portanto, em função do aumento do número de pessoas expostas à privação de sono na sociedade moderna, torna-se importante avaliar o efeito da privação de sono e o uso de uma nova classe de drogas de abuso disponíveis ilicitamente, como "droga de rua", como as *CPP*, por que estas frequentemente são encontradas em comprimidos de *ecstasy* (BOSSONG *et al.*, 2010; ROMÃO *et al.*, 2011; UNODC, 2010).

Depois de desenvolvida a metodologia analítica, esta dará suporte aos estudos de quantificação da *mCPP* no plasma de camundongos submetidos à privação de sono paradoxal e possivelmente correlacionar às avaliações comportamentais (atividade locomotora e ansiedade). Sendo assim, este estudo avaliou a interação do uso das *CPP* com a privação de sono paradoxal e os efeitos do fármaco no rebote de sono paradoxal, a quantificação das amostras de *mCPP* nos animais controle e privados de sono paradoxal e resultando em uma importância que deve ser considerada sobre o sono na qualidade de vida e na manutenção do estado homeostático do organismo.

Generalidades

2. GENERALIDADES

2.1 Drogas de abuso sintéticas e os derivados das piperazinas

A denominação piperazina é possivelmente atribuída à similaridade química com a piperidina, existente em pequenas quantidades na pimenta preta (*Piper nigrum* L.). A pimenta preta e outras plantas da família *Piperaceae* contêm, nos seus frutos, a piperina. As estruturas químicas da piperina e da piperidina estão representadas na **Figura 2**. Apesar da sugestão que piperazinas são compostos derivados das plantas do gênero *Piper* sp., as piperazinas não são compostos de origem natural, pelo contrário, são obtidas por síntese química. Isto pode explicar o fato de drogas de abuso da classe das piperazina serem consideradas erroneamente como drogas naturais, drogas seguras e apelidadas de “herbal ecstasy” (ESCADA, 2007).

Figura 2. Estrutura química da piperina e piperidina.

Derivados de piperazinas foram inicialmente utilizados na prática veterinária, principalmente para combater a infecção parasitária helmíntica em aves. Também foi pesquisado um potencial efeito vasodilatador e como inibidor de crescimento de tumores cancerígenos. Entretanto, as piperazinas não corresponderam às expectativas da área médica e elas entraram no mercado de narcóticos, pois apresentavam um efeito similar ao ecstasy (MDMA): estimulante (em doses baixas) e alucinógeno (em doses altas) (STANASZEK; ZUBA, 2006).

Os derivados da piperazina representam uma ampla classe química de substâncias de estrutura molecular cíclica de seis átomos, sendo dois do elemento nitrogênio em posições opostas, como pode ser observado na **Tabela 1**. Muitos derivados da piperazina possuem propriedades farmacológicas importantes, pertencendo a diferentes classes terapêuticas como antifúngicos, antidepressivos,

antipsicóticos, antivirais e substâncias serotoninérgicas (5-HT) (OEDT, 2006; EMCDDA, 2007; KOVALEVA *et al.*, 2008).

Tabela 1. Estrutura química das drogas de abuso relacionadas com as piperazinas.

Piperazinas	Y	R1	R2

1-benzilpiperazina (BZP)	CH ₂	H	H
1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina (MDBP)	CH ₂	OCH ₂ O	
1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP)	-	OCH ₃	H
1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP)	-	H	Cl
1-(4-clorofenil)piperazina (pCPP)	-	Cl	H
1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP)	-	H	CF ₃

Fonte: Adaptado de Escada, 2007.

Poderão distinguir-se, entre as drogas sintéticas derivadas das piperazinas: as benzilpiperazinas, 1-benzilpiperazina (BZP) e o seu análogo 1-(3,4-metilenodioxibenzil)piperazina (MDBP), e as fenilpiperazinas, 1-(2-clorofenil)piperazina (oCPP), 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), 1-(4-clorofenil)piperazina (pCPP), 1-(3-trifluorometilfenil)piperazina (TFMPP), e 1-(4-metoxifenil)piperazina (MeOPP) (ESCADA, 2007).

A mCPP é um metabólito ativo de fármacos antidepressivos, considerado atípicos, como a trazodona, nefazodona e etoperidona e, tranquilizantes, como o mepiprazol. Ela ainda está relacionada farmacologicamente com o dapiprazol (CACCIA; GARATTINI, 1990), e a molécula faz parte da estrutura da cloperidona e mefeclorazina (STAACK; MAURER, 2003).

A mCPP é largamente utilizada na área da farmacologia experimental como sonda neuroquímica do sistema serotoninérgico em seres humanos. Ela atua tanto como agonista e antagonista em diferentes receptores serotoninérgicos. As estruturas químicas da piperazina e os isômeros orto, meta e para da clorofenilpiperazinas (CPP) estão representados na **Figura 3**. Não foram encontrados dados toxicocinéticos e toxicodinâmicos dos isômeros oCPP e pCPP.

Figura 3. Estrutura molecular da piperazina e seus derivados *oCPP*, *mCPP* e *pCPP*.

2.2 Toxicocinética da meta-clorofenilpiperazina

A farmacocinética é o estudo da relação entre a quantidade de um agente tóxico que atua sobre o organismo e a concentração dele no plasma, relacionando os processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação do agente, em função do tempo (OGA, CAMARGO; BATISTUZZO, 2008). Para que as piperazinas produzam os efeitos pretendidos é necessário que os compostos atinjam a circulação sanguínea. A distribuição através do sangue permitirá que sejam alcançadas as células, tecidos e órgãos-alvo, onde os compostos irão exercer a sua ação farmacológica. A biotransformação destes compostos antecipa a sua eliminação do organismo, ainda que de forma inalterada. Os produtos resultantes dos processos de biotransformação são designados, genericamente, de metabólitos do(s) fármaco(s) administrados.

De uma forma geral, as piperazinas são bases orgânicas e tem o seu valor da constante de ionização (como pK_a) superiores a 8,0; o valor de pK_a da *mCPP* a 37°C é de 8,64 (CACCIA; GARATTINI, 1990; MOKROSZ *et al.*, 1992; BISHOP *et al.*, 2005). O valor de solubilidade da *mCPP* em água é de 7310 mg.L⁻¹ e o valor de logP correspondente a 2,11 (ESCADA, 2007).

A via de administração é fundamental para a explicação das diferenças acentuadas nas concentrações dos fármacos administrados e seus metabólitos. Os fármacos administrados por via oral estão sujeitos ao efeito de primeira passagem no fígado, onde ocorre a metabolização precedendo a sua distribuição no organismo. Desta forma, a fração que não sofreu metabolização e os metabólitos desta primeira metabolização serão distribuídos pela corrente sanguínea ao organismo. Em alguns casos, após a metabolização do fármaco é gerado um metabólito ativo, como no caso do fármaco trazodona, que ao ser metabolizado leva à formação da *mCPP*.

Um estudo recente da farmacocinética da *mCPP*, em humanos, apresentou a grande variabilidade entre os indivíduos, porém sem diferenciação sexual (GIJSMAN *et al.*, 1998). A absorção acontece em média em 1 hora, (intervalo 0,3 a 3,1 horas), a $t_{1/2}$ de eliminação ocorre em aproximadamente 5,8 horas (intervalo 2,4 a 12,7 horas), T_{max} foi de 3,2 horas (intervalo de 1 a 6 horas) e a taxa de depuração é de $49,6 \text{ mL.hora}^{-1}$ (intervalo de $11,6$ a $92,2 \text{ mL.hora}^{-1}$) (GIJSMAN *et al.*, 1998). Após administração oral de uma dose do fármaco ($0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) a concentração plasmática máxima (C_{max}) é de $30,8 \text{ ng.mL}^{-1}$ (MAES *et al.*, 2001; FEUCHTL *et al.*, 2004).

A quantidade ingerida pode ter relação direta com o tempo que o usuário necessita esperar para que ocorra o pico de concentração plasmática do fármaco no organismo. No anseio de obter os efeitos desejáveis mais rapidamente, o usuário ingere uma quantidade maior da substância, e conseqüentemente, quando o fármaco atingir o pico de concentração possivelmente ocorrerá uma intoxicação decorrente da superdosagem, diagnosticado pelos sinais e sintomas apresentados pelo usuário. A biodisponibilidade da *mCPP* (capacidade do composto atingir a corrente sanguínea na forma ativa varia entre 12 a 84% (FEUCHTL *et al.*, 2004), indicando uma variabilidade interindividual elevada.

Em ratos, o volume de distribuição (VD) da *mCPP* é de $4,0 \text{ L.kg}^{-1}$, indicando uma boa distribuição tecidual. Após administração endovenosa as piperazinas distribuem-se em grande extensão nos pulmões, cérebro, fígado, rins e glândulas adrenais. Coração e bolsas de gordura epididimária apresentavam concentrações mais baixas, mas ainda superiores aos presentes no sangue. As concentrações encontradas no sistema nervoso central são sempre mais elevadas quando comparadas com as concentrações sanguíneas (FULLER *et al.*, 1981; CACCIA *et al.*, 1987; CACCIA; GARATTINI, 1990).

No sangue, as piperazinas distribuem-se entre os eritrócitos e o plasma, e neste último, entre a fração aquosa e a protéica. A ligação da *mCPP* às proteínas plasmáticas é fraca, cerca de 30 a 40%. A razão entre as concentrações sanguíneas e plasmáticas das piperazinas (proporção sangue/plasma) da *mCPP* é de 1:1, revelando uma distribuição equitativa entre os glóbulos vermelhos e o plasma (CACCIA; GARATTINI, 1990).

No processo de biotransformação diferenciam-se duas fases metabólicas. Numa primeira fase (fase I) são englobadas reações químicas de natureza distinta (por exemplo, oxidação, redução, hidrólise) com alterações da estrutura química da

molécula, cujo objetivo é a obtenção de metabólitos mais polares, menos lipofílicos, de modo a facilitar a sua eliminação. Numa fase posterior (fase II), os metabólitos formados durante a fase I ligam-se covalentemente a moléculas endógenas (por exemplo, carboidratos e sulfatos). Os produtos destas reações denominam-se genericamente de metabólitos conjugados, sendo então observado o aumento de hidrossolubilidade da molécula. A biotransformação dos xenobióticos nos seus metabólitos ocorre principalmente a nível hepático, conduzindo, em geral, a compostos mais polares, mais hidrofílicos, o que facilita a sua eliminação do organismo (CANÃDAS, 1998).

A metabolização da *mCPP* é intensa e o principal metabólito gerado é a para-hidroxyclorofenilpiperazina. Em diversos estudos é detectada a presença da *mCPP* sob a forma inalterada (MILLER; DEVANE, 1986; STAACK *et al.*, 2007; DICKSON *et al.*, 2010), assim como do principal metabólito sob a forma livre (STAACK; MAURER, 2003, 2005). Há relato de reação cruzada em *kits* de imunoensaio para identificação qualitativa de MDMA, quando fármacos como a trazodona, *mCPP* e *TFMPP* estão presentes em quantidades significativas nas amostras de urina, gerando um resultado falso-positivo, sendo confirmado posteriormente pela técnica analítica de GC-MS (LOGAN *et al.*, 2010).

Para a afirmação de que a presença da *mCPP* foi decorrente de um uso recreativo ilícito pode não ser verídica, uma vez que o uso terapêutico legal de alguns fármacos pode gerar como metabólito, a molécula de *mCPP*. Caso não seja confirmada a presença do fármaco e de outros metabólitos é possível presumir que a presença da *mCPP* seja compatível com uma administração para utilização recreativa. Por outro lado, alguns metabólitos da *mCPP* não são exclusivos deste composto. Alguns herbicidas (por exemplo, barbane, clorbufame e clorprofame) apresentam como metabólito a 3-cloroanilina. O butiron, um herbicida, apresenta na sua estrutura a molécula de 4-cloroanilina, cujo espectro de massas é similar (STAACK; MAURER, 2003).

A eliminação das piperazinas ocorre principalmente por via renal, sendo que na urina estes fármacos são eliminados na forma inalterada em quantidade reduzida, inferior a 1%, e nas formas mais lipofílicas como a *mCPP* e a *TFMPP*. Decorrida 24 horas após a sua administração, a presença da *mCPP* na urina é de 0,5% da dose administrada (CACCIA *et al.*, 1987). Na **Figura 4** está esquematizada a formação dos metabólitos da *mCPP* no organismo de ratos.

Figura 4. Representação esquemática do metabolismo da *mCPP* em ratos: *mCPP* (1); hidróxi-clorofenilpiperazina, 2 isômeros (2,3); N-(3-clorofenil)etilenodiamina (4); 3-cloroanilina (5); N-acetil-3-cloroanilina (6); hidróxi-3-cloroanilina (7,8); N-acetil-3-cloroanilina (9,10). Fonte: STAACK; MAURER, 2003, 2005.

2.3 Toxicodinâmica da meta-clorofenilpiperazina

O conhecimento dos mecanismos de ação das piperazinas permite compreender os efeitos fisiológicos e psicológicos evidentes após o consumo destas substâncias. A *mCPP* aumenta as concentrações extracelulares dos neurotransmissores (por exemplo: serotonina, dopamina e noradrenalina), sendo que este mecanismo de ação farmacológica ocorre tanto por inibição da recaptação do neurotransmissor, como por estimulação dos receptores pré-sinápticos. Ainda que se encontrem semelhanças no mecanismo de ação das piperazinas, entre si, e entre outras drogas de abuso, não obstante, existem algumas diferenças relacionadas com a magnitude dos seus efeitos nos sistemas serotoninérgico e dopaminérgico (ESCADA, 2007).

Após a administração da *mCPP*, relatam-se efeitos psicológicos de natureza subjetiva, sentimentos positivos, em particular uma sensação de bem-estar, empatia, euforia, comparáveis aos efeitos subjetivos positivos, e os efeitos estimulantes e alucinógenos da MDMA (TANCER; JOHANSON, 2001, 2003). O consumo de drogas recreativas tem por finalidade a diversão (KALANT, 2001) e são estes efeitos de euforia e sensações de bem-estar, efeitos subjetivos positivos, que o consumidor procura nas *party pills* (festas com o uso de comprimidos de fármacos estimulantes).

O mecanismo molecular de ação das piperazinas responsável pelo aumento de serotonina (5-HT) no Sistema Nervoso Central envolve a inibição da recaptação sináptica deste neurotransmissor pela *mCPP*, mecanismo análogo à ação farmacológica da MDMA (BANKSON; CUNNINGHAM, 2001; GOBBI *et al.*, 2002). No entanto, quando são comparados os efeitos da MDMA e das piperazinas, a primeira é mais potente e eficaz no que se refere à capacidade para estimular a liberação de 5-HT endógena (GOBBI *et al.*, 2002).

Os efeitos nos receptores serotoninérgicos têm principalmente propriedades agonistas não-seletivas, porém, efeitos antagonistas também são descritos. A *mCPP* tem afinidade pelos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₃ no cérebro de ratos, entretanto nos receptores 5-HT₂, a interação ocorre de modo mais potente (HAMIK; PEROUTKA, 1989; HOYER, 1989; KILPATRICK *et al.*, 1987). A *mCPP* é um agonista dos receptores 5-HT_{2C} em humanos (Thomas *et al.*, 1996). Em humanos, a *mCPP* ainda apresenta atividade antagonista para os receptores 5-HT_{2B} e 5-HT₇ (THOMAS *et al.*, 1996; WOOD *et al.*, 2000). Também se liga fortemente a receptores α -2, fracamente a α -1 e β -adrenérgicos e, de modo mais fraco, a receptores dopaminérgicos e colinérgicos (SMITH; SUCKOW, 1985; HAMIK; PEROUTKA, 1989).

Neste sentido a comparação neuroquímica entre *mCPP* e MDMA é extremamente relevante, uma vez que existe uma similaridade dos efeitos subjetivos produzidos por ambos os fármacos. Um estudo comparativo neuroquimicamente identificou que a inibição da recaptação de serotonina causada pela *mCPP* é potencialmente maior em relação à MDMA (GOBBI *et al.*, 2002), comprovando alguns dados prévios da literatura (Huang *et al.*, 1992; Baumann *et al.*, 2001). Além disso, também foi constatado que a indução da liberação do mesmo neurotransmissor é inferior à MDMA (GOBBI *et al.*, 2002).

Dentre as isoformas hepáticas do citocromo P450, a isoforma CYP 2D6 é responsável pela para-hidroxilação da *mCPP* na formação da OH-*mCPP* (ROTZINGER *et al.*, 1998). Uma ampla variedade de fármacos de diversas classes diferentes são substratos ou inibidores da enzima CYP 2D6 (ERESHEFSKY *et al.*, 1995; SHEN, 1995). A coadministração de fármacos que dão origem a *mCPP* como produto metabólito pode resultar em uma diminuição no metabolismo de ambos, com potencial tóxico ou outro efeito adverso. Nos substratos comuns da CYP 2D6 incluem-se os agentes cardiovasculares e psicoativos, que tem uma estreita faixa terapêutica, e a codeína, que não possui efeito analgésico, caso não seja convertida à morfina pela via CYP 2D6 (CHOLERTON *et al.*, 1992).

Considerando o alto potencial de interação medicamentosa com substratos ou inibidores da isoforma CYP 2D6, e a possível consequência fisiofarmacológica do aumento nos níveis da *mCPP*, deve-se ter precaução no momento em que são combinados fármacos inibidores ou substratos da CYP 2D6 com nefazodona, trazodona, *etoperidone* ou *mepiprazole* (ROTZINGER *et al.*, 1998). Uma dose única da *mCPP* em combinação com outros medicamentos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina ou com álcool pode induzir a uma síndrome serotoninérgica (KLAASSEN *et al.*, 1998).

Em estudos com voluntários que tinham ingerido comprimidos de “ecstasy”, quando na realidade se tratava da *mCPP* (de 17,5 a 52,5 mg), afirmaram ter sensação estimulante e alucinante, similar ao efeito produzido após a administração da MDMA (TANCER; JOHANSON, 2001). Em contraste à MDMA, não foram observados o aumento da pressão e da frequência cardíaca (STANASZEK; ZUBA, 2006).

Em animais e humanos, a *mCPP* provoca uma elevação dose-dependente do hormônio adrenocorticotrófico, cortisol, prolactina e um aumento na temperatura corporal (MULLEER *et al.*, 1986; KAHN *et al.*, 1990; KAHN; WETZLER, 1991; COWEN *et al.*, 1995). Estudos apontam ainda que a *mCPP* reduz a ingestão de alimentos e aumenta a ansiedade em animais (SAMANIN *et al.*, 1979; GIBSON *et al.*, 1994; KAHN; WETZLER, 1991) e humanos (MURPHY *et al.*, 1989; KRYSTAL *et al.*, 1993; WALSH *et al.*, 1994; COWEN *et al.*, 1995). Além disso, o uso da *mCPP* agrava os sintomas centrais de muitos transtornos psiquiátricos, como os sintomas positivos da esquizofrenia (KRYSTAL *et al.*, 1993) e sintomas de pânico em pacientes que já apresentavam síndrome do pânico (KAHN *et al.*, 1988; GERMINE *et al.*, 1994).

A administração intravenosa de *mCPP*, produziu grandes aumentos dose-dependentes de adrenalina, noradrenalina e dopamina no plasma de ratos conscientes (BAGDY *et al.*, 1988). Além dessa liberação de hormônios e de neurotransmissores, um estudo em ratos demonstrou que 2,5 mg.kg⁻¹ da *mCPP* elevam as médias da pressão arterial para até 20 mm de Hg e da frequência cardíaca para 40 batimentos por minuto (BAGDY *et al.*, 1989).

Entre os sinais clínicos de intoxicação da *mCPP* incluem-se: insônias, ansiedade, agitação, cefaléia, confusão, ataques de pânico, náuseas, vômitos, palpitações, distonia, estados convulsivos e retenção urinária, hipersensibilidade a luz e ao som, sonolência, constatando-se ainda, a presença de efeitos simpaticomiméticos (por exemplo, hipertensão e taquicardia) (GEE *et al.*, 2005; STANASZEK; ZUBA, 2006). O consumo de derivados piperazínicos é acompanhado de taquicardia, hipertonía e aumento de temperatura corporal, e em altas doses pode produzir alucinações, tremores e depressão do sistema respiratório (STANASZEK; ZUBA, 2006).

Pesquisadores descreveram um caso de intoxicação pela *mCPP* em que após a ingestão de três comprimidos multicoloridos, uma paciente desenvolveu ansiedade, agitação, sonolência, rubor facial, distúrbios visuais e taquicardia (KOVALEVA *et al.*, 2008). A concentração encontrada da *mCPP* foi de 320 ng.mL⁻¹ no plasma e 2.300 ng.mL⁻¹ na urina. Anfetamina (40 ng.mL⁻¹), benzoilecgonina (47 ng.mL⁻¹) e álcool (0,7 g.L⁻¹) também foram detectados no plasma. A concentração de *mCPP* no plasma foi de aproximadamente 6 vezes maior que a concentração usual medida em pacientes sob tratamento com trazodona (média de 56 ng.mL⁻¹). No entanto, este episódio demonstra a necessidade de precaução em relacionar os sintomas observados, com a utilização da *mCPP*, uma vez que a interação entre as drogas de abuso identificadas poderiam também ter desempenhado um papel fundamental (KOVALEVA *et al.*, 2008).

Em outro caso, uma mulher de 29 anos relatou ter consumido três comprimidos de “*arlequin*” e 30 minutos após a ingestão ela apresentou os seguintes sinais e sintomas: visão embaçada, ansiedade e hipertermia. Foi realizada a quantificação da *mCPP* na amostra de plasma e foi encontrada a concentração de 3,2 µg.mL⁻¹ (LECOMPTE *et al.*, 2006). Isto indica que podem ser encontradas elevadas concentrações do fármaco no plasma de indivíduos submetidos à administração de comprimidos com *mCPP*. Este achado corrobora os dados da

literatura que apontam a grande variabilidade das concentrações circulantes (CACCIA *et al.*, 1987; GIJSMAN *et al.*, 1998).

Como observado anteriormente, comprimidos apreendidos pela polícia continham, além da *mCPP*, a substância *pCPP*. Comparando os isômeros da clorofenilpiperazina, os isômeros *oCPP* e *pCPP*, não foi encontrado uso significativo como *probes* de receptores 5-HT (EMCDDA, 2007). Pesquisadores realizaram cálculos de mecanismos moleculares com várias piperazinas e mostraram que para a ligação ideal ao receptor 5-HT_{2C}, a piperazina e o anel fenil devem ser co-planares (VERDONK *et al.*, 1997). Além disso, a previsão era de que o isômero *oCPP*, ao contrário da *mCPP*, seria um antagonista deste receptor. Esta previsão foi posteriormente confirmada por estudos *in vitro* e *in vivo*, ratificando assim, que os efeitos produzidos pela *oCPP* são antagônicos ao da *mCPP*. Não existem medicamentos que contenham a *pCPP*, *oCPP* ou fragmentos de suas estruturas (EMCDDA, 2007).

2.4 Estudos do sono

Objeto de análise subjetiva, observativa e discursiva, o sono tem sido alvo de estudo há muitos anos. Na década de 1930, Loomis, Harvey e Hobart utilizaram o eletroencefalograma (EEG) para o estudo do sono em seres humanos e observaram que o sono se caracterizava por estágios distintos, os quais se alternavam espontaneamente durante o período noturno.

Em 1953, Aserinsky e Kleitman seguiram na pesquisa sobre o sono identificando os movimentos oculares rápidos (sono *REM*, do inglês *rapid eyes movement*) e posteriormente, Dement e Kleitman (1957) demonstraram que a atividade ocular rápida ocorria durante o período onírico do sono. Esta fase de sono *REM* foi então denominada por Jouvet, Michel e Courjon (1959) de sono paradoxal, após observar em gatos que o EEG era caracterizado por dessincronização cortical semelhante à da vigília, mas com presença da atonia muscular. Adota-se, pois, a denominação de sono de ondas lentas ou sono paradoxal para se referir aos estágios de sono em ratos, e sono *NREM* e *REM* como referência em seres humanos.

Atualmente o padrão de sono é bem estabelecido. A evolução dos potenciais eletroencefalográficos durante o sono reflete a existência de várias fases, as quais

se agrupam em dois estados distintos: Sono não-*REM* (*NREM*) ou de ondas lentas, caracterizado pela sincronização dos potenciais e sono *REM* ou paradoxal, caracterizado pelo predomínio de potenciais de baixa tensão e alta frequência.

O sono é considerado um estado comportamental ativo e complexo, constituído por alternância de estágios *REM* e *NREM*. Esse é caracterizado pela presença de ondas sincronizadas no EEG e pode ser dividido em estágios 1, 2 e 3, sendo o último equivalente ao sono de ondas lentas ou sono delta, enquanto aquele é caracterizado por ondas dessincronizadas e de baixa amplitude no EEG (RECHTSCHAFFEN; KALES, 1968; IBER *et al.*, 2007). É também uma função biológica ativamente regulada e organizada, a qual consiste de três processos: homeostático, determinado pela quantidade de sono e vigília; circadiano, que organiza as alternâncias entre sono e vigília durante as 24 horas do dia; ultradiano, que controla essa alternância entre os dois tipos de sono, *REM* e *NREM*. Porém, quando este padrão de ciclo vigília-sono torna-se alterado, alguns efeitos decorrentes podem surgir como a diminuição do nível de vigília e o prejuízo de atividades que requerem atenção, concentração, além dos efeitos psicológicos, como irritabilidade, tensão, depressão, ansiedade e confusão (KRIEGER, 2000).

Pode-se afirmar que o sono é um fenômeno biológico fundamental para a manutenção da saúde mental e emocional, além de ser essencial na manutenção de uma vida saudável (Everson *et al.*, 1989). Fisiologicamente, é considerado como um estado funcional, cíclico e reversível que está presente em todas as faixas etárias e na maioria das espécies animais. Possui algumas características comportamentais, como uma imobilidade relativa e o aumento do limiar de resposta aos estímulos externos.

De forma geral, o sono varia conforme a idade, maturação cerebral, tamanho do corpo e condição presa ou predador. Mas, em comum a todos os animais, o sono é marcado por um padrão de quiescência, repouso e redução cognitiva (TIMO-IARIA, 1985). As fases de sincronização/dessincronização alternam-se a intervalos que variam de espécie para espécie e dependem da quantidade total de sono. A duração dos ciclos possui uma relação direta com o tamanho do animal, ou seja, em animais menores os ciclos serão mais curtos. Por exemplo, a duração média de um ciclo no gato é de 45 minutos; no rato, 10 minutos; e no camundongo, 5 minutos (TIMO-IARIA, 1985).

Ratos e camundongos apresentam um sono polifásico e possui seu período de repouso concentrado durante o dia, havendo predomínio maior de sono durante as

três primeiras horas de claro, ou seja, período de maior concentração de ondas lentas (ROSENBERG; BERGMANN; RECHTSCHAFFEN, 1976; TRACHSEL, 1986) e, entre as 12 e 15 horas, maior predomínio de sono paradoxal (KLEINLOGEL, 1983). Esse breve despertar parece ser característico de animais naturalmente predados (roedores), ao passo que os predadores (homem, gato, cão) raramente despertam entre um ciclo e outro, apresentando um padrão de sono monofásico. Entretanto, breves períodos de vigília ou pelo menos de forte superficialização do sono (microdespertares) também ocorrem em seres humanos. É possível que no rato esses curtos períodos de vigília tenham por finalidade explorar olfativamente o ambiente, para identificar algum eventual predador presente nas redondezas.

Em média, os roedores dormem aproximadamente 62% do período claro e 33% do período escuro, sendo que, durante a vigília, os animais realizam suas atividades vitais e sociais (alimentação, procriação, interação social e exploração do ambiente). Somando-se os períodos de sono, verifica-se que os roedores dormem cerca de 50% das 24 horas, dividindo-se em sono leve (fases I e II), sono profundo (sono de ondas lentas, propriamente dito) e sono paradoxal (TIMO-IARIA *et al.*, 1970).

Estudo realizado por Timo-laria e colaboradores (1970) revelou a grande semelhança entre o sono do rato e do humano. O sono *NREM* humano, por exemplo, caracteriza-se pela presença de fusos e ondas delta, que também ocorrem nas áreas frontais do cérebro do rato. Comparando-se a porcentagem média de sono paradoxal observada no rato durante o tempo total de sono há similaridade àquela verificada em seres humanos no período de 8 horas de sono, isto é, de 18% (HOSHINO, 1972). Logo, é significativo avaliar a importância das consequências de diversas variáveis, ainda pouco estudadas, que possam afetar o sono, levando-se em conta a relevância de modelos animais e sua validação.

O sistema serotoninérgico também é conhecido por estar envolvido na regulação do ciclo vigília-sono (JOUVET, 1972; DATTA, 1997; BOUTREL *et al.*, 1999; MONTI; MONTI, 1999). Alguns trabalhos científicos indicam que a *mCPP* aumenta as concentrações extracelulares de neurotransmissores (principalmente serotonina, mas também dopamina), e esse mecanismo de ação ocorre tanto por estimulação de receptores pré-sinápticos e particularmente por promover uma inibição da recaptação dos mesmos (BANKSON; CUNNINGHAM, 2001; GOBBI *et al.*, 2002). Pesquisadores mostraram que a injeção de *mCPP* em ratos depressivos causou uma redução

significativa na duração total e no número de episódios de sono paradoxal enquanto houve o aumento do período inicial de latência do sono paradoxal em comparação com grupo veículo controle (MAVANJI *et al.*, 2002).

A privação de sono é uma das consequências da pressão exercida pela sociedade sobre os indivíduos, levando a repercussões nítidas na saúde e bem-estar. Em roedores, provoca alterações em vários aspectos do funcionamento comportamental, como memória (MOREIRA *et al.*, 2003), ansiedade (SUCHECKI *et al.*, 2002), atenção (GODOI *et al.*, 2005), comportamento sexual (ANDERSEN; TUFIK, 2002, 2006; ANDERSEN *et al.*, 2007), alterações hormonais (ANDERSEN *et al.*, 2005, 2007; ANTUNES *et al.*, 2006), assim como danos no sistema imunológico (EVERSON, 2005; PALMA *et al.*, 2006; RUIZ *et al.*, 2007).

A privação de sono é considerada um instrumento de estudo clássico e útil para elucidar as funções do sono, bem como permitir o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesse comportamento. Entretanto, estudos têm revelado dificuldades em determinar se as alterações fisiológicas observadas com o uso dessa metodologia são decorrentes da falta de sono ou da condição estressante a que o animal é submetido durante esse procedimento (VOGEL, 1975; VELAZQUEZ-MOCTEZUMA *et al.*, 1984; TUFIK *et al.*, 1995; PAPALE *et al.*, 2005). Entretanto, Apesar da privação de sono demonstrar um componente estressor intrínseco, estudos recentes revelam que esta interfere na resposta imunológica não somente como um estressor comum, mas também desencadeia uma resposta particular, que vai além de um efeito imunossupressor geral, por promover um aumento significativo da porcentagem de células NK (VELAZQUEZ-MOCTEZUMA *et al.*, 2004).

Na década de 90, estudos com enfoque imunológicos demonstraram que até mesmo alterações discretas no padrão de sono (privação de sono parcial durante a noite: 22:00 às 03:00) ocasionaram redução de granulócitos, linfócitos, e de células NK na circulação, além de prejudicaram a atividade dessas células (IRWIN *et al.*, 1996).

Um estudo recente em ratos mostrou que a restrição de sono por 21 dias é mais nociva que a privação de sono paradoxal por 96 horas, uma vez que há uma diminuição significativa do número total de linfócitos e leucócitos e aumento da quantidade de IgG (ZAGER *et al.*, 2007), indicando que a privação crônica é mais prejudicial ao sistema imunológico, causando um maior dano ao organismo. Além disso, o modelo de restrição de sono crônica por 21 dias resultaram em alterações

imunológicas significativas, apesar dos níveis de corticosterona terem permanecido inalterados (ZAGER *et al.*, 2007), demonstrando que o estresse inerente a esse modelo não desencadeou essas modificações, mas sim, a privação de sono propriamente dita.

Outros estudos têm demonstrado que em animais privados de sono paradoxal por 96 horas há uma diminuição das concentrações de testosterona e um expressivo aumento de prolactina, catecolaminas e glicocorticóides (ANDERSEN *et al.*, 2005). Recentemente, um estudo em humanos demonstrou que a privação de sono NREM diminui a tolerância para glicose e aumenta a liberação de insulina, aumentando assim, o risco de diabetes do tipo dois (TASALI *et al.*, 2008).

Aspectos Analíticos

3. ASPECTOS ANALÍTICOS

A análise de amostras biológicas líquidas (por exemplo, plasma, soro, sangue total), semi-sólidas (por exemplo, órgãos) ou sólidas (por exemplo, cabelo) por técnicas cromatográficas requer um pré-tratamento da amostra, devido à complexidade das matrizes envolvidas, e ao fato de compostos serem analisados em concentrações vestigiais (QUEIROZ, COLLINS; JARDIM, 2001; JONES, 2004). O objetivo final de qualquer pré-tratamento da amostra é a obtenção do composto de interesse na forma de extrato concentrado, que possibilite uma boa separação no sistema cromatográfico (ALMEIDA *et al.*, 2004), com seletividade e sensibilidade adequadas (VAN HOUT *et al.*, 2003).

3.1 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (do inglês, *liquid liquid extraction - LLE*) ou extração por solventes é uma técnica tradicional utilizada para separar, concentrar e purificar compostos orgânicos existentes numa fase líquida. Na *LLE*, estabelece-se o contato entre duas fases líquidas imiscíveis, e ocorre a transferência seletiva do analito da fase aquosa (amostra biológica) para a fase orgânica (solvente orgânico). O esquema do procedimento da *LLE* está representado na **Figura 5**. O coeficiente de partição do analito ou constante de distribuição (K_d), é descrito pela razão entre a concentração do analito na fase orgânica (C_{org}) e a concentração do mesmo composto na fase aquosa (C_{aqu}); a partição é atribuída em função das diferenças de solubilidade do analito entre as duas fases (ALMEIDA *et al.*, 2004), de acordo com a lei de Nernst ($K_d = C_{org}/C_{aqu}$).

O valor de K_d pode ser aumentado com a alteração de alguns parâmetros, a fim de se melhorar a eficiência da transferência da fase aquosa para a fase orgânica: ajuste do pH da amostra, para promover o estado molecular dos analitos, e adição de sais neutros, diminuindo a solubilidade dos compostos orgânicos na fase aquosa, devido à diminuição de moléculas de águas ao redor do analito. É importante a escolha de solventes fortes e com baixo ponto de ebulição; isso implica

em um processo eficiente e com tempo reduzido para realizar a extração e a posterior secagem sob fluxo de um gás inerte.

Figura 5. Esquema do procedimento de extração líquido-líquido.

Entretanto, a *LLE* também implica no elevado consumo de solventes orgânicos, dificuldade de automação e/ou a conexão “*on-line*” com os instrumentos analíticos e dificuldade experimental como a formação, frequente, de emulsões (JÖNSSON; MATHIASSEN, 2000; JÖNSSON *et al.*, 2000). Apesar disso, a maior vantagem da *LLE* é a seletividade, e, dependendo da escolha do solvente, o fármaco de interesse pode ser bem mais extraído que os componentes endógenos e seus metabólitos (MOREAU; SIQUEIRA, 2008).

3.2 Técnicas de separação e identificação

A escolha da técnica analítica a ser empregada na identificação e quantificação de um composto deve ser submetida a algumas questões fundamentais. Entre elas, o tipo de matriz da amostra a ser analisada, a concentração esperada, custo total do equipamento e individual de cada análise e a demanda de análise são alguns dos itens a serem considerados.

A cromatografia é um processo de separação dos compostos de uma amostra através de uma interação diferencial dos seus componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Os principais fatores que afetam uma separação eficiente são: características intrínsecas dos analitos e composição das fases móvel e estacionária. Os métodos cromatográficos, como a cromatografia em fase gasosa

(do inglês, *gas chromatography* - GC) e a cromatografia líquida (do inglês, *liquid chromatography* - LC), são os mais utilizados para a determinação de fármacos e drogas de abuso em fluidos biológicos e, em diversos outros tipos de matrizes. Para análise por espectrometria de massas (do inglês, *mass spectrometry* – MS), as amostras podem ser inseridas diretamente no espectrômetro de massas, ou através do acoplamento com uma técnica de separação cromatográfica. A possibilidade de automação aliada à rapidez das análises permite que grande número de amostras seja analisado em curto período de tempo.

Resumidamente, a análise por MS consiste na geração de íons moleculares por meio de um método de ionização apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas e identificados qualitativamente e ou quantitativamente. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004).

O processo de nebulização por *electrospray* consiste na transferência das moléculas na forma iônica provenientes de uma solução para a fase gasosa. É a técnica mais difundida para a ionização de analitos em sistemas de cromatografia líquida acoplados à espectrometria de massas. As principais vantagens proporcionadas por esta técnica de ionização são: evitar um eventual processo de derivatização dos compostos presentes na amostra e até favorecer a ionização de compostos polares e pouco voláteis.

O processo de nebulização na fonte de ionização por *electrospray* no espectrômetro de massas ocorre com o objetivo da formação de microgotículas eletricamente carregadas. A solução passa pela fonte de ionização onde três processos acontecem simultaneamente: submissão do conjunto à pressão atmosférica, favorecendo a formação dos íons e a sua injeção no espectrômetro de massas: nebulização com auxílio de um gás inerte, aplicação de um campo elétrico de alta tensão e evaporação do solvente presente na solução. A nebulização da amostra acontece normalmente com auxílio de um gás inerte. A aplicação do campo elétrico de alta tensão tem o objetivo de concentrar a densidade de cargas positivas na superfície da gotícula. Simultaneamente com a evaporação constante do solvente, a repulsão eletrostática aumenta e se torna mais intensa que a tensão superficial da gotícula, acarretando uma “explosão coulômbica”, que origina

novas gotículas ainda menores. Este processo se repete até que sejam formados íons livres e dessolvatados. O processo de ionização é finalizado com o encaminhamento destes íons para dentro de um contraeletrodo (BRUINS, 1998). O processo pode ser exemplificado no esquema da **Figura 6**.

Figura 6. Esquema do mecanismo de ionização da molécula através da *ESI* com evaporação do solvente solvatador e com a explosão coulômbica. Fonte: Adaptado de University of Bristol, 2004.

A técnica de identificação e quantificação por espectrometria de massas é considerada padrão ouro devido a sua sensibilidade e especificidade. Atualmente a aplicação está difundida em diversas áreas do conhecimento, como na aplicação para análise de biomoléculas de elevada massa molecular (FENN *et al.*, 1989), na área de alimentos com a determinação de resíduo de praguicidas em frutas e vegetais (LEHOTAY *et al.*, 2005), e na área forense com a quantificação de fármacos ilícitos e seus metabólitos em efluentes urbanos (CASTIGLIONI *et al.*, 2006).

O monitoramento de reações selecionadas consiste em selecionar uma reação de fragmentação, onde dentro de um analisador de massas específico (do tipo *ion trap*) são focalizadas massas pré-determinadas. Para isso é preciso ter conhecimento da relação massa/carga do analito e dos seus principais fragmentos. A especificidade na focalização apenas do íon precursor e dos fragmentos aumenta a sensibilidade para o monitoramento dos compostos de interesse. A esquematização do funcionamento do *ion trap*, mostrando a seleção do íon precursor, a colisão da molécula com elétrons e as relações de massa/carga definidas, sendo então detectadas estão representadas na **Figura 7**.

Figura 7. Ilustração do funcionamento do *ion trap* e o modo de detecção pelo monitoramento de reações selecionadas. As etapas ilustradas são: armazenamento dos analitos da amostra ionizados (A), ejeção dos íons não-precursores (B), fragmentação dos analitos (C), e detecção dos íons produtos pré-determinados.

Diferentes estratégias têm sido estudadas para detectar *mCPP* como metabólito de seu fármaco precursor, mas poucos trabalhos têm o seu foco na separação dos isômeros de posição da *CPP*. Dentre eles destaca-se o estudo conduzido por Schürenhamp e colaboradores (2010), onde desenvolveram a separação analítica dos isômeros da *CPP* através da cromatografia líquida utilizando colunas analíticas de alto custo para separação de isômeros de posição ou enantiômeros (coluna quiral). Ressalta-se a grande aplicabilidade das técnicas analíticas para a detecção e quantificação da *mCPP* em amostras biológicas. Por fim, destaca-se o alto percentual de separação por cromatografia líquida (73% dos estudos encontrados) e a alta aplicação do método de extração líquido-líquido (68% dos estudos encontrados). Alguns dos trabalhos empregando diferentes tipos de extração e detecção para *mCPP* e/ou com a presença dos seus isômeros estão compilados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Reunião dos dados encontrados na literatura científica para detecção de *mCPP* utilizando técnicas cromatográficas.

Amostra	Analito	Preparo de Amostra	Técnica Analítica	Referências
Comprimidos	<i>mCPP</i> , MDMA	Dissolução	GC-MS e LC-DAD	SANTANA, SOUZA; CUNHA, 2006
Comprimidos	<i>CPP</i>	Dissolução	LC-DAD e MS/MS	LANARO <i>et al.</i> , 2010
Comprimidos	<i>oCPP</i> , <i>mCPP</i> , <i>pCPP</i>	Dissolução	LC-DAD	SCHÜRENHAMP <i>et al.</i> , 2010
Comprimidos	BZP, <i>mCPP</i> , TFMPP	<i>LLE</i>	GC-MS	DICKSON <i>et al.</i> , 2010
Comprimidos, cápsulas e pó	<i>mCPP</i>	Dissolução	GC-MS e LC-DAD	STANASZEK; ZUBA, 2006
Cabelo (humano)	TZD, <i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	LC-MS	STANASZEK; LECHOWICZ, 2006
Cabelo (humano)	<i>mCPP</i> , TFMPP, MeOPP	<i>SPE</i>	GC-MS	BARROSO <i>et al.</i> , 2010
Urina, sangue total (humano)	BZP, TFMPP, <i>mCPP</i>	<i>SPE</i> , <i>SPME</i> , <i>LLE</i>	GC-MS	ESCADA, 2007
Urina, plasma (humano)	<i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	LC-UV, LC-DAD e GC-MS	STAACK <i>et al.</i> , 2007
Urina, plasma (humano)	<i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	LC-MS/MS	KOVALEVA <i>et al.</i> , 2008
Urina (rato)	<i>mCPP</i> e seus metabólitos	<i>LLE</i>	GC-MS	STAACK; MAURER, 2003

(Continuação da Tabela 2)

Amostra	Análito	Preparo de Amostra	Técnica Analítica	Referências
Plasma (humano)	TZD, <i>mCPP</i>	<i>SPE</i>	<i>LC-UV</i>	MARCOLINI <i>et al.</i> , 2008
Plasma (humano)	TZD, <i>mCPP</i>	<i>SPE</i>	<i>LC-UV</i> e <i>LC-ECD</i>	OTANI <i>et al.</i> , 2007
Plasma (humano)	TZD, <i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	<i>LC-MS</i>	PATEL <i>et al.</i> , 2008
Plasma (camundongo, rato, cachorro, humano)	EPD, <i>mCPP</i> , 5-(1-hidroxietil)EPD	<i>LLE</i>	<i>LC-UV</i>	HOLLAND; HEEBNER, 1991
Plasma (humano)	<i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	<i>LC-UV</i>	SUCKOW, COOPER; KAHN, 1990
Plasma (humano)	NEF, <i>mCPP</i> , PHN, OH-NEF	<i>LLE</i>	<i>LC-UV</i>	FRANC <i>et al.</i> , 1991
Plasma, eritrócitos (humanos)	TZD, <i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	<i>LC-UV</i>	VATASSERY <i>et al.</i> , 1997
Plasma, cérebro (rato)	TZD, <i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	<i>GC-NPD</i>	CACCIA <i>et al.</i> , 1981
Plasma, cérebro (rato)	TZD, <i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	<i>LC-UV</i>	MILLER; DEVANE, 1986
Plasma, cérebro (rato)	TZD, <i>oCPP</i> , <i>mCPP</i> , <i>pCPP</i>	<i>LLE</i>	<i>LC-ECD</i>	SMITH; SUCKOW, 1985
Plasma, cérebro (rato)	<i>mCPP</i>	<i>LLE</i>	<i>GC-MS</i>	ANDRIOLLO <i>et al.</i> , 1990

Objetivos

4. OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos comportamentais de ansiedade e atividade locomotora dos isômeros *oCPP*, *mCPP* e *pCPP* em camundongos privados de sono paradoxal.
- Desenvolver uma metodologia analítica de identificação e quantificação de *mCPP* por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (*LC-MS/MS*) em amostras de camundongos privados de sono paradoxal.
- Avaliar o efeito da *mCPP* sobre animais com rebote de sono paradoxal e o tempo necessário para que os resultados dos animais privados de sono e submetidos à administração da *mCPP*, retornassem a homeostasia.

Materiais e Métodos

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Experimentação animal

5.1.1 Animais

Na condução deste estudo foram utilizados 290 camundongos da linhagem *Swiss*, machos, com peso entre 30-50 gramas e com idade entre 10-14 semanas provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP). Os animais foram alojados (n=20/gaiola moradia) em caixas de polipropileno até o início do experimento (41 cm x 34 cm x 16,5 cm), contendo sabugo de milho, desidratado e desintegrado, como forração e com livre acesso à água limpa e ração. Antes de iniciar qualquer experimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação das condições ambientais durante uma semana no Departamento de Psicobiologia da UNIFESP. Os animais foram mantidos em períodos claro/escuro de 12:12 horas (início do período claro as 7:00 h), e temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Os animais foram pesados no dia anterior do experimento para efeito de cálculo da dose a ser administrada. Além disso, todos os grupos experimentais foram distribuídos aleatoriamente durante o período de experimentos. Desta forma, tentou-se evitar que fossem comparados grupos submetidos a testes comportamentais em horários distintos, uma vez que as alterações do ciclo circadiano interferem naturalmente nos resultados comportamentais. Os experimentos foram conduzidos na fase clara do ciclo, entre 08:00 e 13:00 horas.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de São Paulo (processo #1520/2010). Os procedimentos utilizados neste estudo estavam de acordo com o guia "*Animal models as ethical tools in biomedical research*" (ANDERSEN *et al.*, 2010a). Todos os esforços possíveis foram realizados para reduzir o número de animais e os resultados coletados foram obtidos causando o mínimo de dor e desconforto aos animais.

Os materiais necessários para a realização dos testes comportamentais deste projeto de pesquisa foram elaborados em colaboração com pesquisadores Prof. Dr. Roberto Frussa-Filho e Profa. Dra. Monica Levy Andersen, respectivamente

dos Departamentos de Farmacologia e de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

5.1.2 Drogas de abuso e a administração e grupos experimentais

As drogas de abuso a serem administradas foram padrões analíticos (pureza superior a 99%) de 1-(2-clorofenil)piperazina (*oCPP*), 1-(3-clorofenil)piperazina (*mCPP*) e 1-(4-clorofenil)piperazina (*pCPP*) (Alfa Aesar®, Estados Unidos) e preparados individualmente como estoques em soluções salinas estéreis (0,9% NaCl) na concentração de 1 mg.mL⁻¹. As soluções estoque foram usadas por até uma semana para preparação das doses individuais. Todas as substâncias, *oCPP*, *mCPP* e *pCPP* (três doses/grupo), foram administradas intraperitonealmente (ip) em volume constante de 0,01 mL.g⁻¹ de peso corporal do animal. Foi utilizado o fármaco, *mCPP* como referência para a determinação da dose e do tempo pós-administração, a fim de minimizar a quantidade de animais usados no estudo e em razão da literatura ter apontado este isômero como o de maior potência. Para obtenção das doses, estas sempre foram ajustadas seguindo a relação massa do fármaco/peso do animal.

5.1.3 Testes comportamentais

Para avaliar os comportamentos de ansiedade e atividade locomotora apresentada pelos camundongos foram utilizados sequencialmente os testes do Labirinto em Cruz Elevado e o Campo Aberto, respectivamente. Os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal de solução veículo (solução salina 0,9%) ou dos isômeros da *CPP*. A escolha para observação primeiramente do Labirinto em Cruz Elevado foi devido a sua análise objetivar a quantificação de um parâmetro mais sensível a interferências. Finalizado o primeiro teste comportamental, o animal foi colocado imediatamente no teste de locomoção (teste do Campo Aberto). Os camundongos têm o instinto inato da exploração ambiental e a administração de fármacos pode alterar significativamente este padrão comportamental. A administração de fármacos estimulantes podem aumentar o tempo de permanência e

maior frequência de entradas decorrentes da maior exploração (teste do Labirinto em Cruz Elevado) e aumentar o volume exploratório (teste do Campo Aberto). Por outro lado, fármacos inibitórios conduzem a respostas inferiores de permanência nos braços abertos e de frequências na movimentação no teste do Labirinto em Cruz Elevado e a menor quantidade de quadrantes percorridos em relação aos grupos controles (teste do Campo Aberto). Não foi utilizada a habituação prévia de qualquer grupo experimental aos testes comportamentais. Os equipamentos serão descritos abaixo.

5.1.3.1 Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado é um dos principais modelos usados no estudo da ansiedade. A aversividade aos braços abertos pode ser explicada por diferentes hipóteses. Uma dessas hipóteses é defendida por Treit e Fundytus (1989), onde eles propuseram que a impossibilidade do animal realizar a tigmotaxia nos braços abertos, justificando o estímulo aversivo associado aos braços abertos do labirinto. A tigmotaxia é a tendência comportamental do animal em permanecer com o corpo próximo a ou em contato com superfícies verticais e de se esquivarem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas, indicando maior insegurança em um ambiente novo. Acredita-se que pertença a uma categoria de reações ao medo, filogeneticamente determinadas (CHOLERIS *et al.*, 2001). Grossen e Kelly (1972), hipotetizam que isto seria uma estratégia comportamentalmente evoluída a fim de evitar o fato de estar exposto à predadores, especialmente aqueles aéreos.

A estrutura física do equipamento nos moldes em que é atualmente utilizado foi modificado e validado para ratos (Pellow *et al.*, 1985) e para camundongos (Lister *et al.*, 1987). Os índices primários de ansiedade no labirinto em cruz elevado eram a frequência de entradas e o total de tempo gasto nos braços abertos, ou seja, quanto mais intensa é a exploração do animal aos braços abertos, menor é a ansiedade do mesmo. Por fim, o método é um importante instrumento para avaliar a ansiedade, investigando aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (ANSELONI; BRANDÃO, 1997; CRUZ *et al.*, 1994; PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS; COLE, 1994).

O teste do Labirinto em Cruz Elevado seguiu as especificações desenvolvidas por Pellow e colaboradores em 1985, consistindo de dois braços abertos e opostos

(50 cm x 10 cm cada um), e outros dois braços opostos do mesmo tamanho e fechados com paredes laterais de 20 cm de altura. Os braços abertos e fechados se situam elevados 50 cm do solo e cruzam-se perpendicularmente formando uma cruz, delimitada por uma área central de 10 cm x 10 cm. Nas laterais dos braços foi fixada uma pequena borda de madeira (com 1 cm de altura) para servir de apoio do momento da exploração e consequentemente evitar a queda. A **Figura 8** ilustra o equipamento do teste do Labirinto em Cruz Elevado e suas dimensões.

Figura 8. Representação do Labirinto em Cruz Elevado e suas dimensões.

Neste teste, o animal foi colocado no centro com o focinho voltado para o braço fechado no início do teste, podendo optar por explorar qualquer dos braços. O comportamento ansioso do animal foi avaliado durante 300 s, através do percentual de tempo de permanência do animal no mesmo (tempo no braço aberto/tempo total do experimento), pois quando o animal apresenta maior tempo nos braços abertos (característica explorativa), menor é o seu nível de ansiedade. Além disso, foi avaliado também o percentual do número de entradas no braço aberto do labirinto (número de entradas no braço aberto/número total de entradas nos braços abertos e fechados), onde o aumento na frequência de entradas indica um aumento proporcional no nível de ansiedade do mesmo.

A área interna do labirinto foi limpa com solução hidroalcoólica a 5% após a observação de cada animal, com o objetivo de retirar odores do animal que anteriormente esteve ali e não mais concentrado para que o odor do álcool não

permaneça no ambiente do Campo Aberto de modo a interferir nos resultados dos testes do próximo animal.

5.1.3.2 Campo Aberto

O teste comportamental do Campo Aberto consiste em uma arena de polietileno branco opaco com formato cilíndrico, o corpo do cilindro tem 50 cm de altura e sua base é de madeira com 40 cm de diâmetro e 2 cm de altura, o chão da arena é subdividido em 19 regiões aproximadamente igualmente demarcadas por três circunferências concêntricas de raios diferentes (4, 12 e 20 cm) intersectadas por segmentos de retas radiais. Na **Figura 9** está representado o equipamento utilizado no teste do Campo Aberto e suas dimensões. O animal foi colocado individualmente no centro do campo e seu comportamento foi avaliado por 300 s.

Figura 9. Imagem de um equipamento de Campo Aberto.

Durante a observação foram registradas: frequência de locomoção (se localizar imaginariamente em um quadrante delimitado com todas as patas); a ação de levantar (apoiar-se somente nas patas traseiras, com o tronco perpendicular ao chão da arena) e a duração do reflexo de auto-limpeza (pelagem, genitália e focinho).

A frequência de locomoção e a ação de levantar (do inglês, *rearing*) estão relacionadas com a atividade motora e a submissão a qualquer intervenção (por exemplo, administração de um fármaco ou outro tipo) pode alterar o comportamento natural do animal. Por outro lado, a diminuição significativa da duração do reflexo de

auto-limpeza tem grande correlação com o aumento do nível de ansiedade quando em comparação ao grupo controle experimental.

Foram utilizados cronômetros para controle da duração de imobilidade, limpeza e do tempo total da exposição do animal ao teste comportamental em contagem regressiva. A parte interna da arena foi limpa com solução hidroalcoólica a 5% após a observação de cada animal.

5.1.4 Delineamentos experimentais

5.1.4.1 Determinação da melhor dosagem

Primeiramente foi realizada uma busca de estudos científicos que utilizassem a *mCPP* em algum procedimento do estudo. Nesta busca foi identificada a dose utilizada, a via de administração, a linhagem dos camundongos usados e a referência bibliográfica. Os resultados foram agrupados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Reunião dos dados bibliográficos de estudos científicos com a *mCPP*.

Dose	Via de administração	Linhagem (camundongos)	Referência bibliográfica
1 mg.Kg ⁻¹	Intraperitoneal	SV129 e C57BL/6J	Mongeau <i>et al.</i> , 2010
1 mg.Kg ⁻¹	Intraperitoneal	C57BL/6J	Moya <i>et al.</i> , 2011
1 mg.Kg ⁻¹	Intraperitoneal	Swiss albino	Rajkumar <i>et al.</i> , 2009
1-2 mg.Kg ⁻¹	Intraperitoneal	Charles River	Landry <i>et al.</i> , 2008
2 mg.Kg ⁻¹	Intraperitoneal	Bairdii e C57BL/6J	Korff <i>et al.</i> , 2008
2,5 mg.Kg ⁻¹	Subcutânea	C57/6	Huang <i>et al.</i> , 2010
1-10 mg.Kg ⁻¹	Intraperitoneal	Swiss Webster	Yarosh <i>et al.</i> , 2007

Foram avaliadas as dosagens de 1,0, 2,5 e 5,0 mg.kg⁻¹, visando resultados com diferença significativa em relação ao grupo controle (veículo). O tempo de pós-administração para submeter os animais aos testes comportamentais foram de 30 minutos. Os camundongos receberam a administração intraperitoneal de solução

veículo (salina 0,9% estéril; n=9) ou solução padrão *mCPP* nas doses 1,0 mg.kg⁻¹ (n=10), 2,5 mg.kg⁻¹ (n=10) ou 5,0 mg.kg⁻¹ (n=10). O desenho experimental está representado na **Figura 10**.

Figura 10. Desenho experimental para determinação da melhor dose de *mCPP*.

5.1.4.2 Determinação do melhor tempo pós-administração de *mCPP*

Também foram avaliados os tempos pós-administração do fármaco *mCPP* visando resultados com diferença significativa nos testes comportamentais em relação ao grupo controle. Os tempos avaliados foram: 5, 15, 30, 45 e 60 minutos. Os animais eram expostos ao Labirinto em Cruz Elevado e ao Campo Aberto durante 5 minutos em cada teste comportamental, respectivamente. Os camundongos foram distribuídos em sete grupos: solução veículo (n=10), 5 min/*mCPP* (n=9), 15 min/*mCPP* (n=7), 30 min/*mCPP* (n=12), 45 min/*mCPP* (n=8) e 60 min/*mCPP* (n=9). O grupo controle foi composto pelo agrupamento dos resultados de dois camundongos de cada tempo analisado que receberam a administração de solução veículo. A concentração da dose a ser administrada foi estipulada após os testes do tópico **5.6.4.1**. O desenho experimental está representado na **Figura 11**.

Figura 11. Desenho experimental para determinação do melhor tempo pós-administração de *mCPP*.

5.1.4.3 Método de privação de sono paradoxal e administração dos isômeros da CPP

A privação de sono paradoxal (PSP) foi conduzida como previamente descrita (SILVA *et al.*, 2004; ZAGER *et al.*, 2009). A PSP foi induzida colocando os animais dentro de um tanque com água (41 cm × 34 cm × 16,5 cm), contendo 10 plataformas de cimento com 3,5 cm de diâmetro, cercadas por água até um cm abaixo da superfície, por 24 ou 48 horas. Foi previamente comprovado em estudos anteriores que este protocolo de privação de sono suprime 95% da quantidade normal de sono paradoxal em camundongos (SILVA *et al.*, 2004). A **Figura 12** mostra camundongos durante o protocolo de privação de sono dentro de um tanque de PSP. Neste método, os animais são capazes de se mover dentro do tanque, pulando de uma plataforma para outra. Entretanto quando o animal dorme e entra na fase paradoxal do sono, ele cai na água, devido à atonia muscular, e retorna ao estado de vigília.

Alimentos e água foram disponíveis *ad libitum* através de uma grade de aço colocada em cima do tanque. A PSP era iniciada sempre no mesmo horário (09:00 horas). Dentro dos tanques foram colocados grupos de aproximadamente cinco camundongos. Os grupos controle foram mantidos em gaiolas contendo forragem de sabugo de milho desidratado. As gaiolas-moradia dos grupos controle foram mantidas na mesma sala que os animais submetidos à PSP.

Figura 12. Camundongos colocados em plataformas dentro de um tanque próprio para privação de sono paradoxal.

Os animais foram distribuídos em grupos e submetidos à PSP pelo período de 24, 48 horas ou grupo controle. Após este período foram administradas solução veículo ou cada isômero da *CPP* na concentração analisada no teste do item **5.1.4.1**. Após o tempo da administração do fármaco, determinado no item **5.1.4.2**, o animal foi submetido à mesma sequência dos testes comportamentais anteriores.

Neste experimento foram avaliados animais privados e controles associado a um dos três isômeros da *CPP* ou solução veículo (salina 0,9% estéril). Os camundongos foram distribuídos em 12 grupos experimentais: controle, CTRL/*oCPP* (n=7), CTRL/*mCPP* (n=8), CTRL/*pCPP* (n=8), CTRL/veículo (n=8) e privados de sono paradoxal, PSD24h/*oCPP* (n=7), PSP24h/*mCPP* (n=9), PSP24h/*pCPP* (n=7), PSP24h/veículo (n=8), PSP48h/*oCPP* (n=8), PSP48h/*mCPP* (n=7), PSP48h/*pCPP* (n=8) e PSP48h/veículo (n=8). O desenho experimental está exemplificado na **Figura 13**.

Figura 13. Desenho experimental da avaliação dos isômeros da *CPP* associados ou não à privação de sono paradoxal.

5.1.4.4 Avaliação do efeito do sono rebote de sono paradoxal

Este experimento consistia em aplicar a privação de sono paradoxal nos camundongos pelo período de 24 horas e, no fim deste período realizar a administração da *mCPP* e colocá-los em suas gaiolas moradia por 24 ou 48 horas. O objetivo foi avaliar o período mínimo para que os efeitos da PSP e da associação com a administração do fármaco não resultassem em diferenças comportamentais significativas entre os grupos, nos parâmetros de ansiedade e/ou atividade locomotora. O desenho experimental está exemplificado na **Figura 14**.

Figura 14. Desenho experimental da avaliação do rebote de sono.

Foi usado o tempo de PSP de 24 horas em razão das alterações comportamentais já observados com este curto período de privação de sono. No rebote de sono paradoxal, o organismo do animal tenta compensar a fase do sono perdida e por isso, este animal tem várias ocorrências de sono paradoxal durante o seu período de sono (efeito rebote). Após a administração do fármaco, os animais foram devolvidos às suas gaiolas moradia anteriores e os comportamentos foram

observados após um ou dois dias, em que estes poderiam dormir e ter rebote da fase recuperadora e essencial do sono (fase paradoxal). Para a realização deste experimento os animais foram distribuídos em oito grupos experimentais, para que houvesse grupos de controle experimental dos efeitos isolados da condição de sono e do efeito exclusivo do fármaco. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: controle, CTRL24h/veículo (N=6), CTRL24h/*mCPP* (N=6), CTRL48h/veículo (N=5), CTRL48h/*mCPP* (N=5), e rebote de sono paradoxal, RBT24h/veículo (N=5), RBT24h/*mCPP* (N=5), RBT48h/veículo (N=5) e RBT48h/*mCPP* (N=5).

5.1.5 Eutanásia

No dia do teste, os animais receberam uma injeção da respectiva droga de abuso ou veículo e depois foram submetidos ao teste comportamental. Finalizado o teste comportamental, os sujeitos foram eutanasiados por decapitação e coletadas as amostras de plasma. As amostras plasmáticas foram acondicionadas em tubos limpos de polipropileno e congelados imediatamente em gelo seco após a eutanásia. Posteriormente os tubos com as amostras foram armazenados em um congelador a -80°C.

5.1.6 Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio de teste estatístico ANOVA através do Software IBM® SPSS® Statistics (versão 19.0.0.). Quando apropriado os resultados eram seguidos do teste *post hoc* de Tukey, com o objetivo de ser mais rigoroso, obter a correlação entre os grupos e apresentar o nível de significância entre os mesmos. Os dados foram representados pela média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância considerado foi 5% ($p < 0,05$). Os resultados de probabilidade (p), tamanho do efeito (η^2 parcial) e poder observado são parâmetros estatísticos que em conjunto corroboram na ratificação do efeito do tratamento aplicado e a sua magnitude.

O tamanho do efeito ou *eta* quadrado (η^2) parcial é definido como grau de magnitude em que o fenômeno está presente na população (COHEN, 1988). Quanto

maior for o valor do tamanho do efeito, maior será a manifestação do fenômeno avaliado na população. Para interpretar os números resultantes do tamanho do efeito, a comunidade científica em geral usam o guia geral desenvolvido por Cohen:

- ❖ Menor que 0,1 = efeito trivial;
- ❖ 0,1 – 0,3 = efeito pequeno;
- ❖ 0,3 – 0,5 = efeito moderado;
- ❖ Maior que 0,5 = efeito intenso.

Em um teste experimental existem duas hipóteses avaliadas, a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_a). Na H_0 , hipotetiza-se que os resultados do grupo experimental avaliado não apresentam diferenças comparativamente com o grupo controle. Contrariamente está a H_a , que hipotetiza a confirmação de que os resultados do grupo experimental avaliado apresentam diferenças significativas em comparação com o grupo controle.

O erro do Tipo I rejeita a hipótese nula quando ela é realmente verdadeira (probabilidade = α). A característica deste tipo de erro é a afirmação da existência de uma diferença sistemática, quando na realidade esta diferença não existe. Por outro lado, o erro do Tipo II aceita a hipótese nula quando ela é na prática falsa (probabilidade = β). O problema relacionado com o erro do Tipo II é a afirmação do pesquisador da não-existência de uma diferença sistemática entre os grupos experimentais testados, quando na realidade esta diferença existe.

Obviamente é desejável a redução ao mínimo das probabilidades α e β dos dois tipos de erros. Porém, a diminuição de se ter um erro implica consequentemente no aumento de ter outro erro. Em geral, escolhe-se pela diminuição do erro Tipo I, que é quando se rejeita a possibilidade da existência real da hipótese nula e quando ela de fato existe, ou seja, quando se afirmam diferenças entre os grupos experimentais e na prática a diferença não existe. A redução simultânea dos erros poderá ser alcançada pelo aumento do tamanho da amostra. Para um teste de hipóteses, determina-se a probabilidade máxima de aceitar o erro Tipo I. Essa probabilidade máxima é chamada de nível de significância, e pode ser estipulada de acordo com o pesquisador. O valor da probabilidade de se obter o efeito observado, dado que a hipótese nula é verdadeira, é chamado de valor de “p”. Se o valor do “p” for menor que o nível de significância estipulado, assume-se o erro

Tipo I e aceita a hipótese alternativa do estudo. Ao contrário, se o valor do “p” for maior, assume-se o erro Tipo II e se aceita a hipótese nula (OBID, 2007). O teste de hipóteses está exemplificado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Teste de hipótese e as suas possibilidades experimentais.

Decisão	H ₀ VERDADEIRA	H ₀ FALSA
Aceitar H₀	Decisão correta (Probabilidade = $1 - \alpha$)	Erro do tipo II (Probabilidade = β)
Rejeitar H₀	Erro do tipo I (Probabilidade = α)	Decisão correta (Probabilidade = $1 - \beta$)

O poder estatístico de um estudo experimental pode ser definido como a habilidade do teste em detectar o efeito de probabilidade da existência real da diferença de efeito entre os grupos experimental e controle, quando ela realmente existe. O poder estatístico é influenciado por quatro principais fatores: a natureza do teste estatístico, o nível de significância estatística adotada, o tamanho da amostra e a diferença esperada no efeito dos dois tratamentos. Em outras palavras, o poder observado é a probabilidade em rejeitar a hipótese nula (e assim, evitar o erro do Tipo II). Recomenda-se a aceitação de resultados com poder observado maior que 0,8, ou seja, espera-se uma probabilidade maior a 80% em encontrar uma diferença estatisticamente significativa.

5.2 Procedimentos para análise por LC-MS/MS

5.2.1 Condições cromatográficas e espectrométricas

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) modelo FinniganTM SurveyorTM PLUS (Thermo Electron Corporation®, San Jose/CA, Estados Unidos) foi utilizado acoplado ao equipamento de espectrometria de massas utilizado no estudo é um *ion trap* de três dimensões LCQ DECA XP MAX (Thermo Electron Corporation®, San Jose/CA, Estados Unidos). A fase móvel era composta pela fase A (água deionizada + 0,1% ácido

fórmico) e fase B (acetonitrila + 0,1% ácido fórmico). Foi utilizado o modo de eluição isocrático, 75% A e 25% B, mantida a proporção durante toda a corrida analítica.

O volume de injeção foi de 10 μL , a vazão da coluna cromatográfica foi de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, mas por meio de um divisor de fluxo eram encaminhados somente 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ao espectrômetro de massas. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Zorbax Eclipse XDB-C18 com dimensões 4,6 mm x 150 mm e 5 μm de diâmetro de partícula (Agilent Corporation®, Santa Clara/MA, Estados Unidos). As temperaturas do forno de colunas e da bandeja de amostras eram de 30°C e 20°C, respectivamente.

O espectrômetro de massas utilizado no estudo é do tipo *ion-trap* de três dimensões LCQ DECA XP MAX (Thermo Electron Corporation®, Waltham/MA, Estados Unidos) equipado com uma interface de ionização por *electrospray* (do inglês, *electrospray ionization* - *ESI*). O instrumento foi controlado pelo computador através do software *Xcalibur*, fornecido pelo fabricante. A tensão do spray no sistema *MS* era de exatamente 5 kV no modo positivo. A vazão de gás de nebulização foi de 30 (unidades arbitrárias). A temperatura da linha de transferência da fonte de ionização para o interior do equipamento foi de 275°C. A energia de colisão utilizada para fragmentação da molécula alvo foi de 34 eV e a temperatura de dessolvatação foi de 100°C. Para a detecção das *CPP* no espectrômetro de massas, foi usado o monitoramento de reações selecionadas (do inglês *selected reaction monitoring* - *SRM*) na detecção por modo contínuo (sem segmentação) com apenas um evento detectando os fragmentos 154 e 119 (197 $\rightarrow$ 154; 197 $\rightarrow$ 119).

5.2.2 Soluções-padrão

Padrões analíticos (pureza superior a 99%) de 1-(2-clorofenil)piperazina (*oCPP*), 1-(3-clorofenil)piperazina (*mCPP*) e 1-(4-clorofenil)piperazina (*pCPP*) (Alfa Aesar, Ward Hill/MA, Estados Unidos) foram pelo Prof. MsC. Rafael Lanaro (Centro de Controle de Intoxicações), Universidade Estadual de Campinas (CCI-UNICAMP). A partir dos padrões foram preparadas soluções estoque a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em água deionizada. Nas corridas cromatográficas (*LC-MS/MS*) foram utilizadas concentrações das soluções padrões de até 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

5.2.3 Escolha do solvente

Foi realizado um estudo comparativo entre os seguintes solventes extratores: Acetato de etila, hexano e MTBE. A amostra foi enriquecida com *mCPP* a 100 ng.mL⁻¹, as injeções foram realizadas em quintuplicata e o resultado foi estimado em percentual médio de recuperação $\pm$ desvio padrão. As amostras de plasma foram divididas em dois grupos: o primeiro em que o analito foi submetido a todo o processo de extração, juntamente com o padrão interno; e o segundo, que apenas o padrão interno foi submetido ao processo de extração, enquanto que o analito seria adicionado posteriormente à extração, na forma de solução. Para determinação do percentual de recuperação foi dividido o valor da concentração média obtida pós-extração pelas amostras adicionadas após o processo de secagem. A concentração da amostra que passou pelo processo extrativo e aquela que foi pipetada posteriormente à extração eram de 100 ng.mL⁻¹.

5.2.4 Procedimentos de extração

As amostras de plasma referência negativa foram adquiridas a partir dos camundongos que receberam solução veículo nos experimentos comportamentais deste estudo. Não foi realizado um estudo de seletividade para fármacos como dapiprazol, nefazodona, etoperidona, trazodona e mepiprazol, que quando metabolizados dão origem a isômeros da *CPP*, pois o objetivo desta validação foi avaliar apenas as amostras provenientes de animais submetidos aos experimentos de privação de sono.

Na validação das amostras de plasma (referência negativa), foram transferidos 200 μ L do material biológico, enriquecidos com 50 μ L de solução aquosa padrão interno *oCPP* (solução a 500 ng.mL⁻¹) para tubos com capacidade para 2 mL. Os tubos continham 550 mg ou 3 unidades de pérolas de cerâmica com 2,8 mm de diâmetro (MO-BIO Laboratories®, Carlsbad/CA, Estados Unidos). Foram adicionados 300 mg de cloreto de sódio e 50 μ L de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹. Por fim, foram adicionados 1.000 μ L do solvente metil terc-butil éter (MTBE). Após homogeneização 30 s em um homogeneizador de tecidos (Precellys 24®, Stretton

Scientific[®], Stretton/DE, Reino Unido), em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.500 rpm, sob a temperatura de 4°C. Da fase orgânica obtida, tomaram-se 800 µL que foram transferidos diretamente para tubos com capacidade de 2 mL e evaporados à secura sob fluxo de nitrogênio a temperatura ambiente. Os resíduos foram retomados com 200 µL de fase móvel, homogeneizados em vórtex por 5 minutos e transferidos diretamente para frascos âmbar que foram vedados por septo de silicone e tampa de rosca, adequado para o amostrador automático do cromatógrafo. Desta forma não houve fator de pré-concentração, sendo que o volume inicial de amostra e o volume final ressuspendido eram os mesmos. Este procedimento de extração está ilustrado na **Figura 15**.

As amostras referentes aos controles de qualidade foram obtidas a partir de amostras de plasma branco (referência negativa) adicionadas do composto de interesse (*mCPP*) nas concentrações determinadas de 20, 500 e 2000 ng.mL⁻¹ correspondendo aos controles de qualidade 1 (CQ1), 2 (CQ2) e 3 (CQ3), respectivamente.

Figura 15. Fluxograma do procedimento para extração do *mCPP* em plasma.

O presente método analítico apresenta vantagens como o uso de NaCl como facilitador de extração através do procedimento de salting-out, onde sais neutros são adicionados com o objetivo de solvatar as moléculas de água e deixar os analitos mais expostos quando em contato com o solvente extrator. Além disso, foi utilizado o Precellys 24[®] que favoreceu em uma homogeneização e extração mais estável e eficiente. Este equipamento para extração é utilizado frequentemente em laboratórios biomoleculares para causar a lise celular e em seguida extraído o DNA. Dessa forma é extraída pelo solvente orgânico a maior parte do fármaco presente na forma livre no plasma.

5.3 Validação analítica

O procedimento para validação analítica foi baseado no guia da ANVISA para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, tendo como parâmetros os seguintes itens: linearidade, limite de quantificação, precisão intra-ensaio e interensaio e recuperação.

5.3.1 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RIBANI *et al.*, 2004). O estudo de linearidade foi realizado pela análise da amostra de plasma dopada submetida ao método em triplicata nas seguintes concentrações de *mCPP*: 20, 100, 500, 1.000 e 2000 ng.mL⁻¹.

5.3.2 Limite de quantificação

Para determinação do limite de quantificação foi empregado o método empírico que consiste em analisar diversas amostras plasmáticas (referência negativa) adicionados de quantidades decrescentes do analito em questão (AMBRUSTER *et al.*, 1994). De acordo com a ANVISA, a qualidade da curva de calibração é garantida quando no ponto de menor concentração quantificado pelo método analítico não resulte em um coeficiente de variação superior a 15%.

5.3.3 Precisão intra-ensaio e interensaio

A precisão intra-ensaio foi através da determinação do coeficiente de variação do método (% CV). O estudo utilizando o plasma para a avaliação da precisão intra-ensaio contemplou as seguintes concentrações: 20, 500 e 2000 ng.mL⁻¹. As análises foram realizadas em quatro replicatas para cada concentração.

A determinação da precisão interensaio foi analisada em três dias diferentes, sendo três replicatas de amostras plasmáticas enriquecidas e com padrão interno e *mCPP* nas concentrações dos três controles de qualidade citados no **item 5.2.3**.

5.3.4 Recuperação

Para o estudo de recuperação foram utilizadas amostras referência negativa enriquecidas da *mCPP* nas concentrações de 20, 500 e 2000 ng.mL⁻¹, chamados de controles de qualidade 1, 2 e 3, respectivamente. As amostras de plasma foram divididas em dois grupos: o primeiro em que o analito seria submetido a todo o processo de extração, juntamente com o padrão interno; e o segundo, que apenas o padrão interno seria submetido ao processo de extração, enquanto que o analito seria adicionado posteriormente à extração, na forma de solução. A concentração utilizada para o padrão interno foi 500 ng.mL⁻¹. Foram realizadas quadruplicatas para a análise de cada solvente extrator e a duplicata de cada grupo de ressuspendido com solução

padrão. A recuperação absoluta foi avaliada pela área relativa média obtida no primeiro grupo em relação à área relativa média obtida no segundo.

5.3.5 Quantificação das amostras

Depois de finalizado o método bioanalítico para a quantificação de *mCPP*, foram quantificadas amostras de camundongos submetidos a administração intraperitoneal de *mCPP* após alguns grupos experimentais terem sido privados de sono paradoxal por 24 ou 48 horas. Foram quantificadas apenas as amostras de animais que receberam a administração intraperitoneal de *mCPP*, em razão da sua potência e do uso ilícito como droga de abuso.

Nos casos que as amostras apresentassem concentrações fora do intervalo dinâmico da curva analítica, o critério usado foi realizar a diluição com solução da fase móvel na amostra ressuspensa até que ela estivesse adequada dentro do intervalo dinâmico do método (CAUSON, 1997). Vale ressaltar que os animais foram imediatamente eutanaziados após a avaliação dos testes comportamentais, ou seja, houve um intervalo de tempo muito pequeno entre o final do teste do campo aberto e a eutanásia para coleta do plasma e dos órgãos.

Resultados e Discussão

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Estudos experimentais

O estudo da escolha da dose e do tempo pós-administração foi realizado utilizando o isômero *mCPP*, em razão deste isômero possuir propriedades agonísticas (receptor 5-HT_{2C}) e simultaneamente agonísticas com o receptor 5-HT_{2A} e potência maior em relação aos seus isômeros de posição (EMCDDA, 2007). Depois destes parâmetros definidos, o estudo se aprofundou na associação dos isômeros da *CPP* com a PSP, como também os efeitos da *mCPP* no rebote de sono paradoxal.

6.1.1 Escolha da dose

Primeiramente foi realizada uma busca na literatura sobre a concentração da dose, animal e a via de administração dos estudos com *mCPP*. Os trabalhos que utilizavam apenas camundongos em seus estudos trabalhavam com a faixa de solução injetada intraperitonealmente de 1 até 10 mg.mL⁻¹ (**Tabela 3**). Utilizou-se a menor concentração que atingisse o nível de significância desejado. A **Figura 16** apresenta os resultados do tempo de permanência do animal do braço aberto do teste do Labirinto em Cruz Elevado. Os valores das médias e desvio padrão das médias dos grupos foram: 31,9 ± 4,7 (“veículo”); 31,6 ± 2,7 (“1,0 mg.kg⁻¹”); 24,1 ± 3,3 (“2,5 mg.kg⁻¹”) e 29,52 ± 4,4 (“5,0 mg.kg⁻¹”). Os resultados estatísticos desta avaliação não apresentaram diferenças significativas [$F_{(3,35)}=806$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,06 e poder observado=0,21].

Figura 16. Parâmetro do percentual do tempo de permanência no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para avaliar o efeito da dose administrada. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais após 30 minutos da administração do fármaco/veículo. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 9-10 animais/grupo. Na análise da variância (ANOVA), seguido pelo *post hoc* de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Ainda na avaliação realizada no Labirinto em Cruz Elevado foi analisado o percentual de frequência de entradas nos braços abertos [$F_{(3,35)}=542$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,05 e poder observado=0,15]. O resultado da média e desvio padrão do grupo “veículo” foi igual a $38,4 \pm 2,2$; os grupos que receberam as doses apresentaram os seguintes resultados: $37,1 \pm 3,0$ (“1,0 mg.kg⁻¹”); $35,0 \pm 3,1$ (“2,5 mg.kg⁻¹”) e $32,2 \pm 4,8$ (“5,0 mg.kg⁻¹”). No percentual da frequência de entradas no braço aberto (**Figura 17**), houve uma leve tendência de uma diminuição nas médias, mas estatisticamente os resultados não apresentaram diferenças em comparação com o grupo “veículo”.

Figura 17. Parâmetro do percentual de entradas no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para avaliar o efeito da dose administrada. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais após 30 minutos da administração do fármaco/veículo. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 9-10 animais/grupo. Na ANOVA seguida pelo *post hoc* de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

A **Figura 18** mostra os resultados da avaliação de locomoção total através da quantificação de quadrantes centrais e periféricos, percorridos pelo animal no teste do Campo Aberto. A análise de variância através da ANOVA resultou em $F_{(3,35)}=137$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,01 e poder observado=0,07. Os valores de média e do erro padrão de cada grupo experimental estão relacionados a seguir: “veículo” ($94,4 \pm 11,2$); “1,0 mg.kg⁻¹” ($87,4 \pm 8,3$); “2,5 mg.kg⁻¹” ($92,5 \pm 8,8$) e “5,0 mg.kg⁻¹” ($88,3 \pm 5,4$). Observou-se que estatisticamente os grupos experimentais que não expressaram diferenças significativas.

Figura 18. Parâmetro da quantidade de quadrantes percorridos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito da dose administrada. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais após 30 minutos da administração do fármaco/veículo. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 9-10 animais/grupo. Na ANOVA seguida pelo *post hoc* de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Comparando o grupo veículo com as demais concentrações (**Figura 19**), observou-se que na dosagem de “5,0 mg.kg⁻¹” foi a que proporcionou uma média menor de levantares e os resultados estatísticos da ANOVA indicaram um valor de $F_{(3,35)}=3199$; $p<0,05$; η^2 parcial=0,22 e poder observado=0,69. As médias e seus respectivos valores de desvio padrão estão descritos a seguir: “veículo” ($27,0 \pm 5,4$); “1,0 mg.kg⁻¹” ($19,4 \pm 3,3$); “2,5 mg.kg⁻¹” ($13,4 \pm 2,5$) e “5,0 mg.kg⁻¹” ($12,0 \pm 2,8$). Após o teste de *post hoc* de Tukey, observa-se um aumento do valor de significância atingido com o aumento da concentração administrada. A concentração de “2,5 mg.kg⁻¹” atinge valores desejados de significância ($p<0,05$) e a concentração de “5,0 mg.kg⁻¹” apresenta resultados ainda mais significativos ($p<0,01$). Dessa forma, os grupos que receberam a administração intraperitoneal de *mCPP* nas doses de 2,5 e 5,0 mg.kg⁻¹ demonstraram menor atividade motora e exploratória do ambiente novo.

Figura 19. Parâmetro da quantidade de levantares produzido pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito da dose administrada. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais após 30 minutos da administração do fármaco/veículo. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 9-10 animais/grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

O último parâmetro do Campo Aberto avaliado no experimento para definição da dose foi referente ao tempo de reflexo de auto-limpeza (**Figura 20**). Os resultados da análise estatística resultaram em um $F_{(3,35)}=2628$; $p > 0,05$; η^2 parcial=0,18 e poder observado=0,59. Os valores individuais de cada grupo experimental foram: $32,9 \pm 8,5$ (“veículo”); $28,5 \pm 8,3$ (“1,0 mg.kg⁻¹”); $12,4 \pm 4,2$ (“2,5 mg.kg⁻¹”) e $11,7 \pm 2,7$ (“5,0 mg.kg⁻¹”). Os valores dos grupos “2,5 mg.kg⁻¹” e “5,0 mg.kg⁻¹” foram igualmente significativos em relação ao grupo “veículo” ($p < 0,05$), apresentando assim uma indicação destes grupos experimentais.

Figura 20. Parâmetro do tempo de reflexo de auto-limpeza produzido pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito da dose administrada. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais após 30 minutos da administração do fármaco/veículo. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 9-10 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Após as análises estatísticas dos resultados para escolha da dose administrada com efeitos mais significativos, os principais resultados foram agrupados na **Tabela 5**. Diante dos resultados significativos obtidos no teste *post hoc* de Tukey para a quantidade de levantares e do reflexo de auto-limpeza, determinou-se que a dose de $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ foi capaz de apresentar uma significância maior em relação a outros grupos experimentais. Por este motivo, esta concentração foi utilizada como referência para os seguintes experimentos deste estudo.

Tabela 5. Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento para definição da dose.

Parâmetro	F	p	η^2 parcial	Poder observado
Permanência no braço aberto (%)	806	0,499	0,065	0,206
Entradas no braço aberto (%)	542	0,657	0,044	0,150
Quadrantes percorridos (n)	137	0,937	0,012	0,073
Levantares (n)	3199	0,035	0,215	0,688
Reflexo de auto-limpeza (s)	2628	0,066	0,184	0,593

Dados: F (Graus de liberdade, Resíduo) = $F_{(3,35)}$.

A definição da dose em $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ foi usada uma vez que foi a concentração encontrada nos trabalhos da literatura (**Tabela 3**) e que nos relatos de casos foi observado a ingestão de três comprimidos (KOVALEVA et al., 2008; LECOMPTE et al., 2007). A definição da concentração da dose é um parâmetro discutível, uma vez que a extrapolação para um peso médio do ser humano (70 kg) acarretaria em uma quantidade de 350 mg nos comprimidos. A maior quantidade encontrada nos comprimidos foi de 80 mg (EMCDDA, 2007), mas vale ressaltar a ingestão de múltiplos comprimidos a fim de obter maiores efeitos de natureza subjetiva positiva.

A **Tabela 6** reúne os resultados do experimento para obtenção da concentração a ser utilizada no estudo de privação de sono.

Tabela 6. Reunião dos dados referentes ao experimento para definição da dose, com a identificação do grupo experimental observado em relação ao grupo controle (veículo).

Fármaco	Dose	T-LCE	E-LCE	Q-CA	L-CA	A-CA
<i>mCPP</i>	$1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$	—	—	—	—	—
	$2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$	—	—	—	↓	↓
	$5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$	—	—	—	↓↓	↓

Legenda:

↓ ou ↑ = Significância superior a 95% ($p < 0,05$);

↓↓ ou ↑↑ = Significância superior a 99% ($p < 0,01$).

6.1.2 Escolha do tempo pós-administração

A definição do tempo pós-administração foi avaliado indiretamente por meio da identificação do pico de efeito comportamental. Este tipo de análise é válida para reconhecimento do pico de concentração do fármaco na corrente sanguínea, haja vista que o composto atravessa a barreira hematoencefálica e atua no sistema nervoso central. A **Figura 21** apresenta os resultados do teste do Labirinto em Cruz Elevado no parâmetro do percentual de tempo de permanência do animal no braço aberto. Houve uma diminuição das médias, com pico de efeito ansiogênico observado após 15 minutos da administração da *mCPP*.

Figura 21. Parâmetro do percentual do tempo de permanência no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para determinar o tempo pós-administração do fármaco para exposição comportamental. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 7-10 animais/grupo. * $p < 0.05$ comparado ao grupo veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Os resultados individuais de cada grupo experimental estão descritos a seguir: grupo “veículo” ($34,2 \pm 8,7$); “5 min *mCPP*” ($25,6 \pm 11,4$); “15 min *mCPP*” ($16,1 \pm 5,3$); “30 min *mCPP*” ($35,6 \pm 14,7$); “45 min *mCPP*” ($33,0 \pm 13,4$); “60 min *mCPP*” ($35,8 \pm 10,5$). No teste estatístico da ANOVA obteve-se um valor significativo dos resultados [$F_{(5,49)}=3280$; $p < 0,05$; η^2 parcial=0,25 e poder observado=0,86]. Nos primeiros 5 minutos não ficaram evidentes a diferenciação, que pode estar relacionada com o fato do fármaco ainda não ter atingido o seu pico de concentração. Após 30 minutos, os resultados comportamentais não apresentam diferenças entre os grupos veículo e fármaco, sendo indicativo de uma provável metabolização do fármaco administrado.

A maior permanência no braço aberto no teste do Labirinto em Cruz Elevado está relacionada com as características exploratórias inatas do comportamento do camundongo. Quando o animal passa um tempo maior no braço aberto em relação ao grupo veículo, diz-se que o fármaco administrado produziu um efeito ansiolítico, e assim, reduzindo o comportamento ansioso do animal e consequentemente demonstrando uma maior exploração ambiental.

O percentual da frequência de entradas dos animais no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado está representado na **Figura 22**. Os resultados para cada grupo experimental foram: $44,7 \pm 8,9$ (“veículo”); $44,3 \pm 5,8$ (“5 min *mCPP*”); $42,5 \pm 11,5$

("15 min *mCPP*"); $43,1 \pm 8,8$ ("30 min *mCPP*"); $44,0 \pm 4,5$ ("45 min *mCPP*") e $45,7 \pm 8,1$ ("60 min *mCPP*"). A ANOVA resultou em $F_{(5,49)}=156$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,02 e poder observado=0,08. O teste da ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Tukey não apresentou diferenças significativas entre os tempos pós-administração do fármaco e o grupo veículo, no que se refere ao percentual da frequência de entradas dos animais no braço aberto.

Figura 22. Parâmetro do percentual de entradas no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para determinar o tempo pós-administração do fármaco para exposição comportamental. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 7-10 animais/grupo. Na ANOVA seguida pelo *post hoc* de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Os resultados da quantidade de quadrantes percorridos pelos animais no Campo Aberto estão representados na **Figura 23**. A análise da ANOVA resultou em altos valores de significância com $F_{(5,49)}=4377$; $p<0,01$; η^2 parcial=0,31 e poder observado=0,95. Os resultados para cada grupo experimental foram: $109,1 \pm 14,0$ ("veículo"); $60,1 \pm 12,3$ ("5 min *mCPP*"); $53,1 \pm 9,0$ ("15 min *mCPP*"); $71,2 \pm 4,7$ ("30 min *mCPP*"); $85,5 \pm 9,4$ ("45 min *mCPP*") e $100,1 \pm 7,4$ ("60 min *mCPP*"). O teste *post hoc* de Tukey apresentou diferenças igualmente significativas entre os tempos pós-administração do fármaco (5, 15 e 30 minutos) e o grupo veículo. Isso demonstra que após 30 minutos os resultados se tornam ainda menos significativos e com desaparecimento do efeito, com padrão de resultados cada vez mais similar ao demonstrado pelo grupo controle. Dessa forma observa-se um efeito de

hipolocomoção igualmente significativo para os grupos submetidos ao teste comportamental após 5, 15 e 30 minutos.

Figura 23. Parâmetro de quadrantes percorridos produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito do tempo pós-administração da *mCPP* nos camundongos. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 7-10 animais/grupo. ** $p < 0.01$ comparado ao grupo veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

A quantidade de levantares produzido pelos animais no teste do Campo Aberto apresentou diferenças significativas em vários grupos experimentais (**Figura 24**). A ANOVA resultou em altos valores de significância com $F_{(5,49)}=4433$; $p < 0,01$; η^2 parcial=0,31 e poder observado=0,95. Os resultados para cada grupo experimental foram: $34,8 \pm 7,2$ ("veículo"); $10,1 \pm 4,4$ ("5 min *mCPP*"); $8,1 \pm 2,9$ ("15 min *mCPP*"); $12,8 \pm 2,3$ ("30 min *mCPP*"); $12,5 \pm 4,1$ ("45 min *mCPP*") e $21,7 \pm 3,7$ ("60 min *mCPP*"). O teste *post hoc* de Tukey apresentou diferenças significativamente desejadas entre os tempos pós-administração do fármaco (5, 15, 30 e 45 minutos) e o grupo veículo. Entretanto, o maior nível de significância com o efeito de uma menor atividade locomotora foi obtido no grupo experimental submetido aos testes comportamentais após 15 minutos da administração intraperitoneal do fármaco ($p < 0,001$).

Figura 24. Parâmetro da quantidade de levantares produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito do tempo pós-administração da *mCPP* nos camundongos. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 7-10 animais/grupo. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Por fim, foi avaliado o tempo de reflexo de auto-limpeza e os resultados estão apresentados na **Figura 25**. A ANOVA resultou em $F_{(5,49)}=916$; $p < 0,05$; η^2 parcial=0,09 e poder observado=0,30. Os resultados para cada grupo experimental foram: $19,4 \pm 6,7$ ("veículo"); $10,8 \pm 3,6$ ("5 min *mCPP*"); $14,7 \pm 3,1$ ("15 min *mCPP*"); $17,0 \pm 7,6$ ("30 min *mCPP*"); $9,4 \pm 3,0$ ("45 min *mCPP*") e $4,7 \pm 1,4$ ("60 min *mCPP*"). O teste *post hoc* de Tukey não indicou diferenças significativas de reflexo de auto-limpeza entre os tempos pós-administração do fármaco e o grupo veículo.

Figura 25. Parâmetro do tempo de reflexo de auto-limpeza produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito do tempo pós-administração da *mCPP* nos

camundongos. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 7-10 animais/grupo. Na ANOVA seguida pelo *post hoc* de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Após as análises estatísticas dos resultados para escolha do tempo pós-administração do fármaco com efeitos mais significativos, os principais resultados foram agrupados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento para determinação do tempo para exposição comportamental.

Parâmetro	F	p	η^2 parcial	Poder observado
Permanência no braço aberto (%)	3280	0,012	0,251	0,858
Entradas no braço aberto (%)	156	0,977	0,016	0,083
Quadrantes percorridos (n)	4377	0,002	0,309	0,948
Levantares (n)	4433	0,002	0,311	0,950
Reflexo de auto-limpeza (s)	916	0,478	0,086	0,299

Dados: F (Graus de liberdade, Resíduo) = $F_{(5,49)}$.

Levando em consideração a escolha de um período que apresente simultaneamente valores significantes para ambos os testes comportamentais, e um valor de significância maior em relação aos outros grupos, foi definido a escolha do tempo de 15 minutos a ser aplicado na continuação do estudo. Os resultados dos grupos experimentais foram comparados com o grupo veículo e as diferenças foram apresentadas na **Tabela 8**.

Tabela 8. Reunião dos dados referentes ao experimento para determinação do tempo pós-administração do fármaco, com a identificação do grupo experimental observado em relação ao grupo controle (veículo).

Fármaco	Tempo	T-LCE	E-LCE	Q-CA	L-CA	A-CA
<i>mCPP</i>	5 min	—	—	↓↓	↓↓	—
	15 min	↓↓	—	↓↓	↓↓↓	—
	30 min	↓↓	—	↓↓	↓↓	—
	45 min	↓↓	—	—	↓↓	—
	60 min	—	—	—	—	—

Legenda:

↓ ou ↑ = Significância superior a 95% ($p < 0,05$);

↓↓ ou ↑↑ = Significância superior a 99% ($p < 0,01$);

↓↓↓ ou ↑↑↑ = Significância superior a 99,9% ($p < 0,001$).

6.1.3 Avaliação dos isômeros no comportamento de camundongos com padrão de sono normal e privados de sono paradoxal

Depois de finalizados os experimentos que definiram a dosagem a ser administrada ($5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) e do tempo ideal pós-administração dos fármacos para submeter os animais aos testes comportamentais (15 minutos), o estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos dos isômeros da *CPP* no comportamento dos camundongos submetidos a PSP. De acordo com o planejamento experimental, os grupos foram distribuídos em: grupos controle, privados de sono paradoxal por 24 e por 48 horas.

A **Figura 26** apresenta os resultados do percentual do tempo de permanência no braço aberto do teste do Labirinto em Cruz Elevado. A avaliação da variância da condição do sono resultou em $F_{(2,81)}=837$; $p > 0,05$; η^2 parcial=0,02 e poder observado=0,19. Os resultados estatísticos calculados pela MANOVA, a administração das *CPP* não atingiram o nível de significância desejado [$F_{(3,81)}=2.165$; $p > 0,05$; η^2 parcial=0,07 e poder observado=0,53]. Os resultados da média do grupo controle foram: $32,6 \pm 3,1$ (“veículo”); $30,9 \pm 4,1$ (“*oCPP*”); $36,6 \pm 2,0$ (“*mCPP*”) e $31,5 \pm 1,4$ (“*pCPP*”). Após a PSP por 24 horas, os valores individuais das médias,

foram alterados, apesar de não ter sido atingido o nível de significância desejado [“veículo” ($37,7 \pm 4,5$); “oCPP” ($22,2 \pm 2,4$); “mCPP” ($25,1 \pm 3,3$) e “pCPP” ($31,5 \pm 5,7$)]. O período de PSP por 48 horas teve as seguintes médias: $34,4 \pm 5,2$ (“veículo”); $30,1 \pm 3,1$ (“oCPP”); $22,9 \pm 4,3$ (“mCPP”) e $35,8 \pm 4,8$ (“pCPP”). A análise multivariada da variância encontrou diferenças comportamentais significativas dos fármacos (“oCPP” e “mCPP”; $p < 0,05$ para ambos) em relação ao grupo “veículo” dentro do grupo de sono PSP 24h. Nota-se um efeito adaptativo do parâmetro de privação de sono apresentado pelo animal após 48 horas, uma vez que o estado de estresse causado por um animal que nunca fora antes submetido à PSP e a associação com os isômeros orto e meta são significativos apenas com 24 horas de PSP.

Figura 26. Parâmetro do percentual do tempo de permanência no braço aberto durante o teste do Labirinto em Cruz Elevado comparando o efeito das CPP com efeito da PSP. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 9-10 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo dentro da mesma condição de sono (análise multivariada de variância (MANOVA) seguida do teste *post hoc* de Tukey).

O parâmetro da frequência de entradas nos braços abertos do Labirinto em Cruz Elevado apresentou resultados significativos (**Figura 27**). A condição controle em que os animais viveram normalmente em suas gaiolas-moradia teve as seguintes médias: $47,3 \pm 1,2$ (“veículo”); $41,2 \pm 1,9$ (“oCPP”); $51,6 \pm 3,8$ (“mCPP”) e $46,5 \pm 1,5$ (“pCPP”). O primeiro período de PSP reduziu a um nível significativo o percentual da frequência de entradas nos braços abertos [“veículo” ($49,2 \pm 2,4$); “oCPP” ($38,5 \pm 2,3$); “mCPP” ($45,1 \pm 2,5$); “pCPP” ($50,2 \pm 4,2$)]. A PSP por 48 horas acarretou nas seguintes médias: $47,8 \pm 1,8$ (“veículo”); $41,5 \pm 2,8$ (“oCPP”); $43,0 \pm 1,4$ (“mCPP”);

$45,8 \pm 2,2$ (“*pCPP*”). O teste *post hoc* de Tukey indicou diferenças significativas para o grupo “*oCPP*” em relação ao grupo “veículo” apenas para a condição de PSP por 24 horas ($p < 0,01$). Similarmente ao resultado obtido na análise do percentual de tempo de permanência no braço aberto, a análise da frequência de entrada nos braços abertos também mostrou um efeito adaptativo do comportamento animal após a PSP por 48 horas.

Figura 27. Parâmetro do percentual de entradas no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado comparando o efeito das *CPP* com efeito da PSP. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 7-9 animais/grupo. ** $p < 0,01$ comparado ao grupo veículo dentro da mesma condição de sono (MANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Os dados representados no **Figura 28** apresentam os dados da quantidade de quadrantes percorridos pelos animais no experimento de privação de sono associados à administração dos isômeros da *CPP*. Neste experimento o efeito do sono e da administração das *CPP* são avaliados isoladamente e o teste *post hoc* é utilizado posteriormente para determinar a interação entre as variáveis. O efeito isolado do sono não produziu resultados estatísticos $F_{(2,81)}=712$; $p > 0,05$; η^2 parcial=0,02 e poder observado=0,17. Por outro lado, o efeito dos fármacos na locomoção dos animais foi significativamente superior com $F_{(3,81)}=5584$; $p < 0,01$; η^2 parcial=0,17 e poder observado=0,93. Os resultados de cada grupo experimental foram os seguintes: grupo controle [“veículo” ($139,0 \pm 5,1$); “*oCPP*” ($93,2 \pm 11,3$); “*mCPP*” ($90,4 \pm 16,4$) e “*pCPP*” ($108,6 \pm 7,3$)], grupo PSP 24 horas [“veículo” ($95,1 \pm 9,3$); “*oCPP*” ($117,1 \pm 9,4$); “*mCPP*” ($70,6 \pm 11,7$) e “*pCPP*” ($109,3 \pm 8,8$)] e grupo PSP 48 horas [“veículo”

($103,4 \pm 5,9$); “oCPP” ($140,8 \pm 18,3$); “mCPP” ($82,3 \pm 4,6$) e “pCPP” ($91,4 \pm 11,6$)]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferenças significativas, com níveis de significância de 5% atingidas apenas entre o grupo “oCPP” e “mCPP” em relação ao grupo “veículo”, na condição controle de sono. Após a PSP por 48h, houve a diferenciação apenas entre o grupo “oCPP” e o grupo “veículo” ($p < 0,05$).

Figura 28. Parâmetro da quantidade de quadrantes percorridos pelos animais durante o teste do Campo Aberto comparando o efeito das CPP com efeito da PSP. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 7-9 animais/grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo veículo dentro da mesma condição de sono (MANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

A **Figura 29** representa os dados da quantidade de levantares produzido pelos animais no experimento de privação de sono associada à administração dos isômeros da CPP. Neste experimento os efeitos da privação de sono e da administração das drogas de abuso também são avaliados isoladamente e o teste *post hoc* é utilizado posteriormente para determinar a interação entre as variáveis. O efeito isolado do sono não produziu resultados estatísticos da análise da variância [$F_{(2,81)}=1756$; $p > 0,05$; η^2 parcial=0,04 e poder observado=0,36]. Por outro lado, o efeito dos isômeros na locomoção dos animais foi muito significativo $F_{(3,81)}=21018$; $p < 0,001$; η^2 parcial=0,44 e poder observado=1,00. Os resultados de cada grupo experimental foram os seguintes: grupo controle [“veículo” ($35,9 \pm 3,5$); “oCPP” ($5,7 \pm 2,00$); “mCPP” ($13,0 \pm 4,6$) e “pCPP” ($23,5 \pm 4,6$)], grupo PSP 24 horas [“veículo” ($26,1 \pm 4,00$); “oCPP” ($5,7 \pm 1,7$); “mCPP” ($6,9 \pm 1,4$) e “pCPP” ($20,3 \pm 3,9$)] e grupo PSP 48 horas [“veículo” ($25,6 \pm 3,3$); “oCPP” ($13,3 \pm 4,9$); “mCPP” ($7,3 \pm 2,5$)

e “*pCPP*” ($16,9 \pm 3,3$]. Observa-se uma menor quantidade de levantares, ou seja, uma menor atividade exploratória dos animais quando submetidos aos isômeros *oCPP* e *mCPP*.

Figura 29. Parâmetro da quantidade de levantares observado durante o teste do Campo Aberto comparando o efeito das *CPP* com efeito da PSP. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 7-9 animais/grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo dentro de cada condição do sono (MANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Neste experimento o teste *post hoc* de Tukey mostrou que houve resultados com significância inferior a 5% em todos os grupos experimentais. Na condição normal de sono (grupo controle), houve grande diferenciação do grupo veículo com os grupos “*oCPP*” e “*mCPP*” ($p < 0,001$) e também significativo em relação ao grupo “*pCPP*” ($p < 0,05$). Após 24 horas de PSP, apenas os grupos “*oCPP*” e “*mCPP*” mantiveram as diferenças e o nível de significância, comprovando que o efeito é consequente da administração dos fármacos. No grupo PSP pelo período de 48 horas, as diferenças diminuíram, e o nível de significância desejado foi obtido em relação aos grupos “*oCPP*” ($p < 0,05$) e “*mCPP*” ($p < 0,01$). Vale ressaltar, que o grupo experimental “*mCPP*” apresentou diferenças em todas as condições experimentais relacionadas ao sono (normal ou privado), na avaliação da quantidade de levantares produzidos pelo animal após a administração do fármaco.

Dentro da condição normal de sono não foram obtidos resultados significativos do tempo do reflexo de auto-limpeza (**Figura 30**), apenas uma

diminuição nos valores médios em relação ao grupo veículo [“veículo” ($18,4 \pm 5,7$); “oCPP” ($10,7 \pm 4,5$; $p < 0,01$); “mCPP” ($12,8 \pm 5,4$; $p < 0,01$); “pCPP” ($13,6 \pm 3,9$)]. A PSP pelo período de 24 horas alterou as médias de alguns grupos experimentais [“veículo” ($88,9 \pm 21,7$); “oCPP” ($12,1 \pm 4,0$); “mCPP” ($28,2 \pm 6,5$) e “pCPP” ($39,7 \pm 16,2$)]. Por fim, o perfil dos resultados do tempo do reflexo de auto-limpeza obtido com dois dias de PSP foi similar àquele obtido com a privação de apenas um dia [“veículo” ($75,0 \pm 17,8$); “oCPP” ($11,3 \pm 4,2$); “mCPP” ($20,1 \pm 5,8$) e “pCPP” ($64,0 \pm 21,9$)]. O teste estatístico da MANOVA não apresentou resultados com diferenças significativas da administração dos fármacos nos animais que viviam em suas gaiolas moradias e poderiam ter o padrão normal de sono. Entretanto, após a privação de sono por 24 horas, o teste *post hoc* de Tukey indicou o aumento considerável da média do tempo do reflexo de auto-limpeza do grupo “veículo” e que tornou os resultados dos isômeros significativos ($p < 0,001$ - grupo “oCPP”; $p < 0,01$ - grupo “mCPP”; $p < 0,05$ - grupo “pCPP”). O grupo PSP pelo período de 48 horas apresentou diferenças significativas dos grupos “oCPP” ($p < 0,01$) e “mCPP” ($p < 0,01$) em relação ao grupo “veículo”. Ressalta-se um efeito de ansiedade observado pelo animal quando submetido à PSP, especialmente quando relacionada aos isômeros oCPP e mCPP.

Figura 30. Parâmetro do tempo de reflexo de auto-limpeza produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto comparando o efeito das CPP com efeito da PSP. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 9-10 animais/grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo dentro de cada condição do sono (MANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Neste experimento foi realizada uma análise multifatorial da variância dos resultados (MANOVA), em razão dos efeitos isolados da condição de sono e do fármaco administrado. A **Tabela 9** reúne os resultados estatísticos referentes aos efeitos da privação do sono no comportamento dos animais.

Tabela 9. Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento de PSP avaliando apenas o efeito da condição do sono.

Parâmetro	F	p	η^2 parcial	Poder observado
Permanência no braço aberto (%)	837	0,437	0,020	0,189
Entradas no braço aberto (%)	666	0,516	0,016	0,158
Quadrantes percorridos (n)	712	0,494	0,017	0,167
Levantares (n)	1756	0,179	0,042	0,358
Reflexo de auto-limpeza (s)	6364	0,003	0,136	0,890

Dados: F (Graus de liberdade, Resíduo) = $F_{(2,81)}$.

A **Tabela 10** agrupa os resultados dos parâmetros comportamentais e seus respectivos parâmetros estatísticos apenas em função do efeito das CPP no comportamento dos camundongos.

Tabela 10. Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento de PSP avaliando apenas o efeito dos fármacos.

Parâmetro	F	p	η^2 parcial	Poder observado
Permanência no braço aberto (%)	2165	0,099	0,074	0,532
Entradas no braço aberto (%)	5.276	0,002	0,163	0,918
Quadrantes percorridos (n)	5584	0,002	0,171	0,933
Levantares (n)	21018	0,001	0,438	1,000
Reflexo de auto-limpeza (s)	8440	0,001	0,238	0,991

Dados: F (Graus de liberdade, Resíduo) = $F_{(3,81)}$.

Os resultados observados nos grupos “CTRL”, “PSP 24h” e “PSP 48h” foram agrupados na **Tabela 11**. Nesta tabela estão identificados os resultados significativos em relação ao grupo veículo dentro de cada condição experimental de sono. Houve vários pontos importantes resultantes da administração dos isômeros da CPP nos animais submetidos às condições de sono normal e privado de sono

que serão discutidos a seguir. Diferentemente da indicação antagonista feita pelo EMCDDA (2007) sobre o isômero *oCPP*, os resultados apresentaram resultados similares àqueles produzidos pela *mCPP* nas condições de sono, com exceção ao aumento de quadrantes percorridos após a privação de sono paradoxal por 48 horas. Destaca-se também o grande efeito das CPP sobre a quantidade de levantares produzido pelo animal ao explorar o ambiente quando colocado no teste do Campo Aberto. Por fim, deve-se enfatizar o efeito das CPP sobre a quantidade do tempo de reflexo de auto-limpeza após o animal ter sido privado de sono paradoxal por 24 ou 48 horas. Houve maior ansiedade quantificada no animal PSP e submetido à administração intraperitoneal dos isômeros da CPP após 24 horas e dos isômeros *oCPP* e *mCPP* após a privação de sono por 48 horas.

Tabela 11. Reunião dos dados referentes ao experimento de privação de sono, com a identificação do grupo experimental observado em relação ao grupo controle (veículo).

Efeito Sono	Fármaco	T-LCE	E-LCE	Q-CA	L-CA	A-CA
CTRL	<i>oCPP</i>	—	—	↓↓	↓↓↓	—
	<i>mCPP</i>	—	—	↓↓	↓↓↓	—
	<i>pCPP</i>	—	—	—	↓	—
PSP 24h	<i>oCPP</i>	↓	↓↓	—	↓↓↓	↓↓↓
	<i>mCPP</i>	↓	—	—	↓↓↓	↓↓
	<i>pCPP</i>	—	—	—	—	↓
PSP 48h	<i>oCPP</i>	—	—	↑	↓	↓↓
	<i>mCPP</i>	—	—	—	↓↓	↓↓
	<i>pCPP</i>	—	—	—	—	—

Legenda:

↓ ou ↑ = Significância superior a 95% ($p < 0,05$);

↓↓ ou ↑↑ = Significância superior a 99% ($p < 0,01$);

↓↓↓ ou ↑↑↑ = Significância superior a 99,9% ($p < 0,001$).

6.1.4 Avaliação do rebote de sono paradoxal

O teste do Labirinto em Cruz Elevado também foi utilizado no estudo em que foi avaliado o possível efeito da *mCPP* no comportamento dos camundongos previamente submetidos a PSP por 24 horas e desafiados com uma administração da *mCPP* a 5 mg.kg⁻¹.

A **Figura 31** mostra os resultados da permanência dos animais no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado. Estatisticamente foi avaliado apenas a condição do sono do animal que resultou em um $F_{(3,34)}=3125$; $p<0,05$; η^2 parcial=0,22 e poder observado=0,68. Simultaneamente foi avaliado o efeito isolado da administração da *mCPP* e resultou em um $F_{(1,34)}=691$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,02 e poder observado=0,13. Os valores das médias e seus respectivos desvios padrão estão descritos a seguir: CTRL 24 horas [“veículo” (27,6 ± 4,1) e “*mCPP*” (36,1 ± 4,7)], CTRL 48 horas [“veículo” (23,6 ± 4,6) e “*mCPP*” (25,1 ± 6,9)], RBT 24 horas [“veículo” (38,6 ± 4,5) e “*mCPP*” (45,4 ± 5,1)] e RBT 48 horas [“veículo” (32,6 ± 6,3) e “*mCPP*” (33,3 ± 4,8)]. Os grupos rebote de sono apresentaram valores de médias maiores em relação ao grupo controle, entretanto estes aumentos não foram suficientes para que fosse atingido o nível de significância pré-estabelecido no início do estudo. Isto evidencia que a PSP teve influência direta no aumento da média no parâmetro de permanência no braço aberto.

Figura 31. Parâmetro do percentual do tempo de permanência no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para determinar o efeito comportamental da *mCPP* no rebote de sono paradoxal. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 5-6 animais/grupo. Na ANOVA seguida pelo *post hoc* de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

O percentual de frequência de entradas no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado também foi avaliado (**Figura 32**). A análise da variância do efeito do sono resultou em $F_{(3,34)}=3994$; $p<0,05$; η^2 parcial=0,26 e poder observado=0,79. A análise da variância dos resultados da *mCPP* não apresentou valores significativos desejados como $F_{(1,34)}=1411$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,04 e poder observado=0,21. Os valores das médias e seus respectivos desvios padrão estão descritos a seguir: CTRL 24 horas [“veículo” (43,3 $\pm$ 1,7) e “*mCPP*” (48,4 $\pm$ 3,6)], CTRL 48 horas [“veículo” (37,2 $\pm$ 3,00) e “*mCPP*” (39,8 $\pm$ 5,7)], RBT 24 horas [“veículo” (51,2 $\pm$ 3,7) e “*mCPP*” (54,3 $\pm$ 2,7)] e RBT 48 horas [“veículo” (46,8 $\pm$ 4,2) e “*mCPP*” (45,5 $\pm$ 3,6)]. O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferença significativa do grupo “RBT 24h *mCPP*” em relação ao grupo “CTRL 48h veículo” ($p<0,05$). Foi observado um aumento significativo do número de entradas nos braços abertos pelo grupo de animais após a administração da *mCPP* e o rebote de sono paradoxal em relação ao grupo controle, indicando um menor nível de ansiedade ou ainda de retorno à homeostasia comportamental.

Figura 32. Parâmetro do percentual de entradas no braço aberto avaliado pelo teste do Labirinto em Cruz Elevado para avaliar o efeito comportamental da *mCPP* no rebote de sono paradoxal. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 5-6 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos CTRL 48h veículo (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Dentro deste experimento, foi avaliado também o parâmetro de locomoção em que foi mensurada a quantidade de quadrantes percorridos pelo animal (**Figura 33**). O efeito isolado da condição de sono dos camundongos também foram observados [$F_{(3,34)}=2600$; $p > 0,05$; η^2 parcial=0,19 e poder observado=0,59]. O efeito exclusivo dos isômeros não proporcionou resultados com níveis de significância baixos [$F_{(1,34)}=854$; $p > 0,05$; η^2 parcial=0,02 e poder observado=0,14]. Os valores das médias e seus respectivos desvios padrão estão descritos a seguir: CTRL 24 horas [“veículo” ($123,8 \pm 26,0$) e “*mCPP*” ($124,7 \pm 4,0$)], CTRL 48 horas [“veículo” ($130,0 \pm 17,6$) e “*mCPP*” ($157,2 \pm 18,4$)], RBT 24 horas [“veículo” ($104,2 \pm 7,4$) e “*mCPP*” ($110,8 \pm 9,3$)] e RBT 48 horas [“veículo” ($146,2 \pm 10,0$) e “*mCPP*” ($145,4 \pm 12,8$)]. Apesar das média da quantidade de quadrantes percorridos ter sido inferior no grupo “RBT 24h”, através da análise da variância, estes grupos experimentais não apresentaram resultados significativos em relação aos outros grupos experimentais.

Figura 33. Parâmetro da quantidade de quadrantes percorridos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito comportamental da *mCPP* no rebote de sono paradoxal. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 5-6 animais/grupo. Na ANOVA seguida pelo *post hoc* de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

O parâmetro da quantidade de levantes produzidas pelo animal no teste do Campo Aberto também foi avaliado e os resultados estão apresentados na **Figura 34**. Os resultados das principais variáveis foram calculados estatisticamente: efeito da condição de sono [$F_{(3,34)}=918$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,08 e poder observado=0,23] e a administração da *mCPP* [$F_{(1,34)}=29$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,01 e poder observado=0,05]. Os valores das médias e seus respectivos desvios padrão estão descritos a seguir: CTRL 24 horas [“veículo” ($38,0 \pm 14,5$) e “*mCPP*” ($39,8 \pm 3,0$)], CTRL 48 horas [“veículo” ($39,0 \pm 4,7$) e “*mCPP*” ($40,8 \pm 4,8$)], RBT 24 horas [“veículo” ($33,0 \pm 2,7$) e “*mCPP*” ($32,2 \pm 3,1$)] e RBT 48 horas [“veículo” ($45,2 \pm 3,0$) e “*mCPP*” ($44,4 \pm 6,1$)]. A análise multivariada da variância não indicou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

Figura 34. Parâmetro da quantidade de levantares produzidos pelos animais durante o teste do Campo Aberto para avaliar o efeito comportamental da *mCPP* no rebote de sono paradoxal. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 5-6 animais/grupo. Na ANOVA seguida pelo *post hoc* de Tukey não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Por fim, foi avaliado o tempo do reflexo de auto-limpeza observado no animal quando exposto ao teste do Campo Aberto (**Figura 35**). O efeito exclusivo do sono apresentou resultados estatísticos desejados [$F_{(3,34)}=4010$; $p<0,05$; η^2 parcial=0,26 e poder observado=0,79]. Por outro lado, os cálculos resultantes da interação da *mCPP* no rebote de sono paradoxal não proporcionou valores estatísticos significativos [$F_{(1,34)}=362$; $p>0,05$; η^2 parcial=0,01 e poder observado=0,09]. Os valores das médias e seus respectivos desvios padrão estão descritos a seguir: CTRL 24 horas [“veículo” ($22,8 \pm 14,1$) e “*mCPP*” ($9,3 \pm 4,4$)], CTRL 48 horas [“veículo” ($5,2 \pm 2,0$) e “*mCPP*” ($4,4 \pm 1,4$)], RBT 24 horas [“veículo” ($21,4 \pm 10,5$) e “*mCPP*” ($52,6 \pm 12,8$)] e RBT 48 horas [“veículo” ($20,2 \pm 9,5$) e “*mCPP*” ($16,2 \pm 3,9$)]. Entretanto observou-se diferenciação significativa entre o grupo PSP 24h fármaco comparado com os grupos “veículo” (controle 24h e 48h) e ao grupo controle “*mCPP*” PSP 48h” ($p<0,05$). Isoladamente, a privação de sono paradoxal causa um aumento no tempo de reflexo de auto-limpeza, entretanto quando associado com o uso da *mCPP*, o fármaco causou uma diminuição destas médias. Por outro lado, quando avaliado o rebote de sono paradoxal, o uso do fármaco aumentou estes valores e só atingiram limites considerados não significativos após a quantificação

destes parâmetros comportamentais com o animal de volta a sua gaiola-moradia pelo período de 48 horas. O perfil de significância estatística observado no número de entradas no braço aberto também foi encontrado no tempo de reflexo de auto-limpeza. A hipótese é a de que o sinergismo da PSP e a administração do fármaco alteraram significativamente o comportamento em relação ao grupo controle.

Figura 35. Parâmetro de tempo do reflexo de auto-limpeza mensurado no teste do Campo Aberto para avaliar o efeito comportamental da *mCPP* no rebote de sono paradoxal. Os dados foram indicados como média $\pm$ desvio padrão para 5-6 animais/grupo. * $p < 0,05$ comparado aos grupos veículo dentro da condição de RBT 24h (ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey).

Os resultados dos cálculos estatísticos de cada parâmetro observado nos testes comportamentais foram agrupados na **Tabela 12** (efeito da condição de sono) e **Tabela 12** (efeito da *mCPP*).

Tabela 12. Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento de rebote de sono paradoxal avaliando o efeito da condição do sono.

Parâmetro	F	p	η^2 parcial	Poder observado
Permanência no braço aberto (%)	3125	0,038	0,216	0,675
Entradas no braço aberto (%)	3997	0,015	0,261	0,791
Quadrantes percorridos (n)	2600	0,068	0,187	0,587
Levantares (n)	918	0,442	0,075	0,230
Reflexo de auto-limpeza (s)	4010	0,015	0,261	0,793

Dados: F (Graus de liberdade, Resíduo) = $F_{(3,34)}$.

Tabela 13. Parâmetros estatísticos da avaliação do experimento de rebote de sono paradoxal avaliando o efeito da *mCPP*.

Parâmetro	F	p	η^2 parcial	Poder observado
Permanência no braço aberto (%)	691	0,412	0,020	0,127
Entradas no braço aberto (%)	1411	0,243	0,040	0,211
Quadrantes percorridos (n)	854	0,362	0,024	0,143
Levantares (n)	29	0,865	0,001	0,053
Reflexo de auto-limpeza (s)	362	0,552	0,011	0,090

Dados: F (Graus de liberdade, Resíduo) = $F_{(1,34)}$.

Os resultados do experimento de rebote de sono paradoxal foram agrupados na **Tabela 14**, sendo evidenciado as diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Tabela 14. Reunião dos dados referentes ao experimento de rebote de sono paradoxal, com a identificação do grupo experimental observado em relação ao grupo não privado de sono (controle).

Sono	Tempo para avaliação comportamental	T-LCE	E-LCE	Q-CA	L-CA	A-CA
CTRL	24 horas	—	—	—	—	—
	48 horas	—	—	—	—	—
REBOTE	24 horas	—	↑	—	—	↑
	48 horas	—	—	—	—	—

Legenda:

↓ ou ↑ = Significância superior a 95% ($p < 0,05$).

Com estes resultados é possível afirmar que a associação da privação de sono paradoxal com a administração de *mCPP* promoveu um desequilíbrio no organismo de forma que apenas dia de sono paradoxal compensatório (rebote de sono) não faz com que o organismo volte à situação homeostásica em camundongos. São necessários então, pelo menos dois dias para que os parâmetros comportamentais não apresentem diferenças significativas com os grupos experimentais controles. É possível que em uma esfera translacional, as consequências da associação da PSP com a *mCPP* para o corpo humano sejam

consideráveis também e o retorno à homeostasia não seja eficiente em um período curto de tempo.

Sendo assim, é reconhecido que isoladamente a privação de sono ou a administração da *mCPP* não resultam em valores significativamente diferentes em relação aos outros grupos, somente a associação da PSP com a administração do fármaco promoveu uma potencialização dos efeitos ao organismo.

6.2 Dados da separação cromatográfica e espectrométricos

Os primeiros passos para o desenvolvimento do método analítico foram a análise para otimização da corrida analítica no cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (LC-DAD). Este primeiro procedimento objetivava identificar o tempo de retenção da *mCPP* e do padrão interno (*oCPP*), definir o uso de metanol ou ACN como fase orgânica, determinar o modo de eluição dos solventes (gradiente ou isocrático) e definir as temperaturas do forno de coluna. A segunda etapa foi realizada através da infusão direta de uma solução da *mCPP* a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em uma solução composta por composta de 50% de fase orgânica (ACN), 50% fase aquosa (água) e 0,1% de ácido fórmico. Esta etapa visou aperfeiçoar diversos parâmetros relativos ao espectrometro de massas, como: vazão do fluxo do gás de nebulização, tensão no capilar, identificação dos fragmentos de interesse, a energia de colisão dos elétrons para fragmentação, e temperatura de dessolvatação.

A **Figura 36** é referente a um cromatograma utilizando-se um sistema de cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado com um espectrômetro de massas. O analito (*mCPP*) elui e é registrado no detector do espectrômetro de massas com um tempo de 2,92 minutos. O pico referente ao isômero *oCPP*, utilizado como padrão interno, elui com 2,47 minutos de corrida analítica.

Figura 36. Cromatograma obtido de uma amostra de plasma enriquecido com *mCPP* e o padrão interno (*oCPP*) a 500 ng.mL⁻¹. Condições cromatográficas: coluna cromatográfica C18 com 4,6 mm x 150 mm x 5 µm; A fase móvel = 75% de fase A (água deionizada + 0,1% ácido fórmico) e 25% de fase B (acetonitrila + 0,1% ácido fórmico); modo de eluição isocrático; volume de injeção das amostras de 10 µL; vazão cromatográfica foi de 1 mL.min⁻¹; temperatura do forno de colunas=30°C; e temperatura da bandeja de amostras=20°. Condições espectrométricas: ionização por *electrospray*, tensão do capilar=5kV; temperatura da linha de transferência=275°C; energia de colisão=34 eV; temperatura de dessolvatação=100°C; vazão de gás de nebulização=30 unidades arbitrárias; detecção por *SRM* com os fragmentos 154 e 119. Condições de preparo de amostras estão descritos no item 5.2.3.

Foi feito um teste preliminar para definir qual seria a quantidade presente no solvente orgânico na fase móvel do sistema de cromatografia líquida. A **Figura 37** revela que com 25% de acetonitrila (ACN) os picos dos analitos foram bem separados e eluíram até três minutos, enquanto uma proporção menor de ACN aumenta o tempo de retenção, tempo de análise e consequentemente um maior gasto de solventes orgânicos. A escolha da coluna analítica e dos componentes da fase móvel foi baseada em um estudo prévio da literatura que analisavam entre outros compostos, a *mCPP*.

Figura 37. Comparação dos cromatogramas (LC-MS) sob a porcentagem de acetonitrila (ACN) presente na fase móvel na separação do isômero *o*CPP e *m*CPP na concentração de 50 ng.mL⁻¹. As condições cromatográficas e espectrométricas estão descritas na legenda da Figura 36.

A **Figura 38** apresenta um *full scan* da solução padrão de *m*CPP e a **Figura 39** demonstra o modo *zoom scan* do pico referente ao analito ionizado.

Figura 38. Espectro de massas (MS) da análise da *m*CPP obtido no modo *full scan*. As condições espectrométricas estão descritas na legenda da Figura 36.

A **Tabela 15** apresenta os dados a distribuição isotópica da *CPP* na natureza, a partir do estado molecular analisado e suas respectivas massas moleculares, identificação do isótopo (carbono e cloro) e a abundância relativa.

Tabela 15. Massa molecular e abundância relativa dos isótopos da *CPP*.

Estado molecular	Massa molecular do íon (u)	Carbono	Cloro	Abundância Relativa (%)
[M+1]	197,0767208	12	35	100
[M+2]	198,0845458	13	35	11,8
[M+3]	199,8159572	12	37	32,6
[M+4]	200,0849506	13	37	3,8

Na **Figura 39**, o primeiro sinal analítico é referente ao estado molecular em que os átomos de carbono e de cloro se apresentam na sua forma mais abundante na natureza, sendo composta por 12 unidades de peso para cada carbono e 35 unidades para o átomo de cloro. No segundo sinal, há a existência de carbono 13 na molécula e o cloro ainda com 35 unidades de peso. O terceiro não apresenta carbono 13, entretanto as moléculas que geram este sinal apresentam o cloro 37. Por fim, o último e menor sinal (abundância relativa de 3,8%) revela moléculas compostas da presença do carbono 13 e também do cloro 37. Através dos cálculos da massa isotópica de qualquer isômero da *CPP* será obtido o valor de 196,0767 e a massa média dos isótopos é de 196,6764, uma vez que o sinal analítico detectado no modo positivo [M+1].

Figura 39. Espectro de massas (MS) da *mCPP* no modo *zoom scan* para identificação da distribuição isotópica. As condições espectrométricas estão descritas na legenda da Figura 36.

O espectro de massas foi obtido de modo *tandem-in-time*, sendo uma análise sequencial de massas que ocorre no mesmo local, mas em momentos diferentes. Os dados obtidos são de um analisador de massas do tipo *ion-trap*, de baixa resolução, e por isso, não apresentou os mesmos valores que os dados de exatidão calculados previamente. Entretanto, mesmo não informando a massa exata, o *ion-trap* possibilita a confirmação da estrutura de um composto que elua da coluna, estando o pico bem resolvido em termos cromatográficos, sendo muito utilizado para MS^n para moléculas com valores de massa molecular baixos a médios.

A **Figura 40** apresenta o perfil de fragmentação do pico de m/z 197, sendo ele referente à composição dos isótopos do carbono 12 e do cloro 35, com detecção dos fragmentos de $m/z=154$ e 119. Este perfil é resultante da fragmentação do isótopo 35 do átomo de cloro da molécula da *CPP*.

No caso da **Figura 41**, é demonstrado o perfil de fragmentação (MS^2) do composto com a presença do cloro 37, os dois principais íons formados na fragmentação são os fragmentos de $m/z=156$ e 119. Este resultado é decorrente da fragmentação do isótopo 37 do átomo de cloro da molécula da *CPP*.

Figura 40. Espectro de massas (MS^2) do íon de m/z 197,10. As condições espectrométricas estão descritas na legenda da Figura 36.

Figura 41. Espectro de massas (MS^2) do composto de m/z 199,10. As condições espectrométricas estão descritas na legenda da Figura 36.

As **Figuras 42 e 43** representam a fragmentação do íon 154 e 156, respectivamente. A fragmentação (MS^3) é tão mais específica, de forma que o espectro se torna “mais limpo”, ou seja, sem a presença de outros picos. Não ocorre o surgimento de picos ainda menores devido a grande dificuldade de fragmentação

da estrutura remanescente. Existe uma grande dificuldade de realizar MS^n para moléculas com baixa massa molecular uma vez que os resultados apresentam valor de sinal com intensidade cada vez menor.

Figura 42. Espectro de massas (MS^3) do composto 197,1 através do fragmento 154,05. As condições espectrométricas estão descritas na legenda da Figura 36.

Figura 43. Espectro de massas (MS^3) do composto 199,1 através do fragmento 156,05. As condições espectrométricas estão descritas na legenda da Figura 36.

Com base na combinação de massas atômicas, foram definidos dois possíveis sítios para a fragmentação da molécula *CPP*, dando origem aos fragmentos com relação m/z 119 e 154, sendo exemplificados na **Figura 44**. Qualquer um dos

isômeros apresentará perfil de fragmentação idêntico, já que a ligação do átomo de cloro ao anel aromático não diferencia a massa dos isômeros orto, meta e para.

Figura 44. Principais íons moleculares da CPP.

6.3 Validações dos métodos para determinação de *mCPP* em amostras de plasma

6.3.1 Escolha do solvente

Para iniciar os procedimentos de extração foi realizado um procedimento com alguns solventes disponíveis no laboratório e mais usados no método de extração líquido-líquido de drogas de abuso em matrizes biológicas. Entre eles foram escolhidos o hexano, o acetato de etila e o MTBE. Foi usado uma amostra enriquecida com *mCPP* a 100 ng.mL^{-1} , as injeções foram realizadas em quintuplicata e o resultado foi estimado em percentual médio de recuperação $\pm$ desvio padrão. Para determinação do percentual de recuperação foi dividido o valor da concentração média obtida pós-extração pelas amostras adicionadas após o processo de secagem. A concentração da amostra que passou pelo processo extrativo e aquela que foi pipetada posteriormente à extração eram de 100 ng.mL^{-1} . Os valores de recuperação obtidos para a determinação de *mCPP* em amostra de plasma são apresentados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Valor de recuperação obtido com a aplicação do método proposto em plasma.

Solvente	Analito	Recuperação (%) CQ 1
Hexano	<i>mCPP</i>	60,1 ± 4,6
Acetato de Etila	<i>mCPP</i>	55,0 ± 3,3
MTBE	<i>mCPP</i>	77,3 ± 2,1

CQ - 100 ng.mL⁻¹

O solvente escolhido foi o MTBE devido à uma maior porcentagem de recuperação (77,3%) e menor valor de desvio padrão (2,1%) comparado ao hexano e ao acetato de etila, todos na concentração de 100 ppb ou 100 ng.mL⁻¹.

6.3.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação que produzia resultados com coeficiente de variação inferiores a 15% para a *mCPP* em amostras plasmáticas foi de 20 ng.mL⁻¹.

6.3.3 Linearidade

A **Figura 45** apresenta a curva analítica construída a partir da regressão linear proposta por este modelo de quantificação.

Figura 45. Representação da curva analítica para a determinação de *mCPP* nas concentrações plasmáticas de 20 a 2000 ng.mL⁻¹.

A variável "y" foi sinalizada como a concentração de *mCPP* na amostra de plasma, pois é a variável prevista, ou seja, a variável de interesse. A variável preditora foi definida no eixo da abscissa (x) e representa a área relativa dos picos cromatográficos da *mCPP* em relação à área do padrão interno.

O modelo apresentou um valor de r^2 igual a 0,998. Este parâmetro leva em conta os resíduos gerados pela curva aplicada e indica o percentual da variância que é explicada pelo modelo da regressão linear. A equação da reta proposta pelo modelo é " $y = 78,75x - 49,91$ ". O modelo apresentou $F_{(1,27)}=6470$ e $p=0,001$.

6.3.4 Precisão intra-ensaio e interensaio

Os resultados de precisão intra-ensaio e interensaio obtidos para a determinação de *mCPP* em amostras de plasma estão compilados na **Tabela 17**. Os valores de precisão intra-ensaio apresentaram coeficientes de variação (CV) inferior a 15% no controle de qualidade mais baixo e valores inferiores a 10% em todos os outros casos.

Tabela 17. Valores de precisão intra-ensaio e interensaio obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de plasma.

Precisão	Precisão (% CV)		
	CQ 1	CQ 2	CQ 3
<i>Intra-ensaio</i>	8,8	5,1	1,0
<i>Interensaio</i>			
1º dia	7,7	8,4	4,8
2º dia	3,5	2,0	1,8
3º dia	7,0	5,6	1,0

CQ 1 – 20 ng.mL⁻¹; CQ 2 – 500 ng.mL⁻¹; CQ 3 – 2000 ng.mL⁻¹

6.3.5 Recuperação

Foram quantificados os valores de recuperação em amostras das três concentrações do controle de qualidade. Os resultados de recuperação foram agrupados na **Tabela 18**, e observa-se uma diminuição no percentual de recuperação da *mCPP* com o aumento da concentração da *mCPP* na amostra. Foram enriquecidas amostras de plasma branco (referência negativa) nas concentrações de 20, 500 e 2000 ng.mL⁻¹ para formação dos controles de qualidade 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 18. Valores de recuperação obtido com o método proposto em amostras de plasma.

Analito	Recuperação ± DP (%)		
	CQ 1	CQ 2	CQ 3
<i>mCPP</i>	95,9 ± 0,4	91,3 ± 0,2	79,0 ± 0,2

CQ 1 – 20 ng.mL⁻¹; CQ 2 – 500 ng.mL⁻¹; CQ 3 – 2000 ng.mL⁻¹

Observou-se uma diminuição do percentual de recuperação da *mCPP* com o aumento da concentração dos controles de qualidade. Possivelmente seja efeito da saturação do solvente extrator pelo composto extraído.

6.3.6 Análise das amostras de animais PSP

Finalizada os critérios necessários para a validação do método analítico, as amostras plasmáticas de camundongos foram quantificadas. Os valores resultantes para cada indivíduo foram agrupados na **Tabela 19**.

Tabela 19. Resultados da concentração da amostra plasmática de cada indivíduo e o seu respectivo grupo experimental do sono.

Amostra	Grupo experimental	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	Controle	2,84
2	Controle	1,03
3	Controle	1,15
4	Controle	1,10
5	Controle	1,42
6	Controle	1,67
7	Controle	1,91
8	Controle	1,53
9	PSP 24h	1,66
10	PSP 24h	2,47
11	PSP 24h	1,67
12	PSP 24h	2,03
13	PSP 24h	3,24
14	PSP 24h	1,95
15	PSP 24h	1,99
16	PSP 24h	2,34
17	PSP 48h	2,01
18	PSP 48h	2,64
19	PSP 48h	2,74
20	PSP 48h	1,63
21	PSP 48h	3,29
22	PSP 48h	2,82
23	PSP 48h	3,24

As amostras de 1 e 13 foram retiradas do estudo estatístico pois foram consideradas outliers, uma vez que apresentaram distância da média do grupo superior a dois desvios padrões ($p < 0,05$). Através da análise de variância (ANOVA) dos resultados deste experimento foi obtido um valor de $F_{(2,18)} = 13683$; $p < 0,001$; η^2 parcial = 0,603; e poder observado = 0,994. O aumento de tempo privação de sono consequentemente proporcionou maiores valores de média e desvio padrão da concentração de *mCPP*: controle ($1,4 \pm 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), privado de sono paradoxal por 24 horas ($2,0 \pm 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e privado de sono paradoxal por 48 horas ($2,6 \pm 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Para a identificação da diferenciação entre os grupos experimentais foi necessário utilizar o teste *post hoc* de Tukey. Os resultados deste teste foram agrupados na **Tabela 20**.

Tabela 20. Resultados da ANOVA realizada após a determinação da concentração nos indivíduos dos grupos experimentais.

<i>Post hoc</i>	Grupo (A)	Grupo (B)	Diferença de média (A-B)	Valor de p
Tukey	CTRL	PSP 24h	-7,61	0,15
		PSP 48h	-11,77	0,02
	PSP 24h	CTRL	7,61	0,15
		PSP 48h	-4,17	0,54
	PSP 48h	CTRL	11,77	0,02
		PSP 24h	4,17	0,54

Os resultados do teste *post hoc* de Tukey sobre as análises de variância (ANOVA) indicaram que houve um aumento gradativo da concentração média de *mCPP* nas amostras de plasma dos camundongos privados de sono. Com base no índice de significância inferior a 5%, houve diferenciação apenas entre o grupo PSP por 48 horas em relação o grupo controle ($p=0,02$). As comparações entre os outros grupos experimentais não atingiram o índice de significância desejado. A **Figura 46** apresenta o boxplot dos resultados do grupo controle e dos grupos privados e também os outliers.

Figura 46. Boxplot das concentrações de *mCPP* correlacionadas com os grupos experimentais de sono.

Os principais parâmetros de descrição dos resultados da concentração de *mCPP* nos plasma dos camundongos controles e privados de sono paradoxal foram agrupados na **Tabela 21**.

Tabela 21. Dados descritivos da concentração de *mCPP* nos grupos experimentais de sono.

Parâmetros	CTRL	PSP 24h	PSP 48h
Média	1,40	2,02	2,62
Desvio padrão	0,33	0,31	0,61
Variância	0,11	0,94	0,37
Intervalo de confiança 95% (inferior)	1,10	1,73	2,06
Intervalo de confiança 95% (superior)	1,70	2,30	3,19

Os resultados da quantificação da *mCPP* nas amostras de plasma superaram as expectativas, uma vez o resultado esperado seria próximo ao encontrado no relato de caso de intoxicação (aproximadamente de 320 ng.mL⁻¹) (KOVALEVA, 2008). Uma possível razão para esta divergência de resultados pode ser decorrente do tempo entre reconhecimento como um caso de intoxicação e o atendimento hospitalar. O tempo é um fator essencial para a determinação correta do nível de concentração plasmática do fármaco. O processo de metabolização acontece de forma contínua e involuntária, ou seja, quanto mais tempo se passar entre o reconhecimento de um caso de intoxicação e o atendimento hospitalar com a coleta de amostras de sangue, menor será a concentração circulante do composto. Deve-se considerar também que no relato de caso foi encontrada a presença de outros compostos ilícitos como álcool, anfetamina e metabólitos da cocaína poderiam ter potencializados os sinais e sintomas apresentados pela paciente, haja vista que a interação pode ter proporcionado um agravamento do estado clínico.

Com base nestes resultados pode-se afirmar que, dentro destas condições experimentais, a PSP provocou uma alteração na concentração plasmática da *mCPP*. Uma das razões decorrentes dessa maior quantidade disponível do fármaco pode estar relacionada com a quantidade disponível da isoforma CYP 2D6 do citocromo P450. Qualquer variação no nível de disponibilidade desta enzima pode consequentemente alterar a quantidade circulante do fármaco no organismo do animal. Alguns trabalhos científicos corroboram este resultado de potencialização do

efeito de fármacos após a privação de sono em modelos animais (ANDERSEN *et al.*, 2000; ANDERSEN, PERRY, TUFIK, 2005; CALZAVARA *et al.*, 2008; FUKUSHIRO *et al.*, 2007; ANDERSEN *et al.*, 2010b).

A isoforma CYP 2D6 do citocromo P450 pode metabolizar uma ampla gama de fármacos utilizados rotineiramente pelos humanos e os resultados deste estudo indicam que alterações no padrão de sono podem implicar em mudanças farmacológicas significativas. Em indivíduos privados de sono, quando o fármaco administrado é aquele que se encontra na forma ativa, esta terá sua potência de efeito aumentada (tempo de efeito e intensidade), possivelmente até com riscos de intoxicação. Por outro lado, caso o fármaco seja uma pró-droga, ou seja, um composto que só produz efeitos quando metabolizado, este poderá ter uma consequência menor sobre o organismo, possivelmente até com a não observação dos efeitos, diante da baixa taxa de metabolização.

A presença de indivíduos que respondem diferentemente da maioria (*outliers*) pode ser decorrente do uso de uma linhagem de animais heterogênicos (*outbred*), em que os cruzamentos das matrizes são entre animais geneticamente diferentes (baixo grau de consanguinidade, cerca de 1%). Isto pode proporcionar à produção de populações naturais, devido a grande variabilidade gênica, assim como ocorre com a espécie humana. Estudos que utilizam drogas de abuso devem priorizar a utilização deste tipo de linhagem, uma vez que o uso das mesmas drogas em humanos pode acontecer em indivíduos geneticamente diferentes devido à existência de povos e raças em diferentes lugares pelo mundo. Tendo em vista as diferenças naturais entre raças, diversos estudos clínicos utilizam em seus estudos a identificação de populações distintas, como por exemplo, caucasianos, afrodescendentes, latino-americanos, asiáticos e etc.

Esses indícios apontam e corroboram a importância do sono na homeostase bioquímica, uma vez que foi encontrada uma maior concentração do fármaco após a privação de sono por 24 horas e significativamente maior após a privação de sono paradoxal por 48 horas ($p < 0,05$). Entretanto, a confirmação destes resultados deve ser realizada ainda com mais estudos envolvendo a privação de sono e especificamente a expressão quantitativa da isoforma 2D6 do citocromo P450.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

De acordo com os estudos realizados e os resultados obtidos, conclui-se que:

- Alterações comportamentais foram observadas após a administração das *CPP* e tiveram seus efeitos potencializados após a privação de sono paradoxal, os resultados indicam um efeito ansiogênico e de hipolocomoção.
- O método analítico desenvolvido e validado constituído pela extração líquido-líquido de *mCPP* em amostras de plasma seguido pela análise por *LC-MS/MS* mostrou-se simples, rápido e de fácil execução. As figuras de mérito analítico obtidas durante a validação mostraram que o método é confiável e preciso para ser aplicado nas análises das amostras de plasma de camundongos.
- Os resultados da quantificação das amostras plasmáticas de camundongos mostraram um aumento significativo da concentração plasmática circulante de *mCPP* em camundongos submetidos à privação de sono paradoxal por 48 horas em relação ao grupo controle.
- A associação entre a administração de *mCPP* e privação de sono paradoxal causaram alterações comportamentais mesmo após 24 horas de rebote de sono paradoxal do animal. Somente após 48 horas de rebote de sono, os resultados atingiram índices não significativos entre os grupos experimentais.
- Por fim, com base no pensamento da ciência translacional, este estudo realça a importância do sono para a qualidade de vida através das alterações observadas no comportamento e no perfil de metabolização após a privação de sono paradoxal.

Perspectivas

8. PERSPECTIVAS

O presente estudo tinha o objetivo inicial na separação simultânea dos três isômeros da CPP por eletroforese capilar, uma vez que o projeto era intitulado de "*Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação simultânea de meta-clorofenilpiperazina (m-CPP) e seus isômeros em fluidos biológicos, por eletroforese capilar (CE-UV e CE-MS)*". A técnica chegou a ser desenvolvida, mas o limite inferior de quantificação de *mCPP* em solução aquosa não foi inferior a 100 ng.mL⁻¹. Este nível de concentração era obtido apenas através de uma pré-concentração *on-line* da amostra (*stacking*) e utilizando-se de uma ciclodextrina específica no eletrólito de corrida (7,5 mM de hidroxipropil-β-ciclodextrina). Diante do limite inferior de quantificação oferecido pela técnica de *LC-MS/MS*, esta foi escolhida para o desenvolvimento do projeto. Entretanto, agora que obtivemos o nível de concentração estimado em plasma, é possível utilizar a técnica de eletroforese capilar para determinação da concentração de cada isômero e a quantificação de cada um deles, inserindo um padrão interno como a *TFMPP*, que apresenta tempo de migração maior que os isômeros *oCPP*, *mCPP* ou *pCPP*. Por isso também, o título apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo é aquele que aborda o uso da eletroforese capilar como ferramenta analítica de separação e quantificação dos compostos.

Diante dos resultados encontrados, surgiram algumas perguntas importantes durante o desenvolvimento deste estudo relacionadas à toxicocinética e a o perfil de metabolização dos animais submetidos à privação de sono paradoxal. Dentre estas principais perspectivas estão: realizar a análise histológica de tecidos após a administração das *CPP*, a realização de um estudo cinético do composto de interesse, avaliação da destruição tecidual e a caracterização metabolômica a partir de análises obtidas em um espectrômetro de massas de alta resolução.

O conhecimento do coeficiente cinético de decaimento da concentração plasmática do fármaco nas duas condições experimentais de sono (controle e privado de sono paradoxal) facilitaria o entendimento sobre o comportamento da metabolização em cada uma das condições experimentais. Caso se confirme, as hipóteses reforçariam a conclusão do decréscimo da atividade enzimática nos animais previamente submetidos à privação de sono.

Durante o experimento comportamental foram coletadas amostras de tecidos íntegros de cérebro, coração, fígado, rins e pulmões, e elas se encontram identificadas e congeladas em um freezer a -80°C. As análises dessas amostras possibilitam determinar o coeficiente de distribuição destes compostos nas amostras de tecidos estudados e identificar uma possível alteração de distribuição do fármaco no organismo privado de sono. Deve-se ressaltar que foi observado que após a eutanásia, os pulmões dos animais tratados com os isômeros do fármaco apresentavam os seus pulmões visivelmente mais vermelhos em relação aos do grupo veículo, indicando um provável dano tecidual. Uma possível explicação para diminuição quantitativa nos levantares pode ser decorrente do fármaco ter grande afinidade pulmonar e devido à essa lesão, acarretou em uma diminuição da eficiência na realização das trocas gasosas e consequentemente no nível de atividade física. Os pulmões foi o único tecido que aparentemente apresentou alterações teciduais visualmente perceptíveis.

O presente método analítico validado e aplicado para quantificação da *mCPP* no plasma de camundongos poderia ser adaptado para plasma humano. Desta forma, seria possível disponibilizar um método analítico do composto intoxicante para os pacientes encaminhados para Hospitais ou Centros de Controle de Intoxicações.

Por fim, o enriquecimento científico deste estudo pode ser aprimorado com a aplicação das ciências ômicas, em especial a metabolômica. As hipóteses decorrentes desta perspectiva poderiam identificar, quantificar e caracterizar um conjunto de metabólitos resultantes de processos celulares. Enquanto os estudos biomoleculares, como aqueles relacionados com a expressão genética e proteômica fornecem informações celulares específicas, o perfil metabólico apresenta um panorama fisiológico geral. Neste caso, é possível avaliar o efeito isolado de cada variável (privação de sono paradoxal e do fármaco administrada), como também o efeito metabólico da interação entre elas no organismo do animal.

Referências

9. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C.; ROSARIO, P.; SERODIO, P.; NOGUEIRA, J. M. F. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. **Química**. v.95, p.69-77, 2004.
- ALVARENGA, T. A.; ANDERSEN, M. L.; RIBEIRO, D. A.; ARAUJO, P.; HIROTSU, C.; COSTA, J. L.; BATTISTI, M. C.; TUFIK, S. Single exposure to cocaine or ecstasy induces DNA damage in brain and other organs of mice. **Addict Biol**. v. 15, n.1, p.96-99, 2010.
- ALVARENGA, T. A.; RIBEIRO, D. A.; ARAUJO, P.; HIROTSU, C.; MAZARO-COSTA, R.; COSTA, J. L.; BATTISTI, M. C.; TUFIK, S.; ANDERSEN, M. L. Sleep loss and acute drug abuse can induce DNA damage in multiple organs of mice. **Hum Exp Toxicol**. v.30, n.9, p.1275-1281, 2011.
- AMBRUSTER, D. A.; TILLMAN, M. D.; HUBBS, L.M. Limit of detection (LOD)/ limit of quantification (LOQ): Comparison of the empirical, and the statistical methods exemplified with GC-MS assay of abused drugs. **Clinical Chemistry**. v.40, n.7, p.1233-1238, 1994.
- ANDERSEN, M. L.; PALMA, B. D.; RUEDA, A. D.; TUFIK, S. The effects of acute cocaine administration in paradoxical sleep-deprived rats. **Addiction Biology**, v. 5, p. 417-420, 2000.
- ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. Distinct effects of paradoxical sleep deprivation and cocaine administration on sexual behavior in male rats. **Addict Biol**. v.7, p.251-253, 2002.
- ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. Effect of sleep deprivation on seizures induced by cocaine. **Sleep Suppl**. v.26, p.180, 2003.
- ANDERSEN, M. L.; BIGNOTTO, M.; TUFIK, S. Cocaine-induced genital reflexes during paradoxical sleep deprivation and recovery. **Physiology and Behavior**, v. 78, p. 255-259, 2003.
- ANDERSEN, M. L.; PERRY, J. C.; TUFIK, S. Acute cocaine effects in paradoxical sleep deprived male rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 29, p. 245-251, 2005.
- ANDERSEN, M. L.; MARTINS, P. J. F.; D'ALMEIDA, V.; BIGNOTTO, M.; TUFIK, S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. **Journal of Sleep Research**, v. 14, p. 83-90, 2005.
- ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. Does male sexual behavior require progesterone? **Brain Res Rev**. v.51, p.36-43, 2006.
- ANDERSEN, M. L.; MARTINS, R. C.; ALVARENGA, T. A.; ANTUNES, I. B.; PAPALE, L. A.; TUFIK, S. Progesterone reduces erectile dysfunction in sleep-deprived spontaneously hypertensive rats. **Reprod Biol Endocrinol**. v.5, p.7, 2007.
- ANDERSEN, M. L.; RIBEIRO, D. A.; BERGAMASCHI, C. T.; ALVARENGA, T. A.; SILVA, A.; ZAGER, A.; CAMPOS, R. R.; TUFIK, S. Distinct effects of acute and chronic sleep loss on DNA damage in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.33, p.562-567, 2009.
- ANDERSEN, M. L.; MATTOS, G.; MARTINS, R. C. S.; TUFIK, S. Effect of sleep deprivation on cocaine-induced convulsions in rats. **Sleep Science**, v. 3, p. 131-135, 2010.
- ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. **Animal models as ethical tools in biomedical research**. São Paulo: CLR Balieiro Editores, 2010a. v.1. 563 p.
- ANDERSEN, M. L.; PERRY, J. C.; BIGNOTTO, M.; TUFIK, S. Dopaminergic and noradrenergic drugs revert cocaine-induced erection in paradoxical sleep deprived rats. **Sleep Science**, v. 3, p. 69-73, 2010b.
- ANTUNES, I. B.; ANDERSEN, M. L.; BARACAT, E. C.; TUFIK, S. The effects of paradoxical sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. **Horm Behav**. v.49, p.433-440, 2006.
- ANDRIOLLO, O.; LARTIGUE-MATTEI, C.; CHABARD, J. L.; GALMIER, M. J.; BARGNOUX, H.; PETIT, J.; BERGER, J. A. Assay of m-chlorophenylpiperazine in plasma and brain of rat by capillary mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. v.533, p.215-223, 1990.
- ANSELONI, V. Z.; BRANDÃO, M. L. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. **Behavioural Pharmacology**, v.8, p.533-540, 1997.
- ASERINSKY, E.; KLEITMAN, N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. **Science**. v.118, n.3062, p.273-274, 1953.

- BAGDY, G.; SZEMEREDI, K.; HILL, J. L.; MURPHY, D. L. The serotonin agonist, M-chlorophenylpiperazine, markedly increases levels of plasma catecholamines in the conscious rat. **Neuropharmacology**. v.27, n.10, p.975-980, 1988.
- BAGDY, G.; SZEMEREDI, K.; KANYICKA, B.; MURPHY, D. L. Different serotonin receptors mediate blood pressure, heart rate, plasma catecholamine and prolactin responses to m-chlorophenylpiperazine in conscious rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.250, n.1, p.72-78, 1989.
- BANKSON, M. G.; CUNNINGHAM, K. A. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) as a unique model of serotonin receptor function and serotonin-dopamine interactions. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.297, n.3, p.846-852, 2001.
- BARROSO, M.; COSTA, S.; DIAS, M.; VIEIRA, D.N.; QUEIROZ, J.A.; LÓPEZ-RIVADULLA, M. Analysis of phenylpiperazine-like stimulants in human hair as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v.1217, n.40, p.6274-6280, 2010.
- BAUMANN, M. H.; AYESTAS, M. A.; DERSCH, C. M.; ROTHMAN, R. B. 1-(m-chlorophenyl) piperazine (*mCPP*) dissociates in vivo serotonin release from long-term serotonin depletion in rat brain. **Neuropsychopharmacology**. v.24, p.492-501, 2001.
- BECK, J.; MORGAN, P. A. Designer drug confusion: a focus on MDMA. **Journal of Drug Education**. v.16, n.3, p.287-302, 1986.
- BISHOP, S. C.; MCCORD, B. R.; GRATZ, S. R.; LOELIGER, J. R.; WITKOWSKI, M. R. Simultaneous separation of different types of amphetamine and piperazine designer drugs by capillary electrophoresis with a chiral selector. **Journal of Forensic Sciences**. v.50, n.2, p.326-335, 2005.
- BOSSONG, M. G.; VAN DIJK, J. P.; NIESINK, R. J. M. Methylone and *mCPP*, two new drugs of abuse? **Addiction biology**. v.10, n.4, p.321-323, 2005.
- BOSSONG, M. G.; BRUNT, T. M.; VAN DIJK, J. P.; RIGTER, S. M.; HOEK, J.; GOLDSCHMIDT, H. M.; NIESINK, R. J. *mCPP*: an undesired addition to the ecstasy market. **Journal of Psychopharmacol.** v.24, p.1395-1401, 2010.
- BOUTREL, B.; FRANCE, B.; HEN, R.; HAMON, M.; ADRIEN, J. Key role of 5-HT_{1B} receptors in the regulation of paradoxical sleep as evidenced in 5-HT_{1B} knockout mice. **J. Neurosci.** v.19, p.3204-3212, 1999.
- BRUINS, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. **J Chromatogr A**. v.794, p.345-357, 1998.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**. Brasília, 02 jun. 2003, seção 1.
- CANÃDAS, E. V. Toxicocinética. In: CALABUIG, J.A.G. **Medicina Legal y toxicologia**. 5ª ed. Barcelona: Masson. 1998. p.610-627.
- CACCIA, S.; CONTI, I.; NOTARNICOLA, A.; URSO, R. Lipophilicity and disposition of 1-aryl-piperazines in the rat. **Xenobiotica**. v.17, n.5, p.605-616, 1987.
- CACCIA, S.; GARATTINI, S. 1-arylpiperazines as active metabolites of (4-substituted aryl-1-piperazinyl)alkyl heterocyclic drugs. **Acta Pharmacologica Jugoslavica**. v.40, n.3, p.441-460, 1990.
- CACCIA, S.; BALLABIO, M.; SAMANIN, R.; ZANINI, M. G.; GARATTINI, S. *mCPP*, a central 5-HT agonist, is a metabolite of trazodone. **J Pharm Pharmacol** v.33, p.477-478, 1981.
- CALZAVARA, M.; ANDERSEN, M. L.; FUKUSHIRO, D. F.; LOPEZ, G. B.; ABÍLIO V. C.; TUFIK, S.; FRUSSA-FILHO, R. Sleep rebound attenuates context-dependent behavioural sensitization induced by amphetamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1277-1282, 2008.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of chromatography B**, v.689, n.1, p.175-180, 1997.
- CASTIGLIONI, S.; ZUCCATO, E.; CRISCI, E.; CHIABRANDO, C.; FANELLI, R.; BAGNATI, R. Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Chem**. v.78, n.24, p.8421-8429, 2006.

- CHOLERIS, E.; THOMAS, A. W.; KAVALIERS, M.; PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v.25, p.235-260, 2001.
- CHOLERTON, S.; DALY, A. K.; IDLE, J. R. The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.13, n.12, p.434-439, 1992.
- COWEN, P. J.; SARGENT, P. A.; WILLIAMS, C.; GOODALL, E. M.; ORLIKOV, A. B. Hypophagic, endocrine and subjective responses to m-chlorophenylpiperazine in healthy men and women. **Human Psychopharmacology**. v.10, n.5, p.385-391, 1995.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.49, p.171-176, 1994.
- DATTA, S. Cellular basis of pontine ponto – geniculo – occipital wave generation and modulation. **Cell. Mol. Neurobiol.** v.17, p.341-365, 1997.
- DEMENT, W.; KLEITMAN, N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol.**v.9, n. 4, p.673-679, 1957.
- DICKSON, A. J.; VORCE, S. P.; HOLLER, J. M.; LYONS, T. P. Detection of 1-Benzylpiperazine, 1-(3-Trifluoromethylphenyl)-piperazine, and 1-(3-Chlorophenyl)-piperazine in 3,4-Methylenedioxymethamphetamine-Positive Urine Samples. **Journal of Analytical Toxicology**. v.34, n.8, p.464-469, 2010.
- EMCDDA. Europol (2007) **Active Monitoring Report on a new psychoactive substance: 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP)** - Annex 1 Technical Information. 2007. Disponível em: <<http://www.emcdda.europa.eu/themes/new-drugs/early-warning>>. Acesso em: 09 mai. 2010.
- ERESHEFSKY, L.; RIESENMAN, C.; LAM, Y. M. F. Antidepressant drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2D6. **Clinical Pharmacokinetics**. v.29, n.1, p.10-19, 1995.
- ESCADA, M. S. C. S. **Métodos de análise de piperazinas em fluidos biológicos**. 2007. 189 f. Dissertação (Mestrado em Métodos Instrumentais e Controle de Qualidade Analítica). Departamento de Química – Universidade de Aveiro, Aveiro. 2007.
- EUROPOL. The European Police Office – The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (Europol-EMCDDA). **Joint Report on a new psychoactive substance: 1-benzylpiperazine (BZP)**. In accordance with Article 5 of Council Decision 2005/387/JHA on information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances. 2007. Disponível em: <<http://www.emcdda.europa.eu/?nnodeID=1346>>. Acesso em: 08 mai. 2010.
- EVERSON, C. A.; BERGMANN, B. M.; RECHTSCHAFFEN, A. Sleep deprivation in the rat. III. Total sleep deprivation. **Sleep**. v.12,p.13-21, 1989.
- EVERSON, C. A. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Phys**. v.289, R1054-63, 2005.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**. v.246, n.4926, p.61-71, 1989.
- FEUCHTL, A.; BAGLI, M.; STEPHAN, R.; FRAHNERT, C.; KOLSCH, H.; KUHN, K. U.; RAO, M. L. Pharmacokinetics of m-chlorophenylpiperazine after intravenous and oral administration in healthy male volunteers: implication for the pharmacodynamic profile. **Pharmacopsychiatry**. v.37, n.4, p.180-188, 2004.
- FRANC, J. E.; DUNCAN, G. F.; FARMEN, R. H.; PITTMAN, K. A. High-performance liquid chromatography method for determination of nefazodone and its metabolites in human plasma using laboratory robotics. **Journal of Chromatography**. v.570, n.1, p.129-138, 1991.
- FUKUSHIRO, D. F.; CALZAVARA, M.; TROMBIN, T. F.; LOPEZ, G. B.; ABÍLIO V. C.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S.; FRUSSA FILHO, R. Effects of environmental enrichment and paradoxical sleep deprivation on open-field behavior of amphetamine-treated mice. **Physiology & Behavior**, v. 92, p. 773-779, 2007.

- FULLER, R. W.; SHODDY, H. D.; MASON, N. R.; OWEN, J. E. Disposition and pharmacological effects of m-chlorophenylpiperazine in rats. **Neuropharmacology**. v.20, n.2, p.155-162, 1981.
- GEE, P.; RICHARDSON, S.; WOLTERSDORF, W.; MOORE, G. Toxic effects of BZP-based herbal party pills in humans: a prospective study in Christchurch, New Zealand. **New Zealand Medical Journal**. v.118, n.1227, p.1-10, 2005.
- GERMINE, M.; GODDARD, A.W.; SHOLOMSKAS, D.E.; WOODS, S.W.; CHARNEY, D.S.; HENINGER, G.R. Response to meta-chlorophenylpiperazine in panic disorder patients and healthy subjects: Influence of reduction in intravenous dosage. **Psychiatry Research**. v.54, n.2, p.115-133, 1994.
- GIBSON, E. L.; BARNFIELD, A. M. C.; CURZON, G. Evidence that *mCPP*-induced anxiety in the plus-maze is mediated by postsynaptic 5-HT(2C) receptors but not by sympathomimetic effects. **Neuropharmacology**. v.33, n.3-4, p.457-465, 1994.
- GIJSMAN, H. J.; VAN GERVEN, J. M. A.; TIELEMAN, M. C.; SCHOEMAKER, R. C.; PIETERS, M. S. M.; FERRARI, M. D.; COHEN, A. F.; VAN KEMPEN, G. M. J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of oral and intravenous meta-chlorophenylpiperazine in healthy volunteers. **Journal of Clinical Psychopharmacology**. v.18, n.4, p.289-295, 1998.
- GOBBI, M.; MOIA, M.; PIRONA, L.; CEGLIA, I.; REYES-PARADA, M.; SCORZA, C.; MENNINI, T. p-Methylthioamphetamine and 1-(m-chlorophenyl)piperazine, two non-neurotoxic 5-HT releasers in vivo, differ from neurotoxic amphetamine derivatives in their mode of action at 5-HT nerve endings in vitro. **Journal of Neurochemistry**. v.82, n.6, p.1435-1443, 2002.
- GODOI, F. R.; OLIVEIRA, M. G.; TUFIK, S. Effects of paradoxal sleep deprivation on the performance of rats in a model of visual attention. **Behav Brain Res**. v.165, p.138-145, 2005.
- GROSSEN, N. E.; KELLY, M. J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.81, p.307-310, 1972.
- HAMIK, A.; PEROUTKA, S. J. 1-(m-Chlorophenyl)piperazine (*mCPP*) interactions with neurotransmitter receptors in the human brain. **Biological Psychiatry**. v.25, n.5, p.569-575, 1989.
- HOYER, D. 5-Hydroxytryptamine receptors and effector coupling mechanisms in peripheral tissues. In: FOZARD, J.R. **The peripheral actions of 5-hydroxytryptamine**. Oxford: Oxford University Press. 1989, p. 72-99.
- HOLLAND, M. L.; HEEBNER, E. T. High-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection for the determination of etoperidone and two active metabolites, 5-(1-hydroxyethyl)etoperidone and 1-(3-chlorophenyl)piperazine, in plasma. **Journal of Chromatography**. v.567, n.2, p.433-440, 1991.
- HOSHINO, K. **Perturbações motoras agudas induzidas pela lesão eletrolítica da formação reticular mesencefálica em ratos privados de sono paradoxal**. Estudo de seus parâmetros e sua natureza [Tese Doutorado]. Botucatu: Universidade Estadual de São Paulo; 1972.
- HUANG, X.; MARONA-LEWICKA, D.; NICHOLS D. E. p-Methylthioamphetamine is a potent new non-neurotoxic serotoninreleasing agent. **Eur. J. Pharmacol.** v. 229, p.31-38, 1992.
- HUANG, M.; DAI J, MELTZER HY. 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptor stimulation are differentially involved in the cortical dopamine efflux-Studied in 5-HT(2A) and 5-HT(2C) genetic mutant mice. **Eur J Pharmacol.** v.652, n.1-3, p.40-45, 2011.
- IBER, C.; ANCOLI-ISRAEL, S.; CHESSON, A.; QUAN, S. F. (Eds.). (2007). **The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: Rules, terminology and technical specifications** (1st ed.). Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine.
- IRWIN, M.; MCCLINTIK, J.; COSTLOW, C.; FORTNER, M.; WHITE, J.; GILLIN, J. C. Partial night sleep deprivation reduces natural killer and cellular immune responses in humans. **FASEB J.** v.10, p.643-653, 1996.
- JOHANSON, C.E.; ROEHRS, T.; SCHUH, K.; WARBASSE, L. The effects of cocaine on mood and sleep in cocaine-dependent males. **Exp. Clin. Psychopharmacol.** v.7, p.338-346, 1999.
- JÖNSSON, J. A.; ANDERSSON, M.; MELANDER, C.; NORBERG, J.; THORDARSON, E.; MATHIASSEN, L. Automated liquid membrane extraction for high-performance liquid chromatography of Ropivacaine metabolites in urine. **Journal of Chromatography A**. v.870, n.1-2, p.151-157, 2000.

- JÖNSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. Membrane-based techniques for sample enrichment. **Journal of Chromatography A**. v.902, n.1, p.205-225, 2000.
- JONES, G. Postmortem toxicology. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. editors. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**, 3rd ed. London: Pharmaceutical Press, 2004, p. 94-108.
- JOUVET, M.; MICHEL, F.; COURJON, J. Bringing into play of two mechanisms with different electroencephalographic expression during physiological sleep in the cat. **C R Hebd Seances Acad Sci**. v.248, n.21, p.3043-3045, 1959.
- JOUVET, M. The role of monoamines and acetylcholine containing neurons in the regulation of sleep – waking cycle. **Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.** v.64, p.166-307, 1972.
- KAHAN, V.; RIBEIRO, D. A.; ANDERSEN, M. L.; ALVARENGA, T. A.; TUFIK S. Sleep loss induces differential response related to genotoxicity in multiple organs of three different mice strains. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. v.107, p.598-602, 2010.
- KAHN, R. S.; ASNIS, G. M.; WETZLER, S.; VAN PRAAG, H. M. Neuroendocrine evidence for serotonin receptor hypersensitivity in panic disorder. **Psychopharmacology**. v.96, n.3, p.360-364, 1988.
- KAHN, R. S.; WETZLER, S.; ASNIS, G. M.; KLING, M. A.; SUCKOW, R. F.; VAN PRAAG, H. M. Effects of m-chlorophenylpiperazine in normal subjects: A dose-response study. **Psychopharmacology**. v.100, n.3, p.339-344, 1990.
- KAHN, R. S.; WETZLER, S. m-Chlorophenylpiperazine as a probe of serotonin function. **Biological Psychiatry**. v.30, n.11, p.1139-1166, 1991.
- KALANT, H. The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. **Canadian Medical Association Journal**. v.165, n.7, p.917-928, 2001.
- KILPATRICK, G. J.; JONES, B. J.; TYERS, M. B. Identification and distribution of 5HT-3 receptors in rat brain using radioligand binding. **Nature**. v.330, n.6150, p.746-748, 1987.
- KLAASSEN, T.; HO PIAN, K. L.; WESTENBERG, H. G. M.; DEN BOER, J. A.; VAN PRAAG, H. M. Serotonin syndrome after challenge with the 5-HT agonist meta-chlorophenylpiperazine. **Psychiatry Research**. v.79, n.3, p.207-212, 1998.
- KLEINLOGEL H. Sleep in various species of laboratory animals. **Neuropsychobiology**. v.9, p. 174-177, 1983.
- KORFF, S.; STEIN, D. J.; HARVEY, B. H. Stereotypic behaviour in the deer mouse: pharmacological validation and relevance for obsessive compulsive disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.32, n.2, p.348-355, 2008.
- KOVALEVA, J.; IR, E. D.; PAEPE, P. D.; VERSTRAETE, A. Acute Chlorophenylpiperazine Overdose: A Case Report and Review of the Literature. **Therapeutic Drug Monitoring**. v.30, n.3, p.394-398, 2008.
- KRYSTAL, J. H.; SEIBYL, J. P.; PRICE, L. H.; WOODS, S. W.; HENINGER, G. R.; AGHAJANIAN, G. K.; CHARNEY, D. S. m-Chlorophenylpiperazine effects in neuroleptic-free schizophrenic patients. **Archives of General Psychiatry**. v.50, n.8, p.624-635, 1993.
- KRIEGER J. Respiratory physiology: Breathing in normal subjects. In: Kryger M, Roth T, Dement WC, editors. **Principles and Practice of Sleep Medicine**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2000. pp. 229–241.
- LANARO, R.; COSTA, J. L.; ZANOLLI FILHO, L. A.; CAZENAVE, S. O. S. Identificação química da clorofenilpiperazina (CPP) em comprimidos apreendidos. **Química Nova**. v.33, n.3, p.725-729, 2010.
- LEHOTAY, S. J.; DE KOK, A.; HIEMSTRA, M.; VAN BODEGRAVEN, P. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **J AOAC Int**. v.88, n.2, p.595-614, 2005.
- LECOMPTE, Y.; EVRARD, I.; ARDITTI, J. Metachlorophenylpiperazine (*mCPP*): a new designer drug. **Thérapie**. v.61, n.6, p.523-530, 2006.

- LISTER, R. G. Ethological-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacological Therapy**. v.46, p.321-340, 1990.
- LOGAN, B. K.; COSTANTINO, A. G.; RIEDERS, E. F.; SANDERS, D. Trazodone, meta-chlorophenylpiperazine (an hallucinogenic drug and trazodone metabolite), and the hallucinogen trifluoromethylphenylpiperazine cross-react with the EMIT(®)II ecstasy immunoassay in urine. **Journal of Analytical Toxicology**. v.34, n.9, p.587-589, 2010.
- LOOMIS, A. L.; HARVEY, E. N.; HOBART, G. Cerebral states during sleep as studied by human brain potentials. **J Exp Psychol**. v.21, p.127-144, 1937.
- LURIE, I. S. Capillary electrophoresis of illicit drugs seizures. **Forensic Science International**. v.92, n.2, p.125-136, 1998.
- MAES, M.; VAN WEST, D.; DE VOS, N.; WESTENBERG, H.; VAN HUNSEL, F.; HENDRIKS, D.; COSYNS, P.; SCHARPÉ, S. Lower baseline plasma cortisol and prolactin together with increased body temperature and higher *mCPP*-induced cortisol responses in men with pedophilia. **Neuropsychopharmacology**. v.24, n.1, p.37-46, 2001.
- MAVANJI, V.; METI, B.; DATTA, S. Sleep-wake effects of meta-chlorophenyl piperazine and mianserin in the behaviorally depressed rat. **European Journal of Pharmacology**. v.455, p.35-41, 2002.
- MILLER, R. L.; DEVANE, C. L. Analysis of trazodone and m-chlorophenylpiperazine in plasma and brain tissue by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. v.374, n.2, p.388-393, 1986.
- MOKROSZ, J. L.; PIETRASIEWICZ, M.; DUSZYIISKA, B.; CEGLA, M. T. Structure-Activity Relationship Studies of Central Nervous System Agents. 5.Effect of the Hydrocarbon Chain on the Affinity of 4-Substituted 1-(3-Chlorophenyl)piperazines for 5-HT_{1A} Receptor Site. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.35, n.13, p.2369-2374, 1992.
- MONGEAU, R.; MARTIN, C. B.; CHEVARIN, C.; MALDONADO, R.; HAMON, M.; ROBLEDO, P.; LANFUMEY, L. 5-HT_{2C} receptor activation prevents stress-induced enhancement of brain 5-HT turnover and extracellular levels in the mouse brain: modulation by chronic paroxetine treatment. **J Neurochem**. v.115, n.2, p.438-449, 2010.
- MONTI, J. M.; MONTI, D. Functional role of serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor in the regulation of REM sleep. In: MALLICK, B. N.; INOUE, S. (Eds.), **Rapid Eye Movement Sleep**. Narosa Publishing House, New Delhi, pp. 142-52. 1999.
- MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. (Ed.). **Ciências Farmacêuticas: Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.142.
- MOREIRA, K. M.; HIPÓLIDE, D. C.; NOBREGA, J. N.; BUENO, O. F. A.; TUFIK, S.; OLIVEIRA, G. M. Déficits in avoidance responding after paradoxal sleep deprivation are not associated with altered [3H]pirenzepine binding to M₁ muscarinic receptors in rat brain. **Brain Res**. v.977, p.31-37, 2003.
- MOYA, P. R.; FOX, M. A.; JENSEN, C. L.; LAPORTE, J. L.; FRENCH, H. T.; WENDLAND, J. R.; MURPHY, D. L. Altered 5-HT_{2C} receptor agonist-induced responses and 5-HT_{2C} receptor RNA editing in the amygdala of serotonin transporter knockout mice. **BMC Pharmacol**. v.11, n.3, 2011.
- MULLEER, E. A.; MURPHY, D. L.; SUNDERLAND, T. Further studies of the putative serotonin agonist, m-chlorophenylpiperazine: Evidence for a serotonin receptor mediated mechanism of action in humans. **Psychopharmacology**. v.89, n.3, p.388-391, 1986.
- MURPHY, D.L.; MULLEER, E.A.; HILL, J.L.; TOLLIVER, T.J.; JACOBSEN, F.M. Comparative anxiogenic, neuroendocrine, and other physiologic effects of m-chlorophenylpiperazine given intravenously or orally to healthy volunteers. **Psychopharmacology**. v.98, n.2, p.275-282, 1989.
- OBID - Observatório Brasileiro de Informações Sobre Drogas. **Teste de Hipóteses e P-valor**. Disponível em: <http://www.obid.senad.gov.br/portais/OBID/conteudo/index.php?id_conteudo=11443&rastro=PESQUISAS+E+ESTAT%C3%8DSTICAS%2FConceitos+Estat%C3%ADsticos/Teste+de+Hip%C3%B3teses+e+P-valor>. Acessado em: 25 set 2012.
- OEDT (Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência). **Relatório Anual sobre a Evolução do Fenômeno da Droga na União Européia**. 2001. Disponível em:

- <http://ar2001.emcdda.europa.eu/multimedia/Annual_Report_2001//ar01_pt.pdf>. Acesso em: 11 mai. 2010.
- OEDT (Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência). **Relatório Anual sobre a Evolução do fenômeno da droga na União Européia e na Noruega**. 2004. Disponível em: <<http://ar2004.emcdda.europa.eu/pt/home-pt.html>>. Acesso em: 11 mai. 2010.
- OEDT (Observatório Europeu da Droga e da Toxicodependência). **Relatório Anual sobre a Evolução do Fenômeno da Droga na União Européia**. 2006. In: Anfetaminas, ecstasy e outras drogas psicotrópicas. Disponível em: <<http://ar2006.emcdda.europa.eu/pt/page008-pt.html>>. Acesso em: 10 mai. 2010.
- OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- OTANI, K.; MIHARA, K.; YASUI, N.; ISHIDA, M.; KONDO, T.; TOKINAGA, N.; OHKUBO, T.; OSANAI, T.; SUGAWARA, K.; KANEKO, S. Plasma concentrations of trazodone and m-chlorophenylpiperazine and steady state can be predicted from those after an initial dose of trazodone. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v.21, n.1, p.239-244, 1997.
- PALMA, B. D.; GABRIEL JR, A.; COLUGNATI, F. A.; TUFIK, S. Effects of sleep deprivation on the development of autoimmune disease in a experimental model of systemic Lupus Erythematosus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.291, p.1527-1532, 2006.
- PAPALE, L. A.; ANDERSEN, M. L.; ANTUNES, I. B.; ALVARENGA, T. A.; TUFIK, S. Sleep pattern in rats under different stress modalities. **Brain Res**. v.1060, p.47-54, 2005.
- PATEL, B. N.; SHARMA, N.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV, P. S. High throughput and sensitive determination of trazodone and its primary metabolite, m-chlorophenylpiperazine, in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. v.871, n.1, p.44-54, 2008.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**. v.24, n.1, p.68-76, 2001.
- RAJKUMAR, R.; PANDEY, D. K.; MAHESH, R.; RADHA, R. 1-(m-Chlorophenyl)piperazine induces depressogenic-like behaviour in rodents by stimulating the neuronal 5-HT(2A) receptors: proposal of a modified rodent antidepressant assay. **Eur J Pharmacol**. v.608, n.1-3, p.32-41, 2009.
- RECHTSCHAFFEN, A.; KALES, A. **A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Subjects**. Brain Information Service/Brain Research Institute, University of California Los Angeles, Los Angeles, 1968.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RODGERS, R. J.; COLE, J. C. **The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology**. In S. J. Cooper; C. A. Hendrie (Orgs.), *Ethology and psychopharmacology*. New York: John Wiley and Sons. p. 9-43, 1994.
- ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; FRANCO, M. F.; SANVIDO, G.; SCHWAB, N. V.; LANARO, R.; COSTA, J. L.; SABINO, B. D.; BUENO, M. I.; DE SA, G. F.; DARODA, R. J.; DE SOUZA, V.; EBERLIN, M. N. Chemical profile of meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) in ecstasy tablets by easy ambient sonic-spray ionization, X-ray fluorescence, ion mobility mass spectrometry and NMR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.400, n.9, p.3053-3064, 2011.
- ROSENBERG, R.S.; BERGMANN, B.M.; RECHTSCHAFFEN, A. Variations in slow wave activity during sleep in the rat. **Physiol Behav**. v.17, n.6, p.931-938, 1976.
- ROTZINGER, S.; FANG, J.; COUTTS, R. T.; BAKER, G. B. Human CYP2D6 and Metabolism of m-Chlorophenylpiperazine. **Biological Psychiatry**. v.44, n.11, p.1185-1191, 1998.
- RUIZ, F. S.; ANDERSEN, M. L.; ZAGER, A.; MARTINS, R. C. S.; TUFIK, S. Sleep deprivation reduces the lymphocyte count in a non-obese mouse model of type 1 diabetes mellitus. **Braz J Med Biol Res**. v.40, p.633-637, 2007.

- SAMANIN, R.; MENNINI, T.; FERRARIS, A.; BENDOTTI, C.; BORSINI, F.; GARATTINI, S. m-Chlorophenylpiperazine: A central serotonin agonist causing powerful anorexia in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v.308, n.2, p.159-163, 1979.
- SANTANA, M. M. P.; SOUZA, M. F.; CUNHA, R. L. 1-(3-Clorofenil) Piperazina (*mCPP*): Uma Nova Droga Sintética Ilegal no Brasil. **Prova Material**. v.1, n.12, p.23-26, 2006.
- SCHÜRENKAMP, J.; BEIKE, J.; PFEIFFER, H.; KÖHLER, H. Separation of positional CPP isomers by chiral HPLC-DAD of seized tablets. **International Journal of Legal Medicine**. v.125, n.1, p.95-99, 2011.
- SHEN, W. W. Cytochrome P450 monooxygenase and inter-actions of psychotropic drugs: A five year update. **International Journal of Psychiatry Medicine**. v.25, n.3, p.277-290, 1995.
- SILVA, R. H.; ABÍLIO, V. C.; TAKATSU, A. L.; KAMEDA, S. R.; GRASSL, C.; CHEHIN, A. B.; MEDRANO, W. A.; CALZAVARA, M. B.; ANDERSEN, M. L.; MACHADO, R. B.; CARVALHO, R. C.; RIBEIRO, R. A.; TUFIK, S.; FRUSSA FILHO, R. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacology**, v. 46, p. 895-903, 2004.
- SMITH, T. M.; SUCKOW, R. F. Trazodone and m-chlorophenylpiperazine: concentration in brain and receptor activity in region in the brain associated with anxiety. **Neuropharmacology**. v.24, n.11, p.1067-1071, 1985.
- STAACK, R. F.; MAURER, H. H. Piperazine-derived designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (*mCPP*): GC-MS studies on its metabolism and its toxicological detection in rat urine including analytical differentiation from its precursor drugs trazodone and nefazodone. **Journal of Analytical Toxicology**. v.27, n.8, p.560-568, 2003.
- STAACK, R. F.; MAURER, H. H. Metabolism of designer drugs of abuse. **Current Drug Metabolism**. v.6, p.259-274, 2005.
- STAACK, R. F.; PAUL, L. D.; SCHMID, D.; ROIDER, G.; ROLFET, B. Proof of a 1-(3-chlorophenyl)piperazine (*mCPP*) intake: use as adulterant of cocaine resulting in drug-drug interactions? **Journal of Chromatography B**. v.855, n.2, p.127-133, 2007.
- STANASZEK, R.; LECHOWICZ, W. Determination of trazodone and its metabolite 1-(3-chlorophenyl)piperazine (*mCPP*) in hair by the high performance liquid chromatographymethod coupled with mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). **Problems of Forensic Sciences**. v.66, p.131-139, 2006.
- STANASZEK, R.; ZUBA, D. 1-(3-chlorophenyl)piperazine (*mCPP*) – A new designer drug that is still a legal substance. **Problems of Forensic Sciences**. v.66, p.220-228, 2006.
- SUCHECKI, D.; TIBA, P. A.; TUFIK, S. Hormonal and behavioural responses of paradoxical sleep-deprived rats to the elevated plus maze. **J Neuroendocrinol**. v.14, p.549-554, 2002.
- SUCKOW, R. F.; COOPER, T. B.; KAHN, R. S. High-performance liquid chromatographic method for the analysis of plasma m-chlorophenylpiperazine. **Journal of Chromatography**. v.528, n.1, p.228-234, 1990.
- TANCER, M.; JOHANSON, C. E. The subjective effects of MDMA and *mCPP* in moderate MDMA users. **Drug Alcohol Dependence**. v.65, n.1, p.97-101, 2001.
- TANCER, M.; JOHANSON, C. E. Reinforcing, subjective, and physiological effects of MDMA in humans: a comparison with d-amphetamine and *mCPP*. **Drug Alcohol Dependence**. v.72, n.1, p.33-44, 2003.
- TASALI, E.; LEPROULT, R.; EHRMANN, D. A.; VAN CAUTER, E. Slow-wave sleep and the risk of type 2 diabetes in humans. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.105, p.1044-1049, 2008.
- THOMAS, D. R.; GAGER, T. L.; HOLLAND, V.; BROWN, A. M.; WOOD, M. D. m-Chlorophenylpiperazine (*mCPP*) is an antagonist at the cloned human 5-HT_{2B} receptor. **NeuroReport**. v.7, n.9, p.1457-1460, 1996.
- TIMO-IARIA, C. O sono. **Ciência Hoje**. v.4, p.66-76, 1985.
- TIMO-IARIA, C.; NEGRÃO, N.; SCHMIDEK, W. R.; HOSHINO, K.; MENEZES, C. L.; ROCHA, T. L. Phases and states of sleep in the rat. **Physiol Behav**. v.5, p.1057-1062, 1970.

- TRACHSEL, L.; TOBLER, I.; BÓRBELY, A. A. Sleep regulation in rats: effects of sleep deprivation, light and circadian phase. **Am. J. Physiol.** v.251, p.1037-1044, 1986.
- TREIT, D.; FUNDYTUS, M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.31, p.959-962, 1989.
- TUFIK, S.; LINDSEY, C. J.; CARLINI, E. A. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain. **Pharmacology** v.6; p.95-108, 1978.
- TUFIK S. Changes of response to dopaminergic drugs in rats submitted to REM sleep deprivation. **Psychopharmacology** v.72, p.257-260, 1981.
- TUFIK, S.; DE LUCA NATHAN, C.; NEUMANN, B.; HIPÓLIDE, D. C.; LOBO, L. L.; DE MEDEIROS, R.; TRONCONE, L. R.; BRAZ, S.; SUCHECKI, D. Effects of stress on drug-induced yawning: constant vs. intermittent stress. **Physiol Behav.** v.58, p.181-184, 1995.
- University of Bristol, School of Chemistry. **Electrospray Ionisation (ESI)**. Mass Spectrometry Resource. Disponível em: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>>. Atualizado em: 20 Jan 2004. Acessado em: 24 Set 2012.
- UNODC, **World Drug Report 2010** (United Nations Publication, Sales No. E.10.XI.13).
- VAN HOUT, M. W. J.; NIEDERLANDER, H. A. G.; DE ZEEUW, R. A.; DE JONG, G. J.; Chapter 1 New developments in integrated sample preparation for bioanalysis. In: **Handbook of Analytical Separations**. v.4:1-44, 2003. Bioanalytical Separations Pharmaceuticals/Veterinary - Toxicology/Metabolism (Ed. I. Wilson)
- VATASSERY, G. T.; HOLDEN, L. A.; HAZEL, D. K.; DYSKEN, M. W. Determination of trazodone and its metabolite, 1-m-chlorophenyl-piperazine, in human plasma and red blood cell samples by HPLC. **Clinical Biochemistry**. v.30, n.2, p.149-153, 1997.
- VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J.; MONROY, E.; BEYER, C.; CANCHOLA, E. Effect of REM sleep deprivation on the lordosis response induced by gonadal steroids in ovariectomized rats. **Physiol Behav.** v.32, p.91-94, 1984.
- VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J.; DOMINGUEZ-SALAZAR, E.; CORTES-BARBERENA, E.; NAJERA-MEDICA, O.; RETANA-MARQUEZ, S.; RODRIGUEZ-AGUILERA, E.; JIMÉNEZ-ANGUIANO, A.; CORTES-MARTINEZ, L.; ORTIZ-MUÑIZ, R. Differential effects of rapid eye movement sleep deprivation and immobilization stress on blood lymphocytes subsets in rats. **Neuroimmunomodulation**. v.11, p.261-267, 2004.
- VERDONK, M. L.; VOOGD, J. W.; KANTERS, J. A.; KROON, J.; DEN BESTEN, R.; BRANDSMA, L.; LEYSEN, D.; KELDER, J. Structure and serotonin 5-HT_{2C} receptor Activity of *ortho* and *meta*-substituted phenylpiperazines. **Acta Crystallographica B**. v.53, n.6, p.976-983, 1997.
- VOGEL, G. W. A review of REM sleep deprivation. **Arch Gen Psychiatry**. v.32, p.749-761, 1975.
- VORCE, S. P.; HOLLER, J. M.; LEVINE, B.; PAST, M. R. Detection of 1-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazine in urine analysis specimens using GC-MS and LC-ESI-MS. **Journal of Analytical Toxicology**. v.32, n.6, p.444-450, 2008.
- WALSH, A. E. S.; SMITH, K. A.; OLDMAN, A. D.; WILLIAMS, C.; GOODALL, E. M.; COWEN, P. J. m-Chlorophenylpiperazine decreases food intake in a test meal. **Psychopharmacology**. v.116, n.1, p.120-122, 1994.
- WOOD, M.; CHAUBEY, M.; ATKINSON, P.; THOMAS, D. R. Antagonist activity of meta-chlorophenylpiperazine and partial agonist activity of 8-OH-DPAT at the 5-HT (7) receptor. **European Journal of Pharmacology**. v.396, n.1, p.1-8, 2000.
- YAROSH, H. L.; KATZ, E. B.; COOP, A.; FANTEGROSSI, W. E. MDMA-like behavioral effects of N-substituted piperazines in the mouse. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v.88, p.18-27, 2007.
- ZAGER, A.; ANDERSEN, M. L.; RUIZ, F. S.; ANTUNES, I. B.; TUFIK, S. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** v.293: R504-509, 2007.
- ZAGER, A.; ANDERSEN, M. L.; LIMA, M. M. S.; REKSIDLER, A. B.; MACHADO, R. B.; TUFIK, S. Modulation of sickness behavior by sleep: The role of neurochemical and neuroinflammatory pathways in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v.19, p.589-602, 2009.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 11 de fevereiro de 2011.
CEP 1520/10

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) MONICA LEVY ANDERSEN

Co-Investigadores: Daniel Ninello Polese; Marina Franco Maggi Tavares; Monica Levy Andersen (orientadora)

Disciplina/Departamento: Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação simultânea de meta-clorofenilpiperazina (m-CPP) e seus isômeros em fluidos biológicos, por eletroforese capilar (CE-UV e CE-MS)".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental agudo em camundongos (n=130).

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Desenvolver uma metodologia analítica de identificação e quantificação de o-CPP, m-CPP e p-CPP, assim como avaliar os efeitos comportamentais em camundongos tratados com a droga.

RESUMO: Serão utilizados camundongos adultos da linhagem C57BL/6J provenientes do CEDEME da Unifesp, que serão distribuídos em: controle e administração aguda das clofenilpiperazines (CPPs). A originalidade do projeto está no objetivo de identificar e quantificar a presença de 1-(2-clorofenil)piperazine (o-CPP), 1-(3-clorofenil)piperazine(m-CPP) e 1-(4-clorofenil)piperazine (p-CPP) em plasma de camundongos submetidos ao tratamento agudo com a droga, por eletroforese capilar com detectores UV-Visível e espectrometria de massas, respectivamente CE-UV e CE-MS. O método a ser desenvolvido otimizará as condições instrumentais da técnica analítica e quanto à pré-concentração no preparo da amostra (extração de solventes). Por fim, o método será validado conforme o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Após a metodologia analítica ser validada, ela dará suporte a estudos toxicocinéticos e de efeitos comportamentais dos isômeros das CPPs em animais submetidos ao tratamento com as drogas..

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos que serão realizados em cooperação com o Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP..

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP/AFIP DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA E BIOLOGIA DO SONO DA UNIFESP.

CRONOGRAMA: 24 Meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 6/2/2012 e 5/2/2013.

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (continuação).

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

1520/10

Anexo 2. Recebimento do parecer de aprovação pela USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/43/2010

Recebemos o parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, referente ao projeto “Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação simultânea de meta-clorofenilpiperazina (m-CPP) e seus isômeros em fluidos biológicos, por eletroforese capilar (CE-UV e CE-MS)”, de responsabilidade dos pesquisadores Monica Levy Andersen, Marina Franco Maggi Tavares e Daniel Ninello Polesel, o qual ficará arquivado nesta secretaria.

São Paulo, 08 de abril de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Anexo 3. Adendo enviado ao CEP da UNIFESP.

Universidade Federal de São Paulo
Departamento de Psicobiologia
Escola Paulista de Medicina

Prezado(a) Parecerista do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/HSP,

Em resposta as considerações elaboradas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo (UNIFESP/HSP), segue abaixo a justificativa para aqueles questionamentos:

Ref: Adendo para alteração do número total de camundongos utilizados

Identificação CEP: **1520/10**

Título do estudo: Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação simultânea de meta-clorofenilpiperazina (m-CPP) e seus isômeros em fluidos biológicos, por eletroforese capilar (CE-UV e CE-MS)

- Justificar a inclusão de grande quantidade de animais. Justificar porque foram utilizados animais sem previa aprovação da CEUA (comitê de ética de uso de animais).

Em dezembro de 2011, 160 camundongos da linhagem Swiss, machos, e com 60 dias de vida foram colocados a disposição por pesquisadores do Departamento de Psicobiologia da UNIFESP. A solução para o problema foi à utilização destes animais para o projeto em questão, inserindo-os em novos grupos experimentais e assim, reforçar os resultados já obtidos anteriormente (CEP #1520/10 - tese de Mestrado). Nossa intenção foi evitar o descarte de animais e aproveitá-los pois eles já haviam sido produzidos para a pesquisa.

Os objetivos adicionados aos inicialmente propostos foram realizar a avaliação dos efeitos dos isômeros orto, meta e para das clorofenilpiperazinas em animais privados de sono paradoxal, também o rebote de sono paradoxal associado à administração de meta-clorofenilpiperazina (m-CPP) e seus respectivos grupos controles. O objetivo em se estudar m-CPP deve-se ao seu consumo aumentado entre os jovens no Brasil. Fato este comprovado através da quantidade crescente de apreensões dos comprimidos com o fármaco. Um fato que corrobora esta afirmação foi que em 2006, forças policiais europeias apreenderam cerca de 823.000 comprimidos de piperazinas. No território brasileiro, a maior apreensão registrada foi realizada em 2008, quando uma carga de 21.145 comprimidos que tinham como destino o mercado europeu, foram interceptados pela Polícia Federal no aeroporto Internacional Augusto Severo em Natal/RN.

Rua Botucatu, 862 - 1º andar - CEP 04023-062 - São Paulo/SP - Brasil
Tel.: (+55) (11) 2149.0155 - FAX (+55) (11) 5572.5092

Anexo 3. Adendo enviado ao CEP da UNIFESP (continuação).

Universidade Federal de São Paulo
Departamento de Psicobiologia
Escola Paulista de Medicina

- Relatar quais foram os procedimentos cujos animais foram submetidos, e qual foi a origem e como foram mantidos

Os novos animais foram distribuídos em dois tipos de experimentos: 1) avaliação dos efeitos dos isômeros das clorofenilpiperazinas em animais privados de sono paradoxal; 2) estudo de rebote de sono paradoxal associado à administração de m-CPP. Manteve-se o n de 10 animais/grupo para obtenção de resultados estatísticos significativos e necessários para a publicação científica. Estes experimentos mimetizam a situação de um jovem que após um dia de estudo/trabalho se priva de sono quando vai a festas noturnas associadas à ingestão de comprimidos estimulantes como a m-CPP.

No primeiro experimento os camundongos foram submetidos à privação de sono paradoxal através do método das plataformas múltiplas durante 24 ou 48 horas. Após este período de privação de sono os animais foram desafiados com a administração das clorofenilpiperazinas para então serem submetidos aos testes comportamentais (campo aberto e labirinto em cruz elevado).

No segundo experimento os animais que entraram no grupo rebote de sono paradoxal eram inicialmente privados de sono pelo período de 24 ou de 48 horas, quando então foi realizada a administração das clorofenilpiperazinas por via intraperitoneal. A partir deste momento, os animais eram colocados em suas gaiolas moradias iniciais para que pudessem dormir e ter o rebote de sono paradoxal em dois tempos (24 ou 48 horas) para após este período serem submetidos aos testes comportamentais de atividade locomotora e ansiedade. Ressalta-se que estes experimentos de privação de sono e a investigação dos efeitos do m-CPP já foram previamente aprovados pelo CEP (#1520/10).

Coloco-me à disposição para prestar eventuais esclarecimentos.
Atenciosamente,

São Paulo, 02 de maio de 2012

Pós-Graduando: DANIEL NINELLO POLESEL
Pesquisador Principal: MONICA LEVY ANDERSEN
Disciplina/Departamento: Medicina e Biologia do Sono

Rua Botucatu, 862 - 1º andar - CEP 04023-062 - São Paulo/SP - Brasil
Tel.: (+55) (11) 2149.0155 - FAX (+55) (11) 5572.5092

Anexo 4. Aprovação do adendo pelo CEP da UNIFESP.

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 18 de maio de 2012

CEP Nº **1520/10**

CONEP Nº:

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): MONICA LEVY ANDERSEN

Disciplina/Departamento: Medicina e Biologia do Sono

Título do estudo: Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação simultânea de meta-clorofenilpiperazina (m-CPP) e seus isômeros em fluidos biológicos, por eletroforese capilar (CE-UV e CE-MS)

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU E APROVOU o(a) Adendo para alteração do número total de camundongos utilizados do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo