

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação farmacocinética do extrato bruto e de metabólitos secundários
das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Juliana de Carvalho da Costa

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Co-orientador: Prof. Dr. Hartmut Derendorf

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 19/04/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RESUMO

Da Costa, J.C. **Avaliação farmacocinética do extrato bruto e de metabólitos secundários das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.** 2016. 114 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Copaifera langsdorffii Desf., popularmente conhecida como “copaíba”, distribui-se abundantemente no cerrado brasileiro, sendo que diversas atividades biológicas já foram descritas na literatura para o seu oleorresina. Contudo, nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem estudando as partes aéreas desta espécie e verificou-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* apresentava atividade antilitiásica. Com a intenção de descobrir quais são os compostos relacionados a esta atividade, foi realizado o estudo fitoquímico das folhas. Com o auxílio de análises cromatográficas foi possível verificar o perfil de cada fração e, assim, escolher as mais promissoras para isolamento de compostos. A partir da fração em acetato de etila obtiveram-se os flavonoides quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) e canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina), isolados por cromatografia contra-corrente (HSCCC), seguida de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-preparativa). Já a partir da fração aquosa obtiveram-se os derivados galoilquínicos 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico e 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico por cromatografia de filtração em gel (*Sephadex*), seguida de purificação em CLAE-preparativa. Nos testes farmacocinéticos, o extrato hidroalcoólico, quercitrina e o galoilquínico 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico foram os compostos selecionados para serem estudados. Para ambos os compostos, métodos analíticos foram validados em plasma e em salina para a realização dos estudos farmacocinéticos. Realizou-se também a calibração da sonda de microdiálise *in vitro* por retrodiálise, para se determinar as condições a serem empregadas *in vivo*. De maneira geral, quercitrina se ajustou ao modelo farmacocinético de dois compartimentos e, após administração intravenosa de 1 mg/kg, apresentou meia vida curta ($t_{1/2} = 0,40 \pm 0,07$ h), uma rápida ($\alpha = 11,32 \pm 1,90$ h⁻¹) e boa ($V_{dss} = 2,10 \pm 0,52$ L/kg) distribuição tecidual e alta depuração ($CL = 6,85 \pm 0,62$ L/h/kg). Por análise dos microdialisados renais, a fração livre de quercitrina nos rins foi 13 vezes maior do que a concentração livre no plasma. O composto galoilquínico, por se tratar de um composto inédito, foi estudado farmacocineticamente por via intravenosa em três concentrações (1 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2 mg/kg) e se ajustou bem ao modelo de dois compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten, apresentando comportamento não linear ($ASC_{0-\infty}$ 103,85 \pm 23,90; 273,7 \pm 81,6 e 363,6 \pm 142,32 μ g h/mL, respectivamente). Não foi possível quantificar a concentração livre nos rins por microdiálise para o galoilquínico, pois o mesmo se ligava a sonda. Dessa maneira, o estudo de distribuição tecidual foi realizado, demonstrando que tanto quercitrina quanto o galoilquínico apresentavam alta penetrabilidade nos rins, com uma razão tecido renal/plasma de 23,7 e 12,4, respectivamente. Com relação ao perfil farmacocinético do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* e da fração butanólica após administração por via oral, verificou-se que não foi possível detectar nenhum dos isolados no plasma, sugerindo que tais substâncias foram metabolizadas e, provavelmente, tornaram-se ainda mais hidrossolúveis para posterior eliminação por via renal. Frente aos resultados, conclui-se que quercitrina e galoilquínico são substâncias de rápida eliminação e que podem estar relacionadas à atividade antilitiásica descrita para o extrato das folhas de *C. langsdorffii*.

Palavras-chave: *Copaifera langsdorffii*, antilitiásica, quercitrina, galoilquínico, farmacocinética, microdiálise.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais: um pouco de sua história no Brasil.

O uso de plantas medicinais é uma prática milenar e utilizada em diversas culturas de povos para prestar os primeiros serviços básicos de saúde à pacientes com os mais variados tipos de doenças (MEHTA *et al.*, 2015). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, 65 - 80% da população mundial utilizam-se de plantas medicinais como primeira forma de tratamento (YAN *et al.*, 2013).

Partindo-se do princípio que o Brasil é um dos países que abriga uma das maiores biodiversidades do mundo com importante fonte de recursos naturais derivadas de animais, plantas e micro-organismos, evidencia-se a importância de preservar e estudar toda essa riqueza (LIMA *et al.*, 2010). Dados atualizados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2016) demonstram que nos últimos anos houve uma redução de mais de 80% do desmatamento da Amazônia Legal. Entretanto, grande parcela do território brasileiro vem sendo desmatado e isso se deve inclusive pela forma de colonização que o país sofreu (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Como forma de conhecer e preservar toda essa biodiversidade, viajantes e naturalistas europeus de séculos passados já relatavam tudo que encontravam (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Um dos manuscritos recentemente descoberto no Arquivo Histórico do Museu Imperial de Petrópolis - RJ, consta de 1.657 páginas com verbetes botânicos agrupados em ordem alfabética (MARCOLIN, 2013). Dentre as mais de 2000 espécies relatadas no manuscrito, as espécies do gênero *Copaifera* foram descritas com uma enorme riqueza de detalhes. Segundo o manuscrito, “Dez variedades de árvores *Copaifera* se encontram no vasto domínio do Brasil, desde os limites do Rio Negro até os da província de São Paulo.” e “*Copaifera langsdorffii* é notável em São Paulo e Minas” (MAST, 2013).

1.2 O gênero *Copaifera*

As plantas do gênero *Copaifera* L. pertencem à família Leguminosae Juss., subfamília Caesalpinioideae Kunth e são caracterizadas pela presença de estruturas secretoras internas que sintetizam e acumulam oleorresina, que por sua vez possuem expressiva atividade biológica e alto valor comercial (RODRIGUES; TEIXEIRA & MACHADO, 2011).

As árvores são popularmente conhecidas como “copaibeiras” ou “pau d’óleo” e são nativas da região tropical da América Latina e da África Ocidental. Possuem o crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura e podem viver até 400 anos. O tronco é áspero,

medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. Suas folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide, envolvida por uma cobertura carnosa abundante e colorida. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjadas em panículos axilares (VEIGA JR. & PINTO, 2002).

De acordo com o Index Kewensis, o gênero *Copaifera* possui 72 espécies, sendo que algumas apenas são encontradas no Brasil. As espécies mais abundantes deste gênero são: *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth., *C. langsdorffii* Desf., *C. coriácea* Mart. e *C. cearensis* Huber ex Ducke (VEIGA JR. & PINTO, 2002).

1.2.1 *Copaifera langsdorffii* Desf.

A espécie *Copaifera langsdorffii* Desf., popularmente conhecida como “copaíba”, distribui-se abundantemente no cerrado brasileiro (Figura 1). As copaibeiras apresentam estruturas secretórias internas, como os canais e cavidades, que acumulam e sintetizam oleorresina. Tais oleorresinas são um valioso remédio na medicina popular, sendo utilizadas no tratamento de dor de garganta, infecções urinárias (PAIVA *et al.*, 1998), como antimicrobiano, anti-inflamatório, antiulcerogênico, antitumoral e cicatrizante (RODRIGUES; TEIXEIRA & MACHADO, 2011).

Os metabólitos secundários majoritários encontrados no oleorresina da *C. langsdorffii* são os sesquiterpenos e os diterpenos da classe dos labdanos e clerodanos (série normal e série enantiomérica) (VEIGA JR. & PINTO, 2002; TAPPIN *et al.*, 2004; VEIGA JR. *et al.*, 2007).



Figura 1. *Copaifera langsdorffii* medindo cerca de 7 m de altura (A). Folhas e sementes (B).

Com relação às partes aéreas de *C. langsdorffii*, nosso grupo de pesquisa vem sendo pioneiro no relato de sua composição química e atividades biológicas. Neste aspecto, em estudos preliminares foi observado que a composição das partes aéreas desta espécie é bastante distinta do oleorresina, uma vez que o extrato hidroalcoólico das folhas é constituído majoritariamente por compostos polares derivados da via do ácido chiquímico, incluindo flavonoides e ácidos galoilquínicos (SOUZA *et al.*, 2011; NOGUEIRA; FURTADO & BASTOS, 2015). Recentemente, 26 derivados de ácidos galoilquínicos foram identificados por nosso grupo de pesquisa, sendo que 16 deles foram isolados (MOTTA, 2014).

O conhecimento do uso popular do chá das folhas de *C. langsdorffii* para tratar pedra nos rins (urolitíase) serviu como base de estudo etnofarmacológico para o nosso grupo de pesquisa. Sendo assim, animais tratados com extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* demonstraram que a média da massa total dos cálculos foi discretamente menor em comparação ao grupo controle (BRANCALION *et al.*, 2012). Em outro estudo foi avaliado o potencial profilático do extrato no tratamento de pedras renais em ratos induzidos a nefrolitíase por etilenoglicol (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

1.3 Urolitíase

Litíase do trato urinário, popularmente conhecido como pedra nos rins, é assumidamente um problema de saúde, afetando milhões de pessoas no mundo e resultando em internações hospitalares, prescrição de medicamentos, tratamento cirúrgico e perda de horas de trabalho (DURNER; BOURDOUMIS & BUCHHOLZ, 2016).

As principais características clínicas da doença são fortes dores, causada principalmente pela obstrução do canal urinário pela pedra, hematúria (sangue na urina) e infecções, que podem ter sido a causa da formação de pedras renais ou estar ocorrendo devido à obstrução do canal urinário (THOMAS & HALL, 2005).

Pedra nos rins têm se tornado um problema crescente, com prevalência entre 2 e 20% em todo o mundo. Fatores raciais e étnicos estão atrelados ao surgimento da doença, ocorrendo com maior prevalência em caucasianos do sexo masculino e menos em mulheres jovens afro-americanas. Nos homens, a incidência de pedras nos rins parece aumentar após os 20 anos, com picos entre 40 e 60 anos. Nas mulheres, a maior taxa de incidência é próxima aos 20 anos e diminui após os 50 anos (DURNER; BOURDOUMIS & BUCHHOLZ, 2016). Pedra nos rins também tem se tornado cada vez mais comum em crianças e jovens, tornando-os susceptíveis a ter cálculos renais com frequência, de modo a necessitarem realizar

múltiplos procedimentos de remoção de pedras renais ao longo de suas vidas (VELÁZQUEZ *et al.*, 2015).

A etiologia exata da urolitíase é desconhecida, podendo ser causada por fatores ambientais e genéticos, pelo estilo de vida, entre outros (DURNER; BOURDOUMIS & BUCHHOLZ, 2016). A maioria das pedras é composta por oxalato de cálcio e, menos frequentemente, fosfato de cálcio, que juntos respondem por aproximadamente 80% de todas as pedras. Em menor proporção, também existem pedras compostas de ácido úrico (5%), estruvita (10% -15%), cistina (1%) e pedras de composição mista. Em raras ocasiões, medicamentos foram responsáveis por precipitar-se na urina para formar pedras. Acredita-se que a maioria das pedras formam-se quando sais dissolvidos na urina atingem um ponto de supersaturação, formando cristais (GRAHAM; LUBER & WOLFSON, 2011).

Atualmente, algumas maneiras de tratamento para pedras grandes são litotripsia extracorpórea por ondas de choque eletrohidráulico, o qual consiste na criação de fortes vibrações para quebrar as pedras e facilitar a excreção. Traqueostomia percutânea, em que as pedras maiores são retiradas por meio de um pequeno corte feito nas costas do paciente. Ureteroscopia, em que o médico insere um tubo muito fino por meio da uretra do paciente para retirar as pedras presentes no trato urinário (THOMAS & HALL, 2005).

Para casos de pedras menores, procedimentos não invasivos são normalmente recomendados, sendo que beber água e seguir uma dieta balanceada são requisitos fundamentais. Medicações como alopurinol e febuxostat também são prescritas em alguns casos (DURNER; BOURDOUMIS & BUCHHOLZ, 2016).

Dessa forma, com o intuito de buscar alternativas menos invasivas para o tratamento de cálculos renais, as substâncias quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) e o ácido 5',5"-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (galoilquínico), presentes no extrato de *C. langsdorffii*, foram isoladas para realização de estudos farmacocinéticos (Figura 2).

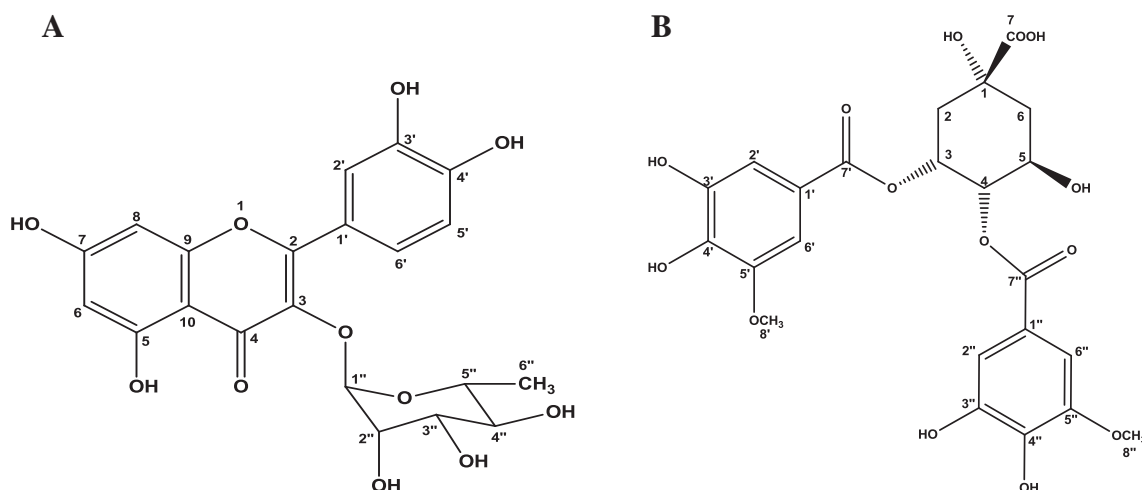


Figura 2. Quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) (A) e ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico (galoilquínico) (B).

1.4 Estudos farmacocinéticos

Apesar do pouco conhecimento sobre biodisponibilidade e perfil farmacocinético da maioria das substâncias provenientes de produtos naturais, nas últimas décadas têm-se adquirido mais informações nesta área, juntamente com o avanço de métodos analíticos mais sensíveis e seletivos (BHATTARAM *et al.*, 2002). De maneira geral, boa parte dos compostos de plantas necessitam ser mais bem avaliados quanto ao perfil farmacocinético, farmacodinâmico, composição química e metabólica. (MEHTA *et al.*, 2015). Esses estudos são necessários para desenvolvimento e interpretação de estudos tóxicos e clínicos, monitoramento de compostos marcadores e/ou compostos majoritários da droga vegetal no sangue (YAN *et al.*, 2013).

A maioria dos produtos naturais apresenta perfil farmacocinético complexo, sendo crucial entender o percurso realizado por essas substâncias no organismo após serem administradas (MEHTA *et al.*, 2015). Assim, a caracterização da absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) de uma substância inédita é fundamental para a descoberta e desenvolvimento de um fármaco (TORRES *et al.*, 2014).

A razão de se avaliar a perfil farmacocinético dos metabólitos secundários presentes no extrato de *C. langsdorffii* é para se ter uma ideia do percurso que as substâncias testadas têm no organismo. De acordo com Schimidt; Gonzalez & Derendorf (2010) é possível prever a atividade farmacológica de uma substância, quando a mesma é encontrada na forma livre no seu sítio de ação. Contextualizando esta afirmação, pode-se inferir que a presença de metabólitos secundário de *C. langsdorffii* nos rins dos animais, pode estar relacionada com a cura/prevenção (BRANCALION *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013) da urolitíase.

1.5 Microdiálise

Microdiálise é uma técnica de recente, minimamente invasiva e de grande utilidade, uma vez que permite a avaliação do fármaco livre no espaço extracelular nos mais diferentes tecidos (CHAURASIA *et al.*, 2007; LOOS *et al.*, 2007). Esta técnica também permite determinar as concentrações livres de compostos exógenos e endógenos, sendo possível obter amostras de múltiplos tecidos de um mesmo animal sem alterar o volume biológico dos mesmos. As amostras coletadas por microdiálise não necessitam de purificação antes da análise e não correm o risco de serem metabolizadas após a captura, uma vez que a membrana de diálise (sonda) só é permeável a moléculas pequenas, excluindo assim as enzimas (ZHANG *et al.*, 2015).

As sondas de microdiálise (Figura 3) são constituídas de uma membrana semipermeável, que obedece aos princípios da difusão passiva e são mantidas constantemente em condição *sink*. Esta condição faz com que o equilíbrio entre os meios, interno e externo da sonda, nunca sejam atingidos (ARAUJO *et al.*, 2008).

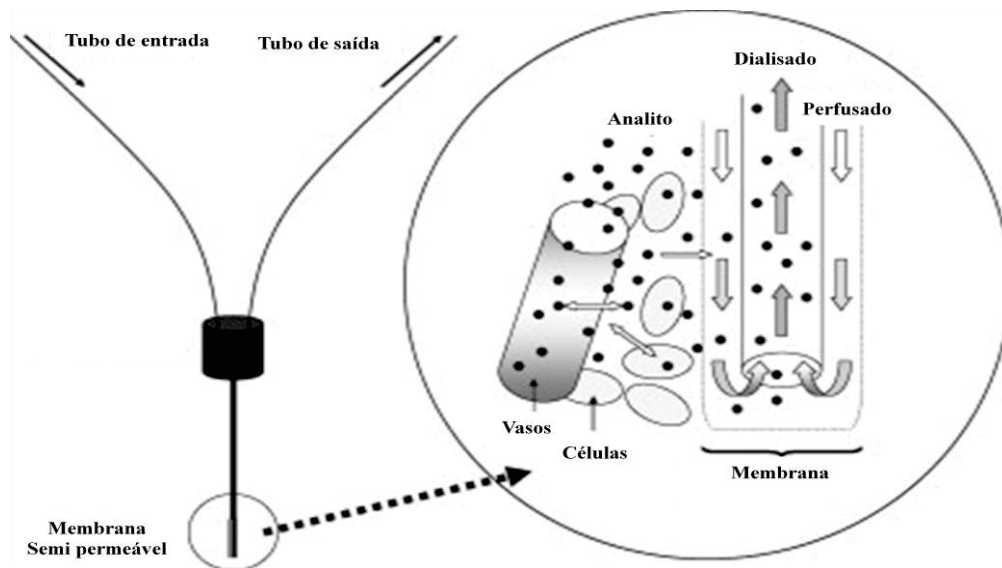


Figura 3. Modelo esquemático de uma sonda de microdiálise (Adaptado de LOOS *et al.*, 2007).

As substâncias difundidas pelo tubo de entrada são coletadas na outra extremidade da sonda, para posterior análise. Estas concentrações coletadas no dialisado, no entanto, não são iguais às concentrações livres no tecido, devido à condição *sink* estabelecida. Dessa forma, a concentração no dialisado representa apenas uma parcela da concentração livre no tecido (ARAUJO, 2008).

Para determinar a fração livre tecidual é necessário antes calcular a recuperação relativa (RR), que pode ser medida em testes de retrodiálise (perda) ou diálise (ganho). A RR é utilizada como um fator de correção para se calcular a verdadeira concentração de uma determinada substância livre no tecido.

1.6 Modelos farmacocinéticos

De acordo com os modelos farmacocinéticos, o organismo é dividido em compartimentos, que por sua vez podem ser classificados como: monocompartimental (um compartimento) ou multicompartmental (mais que um compartimento). Tais modelos têm como premissa a homogeneidade de distribuição e o equilíbrio instantâneo das concentrações do fármaco dentro de cada compartimento. É também por meio de modelos, que os processos de absorção, distribuição e eliminação de uma substância do organismo são simulados (STORPIRTS *et al.*, 2011).

Uma vez que se conhece a quantidade de fármaco administrada por uma das vias no organismo, é possível realizar análises compartimentais farmacocinéticas por meio do estudo contínuo das concentrações plasmáticas. A principal análise realizada é o estudo das curvas obtidas (concentrações plasmáticas *versus* tempo), sendo que tais curvas geram as equações exponenciais, que quando representadas em gráficos ortogonais lineares-logarítmicos (*semilog*), mostram-se como segmentos lineares. De acordo com o gráfico gerado é possível prever o provável número de compartimentos em que o fármaco se distribui (STORPIRTS *et al.*, 2011).

Os principais objetivos para a construção de um modelo são: reduzir dados, estimar os parâmetros e suas respectivas precisões, testar hipóteses e também realizar comparações entre os possíveis modelos. No entanto, questionar-se e desafiar o modelo proposto são fatores importantes para se ter uma boa modelagem (GABRIELSSON & WEINER, 2006).

Construir um modelo que descreva bem os parâmetros desejados pode ser um processo longo e complexo. Por isso, é recomendado a pesquisadores construir modelos apenas quando necessário. Há situações em que uma simples análise não compartimental é suficiente para calcular algum parâmetro (BOURNE, 1995; GABRIELSSON & WEINER, 2006).

Finalmente, determinar um bom modelo permite a predição de resultados futuros. Cálculos de dose, por exemplo, contam com a existência de um modelo adequado (BOURNE, 1995).

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Verificou-se que o perfil metabólico do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. langsdorffii* é bastante complexo e, a partir do seu fracionamento isolaram-se os flavonoides: quercetina-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (quercitrina) e canferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo (afzelina) pela técnica de HSCCC seguida de purificação por CLAE-preparativa. Isolaram-se também dois ácidos galoilquínicos: ácido 5''-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico e ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico por *Sephadex*, seguida de purificação por CLAE-preparativa.

Para realização dos testes farmacocinéticos, métodos analíticos para as substâncias quercitrina e ácido 5',5''-di-*O*-metil-3,4-di-*O*-galoilquínico foram validados de acordo com as recomendações do FDA, em matriz de plasma e de microdialisados. Na calibração da sonda de microdiálise *in vitro*, quercitrina apresentou por retrodiálise uma recuperação relativa em torno de 57,9%. Todavia, a recuperação do galoilquínico não pode ser calculada, visto que esta substância se ligou a alguma parte do sistema de microdiálise.

De acordo com os dados plasmáticos, quercitrina se ajustou ao modelo farmacocinético de dois compartimentos após administração por via intravenosa de 1 mg/kg e, a fração livre de quercitrina encontrada nos rins foi 13 vezes maior do que a concentração livre no plasma. Já o composto galoilquínico se ajustou bem ao modelo de dois compartimentos com eliminação por Michaelis-Menten, após administração por via intravenosa em três concentrações 1 mg/kg, 1,5 mg/kg e 2 mg/kg.

No estudo de distribuição tecidual foi demonstrado que tanto quercitrina quanto o galoilquínico apresentavam alta penetrabilidade nos rins. Entretanto, com relação ao perfil farmacocinético do extrato hidroalcoólico de *C. langsdorffii* e da fração butanólica após administração por via oral, verificou-se que não foi possível detectar nenhum dos isolados no plasma.

Frente aos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que quercitrina e galoilquínico são substâncias que apresentam rápida eliminação e que foram encontrados em grande quantidade no tecido renal, podendo-se inferir que tais substâncias estão relacionadas à atividade antiliteásica descrita para o extrato das folhas de *C. langsdorffii*.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, O. M. & MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Flórida: Taylor & Francis, 2006, p. 1212.
- ARAUJO, B. V.; SILVA, C. F.; HAAS, S.E.; DALLA COSTA, T. Microdialysis as a tool to determine free kidney levels of voriconazole in rodents: A model to study the technique feasibility for a moderately lipophilic drug. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 876 - 881, 2008.
- ARAUJO, B. V.; SILVA, C. F.; HAAS, S. E.; DALLA COSTA, T. Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida* sp.-infected Wistar rats. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p.154-159, 2009.
- ARAUJO, B. V.; LAUREANO, J. V.; GRÜNSPAN, L. D.; DALLA COSTA, T.; TASSO, L., Validation of an efficient LC-microdialysis method for gemifloxacin quantitation in lung, kidney and liver of rats. **Journal of Chromatography B**, v. 919-920, p. 62-66, 2013.
- BENET, L. Z.; WILLIAMS, R. L. **Design and optimization of dosage regimens: pharmacokinetic data**. In: GILMAN, A. G.; RALL, T. W., NIES, A. S. The pharmacological basis of therapeutics. New York: Pergamon, 1990, p.1650–1735.
- BHATTARAM, V. A.; GRAEFE, U.; KOHLERT, C.; VEIT, M.; DERENDORF, H. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. **Phytomedicine**, v. 9, p. 1 - 33, 2002.
- BOURNE, D. W. A. **Mathematical modeling of pharmacokinetic data**. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1995, p. 1028.
- BRANCALION, A. P. S.; OLIVEIRA, R. B.; SOUSA, J. P. B.; GROPPPO, M.; BERRETA, A. A.; BARROS, M. E.; BOIM, M. A.; BASTOS, J. K. Effect of hydroalcoholic extract from *Copaifera langsdorffii* leaves on urolithiasis induced in rats. **Urological Research**, v. 40, p. 475-481, 2012.
- CHAURASIA, C. S.; MÜLLER, M.; BASHAW, E. D.; BENFELDT, E.; BOLINDER, J.; BULLOCK, R.; BUNGAY, P. M.; DELANGE, E. C. M.; DERENDORF, H.; ELMQUIST, W. F.; UDENAES, M. H.; JOUKHADAR, C.; KELLOGG JR., D. L.; LUNTE, C. E.; NORDSTROM, C. H.; ROLLEMA, H.; SAWCHUK, R. J.; CHEUNG, B. W. Y.; SHAH, V. P.; STAHL, L.; UNGERSTEDT, U.; WELTY, D. F.; YEO, H. AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 1014-1025, 2007.
- CHOOLOCK, K.; SINGH, R. P.; SATHIRAKUL, K.; DERENDORF, H. Dermal pharmacokinetics of terpinen-4-ol following topical administration of *Zingiber cassumunar* (plai) Oil. **Planta Medica**, v. 78, p. 1761- 1766, 2012.
- DURNER, L.; BOURDOUMIS, A.; BUCHHOLZ, N.; Metabolic syndrome and urolithiasis. **Comptes Rendus Chimie**, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2015.04.002>

FDA, **Guidance for Industry**, Bioanalytical Method Validation, May 2001.

FUJIMIYA, T.; YAMAOKA, K.; FUKUI, Y. Parallel First-order and Michaelis-Menten elimination kinetics of ethanol. Respective role of alcohol dehydrogenase (ADH), Non-ADH and First-order pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 249, p. 311-317, 1989.

GABRIELSSON, J. & WEINER, D. **Pharmacokinetic & Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications**, Suécia: Printografen AB, 2006, 4. ed., p. 1254.

GIBALDI, M. & PERRIER, D. **Pharmacokinetics**, Nova Iorque: Marcel Dekker, 1989, 2. ed.

GRAHAM, A.; LUBER, S.; WOLFSON, A. B. Urolithiasis in the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v.29, p. 519-538, 2011.

HUANG, Y.; CHEN, H.; HE, F.; ZHANG, Z-R.; ZHENG, L.; LIU, Y.; LAN, Y-Y., LIAO, S-G.; LI, Y-J, WANG, Y-L. Simultaneous determination of human plasma protein binding of bioactive flavonoids in *Polygonum orientale* by equilibrium dialysis combined with UPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, p. 376-381, 2013.

HUANG, Y.; ZHANG, P.; HE, F.; ZHENG, L.; WANG, Y.; WU, J. Simultaneous determination of four bioactive flavonoids from *Polygonum orientale* L. in dog plasma by UPLC–ESI-MS/MS and application of the technique to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B**, v. 957, p. 96-104, 2014.

INDEX KEWENSIS, suppl. XX; Claredon Press: Oxford, 1996.

INPE. INPE apresenta taxa de desmatamento consolidada do PRODES 2014. Disponível em: < <http://www.inpe.br/noticias>>. Acesso em: 02 Jan. 2016.

ITO, N. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p.145-168, 2005.

LIMA, M. E.; FORTES-DIAS, C. L.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Toxinology in Brasil: A big challenge for a rich biodiversity. **Toxicon**, v. 56, p. 1084-1091, 2010.

LOOS, W. J.; ZAMBONI, W. C.; ENGELS, F. K.; BRUIJN, P.; LAM, M. H.; WIT, R.; VERWEIJ, J.; WIEMER, E. A. C. Pitfalls of the application of microdialysis in clinical oncology: Controversial findings with docetaxel. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 288-294, 2007.

MARCOLIN, N. **Uma boa relação: Dicionário anônimo botânico do século XIX tinha forte ligação com a química**. Pesquisa FAPESP, v. 204, p. 72-73, 2013.

MAST. A química e o dicionário anônimo de botânica. Disponível em: <www.mast.br>. Acesso em: 02 Mai. 2013.

- MEHTA, P.; SHAH, R.; LOHIDASAN, S.; MAHADIK, K. R. Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants - A comprehensive review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 5, p. 207-227, 2015.
- MOTTA, E V. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV-DAD para quantificação e análise sazonal de derivados galoilquínicos nas folhas de *Copaifera langsdorffii***. 2014. 212 f. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Produtos Naturais e Sintéticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- NOGUEIRA, M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; Flavonoids and Methoxy-galloylquinic. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.63, p.6939-6945, 2015.
- NUGROHO, A.; CHOI, J.; PARK, J.; LEE, K.; CHA, B.; PARK, H. Two new flavonols glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their *in vitro* free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities. **Planta Medica**, v. 75, p. 364-366, 2009.
- OLIVEIRA, R. B.; COELHO, E. B.; RODRIGUES, M. R.; COSTA-MACHADO, A. R. M.; SOUSA, J. P. B.; BERRETTA, A. A.; BASTOS, J. K. Effect of the *Copaifera langsdorffii* Desf. leaf extract on the ethylene glycol-induced nephrolithiasis in rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013. doi: 10.1155/2013/131372
- OLIVEIRA, V B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170-179, 2012.
- PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 62, p. 73-78, 1998.
- PURI, R.; WONG, T. C.; PURI, R. K. ¹H- and ¹³C-NMR Assignments and Structural Determination of a Novel Glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 587-596, 1994.
- RODRIGUES, T. M.; TEIXEIRA, S. P.; MACHADO, S. R. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). **Flora**, v. 206, p. 585-594, 2011.
- SCHMIDT, S.; GONZALEZ, D.; DERENDORF, H. Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 1107-1122, 2010.
- SHI, S.; MA, Y.; ZHANG, Y.; LIU, L.; LIU, Q.; PENG, M.; XIONG, X. Systematic separation and purification of 18 antioxidants from *Pueraria lobata* flower using HSCCC target-guided by DPPH-HPLC experiment. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 225-233, 2012.
- SOUZA, A. B.; MARTINS, C. H. G.; SOUZA, M. G. M.; FURTADO, N. A. J. C.; HELENO, V. C. G.; DE SOUSA, J. P. B.; ROCHA, E. M. P.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.;

- VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* desf. Against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 215-220, 2011.
- STORPIRTS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- SUN, Z.; ZHAO, L.; ZUO, L.; QI, C.; ZHAO, P.; HOU X. A UHPLC–MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids, gallic acid and 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of Cortex Juglandis Mandshuricae extract. **Journal of Chromatography B**, v. 958, p. 55 - 62, 2014.
- TAPPIN, M. R. R.; PEREIRA, J. F. G.; LIMA, L. A.; SIANI, A. C.; MAZZEI, J. L.; RAMOS, M. F. S. Análise química para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, p. 236-240, 2004.
- THOMAS, B.; HALL, J. Urolithiasis. **Renal and Urology**, v. 23, p.129-133, 2005.
- TORRES, B. G. S.; UCHÔA, F. D. T.; PIGATTO, M. C.; AZEREDO, F. J.; HAAS, S. E.; DALLEGRAVE, E.; CANTO, R. F. S.; EIFLER-LIMA, V. L.; COSTA, T. D. Pre-clinical pharmacokinetics and acute toxicological evaluation of a monastrol derivative anticancer candidate LaSOM 65 in rats. **Xenobiotica**, v. 44, p. 254-263, 2014.
- VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2002.
- VEIGA JR., V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of opaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Haynea comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248-254, 2007.
- VELÁZQUEZ, N.; ZAPATA, D.; WANG, H. S.; WIENER, J. S.; LIPKIN, M. E.; ROUTH, J. C. Medical expulsive therapy for pediatric urolithiasis: Systematic review and metaanalysis. **Journal of Pediatric Urology**, v. 11, p. 321-327, 2015.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996, 2. ed., p. 368.
- YAN, Z.; LI, T.; LV, P.; LI, X.; ZHOU, C.; YANG, X. Sensitive and reliable multianalyte quantitation of herbal medicine in rat plasma using dynamic triggered multiple reaction monitoring. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 22-31, 2013.
- ZHANG, Q.; WU, D.; WU, J.; OU, Y.; MU, C.; HAN, B.; ZHANG, Q. Improved blood–brain barrier distribution: Effect of borneol on the brain pharmacokinetics of kaempferol in rats by *in vivo* microdialysis sampling. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, p. 270 - 277, 2015.