

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DALYARA MENDONÇA DE MATOS

DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO E DA
BIODISPONIBILIDADE SISTÊMICA DO ÁCIDO CAURENOICO EM RATOS

JUIZ DE FORA

2016

Dalyara Mendonça de Matos

**Determinação do perfil farmacocinético e da biodisponibilidade sistêmica do ácido
caurenoico em ratos**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento

Juiz de Fora

2016

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Matos, Dalyara Mendonça de.

Determinação do perfil farmacocinético e da biodisponibilidade sistêmica do ácido caurenico em ratos / Dalyara Mendonça de Matos. -- 2016.

83 f. : il.

Orientador: Jorge Willian Leandro Nascimento

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. Ácido caurenico. 2. Diterpeno. 3. Farmacocinética. 4. Biodisponibilidade. I. Nascimento, Jorge Willian Leandro, orient. II. Título.

Dalyara Mendonça de Matos

Determinação do perfil farmacocinético e da biodisponibilidade sistêmica do ácido caurenóico em ratos

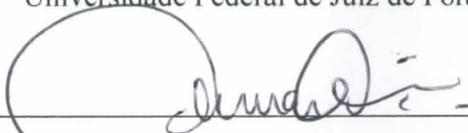
Trabalho apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos Naturais.

Apresentada em 23 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina

Dedico este trabalho a minha mãe, Lucimar, por sua força inabalável, por sempre ter deixado as possibilidades em aberto, pelo apoio constante e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus toda força e por me guiar pelos caminhos da vida, sempre me fazendo encontrar pessoas maravilhosas ao longo dessa trajetória.

À minha família pela união, suporte, compreensão e amor.

Ao meu orientador, Professor Jorge Willian Leandro Nascimento, pelos sábios conselhos, pela confiança, incentivo, direcionamento e disponibilidade em me ajudar sempre.

Ao Professor Ademar Alves da Silva Filho por sua participação ativa nesse projeto e valiosas contribuições para que o mesmo fosse realizado.

À Professora Laura Hora Rios Leite por possibilitar a realização da experimentação animal, não só oferecendo a infraestrutura para isso, mas me orientando nessa parte.

À Professora Priscila de Faria Pinto pelo carinho, por sempre estar com as portas abertas para me ajudar e, é claro, por gentilmente ter me apresentado ao meu orientador.

Ao Professor Nilton Syogo Arakawa por ter aceitado o convite para esta banca.

À toda equipe do Laboratório de Farmacologia Clínica e Experimental (LaFaCE). À Aline, Luciane e Franciele por todo auxílio e em especial, à Milainy e Marcela, que me acompanharam desde o começo e acabaram se tornando amigas para todas as horas!

A todos os amigos que me apoiaram ao longo do caminho até aqui e que tornaram meus dias muito mais divertidos, em especial à Priscila e Felipe que compartilharam todas as emoções do mestrado comigo!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por essa oportunidade única de aprendizado e crescimento.

À Central Analítica da Faculdade de Farmácia, onde foram realizadas as análises em CLAE-IR. À amiga Carolina Miranda Gasparetto por ter me auxiliado com essas análises.

Ao Vinícius Rodrigues Durães Pereira pela realização da análise de RMN.

À Lara Soares Aleixo de Carvalho pela disponibilidade em me ajudar com o trabalho.

Ao Instituto de Ciências Biológicas da UFJF e ao Departamento de Farmacologia pela infraestrutura oferecida.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho, fica aqui registrada a minha gratidão.

RESUMO

O ácido caurenóico é um diterpeno caurânico encontrado em diversas espécies vegetais tais como *Mikania glomerata* (guaco), *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e *Smilax sonchifolia* (yacon). Essa substância apresenta ação tripanocida, larvicida, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, relaxante da musculatura lisa, hipotensora, diurética, hipoglicêmica e citotóxica. Por tratar-se de uma molécula promissora para o desenvolvimento de novos fármacos, o objetivo de nosso estudo é determinar o perfil farmacocinético e a biodisponibilidade oral do ácido caurenóico em ratos. Foram utilizados Ratos Wistar (n=6), aos quais foram administrados 50 ou 100 mg/kg de ácido caurenóico por via IV ou oral. Os animais foram canulados pela veia jugular, permitindo a administração intravenosa do ácido caurenóico e coletas seriadas de sangue do tempo zero até 10 horas. A extração do ácido caurenóico do plasma foi realizada após acidificação com ácido acético 1% (v/v), seguida de precipitação de proteínas com acetonitrila. A quantificação do analito foi realizada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (CLAE-UV), empregando-se as seguintes condições analíticas: coluna C₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 µm) mantida a 40°C, eluição isocrática com fase móvel composta por acetonitrila:água acidificada com ácido ortofosfórico 0,1% (70:30 v/v), fluxo de 1 mL/min, detecção em 200 nm e volume de injeção de 80 µL. A metodologia proposta foi validada e mostrou-se precisa, exata, robusta, confiável e linear entre 0,75 e 100 µg/mL. A partir do decaimento plasmático dos animais que receberam 50 mg/kg do ácido caurenóico por via intravenosa, foram determinados os seguintes parâmetros farmacocinéticos: C_{max} = 22,2 ± 1,6 mg/L, V_d = 14,5 ± 1,5 L/kg, CL = 17,7 ± 1,5 mL/min/kg, ASC = 2859 ± 278 mg/L.h e T_{1/2} = 9,5 ± 0,6 h. Os resultados obtidos apontaram que o ácido caurenóico, administrado por via intravenosa, apresentou um comportamento cinético linear e bicompartmental na dose testada. Não foram encontrados níveis quantificáveis da substância nas amostras provenientes de ratos tratados com 50 ou 100 mg/kg de ácido caurenóico, por via oral, impossibilitando a definição de sua biodisponibilidade oral e sugerindo uma baixa absorção por esta via. Este é o primeiro estudo farmacocinético desta molécula e, esta avaliação, mesmo que pré-clínica, pode contribuir para o processo de desenvolvimento de novos medicamentos a partir desse diterpeno.

Palavras-chave: Ácido Caurenóico. Diterpeno. Farmacocinética. Biodisponibilidade.

ABSTRACT

Kaurenoic acid is a kaurane-type diterpene found in several plant species such as *Mikania glomerata* (guaco), *Copaifera langsdorffii* (copaíba) and *Smallanthus sonchifolia* (yacon). Previous studies described several biological activities for this substance such as antitrypanosomal, antimicrobial, analgesic, anti-inflammatory, smooth muscle relaxant, hypotensive, diuretic, hypoglycemic and cytotoxic. As this molecule represents a lead compound for the development of new drugs, the aim of our study is to determine the pharmacokinetics profile and oral bioavailability of kaurenoic acid in rats. Wistar rats (n = 6) received 50 or 100 mg/kg of kaurenoic acid by intravenous or oral routes. The insertion of a cannula into the right external jugular vein of Wistar rats allowed intravenous administration of kaurenoic acid and collection of blood samples within predetermined time intervals. Extraction procedures from plasma consisted of acidification with 1% acetic acid (v/v), followed by precipitation of proteins with acetonitrile. The supernatant was submitted to high-performance liquid chromatography with UV detection (HPLC-UV) for quantification of kaurenoic acid. The established analytical conditions were: C₁₈ column (150 x 4.6 mm, 5 µm) maintained at 40 ° C, isocratic elution with a mobile phase consisting of acetonitrile: acidified water with 0.1% orthophosphoric acid (70:30 v/v), a flow of 1 mL/min, UV detection at 200 nm and injection volume of 80 µL. The proposed methodology proved to be precise, accurate, robust and reliable. The linearity range is between 0.75 and 100 µg/mL. Plasma decay of animals receiving an intravenously dose of 50 mg/kg allowed the determination of the following pharmacokinetic parameters: C_{max} = 22.2 ± 1.6 mg/L; V_d = 14.5 ± 1.5 L/kg; CL = 17.7 ± 1.5 mL/min/kg; AUC = 2859 ± 278 mg/L.h and T_{1/2} = 9.5 ± 0.6 h. Kaurenoic acid administered intravenously showed a linear and two-compartment kinetic behavior at the tested dose. As no measurable levels of substance were found in the samples from mice treated orally with kaurenoic acid, the determination of oral bioavailability was not possible, suggesting poor absorption through this route. This is the first pharmacokinetic study of this molecule and this preclinical assessment can contribute to the process of development of new drugs with this diterpene.

Keywords: Kaurenoic Acid. Diterpene. Pharmacokinetics. Bioavailability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estruturas químicas de alguns terpenos	17
Figura 2. Estrutura molecular do ácido caurenico	17
Figura 3. Estruturas químicas do ácido caurenico e dos candidatos a padrão interno	32
Figura 4. Esquema da extração do ácido caurenico do plasma – Método B	34
Figura 5. Ácido Caurenico - Detecção em diferentes comprimentos de onda	44
Figura 6. Cromatograma Timol	45
Figura 7. Cromatograma Bisabolol	45
Figura 8. Injeção de timol, bisabolol e ácido caurenico.	46
Figura 9. Cromatograma do Pool de plasmas de ratos Wistar.....	47
Figura 10. Extração de analito e PI do plasma - Método A.....	48
Figura 11. Extração do plasma - Amostra ressuspendida em fase móvel (Método B).....	48
Figura 12. Extração do plasma - Injeção direta do sobrenadante (Método B)	49
Figura 13. Ácido Caurenico 50 µg/mL - Análise em CLAE/IR.....	50
Figura 14. Análise com fase isocrática ACN:H ₂ O (80:20)	51
Figura 15. Análise em gradiente.....	51
Figura 16. Comparação de diferentes fluxos	52
Figura 17. Comparação da acidificação da amostra com ácido acético 1% e 2% (v/v)	52
Figura 18. Método definido para extração (<i>clean-up</i>) das amostras de plasma	54
Figura 19. Condição final determinada para a quantificação do ácido caurenico em plasma	55
Figura 20. Comparação entre cromatogramas - Seletividade.....	56
Figura 21. Linearidade do Método	57
Figura 22. Avaliação do Efeito Residual.....	58
Figura 23. Cromatograma via i.v x via oral.....	63
Figura 24. Decaimento plasmático do ácido caurenico - via i.v. 100 mg/kg	64
Figura 25. Decaimento plasmático do ácido caurenico - via i.v. 50 mg/kg	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de CLAE descritos na literatura para análise do ácido caurenico	24
Tabela 2. Parâmetros Farmacocinéticos	41
Tabela 3. Precisão e Exatidão Intradia	59
Tabela 4. Precisão e Exatidão Interdias	59
Tabela 5. Recuperação do ácido caurenico do plasma	60
Tabela 6. Estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento	60
Tabela 7. Estabilidade pós-processamento (na bandeja do injetor).....	61
Tabela 8. Estabilidade de Curto Prazo	61
Tabela 9. Resultados obtidos na validação	62
Tabela 10. Parâmetros Farmacocinéticos do Ácido Caurenico	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Comprimento de onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
AC	Ácido Caurenóico
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva extrapolada ao infinito
ASC_{0-t}	Área sob a curva do tempo 0 até o tempo da última coleta
ATP	Trifosfato de adenosina
C	Concentração
CCD	Cromatografia em camada delgada
CL	Clearance
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
cm	Centímetro
C_{max}	Concentração plasmática máxima
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas com recurso <i>Tandem</i>
EPR	Erro padrão relativo
ESI	Ionização por eletrospray
F	Biodisponibilidade
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase Móvel
FMN	Fator de matriz normalizado por padrão interno
g	Grama
h	Hora
IC ₅₀	Concentração que causa 50% de inibição

K_{el}	Constante de eliminação
kg	Quilograma
LIQ	Limite inferior de quantificação
LPS	Lipopolissacarídeo
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N_2	Nitrogênio
nm	Nanômetros
PI	Padrão interno
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENISUS	Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Tempo
$T_{1/2}$	Meia-vida de eliminação
T_{max}	Tempo em que o fármaco atinge a concentração plasmática máxima
t_R	Tempo de retenção
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV-Vis	Espectoscopia de absorção no ultravioleta e visível
Vd	Volume de distribuição

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	Revisão da literatura.....	16
2.1	Terpenos.....	16
2.2	Ácido caurenóico	18
2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência e métodos aplicados à separação do ácido caurenóico	22
2.4	Farmacocinética	25
3	Objetivos	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	Materiais e métodos	29
4.1	Equipamentos.....	29
4.2	Solventes e padrões de referência	29
4.3	Obtenção e purificação do ácido caurenóico	30
4.4	Preparo das soluções estoque.....	30
4.4.1	Ácido caurenóico (1 mg/mL)	30
4.4.2	Bisabolol (1 mg/mL)	30
4.4.3	Ácido acético glacial 1% (v/v)	31
4.5	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência/UV-vis	31
4.6	Seleção do padrão interno	31
4.7	Processamento do sangue e obtenção de plasma branco	32
4.8	Recuperação do ácido caurenóico do plasma	33
4.9	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta <i>versus</i> índice de refração	35
4.10	Validação do método analítico.....	35
4.10.1	Seletividade	35
4.10.2	Linearidade.....	36
4.10.3	Limite inferior de quantificação (LIQ) e Limite de Detecção	36
4.10.4	Curva de calibração	36
4.10.5	Efeito residual (<i>carryover</i>)	36

4.10.6 Controles de Qualidade	37
4.10.7 Precisão	37
4.10.8 Exatidão.....	37
4.10.9 Recuperação	38
4.10.11 Estabilidade	38
4.11 Animais	39
4.12 Canulação intravenosa e coleta de amostras sanguíneas	39
4.13 Perfil farmacocinético do ácido caurenóico em plasma de ratos	40
4.14 Biodisponibilidade absoluta.....	42
5 Resultados	43
5.1 Condições cromatográficas e seleção do padrão interno	43
5.2 Recuperação do ácido caurenóico do plasma	46
5.3 Cromatografia líquida com detector de índice de refração	49
5.4 Determinação do método de extração da amostra e das condições cromatográficas	50
5.5 Validação do método analítico	55
5.5.1 Seletividade	55
5.5.2 Linearidade.....	56
5.5.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção.....	57
5.5.4 Efeito Residual (<i>Carryover</i>).....	57
5.5.5 Precisão e Exatidão	58
5.5.6 Recuperação	59
5.5.7 Estabilidade	60
5.6 Avaliação Farmacocinética do Ácido Caurenóico em Ratos.....	62
6 Discussão.....	67
7 Conclusão	73
Referências	74
Anexo A – Certificado de aprovação da pesquisa pela CEUA/UFJF	83

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas para o tratamento e cura das enfermidades que acometem os seres humanos é uma prática que existe desde os tempos mais remotos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; MOURA-COSTA et al., 2012). Por um longo tempo, os produtos naturais representaram a principal fonte de medicamentos para a humanidade, formando as bases do que hoje chamamos de medicina tradicional (TIRAPELLI et al., 2008; RATES, 2001).

A utilização de técnicas para o isolamento e identificação de moléculas bioativas provenientes de plantas medicinais permitiu o desenvolvimento de diversos fármacos, muitos deles utilizados na clínica para o tratamento de uma variedade de doenças. Alguns exemplos relevantes de princípios ativos obtidos a partir de plantas são a digoxina (*Digitalis* spp.), quinina e quinidina (*Cinchona* spp.), artemisinina (*Artemisia annua*), vincristina e vimblastina (*Catharanthus roseus*), reserpina (*Rauwolfia serpentina*), efedrina (*Ephedra sinica*), atropina (*Atropa beladonna*), morfina e codeína (*Papaver somniferum*) (CRAGG; NEWMAN, 2013; PHILLIPSON, 2001; RATES, 2001).

Ainda hoje, os produtos naturais continuam sendo fontes significativas de substâncias promissoras como ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos (BALUNAS; KINGHORN, 2005). As plantas medicinais, em especial, contêm misturas de diversos constituintes químicos que podem agir individualmente ou em sinergia para promover a saúde (GURIB-FAKIM, 2006). De fato, a natureza fornece milhões de estruturas químicas diferentes com variados grupos funcionais e arranjos estereoquímicos, o que pode resultar em moléculas capazes de interagir com alvos biológicos específicos (MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

Nosso estudo tem como interesse principal a avaliação da biodisponibilidade do ácido caurenóico, um diterpeno caurânico encontrado nas folhas do guaco (*Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, Asteraceae) (BERTOLUCCI et al., 2009), no óleo de copaíba (óleo-resina de *Copaifera langsdorffii*, Fabaceae) (PAIVA et al., 2002) e nas raízes de yacon (*Smallanthus sonchifolia*, Asteraceae) (PADLA; SOLIS; RAGASA, 2012).

As espécies *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, mais especificamente, são utilizadas na medicina popular para o tratamento de afecções do sistema respiratório, devido às suas propriedades broncodilatadoras, antialérgicas e anti-inflamatórias (GASPARETTO et al., 2015). Um aspecto importante a ser ressaltado é o fato de que estas plantas constam na

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS – que faz parte das iniciativas do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (FERREIRA; DE OLIVEIRA, 2010), lançado pelo Ministério da Saúde em 2009 e que, entre outros objetivos, visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2009b). Ou seja, trabalhos realizados com espécies constantes na lista da RENISUS têm sido incentivados, visto que a finalidade desta relação é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de um elenco de plantas medicinais e fitoterápicos a serem disponibilizados para uso da população (BRASIL, 2009a).

Inúmeros estudos descreveram uma ampla diversidade de propriedades biológicas para o ácido caurenóico tais como inibidor da replicação do vírus HIV em linfócitos, agente citotóxico, tripanocida, larvicida, antimicrobiano, vermífugo, esporicida, analgésico, contraceptivo, relaxante da musculatura lisa, hipotensor, diurético, hipoglicêmico e anti-inflamatório (BATISTA et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2006; HARAGUCHI et al., 2011; SIEBRA et al., 2009; RUFATTO et al., 2012). Diante do potencial farmacológico claramente evidenciado, o ácido caurenóico é uma molécula promissora para servir como protótipo no desenvolvimento de novos medicamentos.

O processo como um todo desde a planta até o lançamento de um novo fármaco é longo, caro e requer abordagens multidisciplinares. Enquanto no passado o interesse maior dos pesquisadores era elucidar a estrutura e a estereoquímica dos metabólitos extraídos das plantas, atualmente os estudos tem se concentrado em investigar as propriedades biológicas dessas substâncias (TIRAPELLI et al., 2008). No entanto, o que percebemos é que ainda existem muitas lacunas a serem exploradas no que se refere a moléculas cujo potencial farmacológico já foi demonstrado, como é o caso do ácido caurenóico. Uma dessas lacunas consiste no fato de que para a grande maioria de metabólitos promissores isolados de plantas ainda não há dados disponíveis na literatura sobre seus perfis farmacocinéticos.

A determinação dos parâmetros farmacocinéticos através de estudos pré-clínicos com animais pode fornecer dados importantes para direcionar a fase clínica de testes com os candidatos a novos fármacos (AMORE; GIBBS; EMERY, 2010).

Diante do panorama aqui exposto, ou seja, frente à importância farmacológica do ácido caurenóico; o fato de o mesmo ser constituinte ativo de espécies medicinais de grande interesse, inclusive governamental; e tendo em vista que ainda não há nenhum relato na

literatura sobre avaliações farmacocinéticas dessa molécula – as quais são necessárias para se traçar diretrizes para os testes clínicos no desenvolvimento de novos fármacos – nosso estudo se propõe a determinar o perfil farmacocinético e a biodisponibilidade oral do ácido caurenóico em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TERPENOS

Os metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídeos) são aqueles considerados essenciais à vida e comuns aos seres vivos. Os metabólitos secundários, entretanto, são substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (SIMÕES et al., 1999).

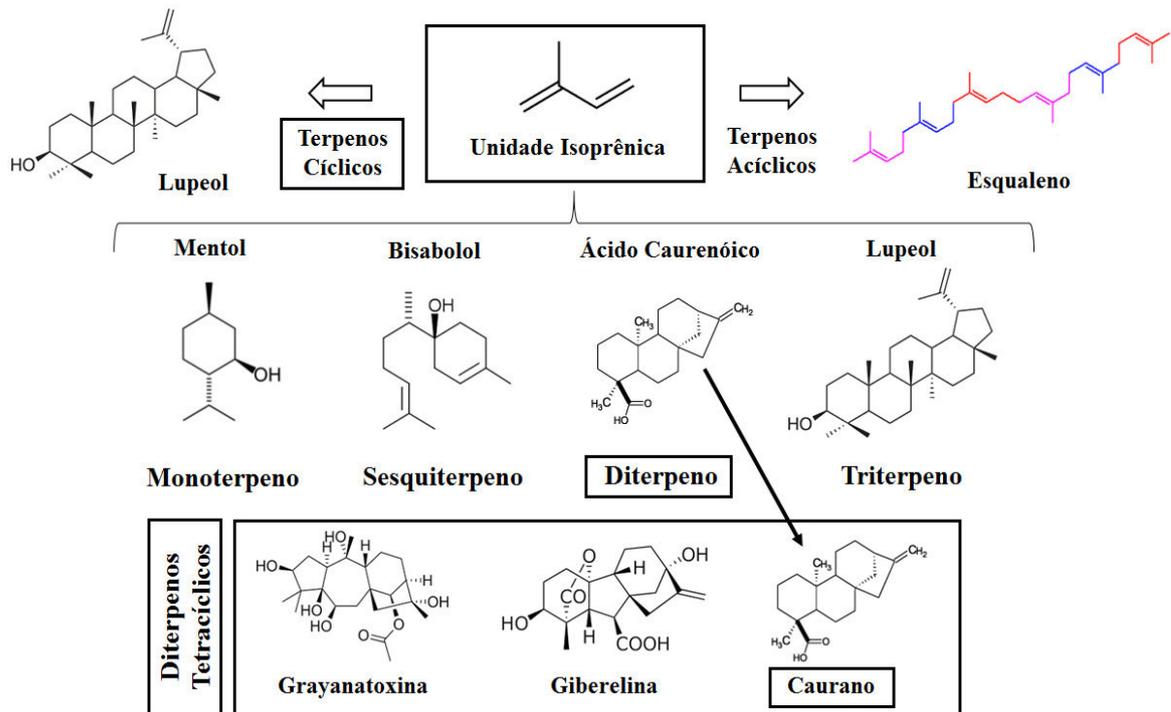
Os terpenos, terpenoides ou isoprenoides são a maior e mais diversa classe de metabólitos secundários com mais de 55 mil estruturas elucidadas (MAIMONE; BARAN, 2007). Essas substâncias desempenham funções de defesa contra herbívoros devido às suas propriedades tóxicas e repelentes. Além desse papel na defesa vegetal, os monoterpenos e alguns sesquiterpenos destacam-se por estarem presentes em compostos voláteis de flores, conferindo aroma característico e sendo responsáveis pela atração de polinizadores (VAN SCHIE; HARING; SCHUURINK, 2006).

Os terpenos podem ser cíclicos ou acíclicos (Figura 1) e são classificados pelo número de unidades isoprênicas de 5 carbonos presentes em suas estruturas: hemiterpenos (C_5 ; 1 unidade isoprênica), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos (acima de 40 carbonos) (BAKKALI et al., 2008)

Os diterpenos cíclicos são agrupados de acordo com o número de anéis em sua estrutura. O ácido caurenóico, molécula em estudo neste trabalho, pertence a subclasse de diterpenos tetracíclicos. Essa subclasse engloba moléculas com diferentes esqueletos básicos: gibberelinas, grayanotoxinas, beiranos, atiseranos, traquilobanos, afidicolonas e, por fim, cauranos – sendo esta última a classe na qual o ácido caurenóico se insere (HANSON, 2009.)

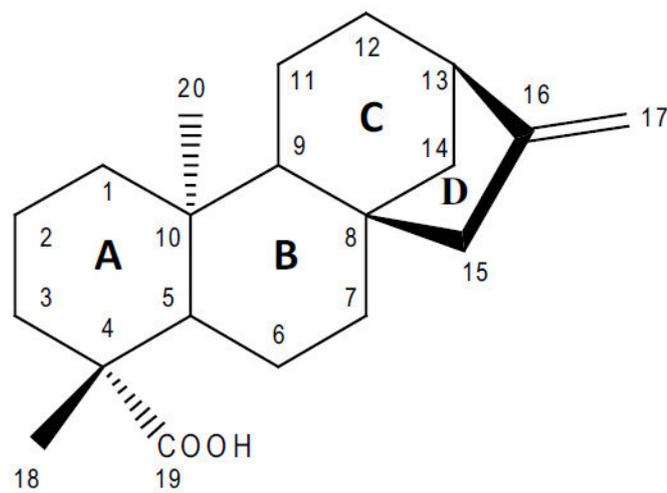
O ácido caurenóico (Figura 2) atua como intermediário na biossíntese de vários diterpenos cauranos, cuja estrutura comum é constituída por uma unidade peridrofenantreno (anéis A, B e C) ligada, por uma ponte entre C-8 e C-13, a uma unidade ciclopentano (anel D) (SIEBRA et al., 2009). Os diterpenos caurânicos são amplamente distribuídos no reino vegetal, porém alguns gêneros, tais como *Xylopia*, *Copaifera*, *Annona* e *Mikania spp.* se destacam por apresentarem elevados teores dessas substâncias (CAVALCANTI et al., 2006).

Figura 1. Estruturas químicas de alguns terpenos



Fonte: da autora.

Figura 2. Estrutura molecular do ácido caurenóico



Fonte: SIEBRA et al., 2009.

Estes compostos tem sido alvo de importantes estudos relacionados às suas propriedades biológicas, tais como: antimicrobiana, antiparasítica, citotóxica, antiproliferativa, vasodilatadora, cicatrizante, anti-HIV, hipotensora, anti-inflamatória, entre outras (CHAVAN et al., 2012; COLL ARÁOZ et al., 2010; COSTA et al., 2015; HARAGUCHI et al., 2011). Desta forma, por representarem um grupo de moléculas com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, inúmeros trabalhos têm sido publicados não só aprofundando os conhecimentos sobre suas ações farmacológicas, mas também propondo modificações químicas a fim de se obter substâncias mais ativas e melhor compreender a relação estrutura-atividade (SIEBRA et al., 2009).

2.2 ÁCIDO CAURENOICO

O ácido caurenoico (Figura 2), também denominado ácido *ent-caur-16-en-19-oico*, é um diterpeno caurânico primeiramente isolado da planta *Ricinocarpus stylosus* (Euphorbiaceae) em 1964 (HENRICK; JEFFERIES, 1964). Desde então, esta substância já foi identificada em diversas outras espécies medicinais, as quais são utilizadas popularmente para o tratamento de inúmeras afecções, tendo sido encontrada nas plantas do gênero *Acanthopanax* provenientes de países como Coreia, Japão, China e Rússia, assim como em plantas originárias da América do Sul e Central, entre elas *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip, as quais são conhecidas como guaco (PEDROSO et al., 2008; PHUONG et al., 2006). Na literatura relata-se também o isolamento do ácido caurenoico no óleo de copaíba e em várias outras espécies tais como *Xilopia frutescens*, *Xilopia aethiopica*, *Wedelia paludosa*, *Aralia Cordata*, *Annona glabra*, *Smalanthus sonchifolius* etc. (DE MELO et al., 2001; OLIVEIRA; SANT'ANA; BASTOS, 2002; BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005; LEE et al., 2009; RAGA et al., 2010).

O ácido caurenoico possui peso molecular de 302.45 g/mol e valor de pKa 4.70 ± 0.40 (COSTA et al., 2015). Trata-se de uma molécula que desperta grande interesse devido a ampla variedade de atividades biológicas que apresenta.

Ao avaliar o efeito *in vitro* do ácido caurenoico sobre a musculatura lisa uterina de ratas, De Alencar Cunha e colaboradores (2003) observaram que este diterpeno foi capaz de inibir de forma dose-dependente a resposta contrátil promovida pelos agentes ocitocina, acetilcolina e cloreto de bário. Os resultados obtidos por esse grupo sugerem que a ação

relaxante do ácido caurenico sob as contrações uterinas não tem envolvimento de receptores β_2 - adrenérgicos ou H_2 -histaminérgicos, mas se justifica principalmente pelo bloqueio de canais de cálcio e parcialmente pela abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP (DE ALENCAR CUNHA et al., 2003). Outro grupo de pesquisa demonstrou essa ação antiespasmódica em experimentos nos quais o ácido caurenico inibiu a contração induzida eletricamente e por acetilcolina no íleo isolado de cobaias (ZHANG, G. et al., 2008).

Já foi também registrado o efeito relaxante do ácido caurenico sob o músculo liso vascular, inibindo a contratilidade promovida pela fenilefrina em testes *in vitro* utilizando a artéria carótida de ratos (AMBROSIO et al., 2006; TIRAPELLI et al., 2002). A pesquisa sobre os possíveis mecanismos responsáveis por essa ação vasodilatadora apontou que o ácido caurenico atua em múltiplos sítios de ação: bloqueando o influxo de cálcio extracelular; estimulando a óxido nítrico sintase neuronal; ativando a via do NO/GMPc, que em última instância pode modular a abertura de canais de potássio; e induzindo a produção de NO a partir de células endoteliais (TIRAPELLI et al., 2004). A fim de compreender melhor a relação estrutura-atividade investigou-se o papel do grupo carboxílico presente na estrutura do ácido caurenico na inibição da contração da aorta de ratos, concluindo-se que a metilação do grupo carboxila em C-19 reduziu, mas não aboliu, a ação antiespasmódica nesta artéria (AMBROSIO et al., 2004).

A aplicação intravenosa de ácido caurenico (10 mg/kg) em ratos normotensos resultou em decréscimo de 17% na pressão arterial sistólica, sem alterações na pressão diastólica e redução de 20% na frequência cardíaca, além disso, outros experimentos demonstraram que esse caurano também desencadeou o aumento do fluxo coronariano e apresentou significantes efeitos diuréticos e natriuréticos (SOMOVA et al., 2001). Outros autores também descreveram o decréscimo da pressão arterial média em ratos normotensos após administração intravenosa em *bolus* (15 mg/kg) (HIPÓLITO et al., 2011; TIRAPELLI et al., 2008). Com base nas ações cardiovasculares demonstradas *in vivo* e *in vitro*, sugeriu-se que o ácido caurenico possui potencial para aplicação em diversas condições crônicas tais como hipertensão, diabetes e aterosclerose (TIRAPELLI et al., 2008).

Quanto à ação antimicrobiana, o ácido caurenico mostrou-se ativo contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (OKOYE et al., 2012; PADLA et al., 2012; URZÚA et al., 2008; VELIKOVA et al., 2000). Experimentos revelaram ação antibacteriana específica, apenas contra microrganismos Gram-

positivos, fato esse que pode estar relacionado às diferenças na estrutura da parede celular e à permeabilidade dessa substância (PADLA et al., 2012). Análises dos efeitos anticariogênicos do ácido caurenico mostraram que o mesmo, além de reduzir a expressão de fatores de virulência, inibiu significativamente o crescimento, a produção de ácido, a formação de biofilme e a aderência do *S. mutans*, uma das principais bactérias cariogênicas (JEONG et al., 2013). Há também registros da atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium herbarum* e *Candida albicans* (OLIVIER; VAN WYK, 2013).

O ácido caurenico exibiu atividade antiparasitária contra *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (AMBROSIO et al., 2006). Observou-se atividade *in vitro* contra as formas tripomastigotas, porém com um fator limitante referente à lise de eritrócitos (VIEIRA et al., 2002). A avaliação do ácido caurenico contra todos os estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* indicou atividade moderada com citotoxicidade parcial, sendo que o melhor valor de IC₅₀ encontrado foi para a forma amastigota do parasito (IZUMI et al., 2012). A síntese de benzaldeído-tiossemicarbazonas derivadas do ácido caurenico potencializou a atividade anti-tripanosossoma desse diterpeno, com alguns desses produtos apresentando menor citotoxicidade (HARAGUCHI et al., 2011).

Em testes *in vitro* de atividade antimalárica, o ácido caurenico exibiu atividade moderada contra linhagens de *Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina (LANGAT et al., 2012). A esterificação do grupo carboxílico em C-19 produziu derivados mais eficazes contra o protozoário (BATISTA et al., 2013).

Os ensaios de atividade leishmanicida, por sua vez, exibiram maior atividade do ácido caurenico contra amastigotas axênicos de *Leishmania amazonensis* (DOS SANTOS et al., 2013). No entanto, esse diterpeno também exibiu efeito direto sob as formas promastigotas, reduzindo também o número de amastigostas intracelulares e a porcentagem de macrófagos infectados no peritônio de ratos (MIRANDA et al., 2015).

Vários autores relataram a atividade anti-inflamatória do ácido caurenico tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No modelo experimental de indução de colite com ácido acético em ratos, essa substância reduziu os danos teciduais (doses de 50 e 100 mg/kg), sendo este efeito protetor atribuído, pelo menos em parte, às suas ações antioxidantes e anti-lipoperoxidativas (PAIVA et al., 2002). Há também evidências de que o ácido caurenico ativa o fator de transcrição Nrf2, que regula a expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante (LYU et al., 2011). O ácido caurenico administrado por via intraperitoneal (100 mg/kg) exibiu

resultados promissores ao inibir em mais de 70% o edema de pata induzido por carragenina, mostrando-se mais efetivo que a prednisolona (LIM et al., 2009). Em experimentos com macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS, o ácido caurenóico inibiu a liberação de prostaglandina E2 e do fator de necrose tumoral (TNF- α), a produção de óxido nítrico e a expressão das enzimas cicloxigenase-2 e óxido nítrico sintase indutiva. Além disso, exibiu efeitos significativos no modelo *in vivo* de edema de orelha (CHOI et al., 2011; DÍAZ-VICIEDO et al., 2008). Os resultados promissores obtidos permitiram sugerir que o ácido caurenóico apresenta potencial para o desenvolvimento de medicamentos com aplicação em quadros inflamatórios tais como colite, artrite reumatoide, asma e gastrite (CHOI et al., 2011).

A ação antinociceptiva desse metabólito foi evidenciada em modelos *in vivo* como o teste da formalina, contorções abdominais, placa quente e hiperalgesia mecânica induzida por carragenina, tendo sido observados efeitos significativos (CHAVAN et al., 2012; MIZOKAMI et al., 2012). Os principais mecanismos que podem estar relacionados são: inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β ; inibição da cicloxigenase-2 e conseqüentemente da produção de prostaglandina E2 e ativação da via de sinalização NO-GMPc-PKG-canais de potássio sensíveis a ATP (MIZOKAMI et al., 2012).

As pesquisas que evidenciam a ação antitumoral do ácido caurenóico indicam que esta molécula pode ser promissora para o desenvolvimento de um novo agente anticancerígeno, sendo assim necessárias avaliações mais aprofundadas e, inclusive, a realização de estudos de estrutura-atividade (CUCA et al., 2011; HENRY et al., 2006; LIZARTE NETO et al., 2013). Em experimentos com cinco linhagens tumorais – câncer de laringe, próstata, mama, pulmão e carcinoma cervical – o ácido caurenóico não só exibiu efeito antiproliferativo marcante em todas, como também teve ação sobre aquelas que se mostraram resistentes ao controle positivo, a doxorubicina (CUCA et al., 2011).

Outros trabalhos indicaram atividade significativa do ácido caurenóico como anticonvulsivante (DALÓ; SOSA-SEQUERA; USUBILLAGA, 2007), gastroprotetor (LEMOS et al., 2015), antiasmático (CHO et al., 2010), além de já terem sido demonstrados possíveis impactos positivos na terapia para diabetes devido à ação inibitória sobre certas enzimas envolvidas nas vias de sinalização e na sensibilidade à insulina (DENG et al., 2013; JUNG et al., 2012; NA et al., 2006).

2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E MÉTODOS APLICADOS À SEPARAÇÃO DO ÁCIDO CAURENOICO

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se destaca pela rapidez, reprodutibilidade e sensibilidade que oferece, além de sua aplicabilidade na separação e purificação de uma ampla variedade de moléculas (AGUILAR, 2004; MCMASTER, 2007). A evolução e o refinamento desta técnica permitiram o desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficientes em análises qualitativas ou quantitativas. São inúmeras as áreas que demandam separações de alta eficiência para as mais diversas finalidades: análises químicas, ambientais, alimentícias e farmacêuticas. Neste último caso, destacam-se as aplicações em ensaios de pureza, controle de qualidade, bem como nos estudos de farmacocinética e metabolismo de fármacos (FEKETE et al., 2014).

Na cromatografia líquida de alta eficiência emprega-se uma fase móvel líquida e uma fase estacionária finamente dividida, a qual encontra-se empacotada em uma coluna. O princípio de separação fundamenta-se nas características físico-químicas de cada composto e nas interações entre os analitos e a fase estacionária, o que resulta na migração diferencial pela coluna (SKOOG et al., 2006)

Na cromatografia de fase reversa a coluna contém uma fase estacionária pouco polar, como C₈ ou C₁₈, e a fase móvel é composta, na maioria dos casos, por misturas de água, acetonitrila ou metanol (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011). A eluição pode ser feita de forma isocrática, na qual concentração do solvente orgânico é constante, ou em gradiente, quando a composição de solvente orgânico na fase móvel é aumentada ao longo do tempo. Os solutos são eluídos em ordem crescente de hidrofobicidade, ou seja, os menos polares, eluem por último (AGUILAR, 2004).

O detector é um transdutor que converte uma propriedade física ou química do analito que está sendo eluído em um sinal elétrico, que pode ser diretamente relacionado à concentração desse analito, o que torna possível as análises quantitativas (SNYDER et al., 2011). As quantidades a serem detectadas podem variar da escala de picogramas e nanogramas (analítica) até miligramas (semi-preparativa) e gramas (preparativa). Entre os sistemas de detecção utilizados podemos citar: UV-Visível, fluorescência, índice de refração, infravermelho, polarímetro e dicroísmo circular, eletroquímicos, espalhamento de luz (*light-scattering*), ressonância magnética nuclear e espectrômetro de massas (MCMASTER, 2007).

Os métodos já descritos na literatura para a determinação do ácido caurenico – alguns deles reunidos na Tabela 1 – serviram como ponto de partida para o desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas em nosso laboratório. Como pode ser observado, a maioria desses trabalhos aplica-se a identificação e/ou quantificação do ácido caurenico em extratos vegetais (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005; BERTOLUCCI et al., 2013a; 2013b; BERTOLUCCI et al., 2009; DE MELO et al., 2001; FUCINA et al., 2012; LEE et al., 2009; MIYAZAKI et al., 2015; OLIVEIRA; SANT'ANA; BASTOS, 2002; PEDROSO et al., 2008).

Além disso, a cromatografia é um método comumente empregado no controle de qualidade de materiais vegetais por possibilitar a detecção de variações químicas na composição, as quais podem ser decorrentes das condições de crescimento da planta, tempo de colheita, processamento e armazenagem (BERTOLUCCI et al., 2013a). Outras vertentes de metodologias de CLAE aplicadas ao ácido caurenico relacionam-se à sua quantificação em preparações farmacêuticas de guaco (GASPARETTO et al., 2011), avaliação da sua permeação cutânea através de células de Franz (MESTRES et al., 2011), além de um estudo cinético com o xarope de guaco, cuja proposta era quantificar os metabólitos dessa planta (cumarinas, ácido caurenico, 7-hidróxi-cumarina e ácido o-cumárico) no sangue de voluntários (GASPARETTO et al., 2015).

Vale ressaltar que o desenvolvimento de métodos de cromatografia líquida envolve a busca de condições operacionais (composição da fase móvel, pH, tipo de coluna, temperatura etc.), a fim de se otimizar os resultados para que proporcionem boa resolução e pureza do pico além de análises mais rápidas (BERTOLUCCI et al., 2013a).

Tabela 1. Métodos de CLAE descritos na literatura para análise do ácido caurenico

Proposta do trabalho	Técnica	Condições Cromatográficas	Referências
Quantificação em espécies de <i>Xylopi</i>	CLAE/UV-Vis	Coluna: ODS (250 x 4,0 mm; 5 µm); Fase móvel: ACN:H ₂ O (70:30 v/v), Eluição isocrática; Forno: 40 °C; Fluxo: 1 mL/min; λ = 220 nm.	De Melo et al., 2001
Quantificação em <i>W. paludosa</i>	CLAE/UV-Vis	Coluna: ODS (150 x 4,0 mm; 5 µm); Fase móvel: ACN:H ₂ O (60:40 v/v); Eluição isocrática; Forno: 35 °C; Fluxo: 1 mL/min; λ = 220 nm.	Batista; Braga; Oliveira, 2005
Quantificação nas raízes de <i>Aralia cordata</i>	CLAE/UV-Vis	Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: ACN:H ₂ O acidificada com 0.1% de ácido trifluoroacético (70:30 v/v); Eluição isocrática; Fluxo: 1 mL/min; λ = 205 nm.	Lee et al., 2009
Quantificação/ avaliação da permeação cutânea com células de Franz	CLAE/UV-Vis	Coluna: C8 (250 x 3,0 mm; 5 µm); Fase móvel: (A): ACN; (B): H ₂ O:ACN (95:5 v/v); (C): H ₂ O, ácido fosfórico 0.05 M - A:B:C (50:45:5, v/v/v); Forno: 40 °C; Fluxo: 0,5 mL/min; λ = 200 nm.	Mestres et al., 2011
Quantificação em folhas de <i>Annona glabra</i>	CLAE-DAD	Coluna: C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: ACN:H ₂ O (85:15 v/v); eluição isocrática; Forno: 25 °C; Fluxo: 1 mL/min; λ = 210 nm.	Oliveira; Sant'Ana; Bastos, 2002
Determinar a presença em extratos de guaco	CLAE-DAD	Coluna: C ₁₈ (150 x 3,9 mm; 4 µm); Fase móvel: MeOH:H ₂ O acidificada com ácido acético 0.01% (30:70 v/v); Eluição isocrática; Forno: 30 °C; Fluxo: 1,5 mL/min; λ = 200 nm.	Pedroso et al., 2008

Continua

Continuação Tabela 1

Proposta do trabalho	Técnica	Condições Cromatográficas	Referências
Quantificação em extratos de <i>Sphagneticola trilobata</i> secos por <i>spray drying</i>	CLAE-DAD	Coluna: C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A): ACN e (B): H ₂ O acidificada com ácido fosfórico, pH 3,0; Gradiente; Forno: 35 °C; Fluxo: 1 mL/min; λ = 210 nm.	Fucina et al., 2012
Quantificação em folhas de <i>Mikania laevigata</i> e <i>Mikania glomerata</i>	CLAE-DAD	Coluna: C ₁₈ (125 x 4mm; 5µm); Fase móvel: H ₂ O, ACN e MeOH acidificados com ácido fosfórico 0,1 %; Gradiente; Forno: 25 °C; Fluxo: 1 mL/min; λ = 210 nm.	Bertolucci et al, 2009; Bertolucci et al, 2013a; Bertolucci et al, 2013b
Quantificação em preparações farmacêuticas de guaco	CLAE-ESI-EM-EM	Coluna: C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm); Fase móvel:(A): H ₂ O, 5 mM de formiato de amônio e (B): ACN:H ₂ O (97:3 v/v), 5 mM de formiato de amônio; Gradiente; Forno: 25 °C; Fluxo: 220 µL/min.	Gasparetto et al., 2011
Quantificação no plasma - farmacocinética dos metabólitos do xarope de guaco	CLAE-EM-EM	Coluna: C18 (150 x 2.1 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) H ₂ O e (B) ACN:H ₂ O (95:5 v/v), ambas contendo 1 mM de formiato de amônio; Gradiente; Fluxo: 400 µL/min; Forno: 35 °C	Gasparetto et al., 2015
Quantificação em plantas	UPLC-EM	Coluna: C ₁₈ (50 x 2.1mm; 1.7 µm); Fase móvel: (A): H ₂ O, ácido fórmico 1% e (B): MeOH, ácido fórmico 1%; Gradiente; Fluxo: 0,2 mL/min.	Miyazaki et al., 2015

Nota: ACN: acetonitrila; H₂O: água; MeOH: metanol; λ: comprimento de onda.

Fonte: elaborada pela autora.

2.4 FARMACOCINÉTICA

Através dos estudos farmacocinéticos, são avaliados os processos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de fármacos. As informações desses estudos

contribuem, por exemplo, para o delineamento das doses ideais e esquemas terapêuticos adequados a serem implementados (WU; LIN; TSAI, 2014).

O efeito de um fármaco é normalmente relacionado à sua concentração no sítio de ação. No entanto, como a determinação dos níveis de fármaco no local de ação é inviável, sua concentração pode ser monitorada em fluidos facilmente amostrados tais como o plasma e a urina (DIPIRO et al., 2005).

Em administrações extravasculares (via oral, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, etc.) as moléculas do princípio ativo devem ultrapassar uma série de barreiras fisiológicas para serem absorvidas, ou seja, para alcançarem o sistema vascular. A fração do fármaco que, de fato, atinge a circulação sistêmica é definida como a biodisponibilidade do mesmo (BAUER, 2001).

A biodisponibilidade pode ser avaliada através de uma curva que relaciona o tempo decorrido após a administração com a concentração plasmática de um fármaco. Para administrações extravasculares o perfil inicial da curva vai apresentar um aumento gradual da concentração do fármaco no plasma, referente à fase de absorção, até que se atinja a concentração máxima (C_{max}) – quando a taxa de absorção se iguala a de eliminação – e a eliminação passa a ser o processo principal com decréscimo das concentrações plasmáticas ao longo do tempo. O tempo máximo (T_{max}) representa o tempo em que o fármaco alcança a concentração plasmática máxima (BAUER, 2001).

Um parâmetro usualmente definido em estudos cinéticos é o volume de distribuição (V_d), que representa uma medida direta da extensão da distribuição do fármaco. Assim, quanto maior o seu valor, mais elevada é a distribuição do fármaco no organismo.

Quanto à fase de eliminação, é importante definirmos mais alguns parâmetros relacionados. A constante de eliminação (K_{el}) representa a fração do fármaco que é removida por unidade de tempo. O tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) é o tempo necessário para que a concentração do fármaco no plasma caia pela metade. E, por fim, o clearance que consiste no volume de plasma depurado do fármaco por unidade de tempo (DIPIRO et al., 2005).

Para fármacos com farmacocinética linear a biodisponibilidade pode ser medida comparando-se as concentrações plasmáticas x tempo alcançadas na via extravascular com a via intravenosa. Ou seja, após construção das curvas de variação temporal da concentração do fármaco no plasma, a biodisponibilidade pode ser calculada dividindo-se a área sob a curva (ASC) da via extravascular pela área sob a curva da via intravenosa, considerando-se que a

dose administrada tenha sido a mesma, ou ajustando-se com as respectivas doses (BAUER, 2001).

Vale ressaltar que, nas etapas envolvidas no desenvolvimento de novos fármacos, os ensaios farmacocinéticos pré-clínicos facilitam a eliminação de candidatos de menor potencial farmacológico, ineficazes e que apresentem efeitos indesejáveis ou alta toxicidade; de modo que aqueles de maior interesse sejam triados de maneira mais específica (AMORE; GIBBS; EMERY, 2010; SINGH, 2006).

No que se refere aos produtos naturais, apesar de muitas substâncias apresentarem efeitos farmacológicos bem documentados, o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de protótipos derivados de plantas apresenta vários desafios, entre os quais o pouco conhecimento sobre os aspectos farmacocinéticos, o que pode representar um obstáculo nas tentativas de transformar esses produtos naturais em fármacos para uso clínico (HAO; ZHENG; WANG, 2014).

Quanto ao ácido caurenóico, ainda não existem avaliações farmacocinéticas pré-clínicas descritas na literatura. Em um estudo clínico com voluntários que receberam 60 mL de xarope de guaco por via oral (17,6 mg de cumarinas; 1,1 mg de ácido o-cumárico e 8,9 mg de ácido caurenóico), nenhum dos metabólitos de interesse foi detectado no plasma até 600 minutos após a administração. Apenas o perfil farmacocinético da cumarina foi traçado após fortificação do xarope com 1500 mg dessa substância (GASPARETTO et al., 2015). Diante da carência de dados farmacocinéticos sobre o ácido caurenóico, nossa proposta foi avaliar seu perfil farmacocinético e sua biodisponibilidade pré-clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo determinar o perfil farmacocinético e biodisponibilidade oral do ácido caurenóico em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir o método para extrair o ácido caurenóico do plasma.

Desenvolver e validar a metodologia analítica para identificação e quantificação do ácido caurenóico, em plasma, por CLAE-UV.

Determinar os parâmetros farmacocinéticos de importância clínica para esta molécula (C_{max} , T_{max} , V_d , K_{el} , $T_{1/2}$, CL e ASC).

Determinar o perfil de absorção oral e a biodisponibilidade absoluta (via oral x via intravenosa) do ácido caurenóico em ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EQUIPAMENTOS

- HPLC Waters e2695 Alliance e detector UV-Vis 2489 duplo canal; Waters Corporation, Milford, EUA
- Coluna XBridge C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm); Waters Corporation, Milford, EUA
- Pré-coluna C₁₈ (20 x 4,6 mm, 5 µm); Waters Corporation, Milford, EUA
- HPLC Waters com detector de índice de refração modelo 2414; Waters Corporation, Milford, EUA
- Sistema de purificação de água Milli-Q®; Millipore do Brasil
- Banho-maria com circulação SL 154/10; Solab, Piracicaba, Brasil
- Agitador tipo Vortex®
- Balança analítica AUY 220; Marte Científica/Shimadzu do Brasil
- Centrífuga refrigerada NT 835; Novatecnica, Piracicaba, Brasil

4.2 SOLVENTES E PADRÕES DE REFERÊNCIA

- Água ultrapura – obtida em sistema de purificação Mili-Q
- Acetonitrila grau HPLC; J. T. Baker/Avantor, Xalostoc, México
- Metanol grau HPLC; J. T. Baker/Avantor, Xalostoc, México
- Ácido acético glacial; Êxodo Científica, Hortolândia, Brasil
- Ácido Ortofosfórico; Merck, Darmstadt, Alemanha
- Bisabolol > 95% (GC); Sigma-aldrich, St. Louis, EUA
- Tween 80
- Timol
- Mentol
- β-cariofileno

4.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO CAURENOICO

O ácido caurenoico foi isolado a partir do óleo-resina de *Copaifera sp.*, segundo metodologia previamente descrita por Simão e colaboradores (2016). Aproximadamente 150,0 g de óleo-resina foram submetidos à cromatografia líquida à vácuo (CLV) (PELLETIER; CHOKSHI; DESAI, 1986) em sílica gel 60 H, utilizando como eluente acetato de etila em hexano em grau crescente de polaridade, o que levou à obtenção de seis frações (F1-F6; 2000 mL cada). As frações F1 a F6 foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD, n-hexano/acetato de etila, 8:2). O ácido caurenoico se apresentou como um dos componentes majoritários da fração F2 (35,3 g), sendo esta posteriormente fracionada por CLV (sílica gel 60 H) empregando-se como eluente quantidades crescentes de 3% de acetato de etila em hexano. Este procedimento resultou em 10 novas frações (F2.1-F2.10, 400 mL cada). A fração F2.7 (11,4 g) foi lavada com metanol frio fornecendo o ácido caurenoico (5,7 g), o qual foi identificado por análise espectroscópica e comparação com os dados disponíveis na literatura (DO NASCIMENTO; DE OLIVEIRA, 2001). Esta substância foi generosamente cedida pelo Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio da Universidade de Franca (São Paulo, Brasil) para a realização deste trabalho.

4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

4.4.1 Ácido caurenoico (1 mg/mL)

Pesou-se 25 mg de ácido caurenoico, que foram dissolvidos em 25 mL de metanol utilizando-se um balão volumétrico para acerto do volume. Dessa forma obtivemos a solução estoque na concentração 1 mg/mL, a qual foi deixada no banho de ultrassom por 15 minutos e, posteriormente, armazenada em microtubos sob refrigeração.

4.4.2 Bisabolol (1 mg/mL)

A solução estoque de bisabolol (1 mg/mL) foi preparada em metanol e posteriormente diluída a fim de obtermos a solução de trabalho na concentração de 0,2 mg/mL. A mesma foi armazenada em microtubos sob refrigeração.

4.4.3 Ácido acético glacial 1% (v/v)

Pipetou-se 1 mL de ácido acético glacial P.A. em um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água ultrapura, a fim de se obter uma solução aquosa de ácido acético 1% (v/v).

4.5 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA/UV-VIS

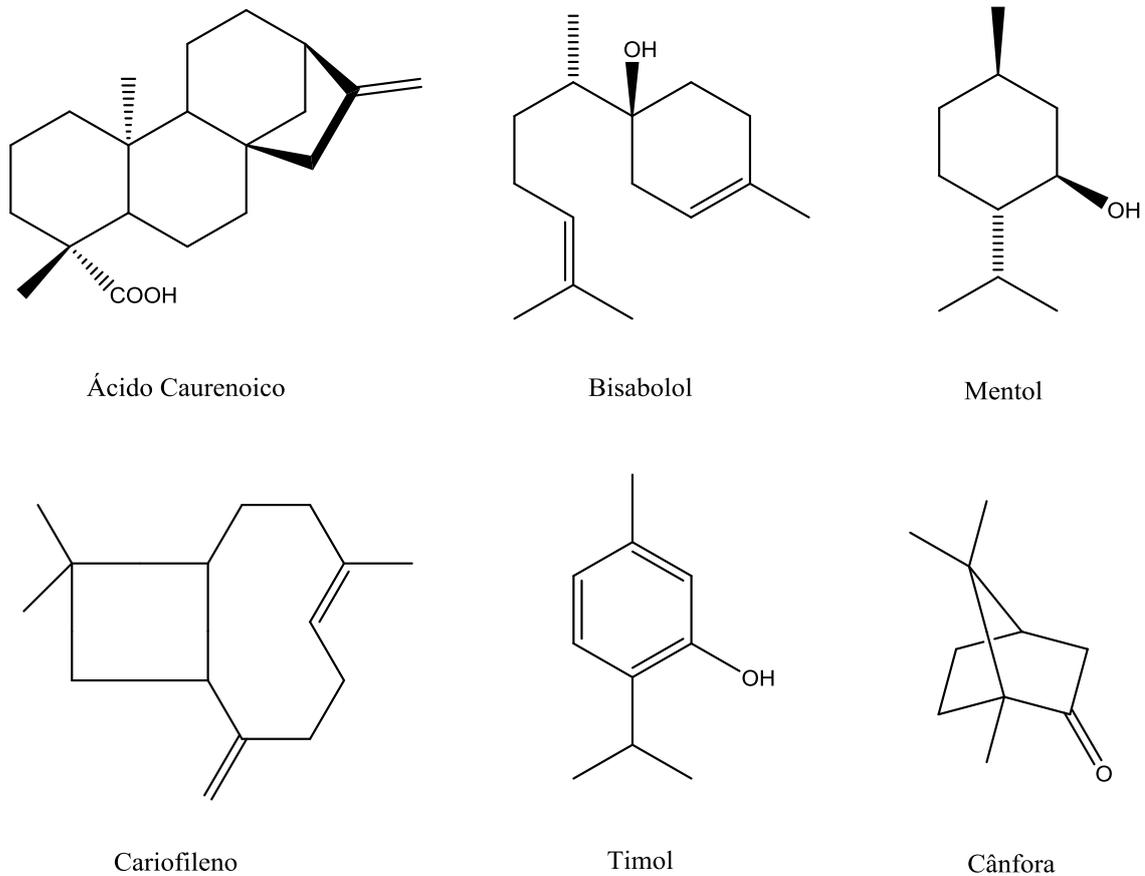
O método para quantificação do ácido caurenico foi desenvolvido no Sistema de cromatografia líquida Waters, constituído de Módulo de Gerenciamento de Solventes e Amostras e2695 Alliance, bomba quaternária, injetor automático de amostras, *degasser* de fase móvel, detector UV-Vis 2489 duplo canal, forno e software Empower 3 para controle do sistema, integração dos picos e elaboração dos relatórios de análise.

Como fase estacionária utilizou-se uma coluna X-Bridge C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm) acompanhada de uma pré-coluna (20 x 4,6 mm; 5 µm). A escolha das melhores condições cromatográficas foi feita após avaliarmos variações de fluxo (1; 1,2 e 1,5 mL/min), temperatura do forno (35 e 40 °C), comprimento de onda (200, 210 e 220 nm) e composição da fase móvel (acetonitrila e água ultrapura).

4.6 SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO

A quantificação do ácido caurenico foi realizada pelo método de padronização interna. Essa técnica consiste na construção da curva analítica da substância de interesse com soluções padrão de concentrações conhecidas, às quais se adiciona a mesma quantidade de um composto chamado padrão interno. Posteriormente, os resultados são expressos em um gráfico que relaciona a razão das áreas dos picos – área da substância dividida pela área do padrão interno que tem concentração constante – com a concentração variada da substância que está sendo quantificada (RIBANI et al., 2004). Assim, a fim de selecionarmos uma substância para ser utilizada como padrão interno no método de quantificação do ácido caurenico, as seguintes moléculas foram avaliadas: cânfora, mentol, timol, bisabolol e cariofileno (Figura 3).

Figura 3. Estruturas químicas do ácido caurenico e dos candidatos a padrão interno



Fonte: da autora.

4.7 PROCESSAMENTO DO SANGUE E OBTENÇÃO DE PLASMA BRANCO

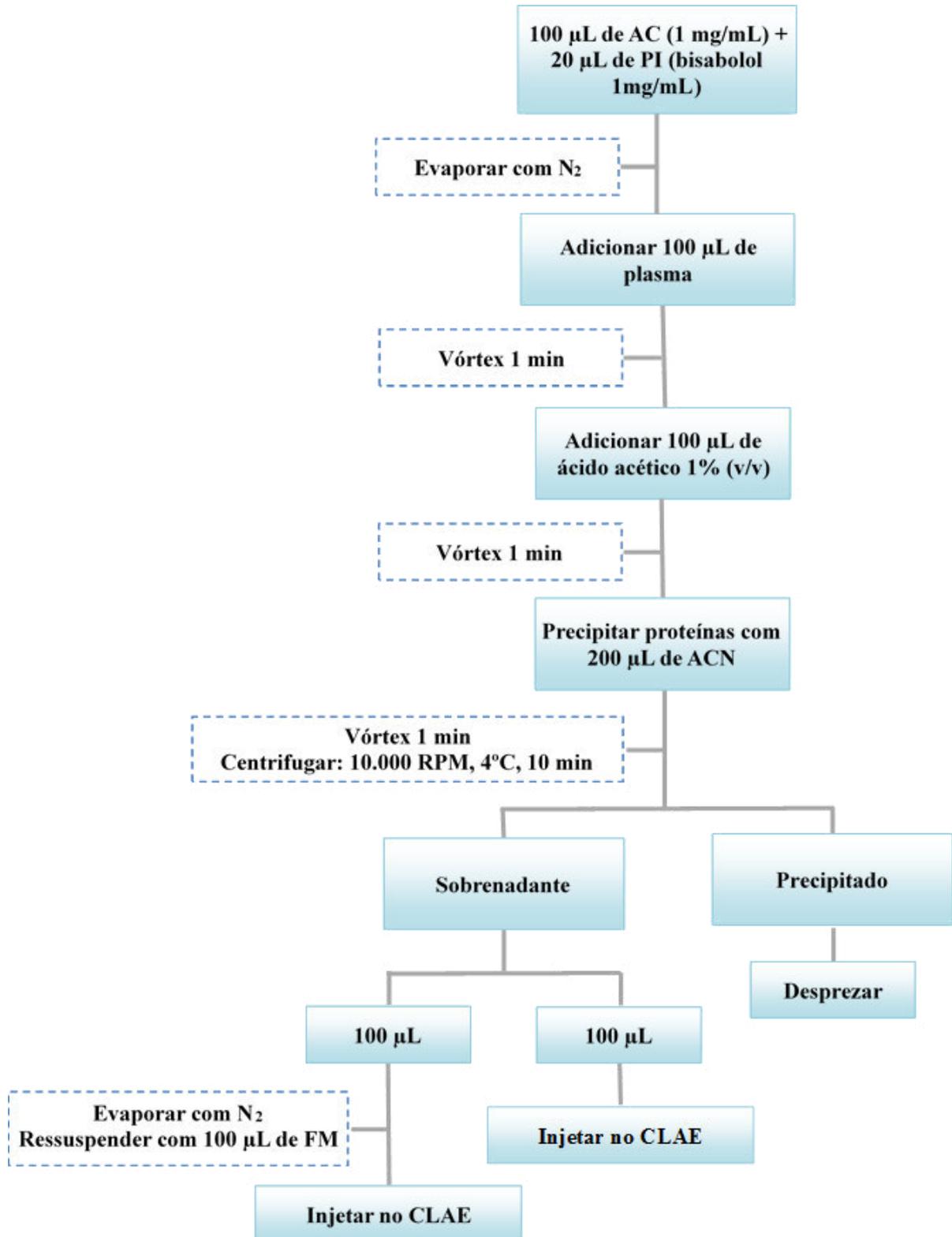
Plasma branco foi obtido de ratos Wistar, os quais não haviam recebido nenhum tipo de tratamento. Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina e o sangue foi coletado por punção cardíaca, utilizando-se heparina como anticoagulante. O mesmo foi centrifugado por 10 minutos, a 25 °C e 10.000 RPM. O sobrenadante foi recolhido e armazenado em congelador até o momento das análises.

4.8 RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO CAURENOICO DO PLASMA

O ácido caurenico e o padrão interno foram adicionados às amostras de plasma branco a fim de se testar o método para extração dessas substâncias através de precipitação de proteínas com acetonitrila (NASCIMENTO et al., 2009). Para isso, dois fluxos de procedimentos foram avaliados:

- Método A: em um microtubo adicionou-se 100µL da solução estoque de ácido caurenico (1 mg/mL) e 20 µL de bisabolol (1 mg/mL). O volume da solução foi evaporado à secura sob corrente de nitrogênio e, posteriormente, adicionou-se 100 µL do pool de plasmas ao resíduo de ácido caurenico e bisabolol. Para a extração utilizou-se uma proporção plasma:acetonitrila 1:2, ou seja, 200 µL de acetonitrila foram acrescentados. Após a adição de acetonitrila, o microtubo foi agitado em vórtex por 1 minuto a fim de facilitar a precipitação das proteínas e, em seguida, foi feita a centrifugação a 10.000 RPM, por 10 minutos, na temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi injetado no CLAE para análise.
- Método B: promoveu-se acidificação das amostras de plasma antes da partição com acetonitrila, conforme esquema apresentado na Figura 4. Em um microtubo foram pipetados 100 µL de ácido caurenico (1 mg/mL) e 20 µL do padrão interno (bisabolol, 1 mg/mL). Esse volume de solução foi evaporado sob corrente de nitrogênio e posteriormente adicionou-se 100 µL de plasma branco, levando-se ao vórtex por 1 minuto. O próximo passo consistiu na adição de 100 µL de ácido acético 1% (v/v) e agitação por mais 1 minuto. Somente depois disso adicionou-se os 200 µL de acetonitrila, seguindo-se então os passos previamente descritos: 1 minuto de agitação e centrifugação por 10 minutos, a 10.000 RPM, na temperatura de 4 °C. Desta vez, 20 µL do sobrenadante foram injetados diretamente no CLAE, enquanto outros 100 µL foram evaporados à secura sob corrente de nitrogênio e ressuspensos no mesmo volume de fase móvel (ACN:H₂O, 70:30 v/v) para posterior análise por CLAE-UV.

Figura 4. Esquema da extração do ácido caurenico do plasma – Método B



Nota: AC: ácido caurenico; PI: padrão interno; N₂: nitrogênio; ACN: acetonitrila; FM: fase móvel.
Fonte: da autora.

4.9 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO ULTRAVIOLETA *VERSUS* ÍNDICE DE REFRAÇÃO

A fim de verificar se a detecção do ácido caurenico seria favorecida utilizando-se como detector o índice de refração, foram realizadas análises na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFJF, nas quais utilizamos Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Waters composto por: bomba binária modelo 1525, forno, injetor automático modelo 2707 e detector de índice de refração modelo 2414. As condições previamente otimizadas em CLAE/UV-Vis foram mantidas: fase móvel isocrática de ACN:H₂O (70:30 v/v), fluxo de 1 mL/min, forno a 40°C e mesma fase estacionária – coluna XBridge C₁₈ (150 x 4.6 mm; 5 µm) acompanhada de uma pré-coluna (20 x 4,6 mm; 5 µm). Durante o experimento, alguns parâmetros inerentes ao detector de índice de refração foram alterados na tentativa de aprimorar a detecção. Entre os parâmetros que foram controlados ao longo das análises estão: a sensibilidade, a taxa de aquisição (*sampling rate*) e a razão sinal/ruído (*filter time*).

4.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação do método analítico para identificação e quantificação do ácido caurenico seguiu as determinações do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos para a Indústria (FDA, 2001) e da RDC N° 27, de 17 de maio de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012), a qual dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos. A validação englobou ensaios para determinação da seletividade, do limite inferior de quantificação, linearidade, curva de calibração, precisão e exatidão intra e intercorridas, estabilidade, bem como efeito residual para o composto conforme as especificações de cada ensaio, descritas a seguir.

4.10.1 Seletividade

A seletividade do método para determinação do analito e do padrão interno (PI) deve ser avaliada em pelo menos 4 amostras de plasma normal, uma lipêmica e uma hemolisada. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos nas amostras processadas do limite

inferior de detecção (LIQ). As respostas dos picos interferentes próxima ao tempo de retenção do analito e do PI deverão ser inferiores a 20% e 5%, respectivamente.

4.10.2 Linearidade

Para verificar a faixa de linearidade do método 100 µg de ácido caurenico (100 µL da solução estoque foram secos sob corrente de nitrogênio) foram adicionados a 1 mL de *pool* de plasma. Diluições sucessivas foram feitas para se obter as seguintes concentrações 100; 50; 10; 5; 2,5; 1 e 0,75 µg/mL. A cada concentração, adicionou-se 50 µL do PI (bisabolol 0,2 mg/mL) para posterior extração e análise por CLAE.

4.10.3 Limite inferior de quantificação (LIQ) e Limite de Detecção

O limite inferior de quantificação do método corresponde à menor concentração do analito, medido com precisão adequada, e com coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 20%. Foi obtido após diluições sucessivas em plasma adicionado de ácido caurenico. O limite de detecção determinado consiste na menor concentração detectável do analito, superior a 3 vezes o ruído da linha de base.

4.10.4 Curva de calibração

O ácido caurenico foi adicionado ao *pool* de plasma para se obter as concentrações definidas dentro da faixa de trabalho, incluindo o limite inferior de quantificação. Através da equação da reta obtida por regressão linear foram calculadas as concentrações do analito nas amostras coletadas. A curva de calibração foi preparada diariamente para análise de cada lote de amostras.

4.10.5 Efeito residual (*carryover*)

O efeito residual representa o aparecimento ou o aumento do sinal do analito ou do PI causado pela contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Para avaliar a existência deste efeito foram realizadas 3 injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra processada no limite superior de quantificação (maior ponto da curva de calibração – 100 µg/mL). As respostas de picos interferentes devem ser inferiores a 20% das respostas do analito processadas no LIQ e 5% da resposta do PI.

4.10.6 Controles de Qualidade

Amostras de plasma adicionadas de ácido caurenico – referentes aos controles de qualidade de baixa (2,5 µg/ml), média (50 µg/ml) e alta (80 µg/ml) concentração – foram preparadas e armazenadas em congelador para realização do teste de estabilidade a longo prazo. Esses níveis de concentração também foram utilizados para a avaliação da exatidão e precisão do método, bem como para os demais testes de estabilidade.

4.10.7 Precisão

Representa a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de um tipo de matriz.

Amostras do *pool* de plasma adicionadas de ácido caurenico em 3 concentrações diferentes (2,5; 50 e 80 µg/ml) foram preparadas e em seguida analisadas em uma mesma corrida para determinar a precisão intracorrída, e em três corridas diferentes para determinar a precisão intercorridas em dias distintos (n=5). Os resultados foram avaliados em função do Coeficiente de Variação (CV%), calculado pela seguinte equação:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Experimental}} \times 100$$

Não foram admitidos valores superiores a 15%.

4.10.8 Exatidão

Corresponde à concordância entre o resultado do ensaio e o valor de referência.

Amostras do *pool* de plasma adicionadas de ácido caurenico em 3 concentrações diferentes (2,5; 50 e 80 µg/ml) foram preparadas e em seguida analisadas em uma mesma corrida para determinar a exatidão intracorrída, e em três corridas diferentes (em dias distintos) para determinar a exatidão intercorridas (n=5). O resultado foi expresso pelo erro padrão relativo (EPR), calculado pela seguinte equação:

$$EPR\% = \frac{\text{Concentração Média Obtida} - \text{Valor Nominal}}{\text{Valor Nominal}} \times 100$$

Não foram admitidos valores superiores a 15% em relação ao valor nominal.

4.10.9 Recuperação

A avaliação da recuperação do ácido caurenico das amostras de plasma foi realizada através da comparação das amostras de plasma extraídas com amostras não extraídas, ou seja, soluções preparadas nas mesmas concentrações (2,5; 50 e 80 µg/ml). Para o cálculo da porcentagem de recuperação do analito utilizou-se a razão entre as áreas do ácido caurenico e do padrão interno nas amostras extraídas e não extraídas, aplicando-se a fórmula:

$$\text{Recuperação\%} = \frac{\text{Amostra extraída}}{\text{Amostra não extraída}} \times 100$$

4.10.11 Estabilidade

Amostras do *pool* de plasma com ácido caurenico adicionado nas concentrações referentes aos controles de baixa, média e alta concentração (2,5; 50 e 80 µg/ml) foram preparadas e armazenadas em alíquotas até serem analisadas em triplicatas, nas seguintes condições:

- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento.

As amostras foram congeladas por um período de 12h e descongeladas naturalmente. Este processo foi repetido três vezes. Após o terceiro ciclo, as amostras foram extraídas e injetadas no cromatógrafo.

- Estabilidade pós-processamento, na bandeja (*rack*) do injetor automático, durante corrida analítica do dia.

Após a corrida analítica de um lote de amostras, as mesmas foram mantidas na bandeja do injetor automático e reinjetadas após 24 horas.

- Estabilidade de Curto Prazo

As amostras foram descongeladas naturalmente à temperatura ambiente e deixadas na bancada por 12 horas para posterior análise em cromatógrafo.

Os resultados dos testes de estabilidade foram expressos na forma de perda percentual da concentração final em relação ao valor obtidos para as amostras recém-preparadas. Sendo consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15%.

4.11 ANIMAIS

Para a avaliação pré-clínica da biodisponibilidade do ácido caurenico foram utilizados ratos Wistar (200-250g), machos, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Esta metodologia foi devidamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFJF) sob número de protocolo 040/2014, cujo certificado consta no ANEXO A. Os animais foram mantidos em grupos de 4, em gaiolas de polipropileno (47x34x18 cm) com ração e água *ad libitum*, em temperatura ambiente (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h (claro de 07:00 às 19:00 h).

Foi preparada uma solução 70 mg/mL de ácido caurenico em salina com 10% de Tween 80. A dose a ser administrada foi calculada com base no peso de cada animal. Seis horas antes da administração por via oral os animais foram privados de alimentação, mantendo acesso livre à água. Os grupos experimentais seguiram a descrição abaixo:

- Grupo 1 (1 rato): recebeu 50 mg/kg de ácido caurenico, dose única, pela via oral, por gavagem, com o auxílio de uma cânula metálica intragástrica.

- Grupo 2 (2 ratos): receberam 100 mg/kg de ácido caurenico, dose única, pela via oral, por gavagem, com o auxílio de uma cânula metálica intragástrica.

- Grupo 3 (2 ratos): receberam 100 mg/kg de ácido caurenico, dose única, pela via intravenosa, através de cânula intravenosa central previamente implantada nos animais;

- Grupo 4 (6 ratos): receberam 50 mg/kg de ácido caurenico, dose única, pela via intravenosa, através de cânula intravenosa central previamente implantada nos animais;

Após a cirurgia os animais foram mantidos em gaiolas individuais.

Outros 20 animais foram utilizados, ainda, para obtenção de plasma branco para validação do método analítico e como animais doadores para reposição sanguínea dos animais dos grupos experimentais (LEITE et al., 2009).

4.12 CANULAÇÃO INTRAVENOSA E COLETA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Após anestesia com associação de cetamina/xilazina (72/8 mg/kg), administrada por via intraperitoneal, os animais receberam implante, através da veia jugular, de cateter de *silastic* no átrio direito do coração, para administração do ácido caurenico (grupos 3 e 4) ou

para coletas seriadas de sangue (todos os grupos). Respeitou-se um período de 48h após a cirurgia de implante da cânula para estabilização física e hemodinâmica dos animais antes das administrações e coletas das amostras sanguíneas.

As amostras de sangue (200 μ L) foram coletadas pelo cateter atrial, com o auxílio de uma seringa heparinizada, em intervalos pré-determinados, a saber: tempo zero (previamente à administração); 0,167; 0,333; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8; e 10 horas após a administração do ácido caurenico.

Para evitar redução no volume sanguíneo do animal foram feitas reposições de mesmo volume, a partir do sangue obtido de um rato doador (LEITE et al., 2009). As amostras sanguíneas foram centrifugadas (10000 RPM, 10 min, 25 °C) e o plasma acondicionado em microtubos plásticos de 500 μ L, no congelador, até o momento da análise em cromatógrafo líquido.

4.13 PERFIL FARMACOCINÉTICO DO ÁCIDO CAURENICO EM PLASMA DE RATOS

A disposição cinética do ácido caurenico, administrado através da via intravascular e oral, foi avaliada aplicando-se modelo bicompartimental com base no delineamento da coleta de amostras sanguíneas após administração única do ácido caurenico nas doses de 50 e 100 mg/Kg, aos respectivos grupos de animais, respeitando os intervalos entre as coletas previamente definidos.

Após quantificação do analito no plasma foram plotados os dados referentes a transformação logarítmica da concentração versus tempo ($\log C \times T$), obtendo-se desta forma a curva de declínio caracterizada por fase de decaimento relativa à eliminação do ácido caurenico do plasma dos animais (RITSCHER; KEARNS, 2009).

Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados com a aplicação do software PK Solutions 2.0, com pares de dados $C \times T$ como descrito a seguir.

A avaliação do decaimento plasmático do ácido caurenico permitiu a proposição de um modelo bicompartimental, o qual foi considerado nos cálculos para determinação dos parâmetros farmacocinéticos.

A meia vida de eliminação ($T_{1/2}$) foi determinada na fase de decaimento ou reta terminal dividindo-se 0,693 pela constante de eliminação (K_{el}). Esse cálculo fornece o tempo

necessário para a redução da concentração plasmática do ácido caurenico em 50%. Já a constante de velocidade de eliminação (K_{el}) é determinada dividindo-se a variação do logaritmo da concentração entre dois pontos da curva de decaimento pela variação temporal deste intervalo (Δt).

As áreas sob a curva de concentração versus tempo e ao infinito (ASC_{0-T} e $ASC_{0-\infty}$) foram calculadas pelo método dos trapezoides e da extrapolação para infinito da última concentração plasmática obtida.

A depuração plasmática (CL) foi obtida dividindo-se a dose administrada (50mg ou 100 mg) pela ASC_T . Obteve-se o volume de distribuição (Vd) dividindo-se a depuração plasmática do fármaco pela sua respectiva constante de eliminação (K_{el}). A concentração máxima (C_{max}) do fármaco no plasma foi obtida através da curva de decaimento plasmático. As equações, bem como unidades e descrição dos parâmetros referidos anteriormente estão reunidos na Tabela 2.

Os parâmetros foram expressos através da média e desvio padrão obtido para o grupo experimental.

Tabela 2. Parâmetros Farmacocinéticos

Parâmetro	Unidade	Definição	Equação
C_{max}	mg/L	Concentração máxima	dado obtido da curva
$T_{(1/2)\beta}$	h	Meia-vida de eliminação	$0,693/K_{el}$
K_{el}	h^{-1}	Constante de velocidade	$\ln C_1 - \ln C_2 / T_2 - T_1$
ASC_T	mg.min/L	Área sob a curva	Método dos trapezóides
CL_T	mL/min/Kg	Depuração plasmática	Dose/ ASC_T
Vd	L/Kg	Volume de distribuição	CL/K_{el}

Fonte: RITSCHHEL; KEARNS, 2009.

4.14 BIODISPONIBILIDADE ABSOLUTA

A avaliação da biodisponibilidade absoluta é realizada comparando-se a área sob a curva do grupo tratado com ácido caurenóico 50 mg/kg por via intravenosa com a ASC do grupo tratado com a mesma dose por via oral (gavagem), a partir da seguinte equação:

$$F = \frac{\text{ASC via intravenosa}}{\text{ASC via oral}} \times 100$$

O resultado obtido representa a porcentagem da quantidade total absorvida, excluindo-se as perdas relacionadas ao processo de absorção e metabolismo de primeira passagem (DIPIRO et al., 2005).

5 RESULTADOS

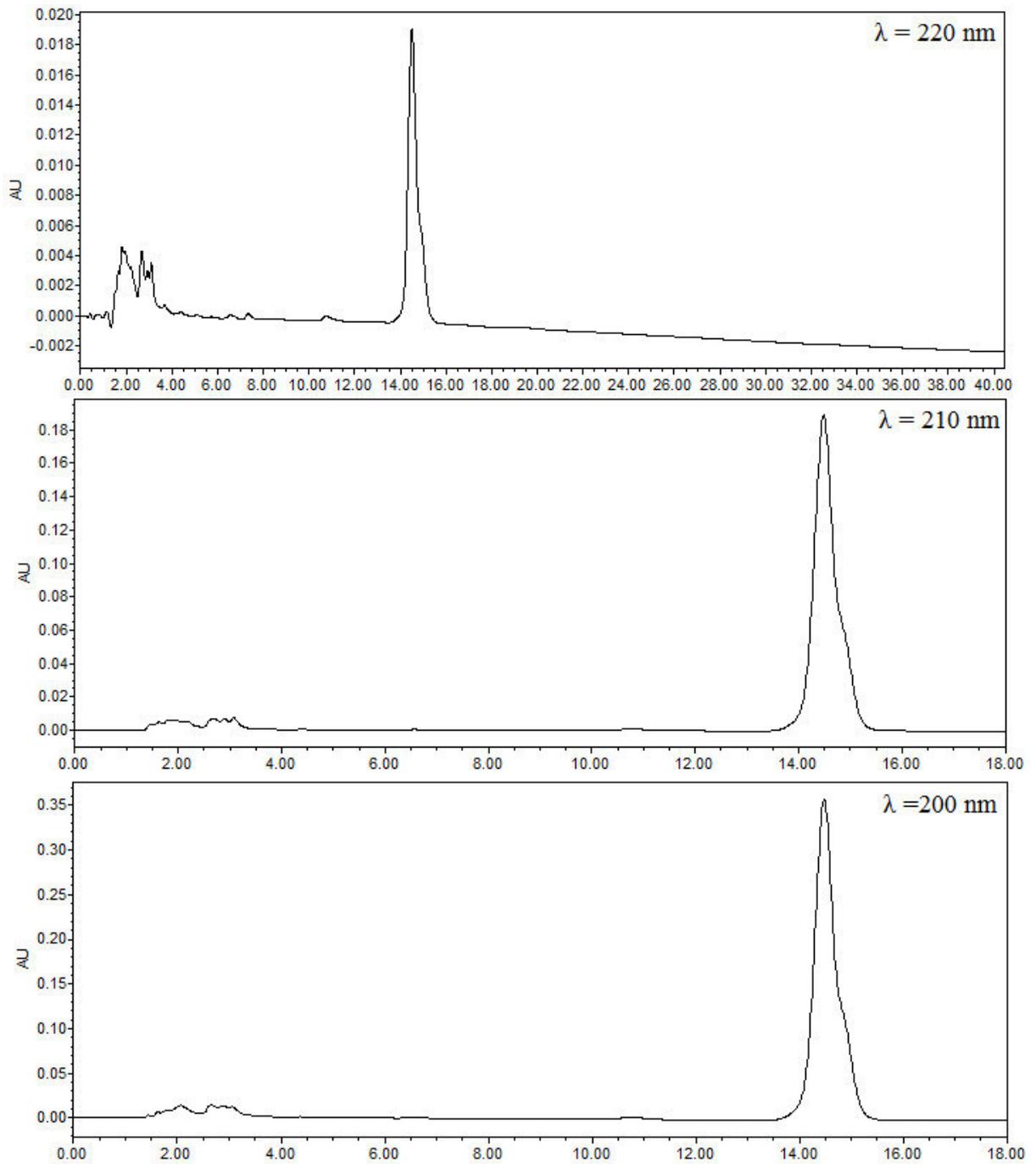
5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E SELEÇÃO DO PADRÃO INTERNO

Todas as análises foram feitas em coluna X-Bridge C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm) acompanhada de uma pré-coluna (20 x 4,6 mm; 5 µm). Após realização de uma corrida inicial mais longa (40 min) com fase móvel composta por acetonitrila: água (70:30 v/v), temperatura de 35 °C e fluxo de 1 mL/min, verificamos que o ácido caurenóico eluiu em aproximadamente 14 minutos, portanto, reduzimos o tempo total de corrida para 18 minutos.

Nessa fase inicial foram testados 3 comprimentos de onda diferentes – 200, 210 e 220 nm – os quais já haviam sido aplicados por outros autores para a detecção por ultravioleta do ácido caurenóico, como pode ser observado na relação de métodos reunida na Tabela 1 (DE MELO et al., 2001; OLIVEIRA; SANT'ANA; BASTOS, 2002; BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005; PEDROSO et al., 2008; MESTRES et al., 2011; FUCINA et al., 2012; BERTOLUCCI et al, 2009; BERTOLUCCI et al, 2013a; BERTOLUCCI et al, 2013b). Entre esses comprimentos de onda, a maior intensidade de sinal para o pico referente ao ácido caurenóico foi observada em 200 nm (Figura 5).

Nas análises posteriores optamos por elevar a temperatura do forno da coluna para 40°C e, mantendo-se o comprimento de onda de 200 nm e o fluxo de 1 mL/min, foram feitas injeções no cromatógrafo dos candidatos a padrão interno para o método de quantificação. Nessas condições, mentol, cânfora e trans-cariofileno não apresentaram detecções adequadas para a metodologia proposta. No entanto, timol ($t_R \approx 3$ min) e bisabolol ($t_R \approx 7,5$ min) produziram respostas satisfatórias como pode ser observado nas Figuras 6 e 7.

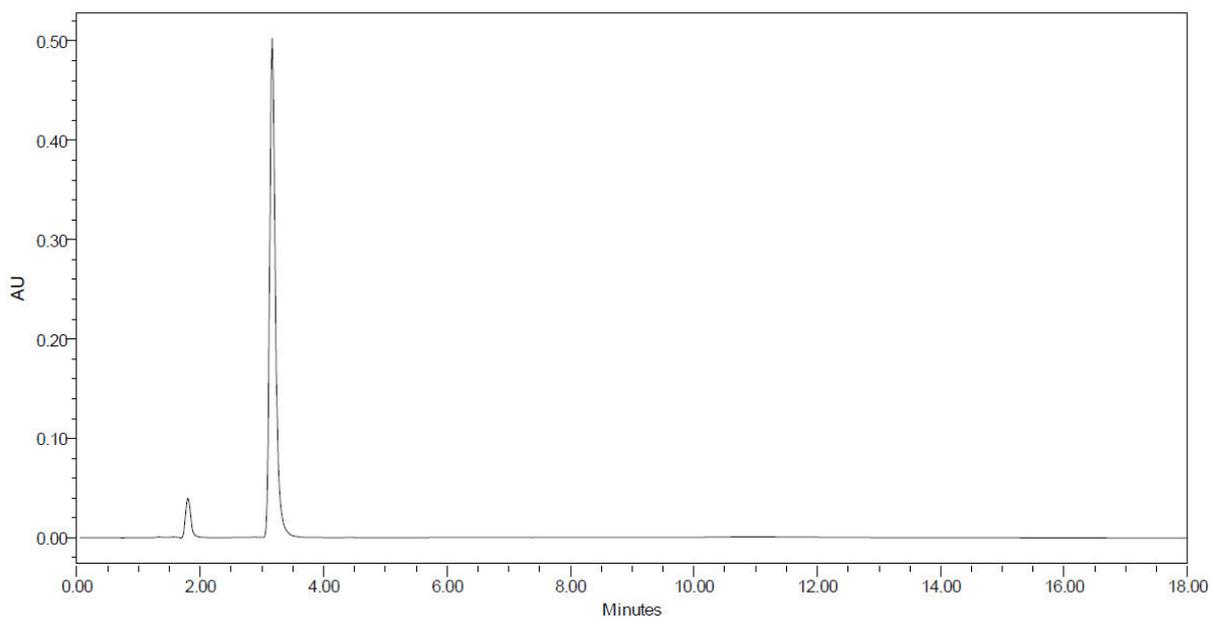
Figura 5. Ácido Caurenóico - Detecção em diferentes comprimentos de onda



Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 35 °C; Injeção: 10 μ L (1mg/mL).

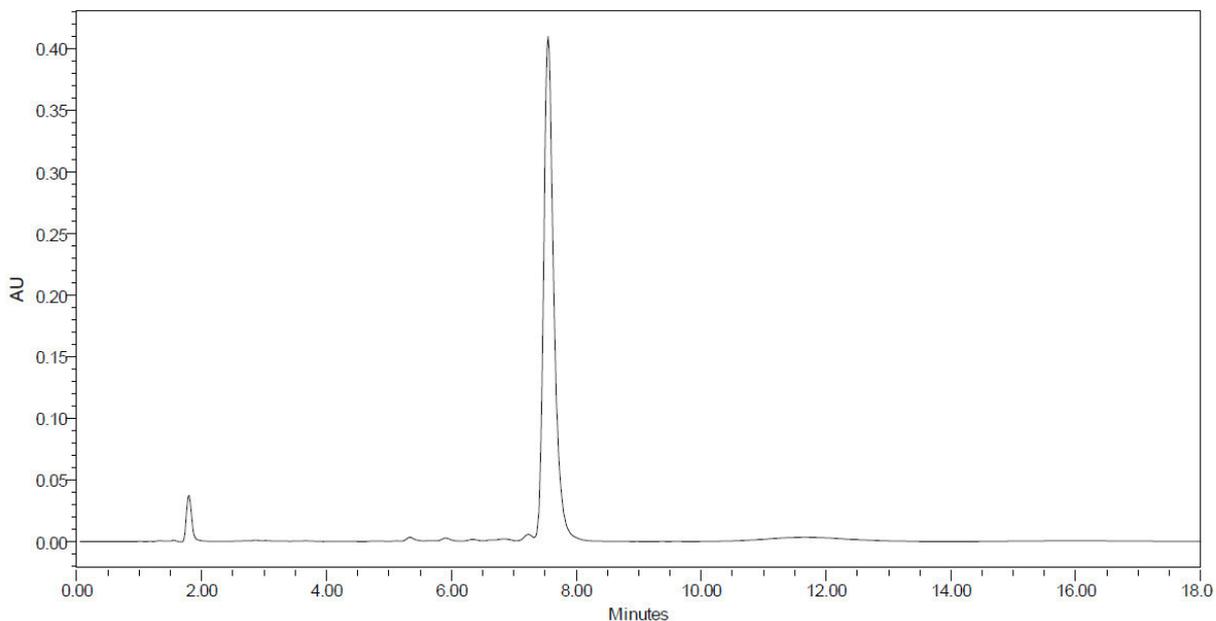
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 6. Cromatograma Timol



Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Solução de trabalho: 0,1 mg/mL; Injeção: 2 µL; $\lambda = 200$ nm. Fonte: dados da pesquisa.

Figura 7. Cromatograma Bisabolol

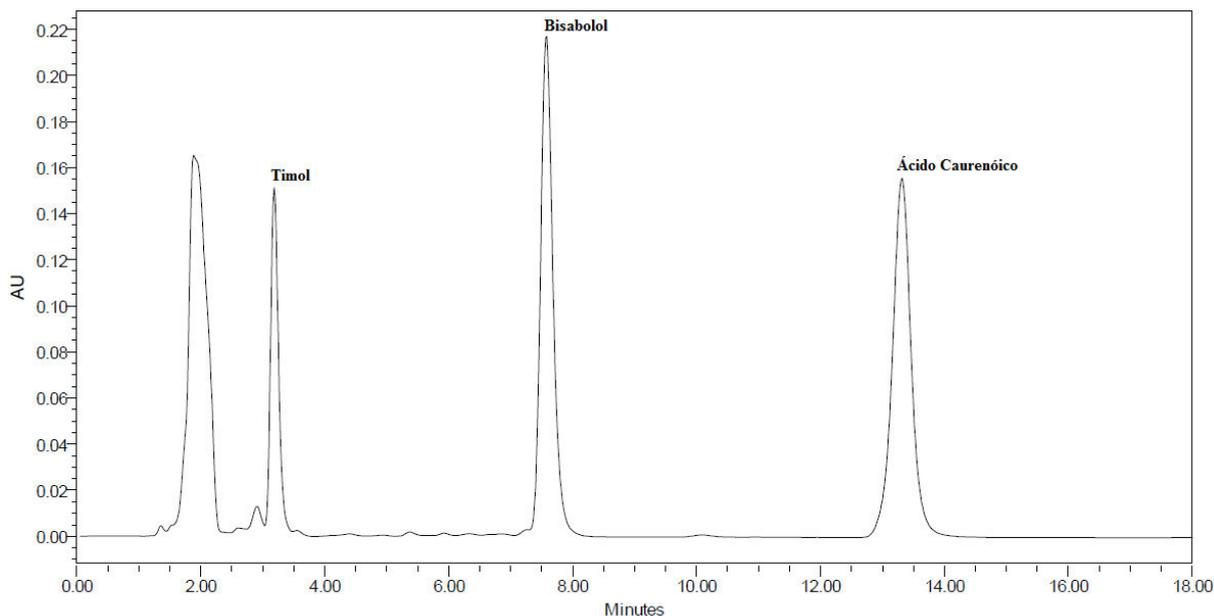


Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Solução de trabalho: diluição 1:1000; Injeção: 2 µL; $\lambda = 200$ nm. Fonte: dados da pesquisa.

Como o timol eluiu muito próximo ao pico de frente do solvente, onde podem ser visualizados muitos interferentes – principalmente na matriz biológica a qual se propõe

(plasma) o método – optamos por selecionar o bisabolol como padrão interno. No cromatograma da figura 8 pode ser visualizada a injeção dessas duas substâncias juntamente com o ácido caurenico. Com o aumento da temperatura do forno da coluna para 40°C o tempo de retenção do ácido caurenico foi adiantado para 13,2 minutos.

Figura 8. Injeção de timol, bisabolol e ácido caurenico.

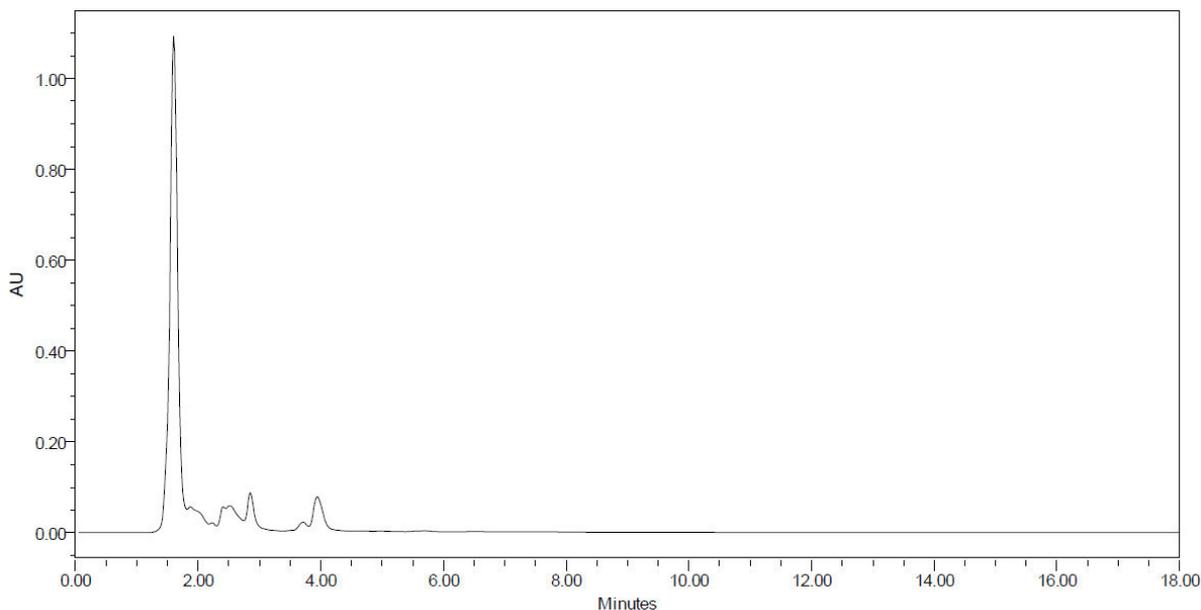


Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Solução de trabalho: 200 µL de ácido caurenico 0,1 mg/mL + 10 µL de bisabolol 1:1000 + 10 µL de timol 0,1 mg/mL; Injeção: 30 µL; $\lambda = 200$ nm. Fonte: dados da pesquisa.

5.2 RECUPERAÇÃO DO ÁCIDO CAURENOICO DO PLASMA

Para avaliarmos o método de extração do ácido caurenico do plasma, inicialmente foi injetada no CLAE uma amostra de pool de plasmas de rato sem adição de analito ou PI, a fim de verificarmos a ausência de picos interferentes na região de detecção dessas substâncias. Assim, 100 µL do branco de plasmas foram preparados conforme o método A, descrito anteriormente (Seção 4.8), através da precipitação de proteínas com 200 µL de acetonitrila.

Como observado na figura 9, nenhum interferente foi visualizado nos tempos de eluição do bisabolol ($t_R \approx 7,5$ min) e do ácido caurenico ($t_R \approx 13,2$ min), portanto, foi possível utilizar esse pool de plasmas para dar continuidade às nossas análises.

Figura 9. Cromatograma do *Pool* de plasmas de ratos Wistar

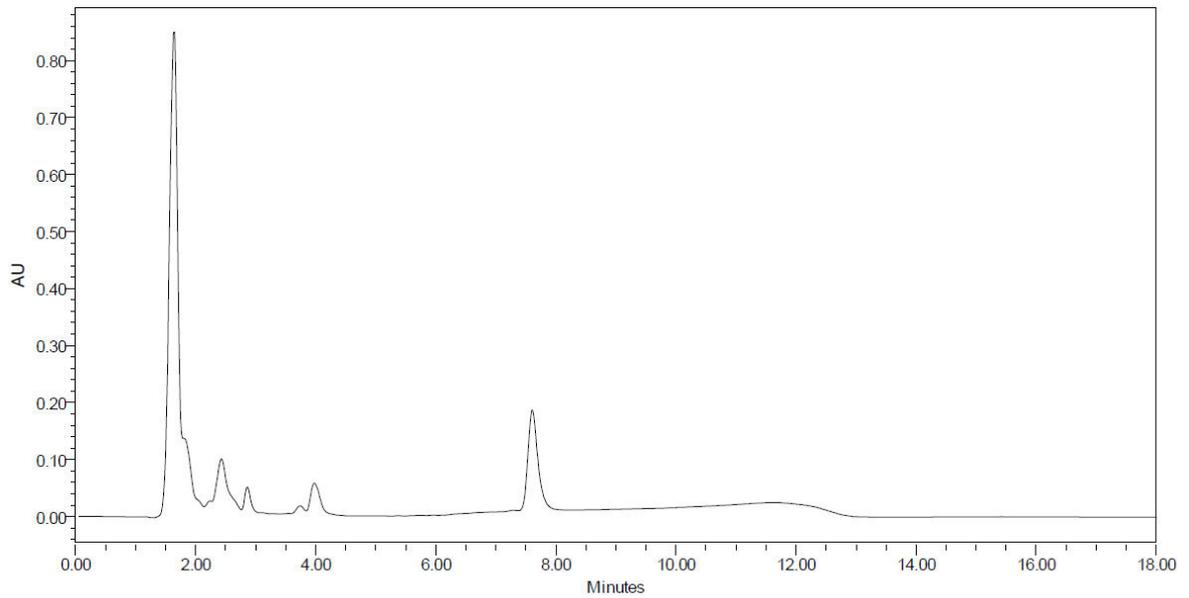
Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Injeção: 20 µL; $\lambda = 200$ nm.
Fonte: dados da pesquisa.

No entanto, ao empregarmos o método A para realizar o *clean-up* da amostra de plasma adicionada de ácido caurenóico e PI, verificamos que apenas o bisabolol foi extraído com sucesso, enquanto o pico referente ao ácido caurenóico nem mesmo foi visualizado (Figura 10).

Como a precipitação de proteínas com acetonitrila por si só não produziu os resultados esperados, conduzimos novos procedimentos de extração segundo o esquema delineado na Figura 4.

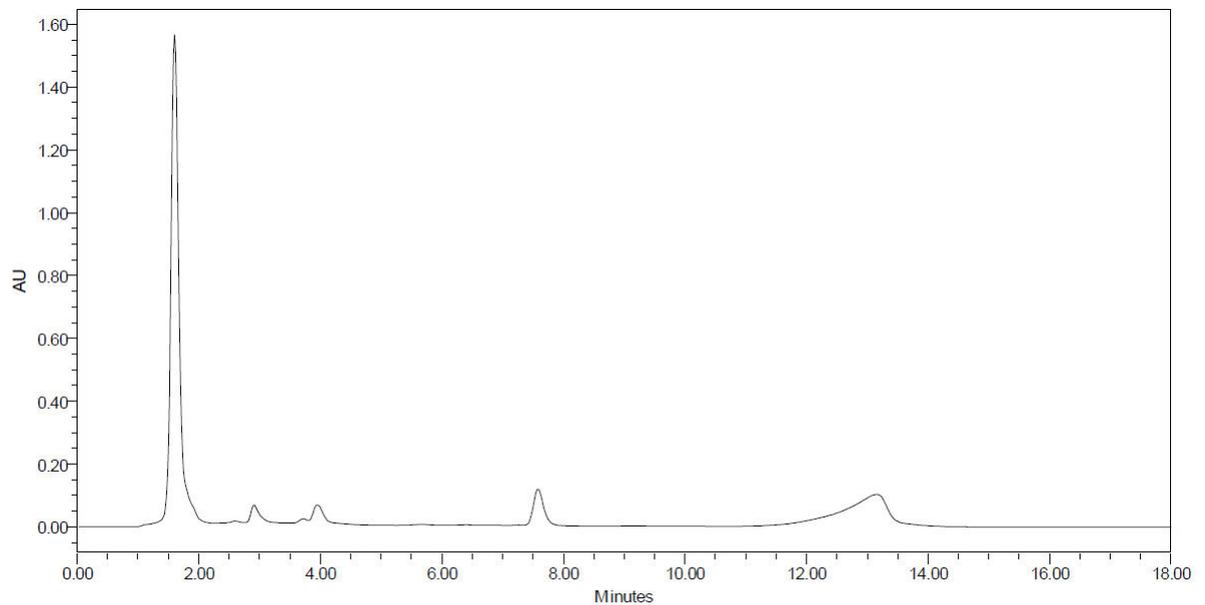
A acidificação da amostra antes da adição de acetonitrila permitiu que o ácido caurenóico, assim como o bisabolol, fosse recuperado do plasma. No entanto, ao final da extração, quando o sobrenadante foi evaporado à secura sob corrente de nitrogênio e ressuspensionado em fase móvel para injeção, observamos uma cauda anterior no pico do ácido caurenóico (Figura 11). Entretanto, a injeção direta do sobrenadante após extração, sem evaporação, permitiu a obtenção de picos adequados para a quantificação (Figura 12).

Figura 10. Extração de analito e PI do plasma - Método A



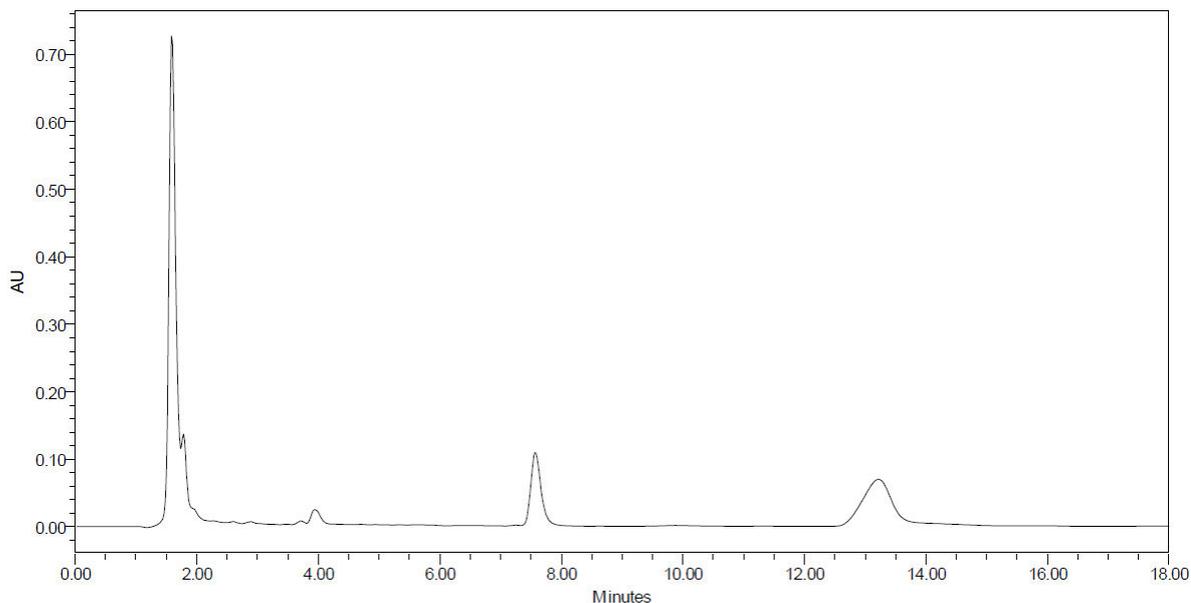
Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Injeção: 20 µL; $\lambda = 200$ nm.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 11. Extração do plasma - Amostra ressuspensa em fase móvel (Método B)



Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Injeção: 25 µL; $\lambda = 200$ nm.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 12. Extração do plasma - Injeção direta do sobrenadante (Método B)

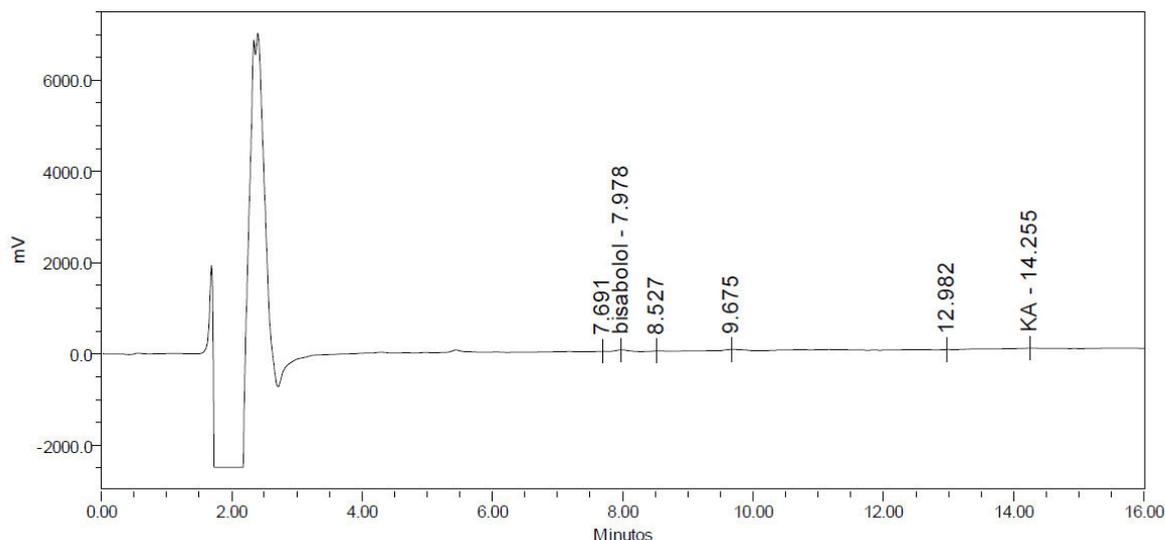


Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Injeção: 10 µL; $\lambda = 200$ nm.
Fonte: dados da pesquisa.

5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Buscando uma alternativa para melhorar a detecção do ácido caurenico foram feitas análises em CLAE com detector de índice de refração, mantendo-se as mesmas condições cromatográficas utilizadas nas avaliações por CLAE/UV-Vis. Mesmo alterando parâmetros referentes à sensibilidade do detector de índice de refração, razão sinal/ruído (*filter time*) e número de pontos da leitura (*sampling rate*), não foram obtidos resultados melhores do que aqueles observados nas leituras em CLAE/UV-Vis. Na figura 13 é apresentado o cromatograma referente à injeção de uma amostra de ácido caurenico em plasma (50 µg/mL). Diante da pobre detecção obtida com o índice de refração, optamos por manter e otimizar o método com detecção por ultravioleta.

Figura 13. Ácido Caurenoico 50 µg/mL - Análise em CLAE/IR

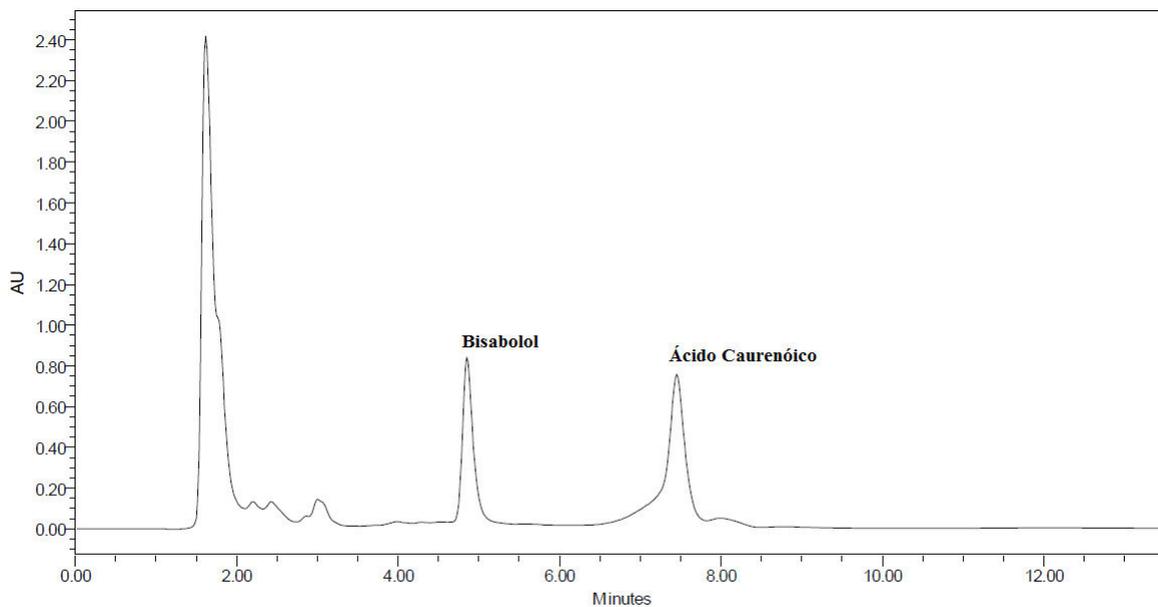


Fonte: dados da pesquisa.

5.4 DETERMINAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA AMOSTRA E DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

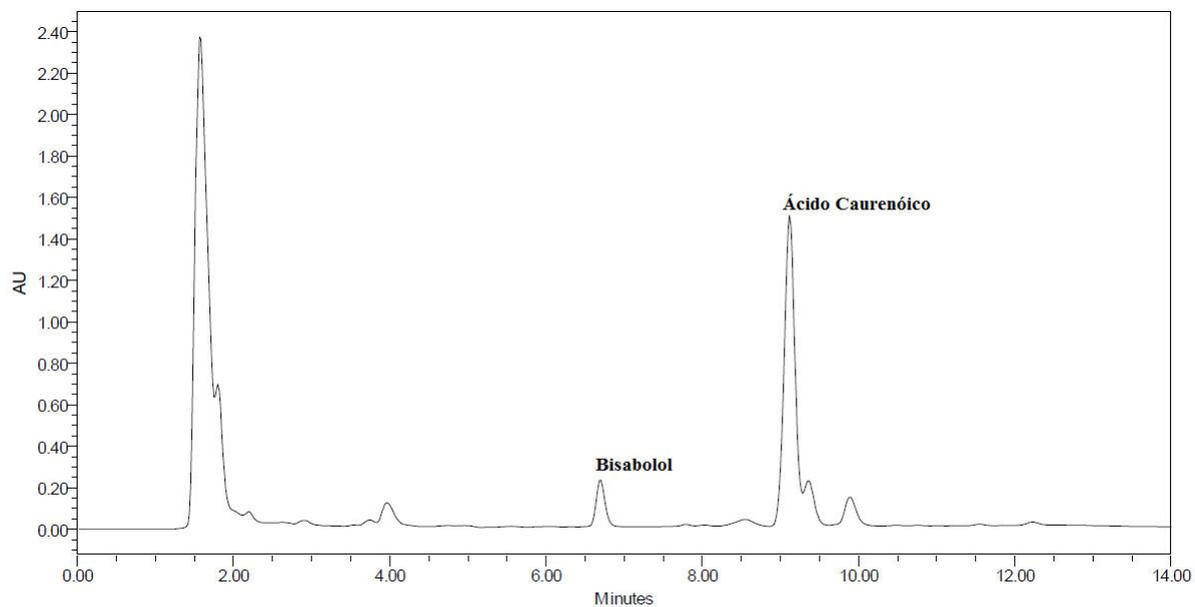
Após constatarmos que o método de precipitação de proteínas do plasma produziu resultados favoráveis quando houve acidificação prévia da amostra, decidimos avaliar outras modificações nas condições cromatográficas. Foram testadas diferentes composições de fase móvel: eluição isocrática com ACN:H₂O (80:20 v/v) (Figura 14) e em gradiente com variação de 70 a 90% de acetonitrila (Figura 15); além de diferentes fluxos – 1,2 mL/min e 1,5 mL/min (Figura 16). Contudo, os melhores resultados continuaram sendo aqueles obtidos com a fase isocrática ACN:H₂O (70:30 v/v) e fluxo de 1 mL/min.

Além disso, avaliamos também se a aplicação de ácido acético 2% (v/v), ao invés de 1% (v/v), produziria melhor recuperação do ácido caurenoico na extração (Figura 17), porém, como não foram observadas diferenças significativas, mantivemos a etapa de acidificação com ácido acético 1% (v/v), evitando pH muito baixo e consequente desgaste para a coluna cromatográfica.

Figura 14. Análise com fase isocrática ACN:H₂O (80:20)

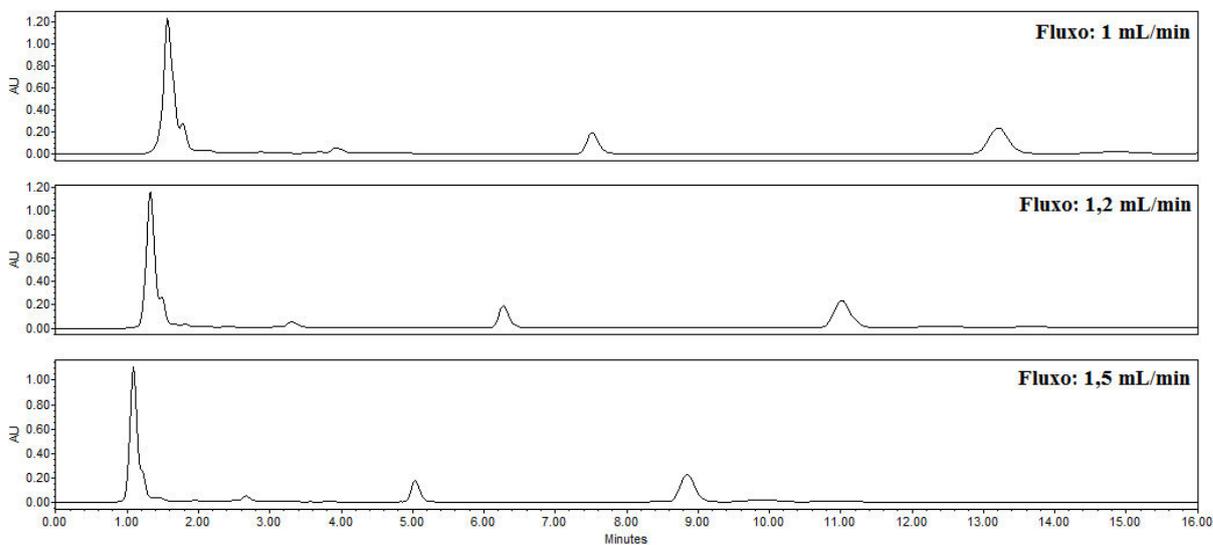
Nota: FM: ACN:H₂O (80:20); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Injeção: 50 µL; $\lambda = 200$ nm.
Fonte: dados da pesquisa.

Figura 15. Análise em gradiente



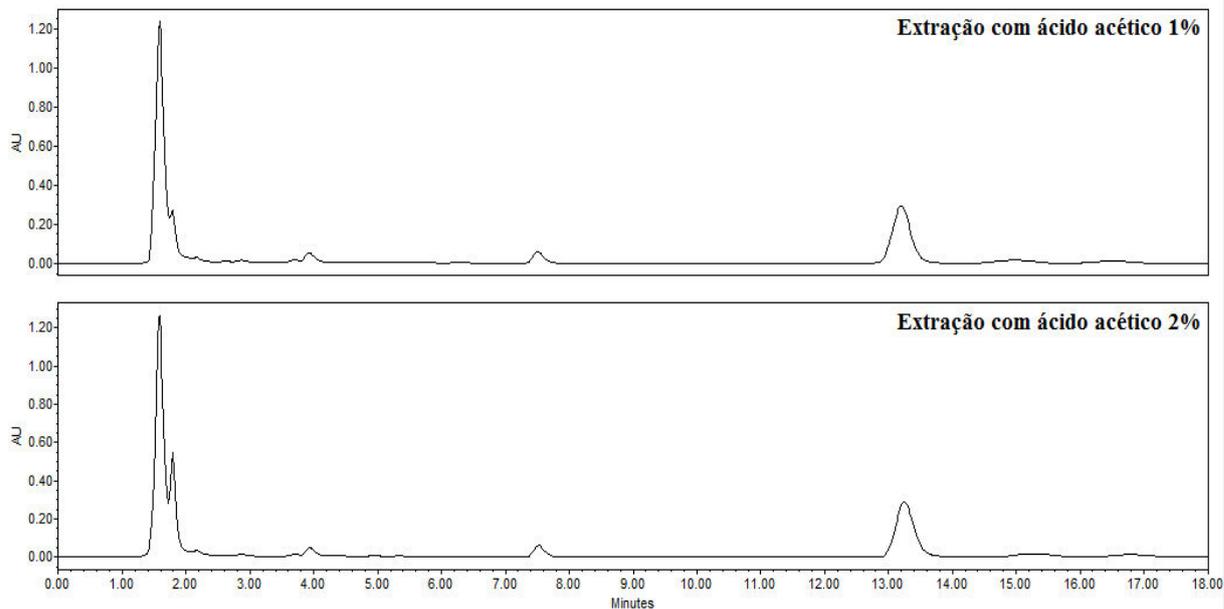
Nota: FM: gradiente de acetonitrila de 70 a 90%; Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40°C; Injeção: 50 µL; $\lambda = 200$ nm. Fonte: dados da pesquisa.

Figura 16. Comparação de diferentes fluxos



Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Temperatura: 40 °C; Injeção: 20 µL; $\lambda = 200$ nm; Diferentes fluxos: 1; 1,2; 1,5 mL/min. Fonte: dados da pesquisa.

Figura 17. Comparação da acidificação da amostra com ácido acético 1% e 2% (v/v)



Nota: FM: ACN:H₂O (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Injeção: 20 µL; $\lambda = 200$ nm. Fonte: dados da pesquisa.

A alteração da fase móvel com a substituição de água por solução aquosa de ácido ortofosfórico 0,1% produziu melhores efeitos, tornando o pico do ácido caurenico mais simétrico na análise das amostras de plasma. Sendo assim, passamos a utilizar fase móvel

acidificada. Ao analisar amostras de plasma foram visualizados alguns picos em torno de 18 minutos, portanto, o tempo total de corrida foi aumentado para 23 minutos.

Durante esta fase de desenvolvimento do método, a concentração da solução de trabalho do padrão interno foi reduzida para 0,2 mg/mL de bisabolol, sendo o volume fixo de 50 µL dessa solução adicionado a todas amostras e padrões de calibração.

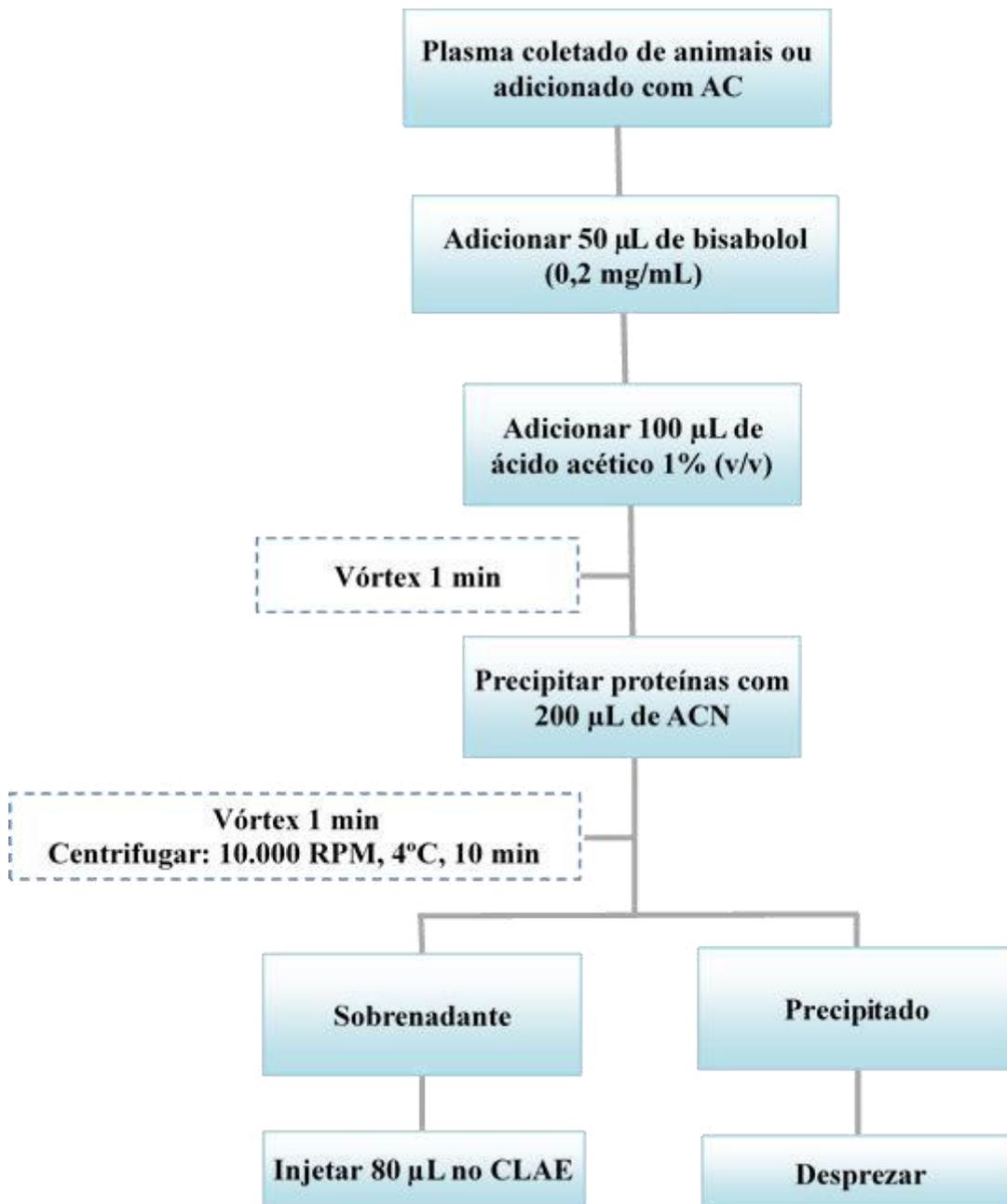
O volume de injeção, por sua vez, foi aumentado para 80 µL, o que permitiu a ampliação da faixa de trabalho do método.

Em suma, com relação ao preparo da amostra, foi acrescentada uma etapa de acidificação prévia à precipitação com acetonitrila, utilizando-se para isso ácido acético 1% (v/v). O volume fixo de padrão interno adicionado a todas as amostras foi de 50 µL de bisabolol (solução 0,2 mg/mL). E, após a centrifugação, foi realizada a injeção direta no CLAE de 80 µL do sobrenadante recolhido. Esses procedimentos estão resumidos na Figura 18.

As condições analíticas para análise e quantificação do ácido caurenico por CLAE ficaram assim determinadas:

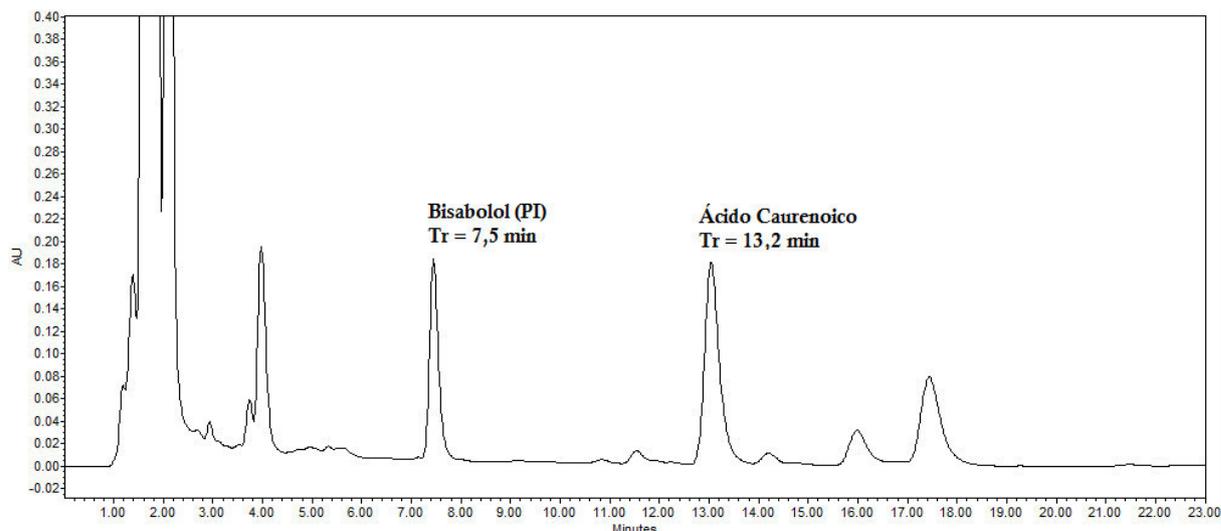
- Coluna: X-Bridge C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 µm)
- Comprimento de onda: 200 nm
- Temperatura do forno da coluna: 40 °C
- Fase móvel: acetonitrila (A) e água acidificada com ácido ortofosfórico 0,1% (B)
- Eluição isocrática: A:B (70:30 v/v)
- Fluxo da fase móvel: 1 mL/min
- Duração da análise: 23 minutos
- Volume de injeção: 80 µL

O resultado final do conjunto das condições determinadas pode ser visualizado no cromatograma obtido para uma amostra de plasma adicionado de bisabolol e ácido caurenico (Figura 19).

Figura 18. Método definido para extração (*clean-up*) das amostras de plasma

Nota: AC: ácido caurenico; PI: padrão interno; N₂: nitrogênio; ACN: acetonitrila. Fonte: da autora.

Figura 19. Condição final determinada para a quantificação do ácido caurenico em plasma



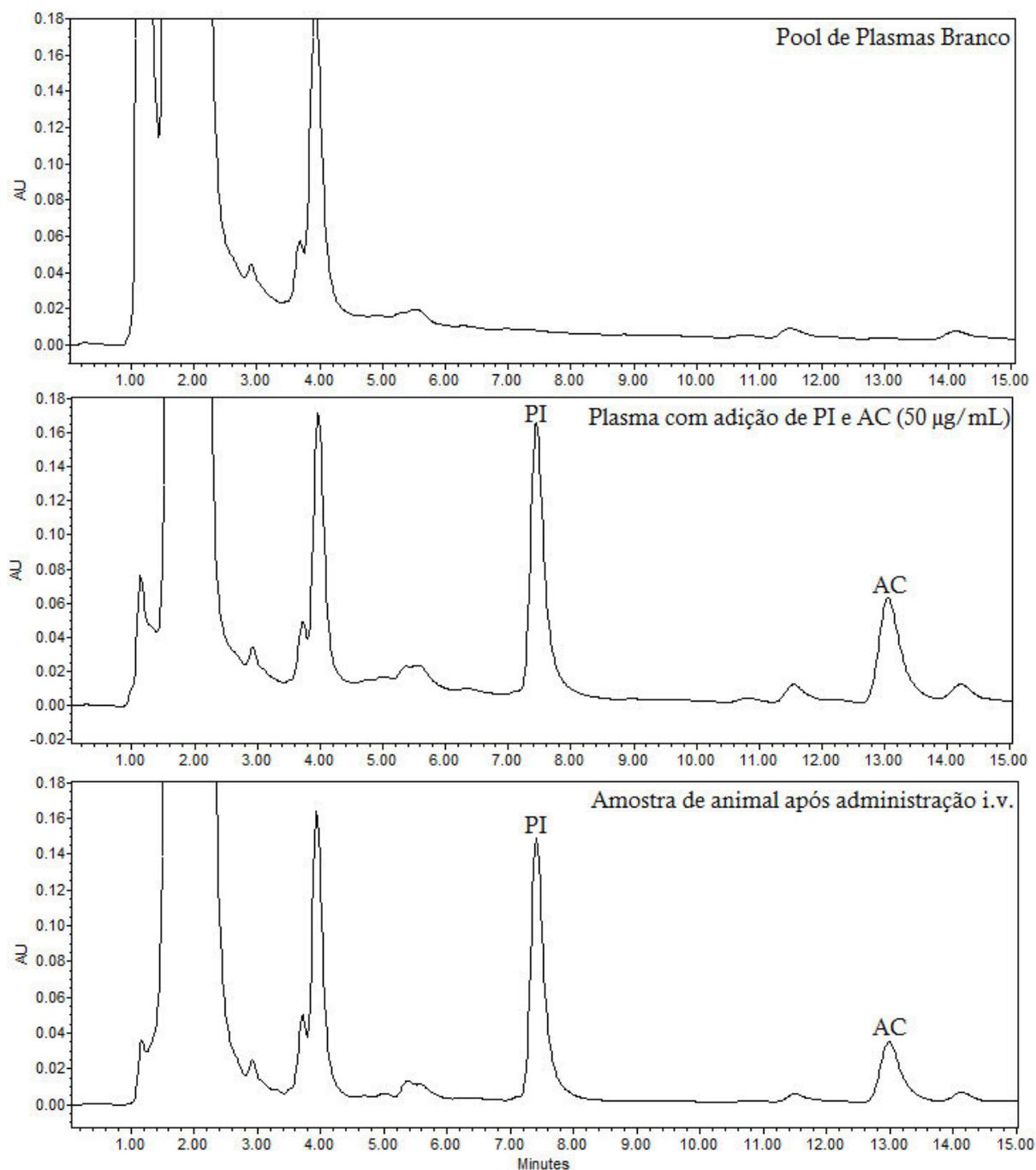
Nota: FM: ACN:H₂O acidificada (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40 °C; Injeção: 80 µL; $\lambda = 200$ nm. Fonte: dados da pesquisa.

5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.5.1 Seletividade

Para o ensaio de seletividade analisamos amostras de plasmas lipêmicos, hemolisados e normais. Como os plasmas injetados no cromatógrafo não apresentaram nenhum pico interferente nos tempos de retenção do analito e do PI, os mesmos foram reunidos, formando um *pool* de plasmas, o qual foi utilizado como matriz “branca” para todo o processo de validação. Na Figura 20 pode ser visualizada a comparação entre o cromatograma do pool de plasma branco com aqueles referentes ao plasma adicionado com ácido caurenico e de uma amostra coletada de animal após administração da substância por via intravenosa.

Figura 20. Comparação entre cromatogramas - Seletividade



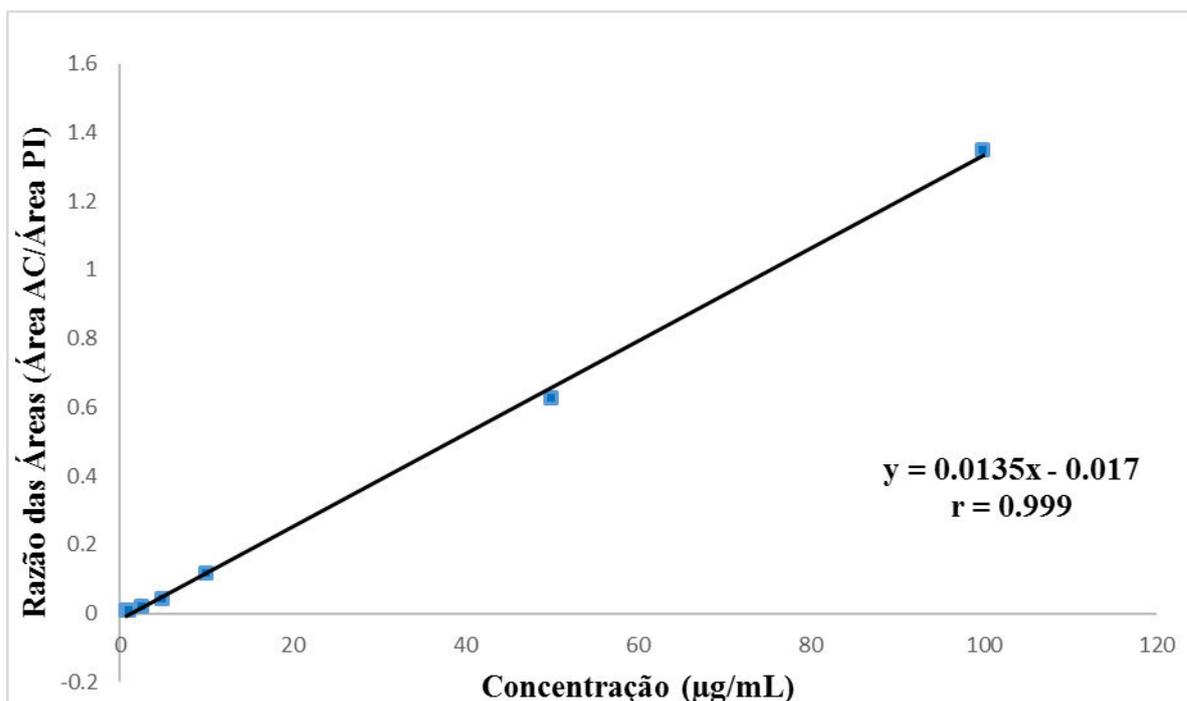
Nota: FM: ACN:H₂O acidificada (70:30 v/v); Fluxo: 1 mL/min; Temperatura: 40°C; Injeção: 80 µL; λ = 200 nm. Fonte: dados da pesquisa.

5.5.2 Linearidade

A linearidade do método foi definida entre 0,75 – 100 µg/mL, apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,999. Essa faixa de trabalho mostrou-se adequada para a

quantificação do ácido caurenico nas amostras provenientes dos animais que o receberam por via intravenosa. A equação da reta e o coeficiente de correlação podem ser visualizados na figura 21.

Figura 21. Linearidade do Método



Fonte: dados da pesquisa

5.5.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

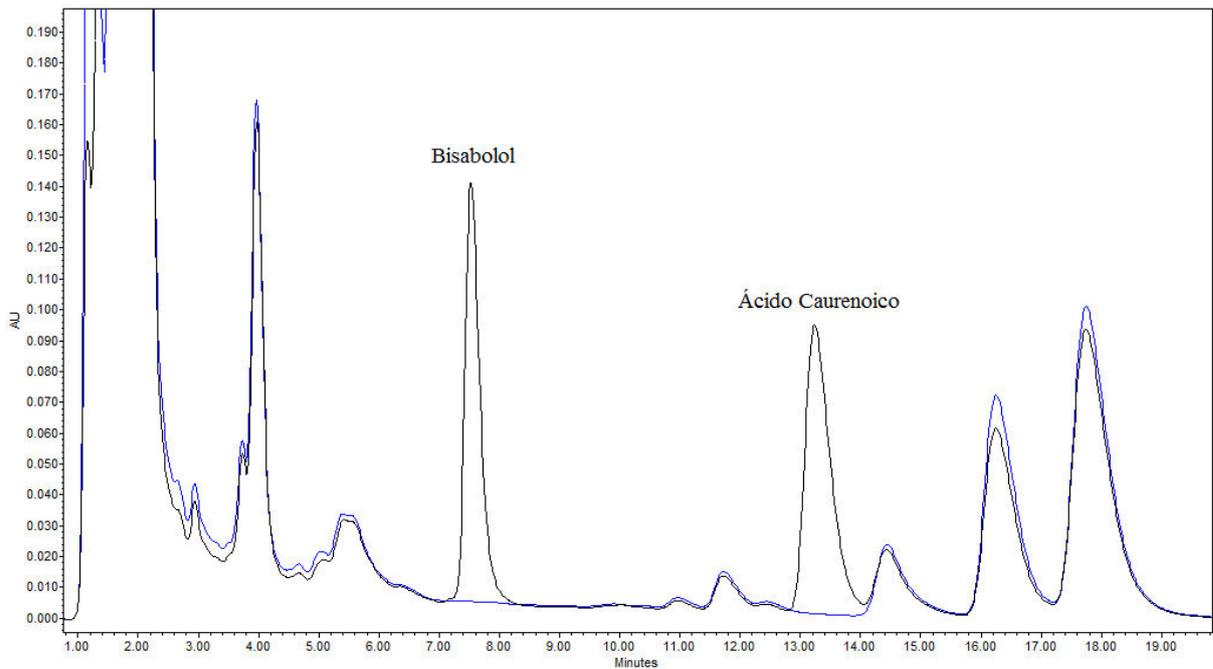
Após diluições sucessivas determinou-se como limite de quantificação do método a concentração de 0,75 µg/mL (CV = 9,1%). O limite de detecção estabelecido foi 0,5 µg/mL.

5.5.4 Efeito Residual (*Carryover*)

A injeção de amostras de plasma branco após a injeção de uma amostra processada no limite superior de quantificação (100 µg/mL) demonstrou que não há riscos de contaminação

provenientes do acúmulo de resíduos de eluições anteriores, visto que nenhum pico interferente foi visualizado no plasma branco nos tempos de retenção do analito e do PI (figura 22).

Figura 22. Avaliação do Efeito Residual



Fonte: dados da pesquisa.

5.5.5 Precisão e Exatidão

Os resultados apresentados nas tabelas 3 e 4 comprovam que o método se mostrou preciso e exato. As análises de 5 replicatas em 3 níveis de concentração forneceu valores satisfatórios de coeficiente de variação e erro padrão relativo (abaixo de 15%).

Tabela 3. Precisão e Exatidão Intradia

Controles de Qualidade	Precisão	Exatidão
µg/mL	Média Intradia (n=5) (CV%)	Média Intradia (n=5) (EPR%)
2,5	7,0	8,1
50	6,2	5,4
80	8,3	1,2
Média	7,2	4,9

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 4. Precisão e Exatidão Interdias

Controles de Qualidade	Precisão	Exatidão
µg/mL	Média Interdia (n=5) CV%	Média Interdia (n=5) EPR%
2,5	12,4	4,3
50	6,3	5,5
80	9,1	9,6
Média	9,3	6,5

Fonte: dados da pesquisa

5.5.6 Recuperação

Os valores de recuperação do analito – obtidos pela comparação entre as respostas das amostras extraídas (preparadas em plasma) com as respostas de amostras não extraídas (preparadas em solvente) – estão reunidos na tabela 5.

Tabela 5. Recuperação do ácido caurenico do plasma

Controles de Qualidade	Recuperação
µg/mL	%
2,5	64
50	92
80	99
Média	85

Fonte: dados da pesquisa

5.5.7 Estabilidade

- Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

O ácido caurenico mostrou-se estável no plasma após a realização de 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Os desvios encontrados estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. Estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento

Níveis de Concentração	Concentração Experimental	Concentração após 12h	Desvio (%)
2,5	2,60	2,45	5,54
50	51,81	50,52	2,48
80	68,41	72,47	5,94

Fonte: dados da pesquisa

- Estabilidade pós-processamento (na bandeja do injetor)

As amostras mostraram-se estáveis por um período de 24 horas quando deixadas na bandeja do injetor. Os resultados encontram-se na tabela 7.

Tabela 7. Estabilidade pós-processamento (na bandeja do injetor)

Níveis de Concentração	Concentração Experimental	Concentração após 24h	Desvio (%)
2,5	2,57	2,63	2,42
50	51,81	51,51	0,58
80	68,40	67,65	1,11

Fonte: dados da pesquisa

- Estabilidade de Curto Prazo

As amostras descongeladas e deixadas na bancada por um período de 12 horas também se apresentaram estáveis, conforme os resultados da tabela 8.

Tabela 8. Estabilidade de Curto Prazo

Níveis de Concentração	Concentração Experimental	Concentração após 12h	Desvio (%)
2,5	2,72	2,42	11,08
50	53,68	54,11	0,80
80	79,01	77,15	2,35

Fonte: dados da pesquisa

Os parâmetros avaliados e os dados obtidos na validação do método analítico para quantificação do ácido caurenico em plasma estão resumidos na tabela 9.

Tabela 9. Resultados obtidos na validação

Parâmetro	Valores Obtidos
Linearidade Coefficiente de Correlação	0,75 – 100 µg/mL r= 0,999
Limite de Quantificação	0,75 µg/mL
Limite de Detecção	0,5 µg/mL
Estabilidade: - Curto Prazo - Ciclos de Congelamento - Na bandeja do injetor	88,92 – 100,80 % 94,46 – 105,94 % 98,89 – 102,42 %
Precisão (CV%) - Intradia - Interdia	7,2 9,3
Exatidão (EPR%) - Intradia - Interdia	4,9 6,5
Recuperação (%)	85

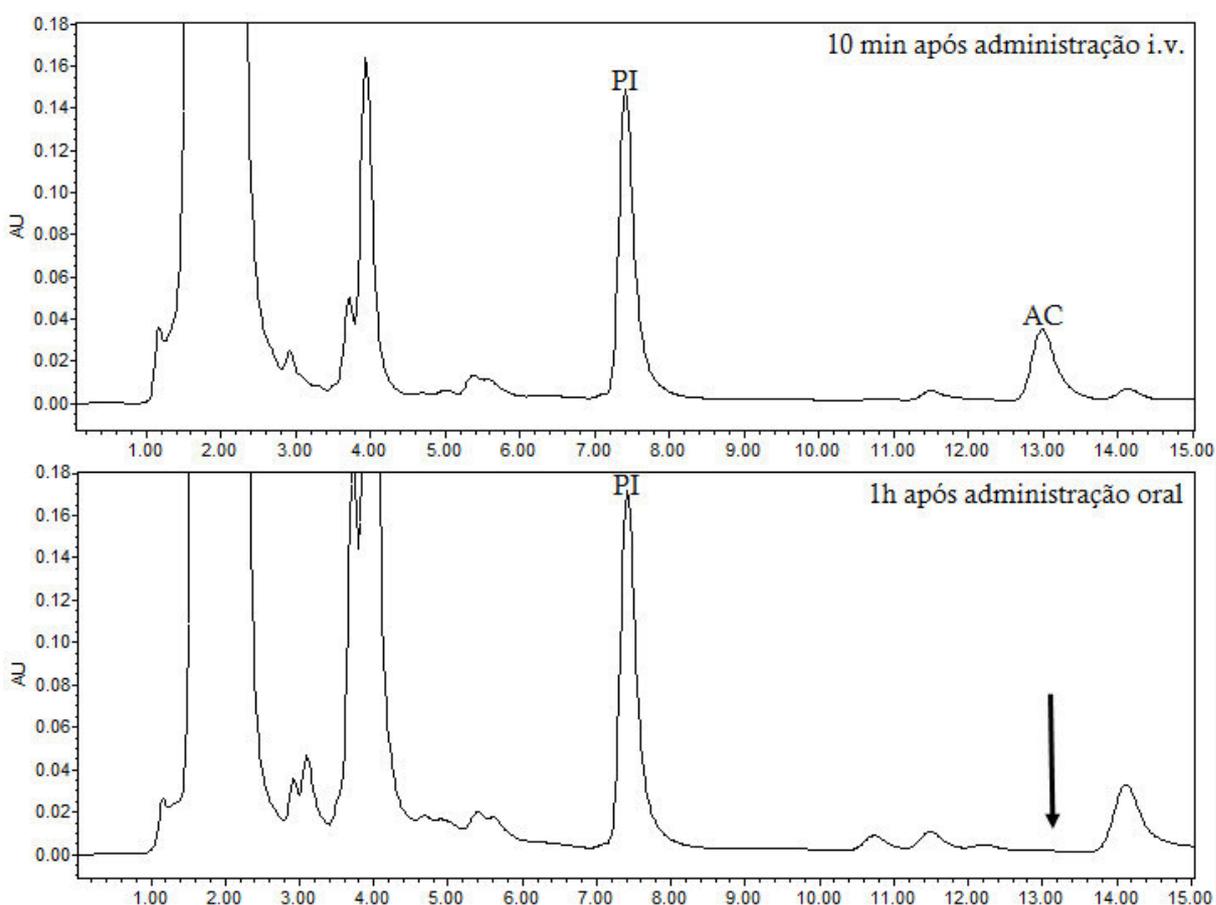
Fonte: dados da pesquisa

5.6 AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DO ÁCIDO CAURENOICO EM RATOS

Para a construção do perfil farmacocinético do ácido caurenico, esta substância foi administrada em ratos tanto por via oral quanto intravenosa, nas doses de 50 e 100 mg/kg. Após a administração foram realizadas coletas sanguíneas seriadas, as quais posteriormente foram analisadas no CLAE para quantificação do ácido caurenico e construção das curvas de concentração plasmática x tempo.

A avaliação das coletas provenientes do rato que recebeu a dose 50 mg/kg por via oral (gavagem) demonstrou que não seria possível detectar o ácido caurenico. Em um novo experimento, utilizando uma dose maior (100 mg/kg), novamente observamos que, por esta via de administração, não seriam encontrados valores de concentração plasmática da substância dentro do limite de quantificação do método aqui proposto. Sendo assim, partimos para a avaliação da via intravenosa. Nos cromatogramas da Figura 23 podem ser comparadas duas amostras: uma proveniente do tratamento por via intravenosa e outra do tratamento por via oral, no qual a substância não foi quantificável.

Figura 23. Cromatograma via i.v x via oral



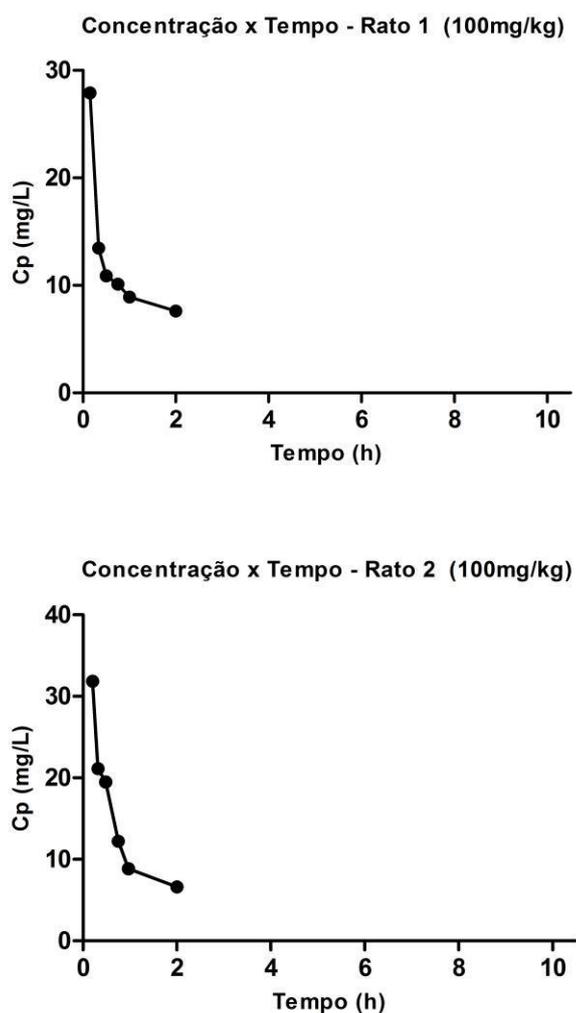
Fonte: dados da pesquisa

Nos dois ratos que receberam 100 mg/kg do diterpeno por via intravenosa tornou-se possível a quantificação de modo satisfatório dentro da faixa de trabalho do método validado. No entanto, nesses animais somente foram realizadas coletas sanguíneas até duas horas depois da administração. Após esse tempo, ambos os animais morreram, o que sugeriu toxicidade da

substância na dose aplicada. Por extrapolação das curvas de decaimento, estimou-se um C_{max} médio de 39 mg/L. Essas curvas podem ser vistas na figura 24.

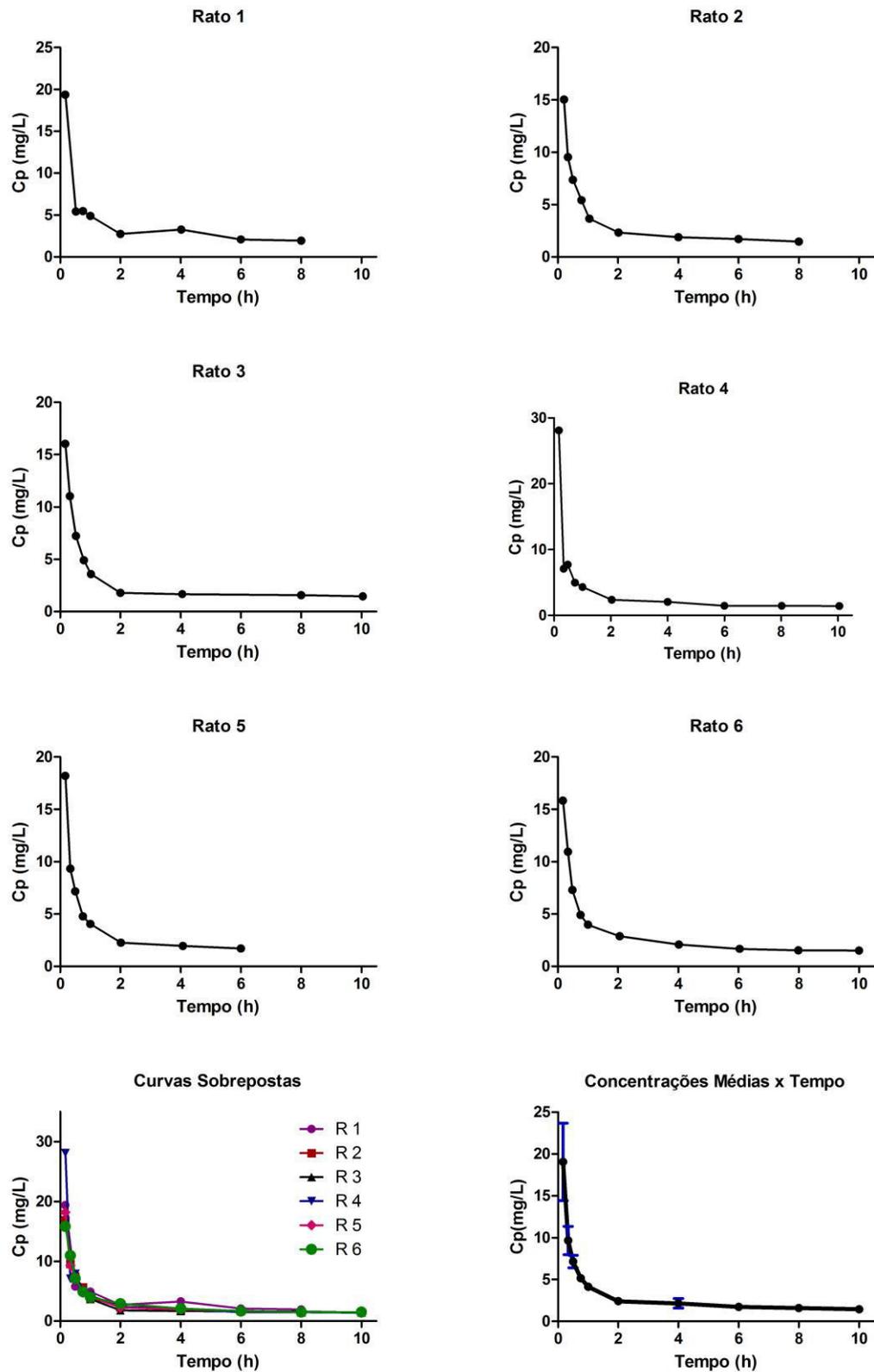
Diante disso, optou-se por reduzir a dose intravenosa para 50 mg/kg. A diminuição da dose possibilitou a manutenção dos animais e conclusão das coletas ao longo de 10 horas após a administração como planejado. Nesta dosagem também foi possível quantificar o ácido caurenico pelo método proposto e com os dados obtidos a partir desse grupo foram construídas as curvas concentração x tempo (figura 25) e calculados os parâmetros farmacocinéticos do ácido caurenico administrado por via intravenosa, os quais estão reunidos na tabela 10.

Figura 24. Decaimento plasmático do ácido caurenico - via i.v. 100 mg/kg



Legenda: Cp: concentração plasmática. Fonte: dados da pesquisa

Figura 25. Decaimento plasmático do ácido caurenóico - via i.v. 50 mg/kg



Legenda: Cp: concentração plasmática. Fonte: dados da pesquisa

Tabela 10. Parâmetros Farmacocinéticos do Ácido Caurenóico

Rato	C_{max} (mg/L)	ASC_{0-t} (mg.min/L)	ASC_{0-∞} (mg.min/L)	VD (L/kg)	Cl (mL/min/kg)	Kel (1/h)	T_{1/2} (h)
1	19,6	1764,1	3368,30	12,2	15	0,073	9,53
2	21,1	1412,8	2583,70	15,5	19	0,075	9,23
3	23,4	1530,9	2785,10	15,6	18	0,069	10,01
4	24	1702,9	2953,90	15	17	0,068	10,22
5	21,8	1028,3	2676,80	15,7	19	0,071	9,73
6	23,1	1685,5	2790,10	13,2	18	0,081	8,52
Média ±	22,17 ±	1520,75 ±	2859,65 ±	14,53 ±	17,67 ±	0,073 ±	9,54 ±
DP	1,65	273,42	278,42	1,47	1,51	0,005	0,61

Nota: C_{max}: concentração plasmática máxima; ASC: área sob a curva; VD: volume de distribuição; CL: clearance; Kel: constante de eliminação, T_{1/2}: meia-vida de eliminação; DP: desvio padrão. Fonte: dados da pesquisa.

6 DISCUSSÃO

Na literatura científica estão documentadas diversas atividades atribuídas ao ácido caurenico, entre as quais a ação tripanocida, larvicida, antimicrobiana, analgésica, relaxante da musculatura lisa, diurética, hipoglicêmica e anti-inflamatória (BATISTA et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2006; HARAGUCHI et al., 2011; SIEBRA et al., 2009; RUFATTO et al., 2012).

Em um estudo realizado com ratos normotensos, no qual se administrou o ácido caurenico por via intravenosa em ratos, observou-se redução da pressão arterial com doses de 10 mg/kg (SOMOVA, 2001) e 15 mg/kg (TIRAPELLI, et al. 2008), dados que fundamentam o interesse no potencial de uso desse diterpeno como anti-hipertensivo.

O efeito antiespasmódico promissor sob a musculatura lisa tem sido alvo de investigações, nas quais foram inclusive propostos os mecanismos de ação envolvidos, como bloqueio de canais de cálcio e abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP (DE ALENCAR CUNHA et al., 2003).

Entretanto, apesar da importância biológica evidenciada tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*, esta molécula ainda não foi caracterizada quanto aos seus dados cinéticos referentes aos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

Em nosso estudo, para avaliarmos o perfil farmacocinético do ácido caurenico em ratos, o primeiro passo foi definir o melhor método para extraí-lo da matriz e quantificá-lo no plasma dos animais.

Com relação ao pré-tratamento das amostras e extração do ácido caurenico da matriz biológica para injeção no CLAE, optamos pela técnica de precipitação de proteínas no plasma com acetonitrila. Esse procedimento é um dos mais utilizados para esse tipo de matriz biológica por sua facilidade, rapidez e baixo custo. A adição de solvente orgânico ao soro/plasma com posterior centrifugação promove purificação adequada da amostra para análises por cromatografia líquida (MA et al., 2008). No entanto, uma desvantagem desse método refere-se à possibilidade de ocorrer co-precipitação do analito de interesse (KE et al., 2000). Esse fenômeno de co-precipitação foi observado em nossos testes. Quando analisamos no CLAE as amostras tratadas apenas com adição de acetonitrila não foi possível detectar o ácido caurenico, indicando que o mesmo havia sido precipitado juntamente com as proteínas do plasma (Figura 10).

Em estudo desenvolvido por Gasparetto e colaboradores (2015), cujo objetivo era traçar o perfil farmacocinético dos metabólitos do guaco presentes no xarope, diversas técnicas de extração dos analitos do plasma foram testadas, entre elas a extração líquido-líquido, a extração em fase sólida e a precipitação de proteínas. Essas avaliações apontaram que a técnica mais eficiente para a recuperação do ácido caurenóico consistia na precipitação de proteínas com acetonitrila (GASPARETTO, 2015). No entanto, em nossas análises, só foi possível alcançar resultados satisfatórios na extração do plasma, após inclusão de uma etapa de acidificação da amostra prévia à adição de acetonitrila. Diversos grupos de pesquisas utilizaram este recurso para aumentar a eficiência da extração de analitos em amostras de soro/plasma (HUO et al., 2013; LEI et al., 2014; PITA et al., 2014; YAN et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

Para definirmos as condições cromatográficas a serem utilizadas realizamos um levantamento na literatura dos métodos relacionados a determinação dessa substância em espécies vegetais. Algumas dessas referências estão reunidas na Tabela 1. Após a avaliação desses estudos verificamos que a maioria dos autores utilizou colunas de fase reversa C₁₈, comprimentos de onda entre 200 e 220 nm para detecção por UV-Vis e fases móveis com alta composição de solvente orgânico, principalmente acetonitrila. Ao comparar metanol e acetonitrila, Bertolucci e colaboradores (2013a) afirmaram que separações com fase móvel constituída de acetonitrila apresentaram melhor resolução para os diterpenos caurânicos analisados, entre os quais se inclui o ácido caurenóico. Partindo de todas essas informações conduzimos nossas próprias análises a fim de desenvolver e otimizar um método aplicável à quantificação do ácido caurenóico em plasma de ratos por CLAE/UV-Vis, o que culminou no estabelecimento das seguintes condições: coluna C₁₈ (150 x 4.6 mm; 5 µm), fase móvel composta por acetonitrila:água (70:30 v/v); fluxo de 1 mL/min, temperatura do forno de 40°C, detecção em 200 nm e volume de injeção de 20 µL.

Como ácido caurenóico apresenta baixa intensidade de absorção na luz UV, visto que não possui um bom cromóforo em sua estrutura molecular (GASPARETTO et al., 2011), realizamos uma avaliação em CLAE com detector de índice de refração, na tentativa de melhorar a detecção da molécula e ampliar a faixa de trabalho do método. O índice de refração é um detector universal indicado para substâncias com baixa absorção no ultravioleta. Entretanto, não conseguimos otimizar a detecção do ácido caurenóico empregando esse detector.

Alternativamente, Gasparetto e colaboradores (2011) optaram pela detecção desse diterpeno por CLAE/EM-EM, porém, mesmo empregando espectrometria de massas, não foi possível obter fragmentos com intensidade adequada, sendo o ácido caurenico detectado apenas pelo íon molecular.

Para verificarmos se a baixa absorção no ultravioleta seria, de fato, um problema para a avaliação farmacocinética, tornou-se necessário iniciar a experimentação animal para avaliação da aplicabilidade do método, assegurando que as amostras poderiam ser quantificadas dentro da faixa de trabalho. Após as avaliações de amostras provenientes de um animal no qual foi administrado o ácido caurenico por via intravenosa, concluiu-se que seria possível detectá-lo e novas modificações foram feitas na metodologia, as quais permitiram a ampliação do intervalo de linearidade, estabelecendo-se como limite de quantificação a concentração de 0,75 µg/mL. Essas alterações em relação ao método inicial consistiram no aumento do volume de injeção de 20µL para 80 µL e na acidificação da fase móvel com ácido ortofosfórico, o que tornou o pico do ácido caurenico mais simétrico. Tendo sido definidas todas essas condições e sabendo que o método atenderia à sua aplicabilidade foi então possível partir para a validação do mesmo.

A validação da metodologia analítica foi realizada segundo as diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2012) e do FDA (2001). Nesse processo um padrão interno de concentração fixa foi adicionado em quantidades iguais a todos os padrões de calibração e amostras em estudo. Para seleção de um padrão interno, fizemos uma triagem com alguns monoterpênicos e sesquiterpênicos, e, a partir dessa análise, optamos pela utilização do alfa-bisabolol.

Os resultados obtidos na validação do método asseguraram sua seletividade em relação a matriz biológica de trabalho, ou seja, não foram detectados interferentes nos tempos de retenção do analito e do PI. Além disso, observou-se estabilidade satisfatória do analito nas avaliações realizadas. De modo geral, a metodologia em questão provou-se robusta, precisa e exata, garantindo a confiabilidade esperada para que fosse traçado o perfil farmacocinético do ácido caurenico administrado por via intravenosa.

Na definição dos grupos experimentais, a proposta inicial era realizar o tratamento com as doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg. No entanto, os dois animais que receberam 100 mg/kg por via intravenosa morreram após 2 horas da administração, tornando-se clara a toxicidade desta substância e a necessidade de redução da dose.

Infelizmente, estudos pré-clínicos de toxicidade, assim como as avaliações farmacocinéticas, ainda são muito pouco explorados no campo dos produtos naturais, havendo poucos dados disponíveis na literatura científica. Alguns pesquisadores realizaram estudos *in vitro* com o ácido caurenico apontando certo potencial citotóxico (COSTA-LOTUFO et al., 2002), genotóxico e mutagênico (CAVALCANTI et al., 2010; MONGELLI et al., 2002). Com relação aos estudos *in vivo*, testes de toxicidade aguda em camundongos tratados por via intraperitoneal com doses de ácido caurenico variando entre 10 e 600 mg/kg levaram a estimativa de uma DL₅₀ de 439,2 mg/kg, sendo que em doses maiores que 10 mg/kg os animais demonstraram certo grau de sonolência, fraqueza e respiração acelerada (SOSA-SEQUERA; SUÁREZ; DALÓ, 2010). Esses mesmos sintomas manifestaram-se de maneira acentuada quando administramos o ácido caurenico por via intravenosa em ambas as doses utilizadas, sendo mais proeminentes na dose de 100 mg/kg.

Tratando-se da via oral, a avaliação da toxicidade aguda feita por Okoye e colaboradores (2012) indicou uma ampla faixa de segurança para esse diterpeno por essa via de administração, tendo sido apontada uma DL₅₀ de 3800 mg/kg nos experimentos também realizados com camundongos.

Avaliar a toxicidade do ácido caurenico não se encontra entre os objetivos do nosso trabalho, no entanto podemos apontar que concentrações plasmáticas acima de 39 mg/L foram letais para os ratos. Como a dose de 100 mg/kg por via i.v. acarretou a morte dos dois animais que a receberam, utilizou-se para a dose i.v. 50 mg/kg, evitando assim a extrapolação da concentração plasmática do ácido caurenico para uma faixa de toxicidade letal.

Com a dose de 50 mg/kg i.v. foi possível então a determinação do decaimento plasmático e dos parâmetros farmacocinéticos do ácido caurenico. Com esse grupo a angulação observada nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo indicou claramente que esta substância segue um modelo bicompartimental. Essa observação foi considerada no cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, tendo sido delineada como fase de distribuição (fase α) aquela compreendida do tempo zero até 60 minutos após a administração e o período subsequente determinado como fase de eliminação (fase β). Nesse tipo de modelo assume-se a existência de dois compartimentos: o central, composto pelo sangue e os tecidos que se equilibram rapidamente com ele; e o periférico, que engloba os tecidos nos quais o fármaco se distribui mais lentamente, ou seja, onde um tempo maior é requerido para se atingir o equilíbrio com o sangue (BAUER, 2001). Depois de alcançado o equilíbrio entre tecido e

plasma, as concentrações plasmáticas declinam de forma menos rápida (DIPIRO et al., 2005). Os cálculos realizados com base no modelo bicompartimental levaram a estimativa de uma C_{max} média de 22,17 mg/L.

O valor médio de V_d obtido foi de 14,53 L/kg. Esse volume de distribuição elevado reflete a alta lipossolubilidade do ácido caurenóico, indicando que essa molécula se distribui amplamente nos tecidos e fluidos corporais.

A meia-vida de eliminação, por sua vez, é considerada um parâmetro dependente, visto que seu valor depende do clearance e do volume de distribuição: $T_{1/2} = (0,693 \cdot V_d) / CL$ (BAUER, 2001). O tempo médio requerido para que a concentração plasmática do ácido caurenóico se reduza pela metade foi de 9,5 horas, enquanto o valor médio de clearance encontrado foi 17,67 mL/min/kg.

Com relação a administração por via oral, tanto na dose de 50 mg/kg, quanto na dose de 100 mg/kg, não foram observados níveis quantificáveis de ácido caurenóico nas análises de CLAE feitas com os plasmas obtidos ao longo de 10 horas de coleta. Desta forma, não foi possível descrever a biodisponibilidade desta molécula. Entretanto, apesar de não terem sido encontradas concentrações plasmáticas dentro da faixa de quantificação do método desenvolvido (0,75 µg/mL - 100 µg/mL), isto não implica, necessariamente, no comprometimento dos efeitos farmacológicos previamente descritos para o uso desta substância por esta via. O fato de não ter sido detectado no plasma, quando administrado por via oral, não implica na falta de eficácia do ácido caurenóico por esta via. A biotransformação da molécula em metabólitos ativos não identificados também poderia resultar em níveis não quantificáveis do ácido caurenóico.

Vale ressaltar que esse é o primeiro estudo pré-clínico acerca do perfil farmacocinético do ácido caurenóico. O trabalho de Gasparetto e colaboradores (2015) propôs a avaliação cinética dos principais metabólitos presentes no xarope de guaco – entre os quais o ácido caurenóico – quando administrado por via oral em seres humanos. Os voluntários receberam 60 mL do xarope contendo 17.6 mg de cumarina, 1.1 mg ácido o-cumárico e 8.9 mg ácido caurenóico. No entanto, com essa dose não foram identificados picos referentes a essas substâncias nas amostras de sangue coletadas até 600 min depois da administração do xarope quando analisadas por CLAE-EM/EM. Sendo assim, o delineamento dos parâmetros farmacocinéticos do ácido caurenóico por via intravenosa realizado em nosso trabalho configura uma abordagem inédita.

Devemos também destacar a reprodutibilidade observada em nossos experimentos *in vivo*. O perfil de decaimento plasmático do ácido caurenóico foi muito similar entre os animais do grupo experimental, evidenciando a angulação característica do modelo e bicompartimental e fornecendo resultados com pequenos desvios entre os animais.

De fato, os estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de metabólitos provenientes de plantas em animais ou humanos ainda são muito escassos. Apesar da importância dos produtos naturais como uma das principais fontes para descoberta de moléculas biologicamente ativas, a grande maioria das substâncias farmacologicamente promissoras obtidas desta forma ainda não foram caracterizadas do ponto de vista farmacocinético. Trata-se de uma lacuna a ser preenchida para que se impulse o processo de desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais, visto que os estudos farmacocinéticos pré-clínicos além de contribuir para a definição dos regimes posológicos e direcionamento dos testes clínicos, podem também ser relacionados com a eficácia e a segurança do ativo (SINGH, 2006).

O ácido caurenóico é um constituinte presente em várias espécies vegetais de importância farmacêutica e econômica como o guaco e a copaíba, as quais encontram-se inclusive na lista da RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, do Ministério da Saúde.

Do ponto de vista farmacológico trata-se de um metabólito vegetal muito bem caracterizado com relação ao seu potencial antiespasmódico, anti-inflamatório e anti-hipertensivo, sendo assim, a determinação pré-clínica de sua farmacocinética é de grande importância para fundamentação de estudos clínicos futuros possibilitando o desenvolvimento de um novo medicamento a partir dessa molécula.

7 CONCLUSÃO

A metodologia analítica desenvolvida mostrou-se seletiva, precisa, exata, robusta e confiável para a quantificação do ácido caurenóico em plasma de ratos.

A partir das coletas sanguíneas seriadas de ratos que receberam o ácido caurenóico por via intravenosa na dose de 50 mg/kg foi possível definir os parâmetros farmacocinéticos para este diterpeno. O ácido caurenóico apresentou um comportamento cinético linear e bicompartimental na dose testada.

Não foram observadas concentrações quantificáveis do ácido caurenóico administrado por via oral, com o método utilizado, sugerindo baixa absorção por esta via e impossibilitando a definição de sua biodisponibilidade oral.

Esse estudo consiste na primeira avaliação farmacocinética do ácido caurenóico, o qual se destaca por atividades biológicas promissoras e bem caracterizadas. A avaliação pré-clínica aqui realizada pode contribuir para o processo de desenvolvimento de novos medicamentos a partir desta molécula.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, M. I. **HPLC of Peptides and Proteins**. Volume 251. New Jersey: Human Press, 2004. 413 p.
- AMBROSIO, S. R. et al. Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 11, p. 1407-1413, 2004.
- AMBROSIO, S. R. et al. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v. 79, n. 10, p. 925-933, 2006.
- AMORE, B. M.; GIBBS, J. P.; EMERY, M.G. Application of in vivo animal models to characterize the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drug candidates in discovery settings. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, v. 13, n. 2, p. 207-218, 2010.
- BAKKALI, F.; et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN; A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- BATISTA, R.; BRAGA, F.; OLIVEIRA, A. Quantitative determination by HPLC of ent-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 119-125, 2005.
- BATISTA, R. et al. New oxidized ent-kaurane and ent-norkaurane derivatives from kaurenoic acid. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p. 622-627, 2007.
- BATISTA, R. et al. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 168-176, 2013.
- BAUER, L. A. **Applied clinical pharmacokinetics**. Second Edition. New York: McGraw-Hill, 2001. 826p.
- BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Isolation and HPLC quantitation of kaurane-type diterpenes and cinnamic acid derivatives of long-term stored leaves of *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 85, n. 2, p. 473-485, 2013a.
- BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Seasonal variation on the contents of coumarin and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata*. Leaves under different shade levels. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 2, p. 288-295, 2013b.
- BERTOLUCCI, S. K. V. et al. Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 280-285, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC N° 27, de 17 de maio de 2012**. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União. ANVISA, Brasília-DF, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação de Plantas Medicinais de Interesse do SUS, Espécies vegetais**, fevereiro de 2009a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em: 21/08/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b. 136 p.

CAVALCANTI, B. C. et al. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560-568, 2009.

CAVALCANTI, B. C. et al. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388-392, 2006.

CAVALCANTI, B. C. et al. Structure-mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 701, n. 2, p. 153-163, 2010.

CHAVAN, M. J. et al. Analgesic and antiinflammatory activity of Kaur-16-en-19-oic acid from *Annona reticulata* L. Bark. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 2, p. 273-276, 2012.

CHO, J. H. et al. Inhibitory effects of diterpene acids from root of *Aralia cordata* on IgE-mediated asthma in guinea pigs. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 190-199, 2010.

CHOI, R. J. et al. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, n. 8-9, p. 677-682, 2011.

COLL ARÁOZ, M. V. et al. Ent-kaurane derivatives from the root cortex of yacon and other three *Smallanthus species* (Heliantheae, Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 5, p. 1042-1048, 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231-1234, 2002.

COSTA, A. R. M. et al. *Copaifera langsdorffii* supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and *in vitro* assays. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 100, n. 5, p. 86-96, 2015.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUCA, L. E. et al. Cytotoxic effect of some natural compounds isolated: From Lauraceae plants and synthetic derivatives. **Biomedica**, v. 31, n. 3, p. 335-343, 2011.

DALÓ, N. L.; SOSA-SEQUERA, M. C.; USUBILLAGA, A. On the anticonvulsant activity of kaurenic acid. **Investigacion Clinica**, v. 48, n. 3, p. 349-358, 2007.

DE ALENCAR CUNHA, K. M. et al. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 320-324, 2003.

DE MELO, A. C. et al. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopia* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 40-45, 2001.

DE S. VARGAS, F. et al. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194, 2015.

DENG, X. et al. Discovery and structure-activity relationships of ent-Kaurene diterpenoids as potent and selective 11 β -HSD1 inhibitors: potential impact in diabetes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 403-414, 2013.

DÍAZ-VICIEDO, R. et al. Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 2, p. 761-766, 2008.

DIPIRO, J. T. et al. **Concepts in Clinical Pharmacokinetics**. Fourth Edition. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2005.

DO NASCIMENTO, A. M.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Kaurene diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 12, p. 552-555, 2001.

DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 59-64, 2013.

DUTRA, L. M. et al. ent-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 15, p. 3315-3320, 2014.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. United States Department of Health and Human Service. Rockville: Food and Drug Administration, 2001.

FEKETE, S. et al. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 105-119, 2014.

FERREIRA, F. P.; DE OLIVEIRA, D. C. R. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 52, p. 6856-6859, 2010.

FUCINA, G. et al. Development and validation of a stability indicative HPLC-PDA method for kaurenoic acid in spray dried extracts of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, Asteraceae. **Talanta**, v. 101, p. 530-536, 2012.

GASPARETTO, J. C. et al. Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1,2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical preparations. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 7, p. 740-748, 2011.

GASPARETTO, J. C. et al. A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans. **Plos One**, v. 10, n. 3, 2015.

GONZÁLEZ, O. et al. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 10-27, 2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HAO, H.; ZHENG, X.; WANG, G. Insights into drug discovery from natural medicines using reverse pharmacokinetics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 4, p. 168-177, 2014.

HANSON, J. R. Diterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 26, p. 1156-1171, 2007.

HARAGUCHI, S. K. et al. Antitrypanosomal activity of novel benzaldehyde-thiosemicarbazone derivatives from kaurenoic acid. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1166-1180, 2011.

HENRICK, C. A.; JEFFERIES, P. R. The chemistry of the *Euphorbiaceae*. VII. The diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* Diels. **Australian Journal of Chemistry**, v. 17, p. 915-933, 1964.

HENRY, G. E. et al. Kaurene diterpenes from *Laetia thamnia* inhibit the growth of human cancer cells in vitro. **Cancer Letters**, v. 244, n. 2, p. 190-194, 2006.

HIPÓLITO, U. V. et al. The semi-synthetic kaurane ent-16 α -methoxykauran-19-oic acid induces vascular relaxation and hypotension in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, n. 2-3, p. 402-410, 2011.

HUO, L. et al. Simultaneous quantification of Kirenol and ent-16 β ,17-dihydroxy-kauran-19-oic acid from *Herba Siegesbeckiae* in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry and its application to pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatography B**, v. 937, p. 18-24, 2013.

IZUMI, E. et al. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.

JEONG, S. I. et al. Kaurenoic acid from *Aralia continentalis* inhibits biofilm formation of streptococcus mutans. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

JUNG, H. J. et al. Inhibitory activity of *Aralia continentalis* roots on protein tyrosine phosphatase 1B and rat lens aldose reductase. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 10, p. 1771-1777, 2012.

KE, J. et al. Quantitative liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of reserpine in FVB/N mouse plasma using a "chelating" agent (disodium EDTA) for releasing protein-bound analytes during 96-well liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 742, n. 2, p. 369-380, 2000.

LANGAT, M. K. et al. Ent-kauren-19-oic acid derivatives from the stem bark of *Croton pseudopulchellus* Pax. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 414-418, 2012.

LEE, M. K. et al. Quantitative determination of diterpenoids from the roots of *Aralia cordata*. **Natural Product Sciences**, v. 15, n. 1, p. 50-54, 2009.

LEI, M. et al. Comparative pharmacokinetics study of a kaurane diterpenoid after oral administration of monomer and *Siegesbeckia pubescens* Makino extract to rats. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 5, p. 673-679, 2014.

LEITE, L. H. R. et al. Central angiotensin AT1 receptors are involved in metabolic adjustments in response to graded exercise in rats. **Peptides**, v. 30, p. 1931-1935, 2009.

LEMOS, M. et al. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 3, p. 238-245, 2015.

LIM, H. et al. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 9, p. 1237-1243, 2009.

LIZARTE NETO, F. S. et al. Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 71-78, 2013.

LYU, J. H. et al. Ent-kaur-16-en-19-oic acid, isolated from the roots of *Aralia continentalis*, induces activation of Nrf2. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1442-1449, 2011.

MA, J. et al. A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. **Journal of Chromatography B**, v. 862, n. 1-2, p. 219-226, 2008.

MAIMONE, T. J.; BARAN, P. S.. "Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes." **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 396-407, 2007.

MCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MCMASTER, M. **HPLC: a practical user's guide**. Second Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. 238 p.

MESTRES, J. P. et al. Assessment of in vitro dermal absorption of the kaurenic acid from *Coespeletia Moriziana* extracts. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 585-590, 2011.

MIRANDA, M. M. et al. Kaurenoic acid possesses leishmanicidal activity by triggering a NLRP12/IL-1 β /cNOS/NO pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

MIYAZAKI, S. et al. Analysis of ent-kaurenoic acid by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biochemistry and Biophysics Reports**, 2015.

MIZOKAMI, S. S. et al. Kaurenoic acid from *Sphagneticola trilobata* inhibits inflammatory pain: Effect on cytokine production and activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-ATP-sensitive potassium channel signaling pathway. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 896-904, 2012.

MONGELLI, E. et al. Ent-Kaur-16-em-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 4, p.387-388, 2002.

MORRIS, B. D. et al. Isolation of the diterpenoids, ent-kauran-16 α -ol and ent-atisan-16 α -ol, from sunflowers, as oviposition stimulants for the banded sunflower moth, *Cochylis hospes*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 1, p. 89-102, 2005.

MOURA-COSTA, G. F. et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 631-638, 2012.

NA, M. et al. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by diterpenoids isolated from *Acanthopanax koreanum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 11, p. 3061-3064, 2006.

NASCIMENTO, J. W. L. et al. Penetration of cefuroxime in subcutaneous tissue during coronary artery bypass grafting surgery. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 31, p. 3960-3964, 2009.

OKOYE, T. C. et al. Antimicrobial Effects of a Lipophilic Fraction and Kaurenoic Acid Isolated from the Root Bark Extracts of *Annona senegalensis*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

OLIVEIRA, B. H.; SANT'ANA, A. E. G.; BASTOS, D. Z. L. Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 6, p. 368-371, 2002.

OLIVIER, D. K.; VAN WYK, B. E. The major diterpenoids of the genus *Arctopus* (Apiaceae) with notes on their chemotaxonomic and medicinal significance. **South African Journal of Botany**, v. 85, p. 94-98, 2013.

PADLA, E. P.; SOLIS, L. T.; RAGASA, C. Y. Antibacterial and antifungal properties of ent-kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 6, p. 408-414, 2012.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303-307, 2002.

PEDROSO, A. P. D. et al. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 1, p. 63-69, 2008.

PELLETIER, W. S.; CHOKSHI, H. P.; DESAI, H. K. Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 892-900, 1986

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 237-243, 2001.

PHUONG, N. T. et al. Capillary electrophoretic method for the determination of diterpenoid isomers in *Acanthopanax* species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 1, p. 56-61, 2006.

PITA, J. C. L. R. et al. Matrix effect and optimization of LC-MSn determination of trachylobane-360 in mice blood. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 262-270, 2014.

RAGA, D. D. et al. Hypoglycaemic effects of tea extracts and ent-kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 24, n. 18, p. 1771-1782, 2010.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RITSCHER, W.A.; KEARNS G. L. **Handbook of Basic Pharmacokinetics: Including Clinical Applications**. Seventh Edition. Washington: American Pharmacists Association. 2009. 490 p.

- RUFATTO, L. C. et al. Genus *Mikania*: Chemical composition and phytotherapeutical activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1384-1403, 2012.
- RUIZ-ANGEL, M. J. et al. Are analysts doing method validation in liquid chromatography? **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 2-9, 2014.
- SIEBRA, C. A. et al. Potencial anti-inflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 82-88, 2009.
- SIMÃO, M. R. et al. In vitro cytotoxicity study of ent-kaurenoic acid derivatives against human breast carcinoma cell line. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 2, p. 303-309, 2016.
- SIMÕES, C. M. O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999. 821 p.
- SINGH, S. S. Preclinical Pharmacokinetics: An Approach Towards Safer and Efficacious Drugs. **Current Drug Metabolism**, v.7, p.165-182, 2006.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo: Editora Thomson, 2006.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. Third Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.
- SOMOVA, L. I. et al. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopia aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2-3, p. 165-174, 2001.
- SOSA-SEQUERA, M. C.; SUÁREZ, O; DALÓ N.L. Kaurenic acid: An in vivo experimental study of its anti-inflammatory and antipyretic effects. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 5, p. 293-296, 2010.
- TIRAPELLI, C. R. et al. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2-3, p. 233-241, 2004.
- TIRAPELLI, C. R. et al. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 56-62, 2002.
- TIRAPELLI, C. R. et al. Diterpenes: A therapeutic promise for cardiovascular diseases. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2008.
- URZÚA, A. et al. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 882-891, 2008.

VAN SCHIE, CCN; HARING; M. A.; SCHUURINK, R. C. Regulation of terpenoid and benzenoid production in flowers. **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p. 203-208, 2006.

VELIKOVA, M. et al. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 693-696, 2000.

VIEIRA, H. S. et al. Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their trypanocidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 151-157, 2002.

WU, Y. T.; LIN, L. C.; TSAI, T. H. Determination of rhynchophylline and hirsutine in rat plasma by UPLC-MS/MS after oral administration of *Uncaria rhynchophylla* extract. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 3, p. 439-445, 2014.

YAN, H. et al. High-performance liquid chromatography method for determination of carnosic acid in rat plasma and its application to pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 23, n. 7, p. 776-781, 2009.

ZHANG, G. et al. Chemical constituents of *Aristolochia constricta*: antispasmodic effects of its constituents in guinea-pig ileum and isolation of a diterpeno-lignan hybrid. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1167-1172, 2008.

ZHANG, Q. et al. Sensitive determination of kaempferol in rat plasma by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection and application to a pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 29, p. 3595-3600, 2009.

ANEXO A – Certificado de aprovação da pesquisa pela CEUA/UFJF**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA****CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 040/2014 – CEUA sobre “DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO E DA BIODISPONIBILIDADE SISTÊMICA DO ÁCIDO CAURENÓICO EM RATOS” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de JORGE WILLIAM LEANDRO NASCIMENTO com a colaboração de LAURA HORA RIOS LEITE está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 05/05/2015. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 60 ratos Wistar (60 machos) de 3 meses de idade conforme solicitado e que serão utilizados no período de 20/05/2015 a 02/03/2017.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 040/2014 - CEUA about “DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO E DA BIODISPONIBILIDADE SISTÊMICA DO ÁCIDO CAURENÓICO EM RATOS” under responsibility of JORGE WILLIAM LEANDRO NASCIMENTO and collaboration of LAURA HORA RIOS LEITE - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 05/05/2015. For the development of this research 60 Wistar rats (60 males) of 3 months of age, will be delivered as requested in the period of 20/05/2015 to 02/03/2017.

Juiz de Fora, 20 de Maio de 2015A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'L' and 'G' shape, positioned above a horizontal line.

Coordenadora
CEUA

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Laura Hora Rios Leite', positioned above a horizontal line.

Vice-coordenadora
CEUA