

Universidade Estadual de Maringá
Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Identificação e determinação do Anetol em plasma de
rato por cromatografia líquida de alta eficiência de
fase reversa.**

Vinicius Henrique Veraldo Fagundes

Maringá-Paraná

2011

Vinicius Henrique Veraldo Fagundes

Identificação e determinação do Anetol em plasma de rato por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Farmacologia), da universidade Estadual de Maringá para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Roberto Kenji Nakamura Cuman

Maringá-Paraná

2011

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	2
Introdução.....	3
Objetivos.....	4
Materiais e métodos.....	4
Resultados e discussão.....	8
Conclusão.....	16
Referencias Bibliográficas.....	17
Anexo01.....	20
Anexo02	24

RESUMO

Os óleos essenciais são constituídos de metabólitos secundários de plantas e são importantes no metabolismo destas apresentando diversidade de atividades biológicas. O anetol, ou trans-anetol (*trans*-1-metoxi-4-(prop-1-enil) benzeno), é um dos principais constituintes do óleo essencial de anis estrelado (*Illicium verum hook*). Porém, um campo pouco explorado na literatura é o estudo de biodisponibilidade de óleos essenciais. Não foram descritos na literatura estudos utilizando cromatografia líquida (CLAE) para quantificação de anetol com finalidade de fazer o estudo de biodisponibilidade, utilizando plasma humano ou mesmo de animais. O objetivo deste trabalho foi a identificação e a quantificação do anetol presente no óleo essencial do anis estrelado e propor um método de quantificação do anetol por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, utilizando como matriz o plasma de rato. Para identificação foi utilizado RMN, CG-MS e CLAE. Na validação do método de análise em CLAE de anetol em plasma, foram realizados testes utilizando fase móvel metanol:água (85:15). O composto foi extraído do plasma pela precipitação com metanol à baixa temperatura, mesmo o composto tendo características físicas apolares. Os resultados da validação foram satisfatórios com o R^2 acima de 0,99 e em relação à precisão um desvio padrão relativo menor que 6%.

Palavras chave: Anetol; CLAE; biodisponibilidade

ABSTRACT

Essential oils are composed of secondary metabolites of plants and they are important in the metabolism of these presenting diverse biological activities. The anethole, or trans-anethole (trans-1-methoxy-4-(prop-1-enyl) benzene), is a major constituent of essential oil from star anise (*Illicium verum* Hook). An unusual topic investigated in the literature, is the study of bioavailability of essential oils. It was not described in the literature, a method using liquid chromatography (HPLC), with a purpose to make a bioavailability study using plasma of human or animals. The objective of this study was the identification and quantification of anethole present in the essential oil of star anise, and proposes a method of quantification of anethole by liquid chromatography of reverse phase, using the rat plasma as matrix, and for Identification was used NMR, GC-MS and HPLC. The validation method of analysis of anethole in plasma, were performed using as mobile phase methanol: water (85:15). The compound was extracted from plasma by precipitation with methanol at low temperature, even the compound being apolar. The validation results were satisfactory with R^2 above 0.99 and the precision present a standard deviation less than 6%.

Keywords: Anethole; HPLC; bioavailability

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são constituídos de metabólitos secundários de plantas e são importantes no metabolismo destas apresentando diversidade de atividades biológicas.

O anetol, ou trans-anetol [1,2,3] (*trans*-1-metoxi-4-(prop-1-enil) benzeno) [1] está presente em vários óleos essenciais como os obtidos de plantas tais como, Anis estrelado(*Illicium verum hook*) [1,4], *Pimpinella anisum* [5] e *Foeniculum vulgare* [6] como componente majoritário [3]. As plantas que contém o anetol têm uso na culinária como condimento [2] e aromatizante de bebidas alcoólicas. O anetol tem sido utilizado na medicina popular por apresentar algumas propriedades, tais como a de calmante e antiespasmódico [4,7]; porém, comprovadamente, foi demonstrada atividade antiviral para Herpes vírus tipo 1 (HSV-1)[8], além de apresentar atividade antimicrobiana [3,5,6] e antifúngica [3,5].

Para os óleos essenciais, a identificação e a quantificação geralmente são realizadas por cromatografia gasosa (CG) [2,6,9] podendo estar acoplado a outras técnicas [6,9,10], isso devido às características químicas destes compostos.

A maioria dos trabalhos descritos na literatura sobre o perfil farmacocinético de drogas são realizados por meio da CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) [11,12]. No estudo sobre o perfil farmacocinético do 1-8 cineol [13] realizado em plasma humano, presente em vários óleos essenciais, tais como: alecrim [13] e do gengibre [10], este composto foi quantificado por CG. Em outro estudo clínico, utilizando o plasma de pacientes que consumiram chá de funcho (*Foeniculum Vulgare*), foi demonstrado por quantificação através de CG que esta planta contém grande quantidade de anetol e, também, de estragol [14]. A metodologia empregada para os estudos de biodisponibilidade é de suma importância, porém o melhor método para este tipo de quantificação é por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), devido ao fato do CG ser um método muito demorado.

Porém, um campo pouco explorado na literatura é o estudo de biodisponibilidade de óleos essenciais, este tema deveria ser mais abordado, pois com esse tipo de estudo, algumas informações importantes tais como, um maior conhecimento sobre absorção, concentrações plasmáticas, tempo de excreção, tempo de meia-vida seriam adquiridos, podendo assim

definir uma concentração terapêutica ideal, sem correr riscos de acontecer uma intoxicação, e ainda apresentar uma melhor forma de administrar a substância.

Na literatura científica já foram descritos vários métodos para análise do anetol [1,2,3,15,16]. Para esta substância os métodos cromatográficos utilizados para a identificação e a quantificação, mesmo realizados por CLAE, apresentam um maior tempo de análise, inviabilizando o estudo de biodisponibilidade, onde o número de amostras é grande e o tempo total de análise demorado, o que os torna praticamente inviáveis devido à grande utilização de solventes e o custo do processo muito alto.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi à identificação e quantificação do anetol presente no óleo essencial do anis estrelado e propor método de quantificação do anetol por cromatografia líquida em fase reversa, utilizando como matriz o plasma de rato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do anetol

Os frutos secos de anis estrelado foram utilizados para obter o óleo essencial de interesse. Estes frutos foram levados a um balão de destilação com duas saídas, em presença água, assim procedeu-se a destilação por arraste de vapor por método de Clevenger. Obtido o óleo, este novamente foi submetido à destilação por arraste a vapor, com finalidade de obter o anetol, com a máxima pureza possível.

3.2 Solventes

Nas análises por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e para extração das amostras foi utilizado reagente metanol grau HPLC (JT Baker, Inc. Phillipsburg, NJ, EUA). A

água deionizada foi purificada usando um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, EUA).

3.3 Análise por RMN e CG-MS

A composição química do óleo foi determinada por meio das análises dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) (Varian modelo Mercury plus BB) de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e ^{13}C), obtidos operando a 300 MHz para ^1H e 75,5 MHz para ^{13}C . O solvente utilizado para dissolução das amostras foi clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos são indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e após a execução do RMN fez-se os testes com CG-MS (Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas) (THERMO ELECTRON CORPORATION modelo Focus GC), para determinar a pureza do anetol.

As Análises por CG-MS foram realizadas utilizando como detector um espectrômetro de massa quadrupolar, com fonte de ionização de impacto de elétrons, operando a 70 eV. A identificação dos constituintes do óleo essencial foi determinada por meio das análises e comparação dos índices de retenção observados no cromatograma com os índices descritos na literatura. Os cromatogramas das amostras foram registrados nas seguintes condições: Coluna capilar: DB-5 (30 m x 0,32 mm, 0,50 μm), temperatura inicial da coluna, 250 °C Tempo inicial, 60°C (1 minuto.); e rampa de aquecimento 3°C/minuto até 180°C; temperatura do injetor 220°C; Hélio como gás de arraste, em fluxo constante de 1,0 mL/min. O volume injetado foi de 1 μL de amostra dissolvida em acetona (1:10).

3.4 Espectro de UV-VIS a partir do detector de arranjo de fotodiodos

A partir da análise cromatográfica com equipamento de CLAE (Marca Varian, modelo Pro star) com detector de arranjo de fotodiodo (PDA), foi determinado o comprimento de onda ótimo para análise de anetol. Neste teste foram utilizados os seguintes parâmetros: Fase móvel metanol: água (86:14) com fluxo de 1,2ml/min, coluna cromatográfica de fase reversa C18 (SGE) (150mm x 4.6mm x 5 μm), e um espectro de varredura entre 210-400 nm. O volume de injeção utilizado foi de 15 μL .

3.5 Instrumentos e condições cromatográficas do método de quantificação do anetol

O sistema cromatográfico foi constituído por cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 2695, com auto injetor (Waters corporation), acoplado com detector de UV-VIS modelo 2487(Waters corporation), e o software utilizado foi o Empower one. As condições cromatográficas foram restritas a utilização de fase móvel com metanol:água (85:15) e coluna (Thermo electron corporation) ODS Hypersil (150 mm x 2,1 mm x 3µm).O fluxo utilizado foi de 0,200 mL/min e o comprimento de onda selecionado foi de 259nm, sendo que o volume de injeção foi de 25 µL.

3.6 Preparo da solução padrão

A solução padrão foi preparada dissolvendo o padrão de anetol em metanol grau CLAE na concentração em de 1000 µg/mL, e armazenada a 4 °C.

3.7 Obtenção do plasma

O sangue dos animais foi coletado em seringa contendo heparina e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente para obtenção do plasma.

3.8 Curva de calibração

A matriz, plasma de rato isento de contaminantes (branco), foi utilizada na preparação das curvas de calibração. Para quantificação, foi utilizado o método por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas em relação à técnica de regressão linear com análise baseada na área do pico do anetol. A curva de calibração tem sete pontos entre 0,2 ug/mL- 3,0 ug/mL.

3.9 Preparo da amostra

Uma amostra de 0,2 ml de plasma contendo anetol foi desproteïnizada pela adição de 0,3 mL de metanol grau HPLC gelado. A amostra foi vigorosamente homogeneizada por 2 minutos, e centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado

e encaminhado para análise cromatográfica no sistema de CLAE para a determinação de anetol.

3.10 Validação do método de quantificação de anetol em plasma

A comparação cromatográfica da solução padrão de anetol em meio de metanol e do plasma de rato isento de contaminantes foi conduzido para avaliar a especificidade e seletividade do método, onde os interferentes presentes no plasma de rato branco podem apresentar no mesmo tempo de retenção da substância de interesse um pico com no máximo 20% da área do pico do LIQ de anetol. As curvas de calibração para determinar linearidade, realizadas em triplicata, foram obtidas a partir da área do pico com relação a concentrações plasmáticas utilizando como modelo de regressão linear $1/X^2$. A correlação com valor maior do que 0,99 é o esperado. As concentrações de CQ (controle de qualidade) foram calculadas por interpolação a partir das curvas de calibração. A precisão intra e inter-corrída foi determinada pela avaliação dos resultados medidos em base das amostras de CQ em baixa, média e alta concentração, sendo que foi utilizado um n=5 para cada concentração. A Precisão foi expressa a partir do desvio padrão relativo (RSD %), e este deverá ser inferior a 20% para a LIQ e para o maior ponto de curva, e 15% em todas as outras concentrações. A exatidão (%) foi determinada em uma relação entre a média das concentrações reais encontradas e a concentração nominal. O LIQ (limite inferior de quantificação) do bioensaio, definido como a mais baixa concentração na curva de calibração, deve ser quantificado com exatidão que não pode exceder 20% do valor nominal e precisão com limite de 20% de desvio. A recuperação da extração das amostras foi estabelecida por comparação entre os picos obtidos do branco com adição padrão de anetol em concentração conhecida e o pico solução em metanol contendo anetol também com uma concentração determinada.

O teste de estabilidade de gelo-degelo foi realizado após um ciclo conhecido como o primeiro derretimento. Outro teste de estabilidade que foi realizado é o teste denominado de estabilidade de pós-processamento que é realizado quando as amostra são extraídas e logo após ocorre injeção em CLAE e ao passar do tempo essas mesmas amostras extraídas são injetadas novamente nos tempos de duas, quatro, seis, oito, dez, doze, dezesseis e vinte e quatro horas após a extração. Em outra série de experimentos de estabilidade foi realizado a estabilidade de curta duração a temperatura ambiente, onde foram preparadas as amostras de plasma contendo anetol, e estas divididas em duas frações, onde uma das frações teve a

extração realizada logo após o término do preparo das amostras, e a outra fração ficou exposta a temperatura ambiente por seis horas, e posteriormente foi realizada extração. Em ambos os casos as amostras recém extraídas foram levadas ao sistema de CLAE para análise e os resultados foram comparados para comprovar a estabilidade da amostra em temperatura ambiente.

3.11 Animais

Todos os experimentos foram realizados com plasma de ratos Wistar submetidos ao jejum de alimento e água, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Maringá. Os ratos foram alojados em $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sob um ciclo doze horas de escuridão e doze horas com iluminação artificial. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise por CG-MS e RMN

O cromatograma do óleo essencial de anis estrelado (Fig.1), obtido por CG-MS, apresenta no tempo de retenção de 21,02 minutos o anetol, que está em alta concentração, aproximadamente 98%. Como a identificação foi realizada por espectro de massa simples, a massa encontrada foi de 148 m/z (Fig. 2), reproduzindo o que já foi descrito na literatura para esta substância [3,17,18] os outros picos correspondem a alguns contaminantes, como o Estragol e o Linalol que foram identificados no tempo de retenção de 17,25min e 12,97min.

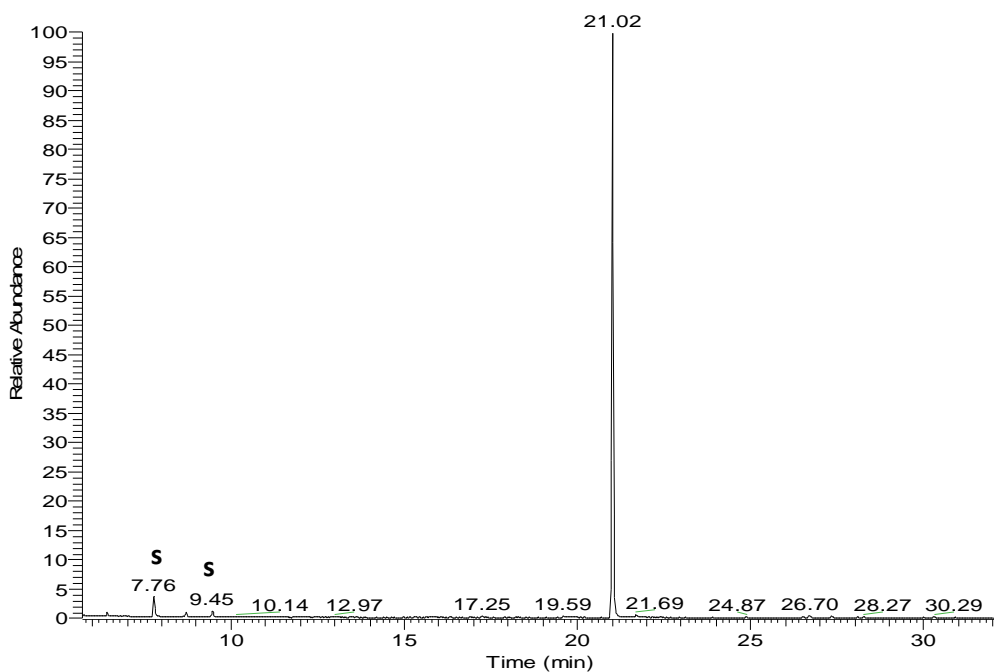


Fig. 1: Cromatograma do óleo essencial de anis estrelado por CG-MS (TR=21.02 correspondendo ao anetol-98% de pureza).

ST34((8mg) #803 RT: 21.04 AV: 1 NL: 5.26E6
T: + c Full ms [50.00-650.00]

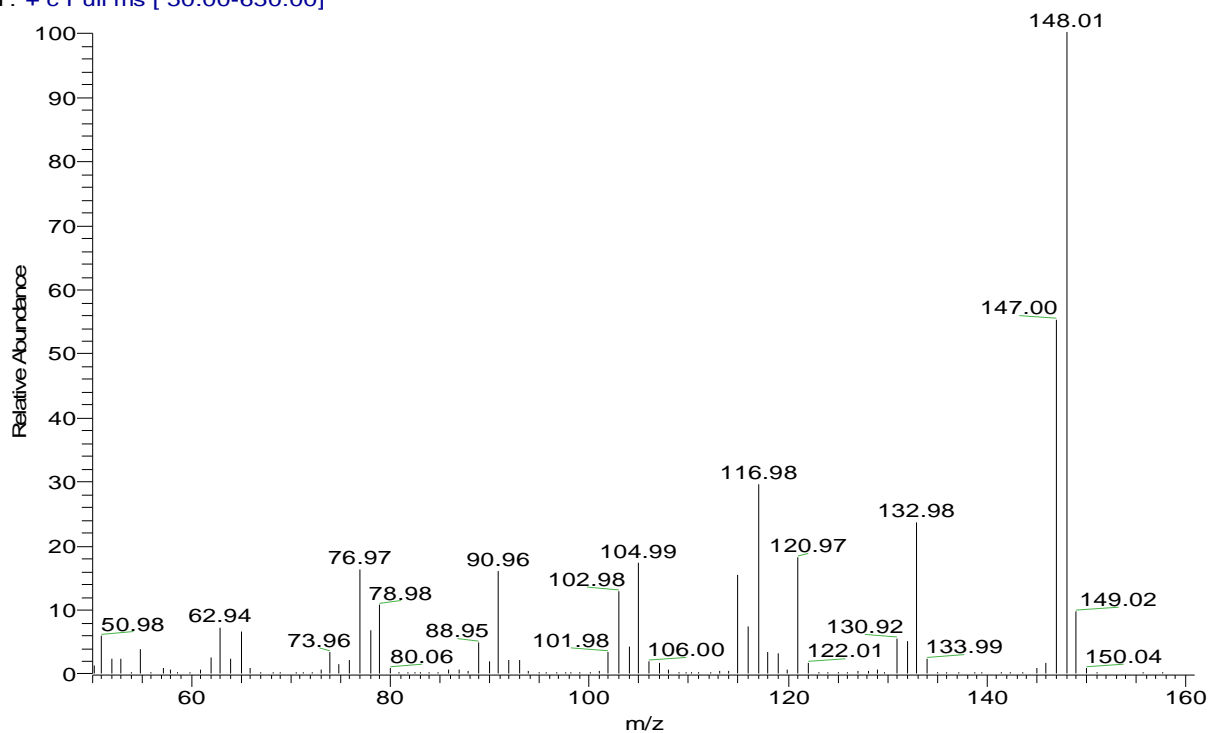


Fig. 2. : Espectro de massas referente ao anetol, encontrado no tempo de retenção de 21,02 minutos, na análise por CG-MS.

A análise dos espectros unidimensionais de RMN de ^{13}C e ^1H deste óleo comprovou a presença do composto majoritário que é o anetol (fig.3). Assim como no CG-MS, nos espectros de RMN foi observada a presença dos contaminantes, mas que nada interferiram na identificação do composto principal.

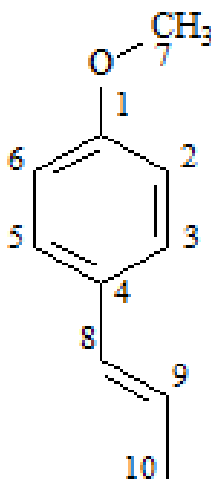


Fig. 3: Estrutura molecular do anetol

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): 7,27 (dt, 2H, H-3 e H-5, $^3\text{J}_{\text{H}_3,\text{H}_2}$ e $^3\text{J}_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 8,7$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H}_3,\text{H}_5}$ e $^4\text{J}_{\text{H}_5,\text{H}_3} = 3,0$ Hz), 6,84 (dt, 2H, H-2 e H-6, $^3\text{J}_{\text{H}_2,\text{H}_3}$ e $^3\text{J}_{\text{H}_6,\text{H}_5} = 8,7$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H}_2,\text{H}_6}$ e $^4\text{J}_{\text{H}_6,\text{H}_2} = 3,0$ Hz), 6,35 (dq, 1H, H_a , $^3\text{J}_{\text{H}_a,\text{H}_b} = 15,7$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H}_a,\text{H}_c} = 1,6$ Hz), 6,10 (dq, 1H, H_b , $^3\text{J}_{\text{H}_b,\text{H}_a} = 15,7$ Hz, $^3\text{J}_{\text{H}_b,\text{H}_c} = 6,6$ Hz), 3,79 (s, 3H, H_d), 1,86 (dd, 3H, H_c , $^3\text{J}_{\text{H}_c,\text{H}_b} = 6,5$ Hz, $^4\text{J}_{\text{H}_c,\text{H}_a} = 1,5$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3): 158,7 (C-1), 131,0 (C-4), 130,5 (C-8), 127,0 (C-3 e C-5), 123,6 (C-9) 114,0 (C-2 e C-6) 55,4 (C-7), 18,6 (C-10).

4.2 UV-VIS

O teste de UV-VIS foi realizado para determinar o melhor comprimento de onda para análise e validação do método de quantificação do anetol. Os resultados mostraram que para a análise deste composto o melhor comprimento de onda é o de 259 nm (Fig.4), concordante com a literatura [1,3].

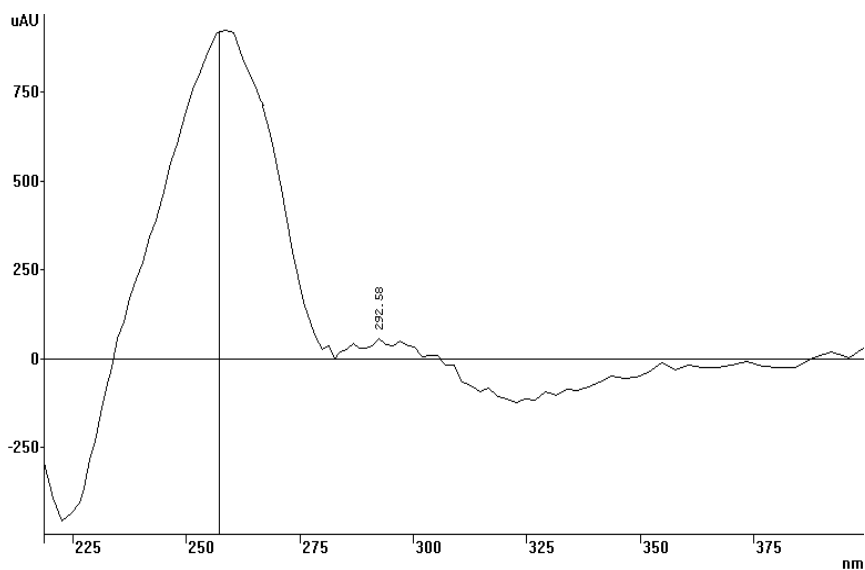


Fig.4 Perfil de absorção molecular do anetol na região do UV-VIS.

4.3 Desenvolvimento de método por CLAE

No desenvolvimento do método de análise de anetol por CLAE, diferentes fases móveis foram utilizadas para obter um bom resultado cromatográfico. No presente método, a fase móvel utilizada foi metanol:água (85:15), v/v), fluxo de 0,2 ml/min, e uma coluna THERMO ODS Hypersil (150mm x 2,1mm e 3,0 μ m) mostrou ser a melhor condição cromatográfica encontrada. O comprimento de onda que teve máxima absorção foi de 259 nm [1,3]. A elevada proporção de metanol na fase móvel foi justificada pelo fato do anetol apresentar características apolares, sendo praticamente insolúvel em água, assim necessário uma fase móvel com elevada proporção de solvente orgânico. Nestas condições, o pico da substância obteve melhor resolução e maior resposta em CLAE, e o tempo de corrida foi de 4 minutos com tempo de retenção de 2,73 minutos (Fig.5), sendo este método de análise para o anetol o mais rápido por cromatografia líquida [1,3,5]. No caso da existência de várias amostras como na validação de método de análises de substância em material biológico, o método por CLAE, que geralmente tem tempo de análise menor para substâncias isoladas, é viável, pelo fato que os testes por cromatografia gasosa são extremamente demorados.

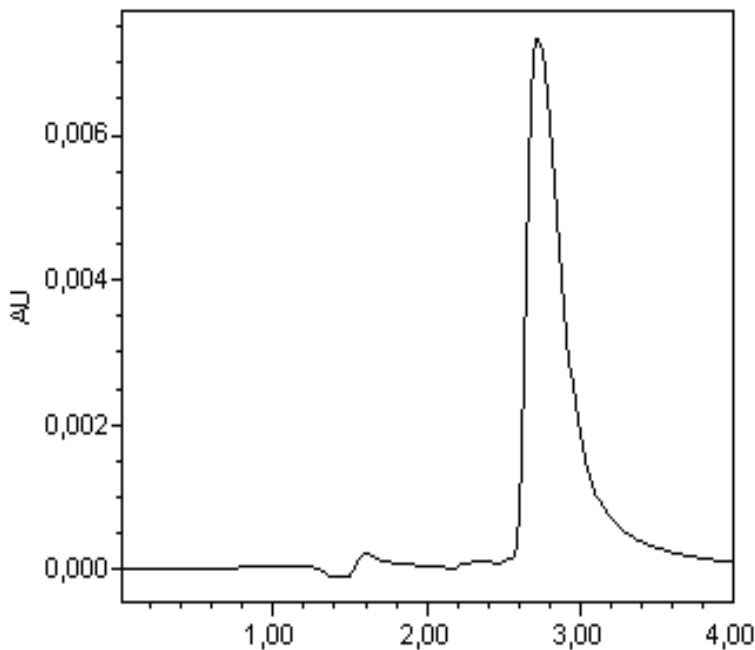


Fig.5: Cromatograma do anetol em CLAE de fase reversa com tempo de retenção de 2,73 minutos na concentração de 1 μ g/mL em plasma utilizando como fase móvel metanol:água (85:15),(I v/v), fluxo de 0,2 ml/min.

4.4 Validação do método de quantificação de anetol em plasma

Para a validação do método foram utilizados vários testes preconizados pela resolução 899 e pelo FDA (Food and Drug administration) [19, 20] dentre eles: especificidade e seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão. Para avaliação da estabilidade da amostra foram realizados testes de pós-processamento da amostra, seis horas a temperatura ambiente e do gelo e degelo [19,20]

No método cromatográfico utilizado neste trabalho foi empregado o metanol para precipitação de proteínas plasmáticas. Várias substâncias tais como: metanol, etanol, acetonitrila ou ácido perclórico tem apresentado bons resultados na precipitação de substâncias endógenas que podem interferir nas análises cromatográficas [21,22,23]. Outra metodologia para realizar a extração de amostras, poderia ser por meio de extração líquido-líquido, utilizando diclorometano como solvente. Em nossos experimentos esta técnica não foi eficaz, devido ao fato de se estar utilizando uma cromatografia de fase reversa, com coluna C18; neste caso a amostra necessita estar seca e ressuspensa em metanol, sendo inviável, pois o anetol é óleo essencial e volátil, sendo evaporado junto com o solvente. Portanto o melhor

método para a extração deste tipo de substância deve ser o método de precipitação, que foi muito eficiente atingindo um bom desempenho, sendo que a recuperação da amostra foi de aproximadamente 96%, considerado um alto índice de recuperação.

Um padrão interno se bem que desejável, não é essencial no método utilizado, uma vez que a padronização externa pode avaliar com eficiência as amostras preparadas em plasma. Neste presente estudo, os resultados obtidos foram satisfatórios, não havendo necessidade do padrão interno, como já referenciado na literatura para outros métodos quantitativos [24-25].

4.4.1 Seletividade e especificidade

Os resultados cromatográficos do branco e da solução de 500 ng/mL de anetol em metanol apresentaram pouca interferência, o que comprova a ausência de interferentes endógenos, correspondendo, portanto a uma alta especificidade e seletividade do método.

4.4.2 Sensibilidade e linearidade

A curva de calibração foi linear em relação aos sete pontos utilizados entre as concentrações 200–3000 ng/ml no plasma, sendo que cada ponto da curva foi obtido a partir de três replicatas. A equação de regressão obtida foi de $Y = 5.379x + 108.330$ e o $R^2 = 0,99459856$ (peso = $1/X^2$). O teste de R^2 foi superior a 0,98 sendo este o valor mínimo preconizado pela ANVISA, estando o nosso teste de linearidade adequado.

4.4.3 Precisão e exatidão

Nos testes de precisão e exatidão, foi utilizado o teste preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pelo FDA [19,20] que são os controles de baixa, média e alta concentração. O controle de qualidade de baixa (CQB), concentração precisa ser menor ou igual a 3 vezes do LIQ, por isso em nossas análises foi utilizado o controle de qualidade baixo com concentração de 0,6 ug/ml; o controle de qualidade médio (CQM), é a média do controle baixo e o alto e assim utilizamos uma concentração de 1,7ug/mL. Pelas normas, o controle de qualidade alto (CQA), necessita estar entre 75% a

90% da concentração do ponto mais alto da curva de calibração, sendo utilizada a concentração de 2,7 ug/mL. Estas normativas são baseadas na resolução 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e pelo guia de validação de método bioanalítico do FDA [19,20], que impõe regras para os ensaios bioanalíticos. A precisão global inter e intra-dia, e a exatidão para determinação de anetol em plasma estão apresentados na Tabela 1.

A determinação da precisão (RSD%) teve resultado menor que 6% para três níveis de controle de qualidade empregados (tabela 1), e estes estão de acordo com as referências utilizadas, onde admite-se um desvio máximo de até 15% para os controles de média e alta concentração, e de até 20% para o controle de baixa concentração. portanto os resultados encontrados em nosso estudo estão dentro dos padrões estabelecidos para validação do método. A exatidão encontrada, na faixa de 90-102,96% (tabela 1) também esta dentro dos padrões. Em conjunto, os resultados indicaram que o ensaio teve notável reprodutibilidade com exatidão e precisão aceitável, para os parametros determinados pela ANVISA e pelo FDA.

Tabela 1: Valores de precisão e exatidão da validação do método de análise de anetol em plasma.

	CQB	CQM	CQA
RSD(%)	2,43	2,1	5,90
Valor nominal	0,6 ug/mL	1,7 ug/mL	2,7ug/mL
Valor encontrado	0,54 ug/mL	1,74 ug/mL	2,78 ug/mL
Exatidão	90%	102.35%	102,96%

CQB: controle de qualidade baixo; CQM: controle de qualidade médio; CQA: controle de qualidade alto

RSD: desvio padrão relativo

4.4.4 Estabilidade pós-processamento da amostra

Em relação à estabilidade do pós-processamento da amostra, no tempo inicial (tempo zero) e após 16 horas da amostra ter sido extraída, não apresentaram variação significativa (dados não apresentados). Por outro lado, o mesmo não ocorreu em vinte quatro horas após a extração, onde a curva de calibração não apresentou linearidade. As amostras foram instáveis considerando que houve variação significativa dos resultados obtidos em relação a análise em tempo inicial.

Os dados obtidos pelo testes de estabilidade do pós-processamento das amostras demonstram que a amostra é estável por muito tempo depois de extraída, e assim pode ser extraída e ficar armazenadas no auto injetor por longos períodos sendo assim muito viável fazer uma extração em série e deixar as amostras em modo de espera no CLAE.

4.4.5 Estabilidade de curta duração

Pelo teste de seis horas de exposição à temperatura ambiente, ficou demonstrado que as amostras se apresentaram estáveis após este período de tempo, indicando que podem ser mantidas em temperatura ambiente para serem extraídas.

4.4.6. Teste de gelo e degelo

Foi realizado o teste de gelo e degelo, segundo normativa da ANVISA e o FDA [19,20]. Em nossos experimentos, o teste de gelo e degelo foi realizado apenas uma vez, já que não houve necessidade de reutilizar a amostra durante a validação. Este teste se torna importante, em caso do descongelamento de uma amostra varias vezes para retirada de alíquotas, podendo reduzir a estabilidade desta amostra, sendo assim este teste é de grande importância para a estabilidade. Os dados obtidos neste teste demonstraram que praticamente não houve perdas com este ciclo, sendo assim um método robusto e estável neste quesito.

5. CONCLUSÕES

Avaliando os resultados, pode-se concluir que:

- O anetol pode ser identificado e determinado por meio de CG-MS, RMN e UV-VIS.
- O metanol pode ser utilizado como solvente de extração do anetol em plasma.
- A CLAE é um método eficiente para análise do anetol.
- O método proposto por apresentar eficácia em sua validação, pode ser utilizado em um estudo farmacocinético.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D. Minakshi , D. Krishna , P. Sen , A.B. Banerjee, *Phytoterapy Research*, 16 (2002).
- [2] Y. Jian-hui, X. Xu-xian, H. Ke-long, *Journal of Central South University of Technology*, 9 (2002).
- [3] M. De, A.K. De, R. Mukhopadhyay, M. Miro, A. Anerjee, *Ars Pharmaceutica*, 42 (2001).
- [4] D.I. Ludlow, S. Ragone, I.S. Bruck, J.N. Bernstein, M. Duchowny, B.M.G. Pena, *Pediatrics*, 114 (2004).
- [5] M.J Mohammed, *Journal of Pharmacy Research* (2009).
- [6] B. Cetin, H. Ozer, A. Cakir, T. Polat, A. Dursun, E. Mete, E. Ozturk, M. Ekinc, *Journal of Medicinal Food*, 13 (2010).
- [7] N. Samuels, Y. Finkelstein, S. R. Singer, M. Oberbaum, *Epilepsia*, 49 (2008).
- [8] A.Astani, J. Reichling, P. Schnitzler, *Evidence-based Complementary and Alternative Medice*, (2009).
- [9] P.Rattanachaikunsopon,P.Phumkhachorn,*Bioscience,Biotechnology, Biochemistry*, 74 (2010).
- [10] F.R. Carrasco, G. Schmidt, A.L. Romero, J.L Sartoretto, S.M. Caparroz-Assef, C.A.B. Amado C.A, R.K.K. Cuman, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61 (2009).
- [11] A. Payasi, M. Chaudhary, A. Gupta, V.K. Dwivedi, A. Bhatnagar, *The Journal of Toxicological Sciences*, 35 (2010).
- [12] Y. Mei, J. Xu, J. Zhao, N. Feng, Y.Liu , L. Wei, *Journal of Chromatography B*, 869 (2008).

- [13] W. Jager, B. NaJel, C. NaSel, R. Binder, T. Stimpfl, W.Vycudilik, G.Buchbauer, *Chemical Senses* 21 (1996).
- [14] A. Zeller, K. Horst, M. Rychlik, *Chemical Reseach in Toxicology*, vol.22 number 12 (2009).
- [15] J.M. Jurado, A. Alcazar, F. Pablos, M.J. Martin, *Chromatographia*, 64 (2006).
- [16] A.R. Bilia, M. Fumarola, S. Gallori, G. Mazzi, F.F. Vincieri, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48 (2000).
- [17] C. A. Marquez, H. Wang, F. Fabbretti, J. O. Metzger, *Journal of American Chemical Society*, 130 (2008).
- [18] H. T. Castro, J. R. Martínez , E. Stashenko, *Molecules*, 15 (2010).
- [19] Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003- Agencia nacional de vigilância sanitária (ANVISA).
- [20] Guidance for industry; Bioanalytical method for validation, FDA (2001).
- [21] J.Billups, C. Jones, T. L. Jackson, S.Y. Ablordeppeyc S. D. Spencer, *Biomedical Chromatography*, 24(2010).
- [22] K. E. Hubbard, P. Schaiquevich, F. Bai, C.H. Fraga, L. Miller, J. C. Panetta, C. F. Stewart, *Biomedical Chromatography*, 23 (2009).
- [23] Y. Zhao, X. Wang, Y. Zhao, X. Gao, K. BI, Z. Yu, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30 (2007).
- [24] C.Wu, Y. Sheng, Y. Zhang¹, J. Zhang, B. Guo, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22 (2008).

[25] J. Shen, C. Yang, C. Wu, P. Feng, Z. Wang, Y. Li , Y. Li, S. Zhang, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24 (2010).

ANEXO 01

1. OBJETIVOS

Demonstrar o estudo de farmacocinética do anetol em plasma de rato.

2. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO ANETOL EM PLASMA DE RATO

O método desenvolvido e validado por meio da CLAE foi utilizado para o estudo de farmacocinético do anetol em plasma de rato.

2.1 Animais utilizados

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, com peso entre 220-280 gramas (n=8) submetidos ao jejum de doze horas.

2.2 Estudo farmacocinético

Os ratos foram tratados por gavagem com anetol na dose de 250 mg/kg. Foram coletadas amostras de 300 μ L de sangue da cauda do animal nos tempos de 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas 8 horas, 12 horas e 24 horas após a administração da substância. Após centrifugação e obtenção do plasma, as amostras sofreram o procedimento de extração para recuperação do anetol , e posterior análise por meio da CLAE.

3. RESULTADOS

Os resultados apresentam o Cmax do anetol em torno de uma hora após a administração da substância, onde foi determinada uma concentração média de 2,1 ug/mL de anetol em plasma de rato, outro resultado também sugerido é que após vinte quatro horas da administração não se encontra mais anetol no plasma do animal (Tabela 1).

Tempo (horas)	Concentração plasmática (ug/mL)	DP %
0.0	0	0
0.25	0.525	0.09
0.5	1.622	0.05
1.0	2.137	0.07
2.0	1.48	0.05
4.0	1.085	0.07
8.0	0.505	0.09
12.0	0.194	0.09
24.0	0	0

Tabela 1: Relação da concentração plasmática de anetol em plasma de rato com o tempo decorrido após a administração da substância.

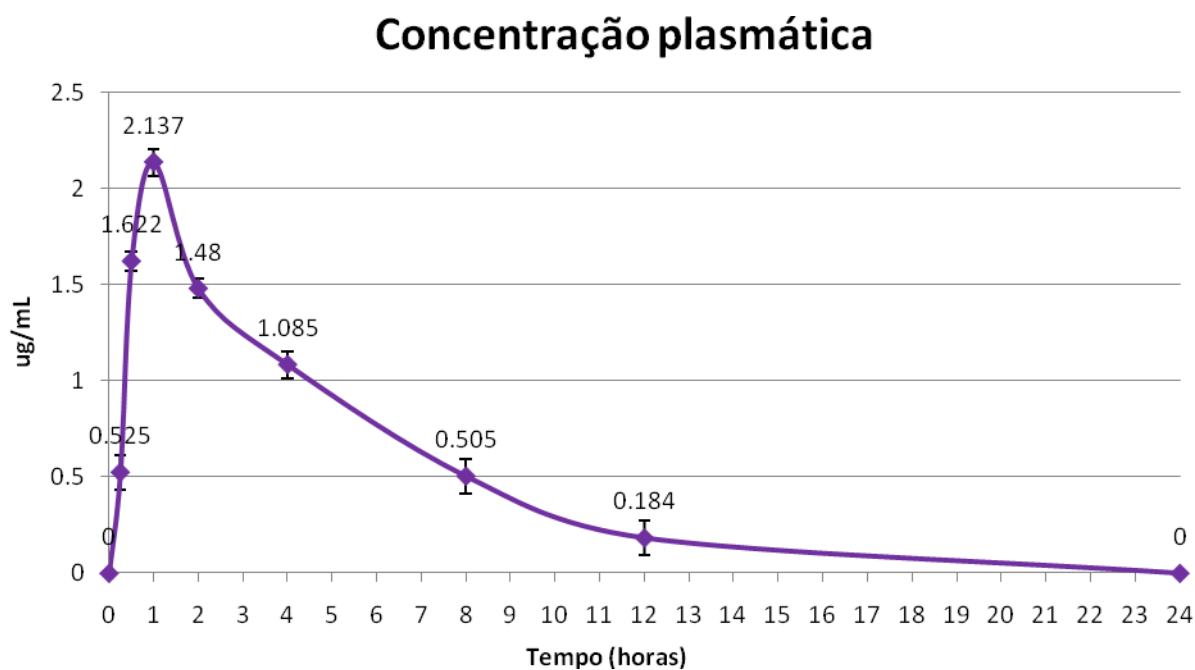


Fig 1. Gráfico de apresentação da farmacocinética do anetol em plasma de rato, onde demonstra a concentração (ug/mL) encontrada em decorrer do tempo(Horas).

4. CONCLUSÕES

Os métodos de preparo de amostra e analítico utilizados para o estudo de farmacocinética demonstraram ser eficientes para esta finalidade, sendo assim foi possível apresentar uma curva de concentração plasmática de anetol em relação ao do decorrer do tempo.

ANEXO 02



ISSN: 1570-0232

Imprint: ELSEVIER

The Journal of Chromatography B publishes papers on developments in separation science relevant to biology and biomedical research including both fundamental advances and applications. Analytical techniques which may be considered include the various facets of chromatography, electrophoresis and related methods, affinity and immunoaffinity-based methodologies, hyphenated and ... [click here for full Aims & Scope](#)

Editors

R.P.H. Bischoff

D.S. Hage

G. Hopfgartner

H.T. Karnes

D.K. Lloyd

G. Xu

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Reference Style

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result"

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, *J. Sci. Commun.* 163 (2000) 51.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, Macmillan, New York, 3rd ed., 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.),

Introduction to the Electronic Age, E-Publishing, New York, 1994, p. 281.