

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA VELOSO FERREIRA

**EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE KAVA-KAVA (*Piper methysticum* G. Forst) -
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, TOXICIDADE AGUDA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS
E BIODISPONIBILIDADE DE KAVAÍNA**

BELO HORIZONTE – MG

2019

JULIANA VELOSO FERREIRA

**EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE KAVA-KAVA (*Piper methysticum* G. Forst) -
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, TOXICIDADE AGUDA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS
E BIODISPONIBILIDADE DE KAVAÍNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Isabela da Costa César

Coorientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

BELO HORIZONTE – MG

2019

F383e Ferreira, Juliana Veloso.
Extratos secos do rizoma de Kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst) – avaliação da qualidade, toxicidade aguda, atividades biológicas e biodisponibilidade de kavaína / Juliana Veloso Ferreira. – 2019.
169 f. : il.

Orientadora: Isabela da Costa César.
Coorientador: Gérson Antônio Pianetti.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Piper methysticum (Homeopatia)/uso terapêutico – Teses. 2. Extratos vegetais/uso terapêutico – Teses. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 4. Farmacocinética – Teses. 5. Controle de qualidade – Teses. 6. Toxicidade – Teses. 7. Antinocicepção – Teses. 8. Antimicrobianos – Teses. I. César, Isabela da Costa. II. Pianetti, Gérson Antônio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.537



FOLHA DE APROVAÇÃO

**EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE KAVA-KAVA (*Piper methysticum* G. Forst) -
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE, TOXICIDADE AGUDA, ATIVIDADES BIOLÓGICAS
E BIODISPONIBILIDADE DE KAVAÍNA**

JULIANA VELOSO FERREIRA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 27 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Isabela da Costa César

Profa. Isabela da Costa César - Orientadora
UFMG

Gerson Antônio Pianetti

Prof. Gerson Antônio Pianetti - Coorientador
UFMG

Jose Eduardo Gonçalves

Prof. Jose Eduardo Gonçalves
UFMG

Rachel Oliveira Castilho

Profa. Rachel Oliveira Castilho
UFMG

Neila Márcia Silva Barcellos

Profa. Neila Márcia Silva Barcellos
UFOP

Tércio Paschke Oppe

Prof. Tércio Paschke Oppe
UFRGS

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2019.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor e apoio incondicional para que eu pudesse chegar até aqui. Aos meus pais, Edson e Patrícia, e meu irmão, Fabiano, por toda dedicação durante esses anos, sempre confiando e acreditando em mim. Ao Rodrigo por compartilhar todos os momentos, sempre com incentivo, carinho e suporte.

À Profa. Dra. Isabela da Costa César, minha querida orientadora, por me receber como sua aluna, sempre com muita dedicação, paciência e amizade. Obrigada por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti, pela coorientação e conhecimentos que ajudaram no enriquecimento e desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores doutores Carlos Alberto Tagliati, Geovanni Dantas Cassali, Daniel de Assis Santos e Renes de Resende Machado, por terem me recebido com muito atenção e prontidão em seu laboratório, contribuindo para que esse projeto se realizasse.

Ao Prof. Dr. Anas El-Aneed e todo seu grupo de pesquisa, por me receber em seu laboratório durante o período de doutorado-sanduíche, pela contribuição intelectual e por toda ajuda profissional e pessoal durante esta etapa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa no Brasil e no exterior durante o período de doutorado-sanduíche.

Ao colegiado de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela ajuda e pela cordialidade com que sempre me receberam. E aos professores da Faculdade de Farmácia, em especial ao Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves e à Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares, pela contribuição para o meu amadurecimento acadêmico.

Aos meus queridos amigos e colegas, Pedro Reis, Graziela Rivelli e Ana Coelho, pela amizade construída, pelas conversas acadêmicas e distrações tão essenciais durante essa etapa. Vocês foram fundamentais.

Aos amigos do LCQ-FAFAR, em especial Juliana Brêtas, Naialy, Talita, André, Pedro Franco, Ana Carolina, Carlos e Mateus, por seus conselhos e dicas, tornando essa jornada mais fácil e prazerosa.

À Isabella, minha querida estagiária, pelo apoio e companhia durante a execução deste projeto.

Aos meus amigos que, de alguma maneira, contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta etapa, sempre na torcendo por mim. Em especial à Tamires, sempre presente em todos os momentos, bons e não tão bons assim. Obrigada a todos pela amizade.

A todos que foram essenciais na concretização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O extrato seco do rizoma da planta *Piper methysticum* G. Forst, popularmente conhecida como Kava-kava, tem sido amplamente comercializado no Brasil devido a suas propriedades ansiolíticas e sedativas. Embora o uso da planta *in natura* ou em fitoterápicos seja amplamente difundido, não há uma monografia completa em compêndios oficiais, além de ser escassa a literatura disponível relacionada a Kava-kava. No presente trabalho, foi desenvolvido e validado um método analítico rápido e eficiente, utilizando cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos, para quantificação simultânea dos marcadores ativos da planta (kavalactonas: metisticina, dihidrometisticina, kavaína, dihidrokavaína, yangonina e desmetoxyyangonina) presentes em amostras de extrato seco de kava-kava provenientes de farmácias magistrais. O controle de qualidade dessas amostras foi realizado por meio de avaliação visual, doseamento e perda por dessecação. A análise quantitativa dos extratos demonstrou grande variabilidade nos teores individuais e totais das kavalactonas entre as amostras. Os parâmetros farmacocinéticos da kavaína foram determinados, após administração *per os* do padrão analítico e do extrato de Kava-kava em camundongos, a partir de método bioanalítico utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial, desenvolvido e validado para a quantificação deste marcador em amostras de plasma. A partir dos parâmetros farmacocinéticos obtidos, a biodisponibilidade relativa da kavaína isolada e presente no extrato foi determinada e a ocorrência de sinergismo farmacocinético entre este marcador e os demais componentes do extrato da planta foi demonstrada. A toxicidade aguda de extratos de Kava-kava foi avaliada após administração *per os* em ratos, sendo possível classificar o extrato como de baixa toxicidade aguda. A análise histológica dos rins e fígados dos animais tratados com o extrato indicaram ausência de toxicidade aguda nesses órgãos. Em relação às demais atividades biológicas avaliadas, não foi observada atividade antibacteriana em modelo *in vitro* para os extratos. Alguns destes apresentaram atividade antifúngica contra *Cryptococcus* spp, no entanto, os valores obtidos não foram suficientes para a continuidade dos testes em ensaios *in vivo*. Visto que a kavaína não apresentou tal atividade, pressupõe-se que ela esteja relacionada a outros compostos presente no extrato. A atividade antinociceptiva de diferentes extratos de kava-kava e do padrão analítico da kavaína foi comprovada por meio de modelo de calor induzido em camundongos, duas horas após a administração dos tratamentos por via *per os*. Por meio do teste em haste girante, comprovou-se que o efeito antinociceptivo observado não está relacionado a comprometimento da resposta motora dos animais após o tratamento. Os resultados obtidos demonstram a importância de um controle de qualidade efetivo para os extratos de Kava-kava, de maneira a assegurar sua eficácia terapêutica e segurança durante o uso. Desse modo, o presente trabalho acrescenta informações importantes à literatura científica a respeito da atividade, farmacocinética e composição dos extratos de Kava-kava.

Palavras-chave: *Piper methysticum*. Kava-kava. Kavalactonas. CLAE-DAD. CLAE-EM/EM. Farmacocinética. Toxicidade aguda. Atividade antinociceptiva. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The dry root extract of the plant *Piper methysticum* G. Forst, popularly known as Kava-kava, has been widely marketed in Brazil due to its anxiolytic and sedative properties. Although the plant consumption *in natura* or present in herbal medicines is widely diffused, there is no complete monograph in official compendium and the available literature related to Kava-kava is scarce. In the present work, a fast and efficient analytical method was developed and validated, using high performance liquid chromatography with diode array detection, for the simultaneous quantification of the plant's active markers (kavalactones: methysticin, dihydromethysticin, kavain, dihydrokavain, yangonin and desmethoxyyangonin) present in Kava-kava extract samples from compounding pharmacies. The quality control of these samples was performed through visual evaluation, assay and loss on drying. Quantitative analysis of the extracts showed a high variability in the individual and total contents of kavalactones between the samples. Kavain's pharmacokinetic parameters were determined, after *per os* administration of the standard and the extract in mice, through a bioanalytical method, using liquid chromatography tandem mass spectrometry, developed and validated for the quantification of this marker in plasma samples. Through the obtained pharmacokinetic parameters, the relative bioavailability of kavain isolated and present in the extract was determined and the occurrence of pharmacokinetic synergism between this marker and other compounds present in the plant extract was demonstrated. Kava-kava extracts acute toxicity was evaluated after *per os* administration in rats and the extract could be classified as low acute toxicity. Kidney and liver histological analysis of animals treated with the extract indicated absence of acute toxicity in these organs. Regarding other evaluated biological activities, no antibacterial activity was observed for the extracts in *in vitro* models. Some of the extracts presented antifungal activity against *Cryptococcus* spp, however, the values obtained were not enough to continue the tests in *in vivo* models. Since kavain did not show such activity, it is assumed that it might be related to other compounds present in the extract. Antinociceptive activity of different Kava-kava extracts and kavain standard was confirmed through induced heat model in mice, two hours after *per os* administration. Through rotarod test, it was proved that the observed antinociceptive effect is not related to the impairment of the animal's motor response after the treatment. The obtained results demonstrate the importance of effective quality control for Kava-kava extracts, to ensure its therapeutic efficacy and safety during use. Thus, the present work adds important information to the scientific literature regarding the activity, pharmacokinetics and composition of Kava-kava extract.

Key-words: *Piper methysticum*. Kava-kava. Kavalactones. HPLC-DAD. HPLC-MS/MS. Pharmacokinetics. Acute toxicity. Antinociceptive activity. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– <i>Piper methysticum</i> G. Forst: arbusto (a), folha (b), rizoma (c), rizoma em pó (d).....	21
Figura 2 – Estrutura química das principais kavalactonas presentes no rizoma de Kava-kava.....	22
Figura 3 – Relação entre o tipo de extrato de Kava-kava consumido em função do sexo e idade do indivíduo, dentre os relatos de caso a respeito dos possíveis efeitos hepatóxicos provenientes do seu consumo.....	31
Figura 4 – Amostras de extrato seco de Kava-kava doadas, com seus respectivos aspectos macroscópicos informados nos laudos dos fornecedores.....	54
Figura 5 – Cromatograma obtido pela análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,5 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 30 °C. Representação dos 25 minutos iniciais da corrida analítica.....	57
Figura 6 – Cromatograma obtido pela análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD utilizando o gradiente A. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 30 °C. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.....	59
Figura 7 – Cromatograma obtido pela análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD utilizando o gradiente B. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 40 °C. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.....	60
Figura 8 – Espectros de varredura (190 – 400 nm) para as soluções dos padrões de metisticina (MET) ^A , diidrometisticina (DHM) ^B , kavaína (KAV) ^C , diidro-kavaína (DHK) ^D , yangonina (YAN) ^E e desmetoxiyangonina (DXY) ^F	62
Figura 9 – Relação entre a área do pico cromatográfico de cada kavalactona em relação ao pH da fase móvel.....	64
Figura 10 – Cromatograma obtido pela análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,15 mg/mL em CLAE-DAD utilizando o método desenvolvido.....	65
Figura 11 – Seleção automática de cinco espectros de varredura (190 – 400 nm) de solução de amostra de extrato seco de Kava-kava contendo as kavalactonas: metisticina ^A , diidrometisticina ^B , kavaína ^C , diidro-kavaína ^D , yangonina ^E e desmetoxiyangonina ^F	68
Figura 12 – Distribuição dos resíduos obtida para cada nível de concentração das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxiyangonina (DXY).....	70
Figura 13 – Curvas de calibração obtidas para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxiyangonina (DXY).....	71
Figura 14 – Curvas de calibração em solução e em matriz obtidas para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxiyangonina (DXY).....	73

Figura 15 – Comparação dos valores médios de área do pico das kavalactonas, metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), obtidos para amostra de ESK após análise com o método analítico utilizando fluxos de 1,0 e 1,1 mL/min.....	76
Figura 16 – Porcentagem das kavalactonas metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), juntamente com o valor de média±DPR, presentes nas amostras de extrato seco de Kava-KAVA (ESK), em função do valor de teor de kavalactonas total.....	78
Figura 17 – Valores de teor total de kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), presentes nas amostras de extrato seco de Kava-kava (ESK), de acordo com o método analítico utilizado para quantificação. Os limites de variação de teor preconizados pela legislação estão demonstrados pelas linhas vermelhas pontilhadas (BRASIL, 2014b).....	80
Figura 18 – Estrutura do analito kavaína (KAV) e do padrão interno Rac-kavaína-d3 (PI).	93
Figura 19 – Espectros EM/EM para [M+H] ⁺ dos padrões de kavaína (A) e rac-kavaína-d3 (B), com energia constante de 14 e 16 volts, respectivamente.....	95
Figura 20 – Proposta de fragmentação para os íons produto mais abundantes para [M+H] ⁺ da kavaína (A) e da rac-kavaína-d3 (B), com energia constante de 14 e 16 volts, respectivamente.....	96
Figura 21 – Cromatogramas obtidos pela análise do padrão de kavaína (KAV: 231 → 152,8) em solução (20 ng/mL), utilizando eluição em gradiente (A) e isocrático (B).....	98
Figura 22 – Cromatogramas obtidos após a extração de amostra de plasma branco utilizando acetonitrila (A) e metanol (B) como solventes precipitantes. Linha pontilhada representando o tempo de retenção da kavaína.....	99
Figura 23 – Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de plasma de camundongo após administração de ESK (A) e plasma branco fortificado com 200 ng/mL de padrão de KAV, utilizando acetonitrila como solvente precipitante. Transição de quantificação KAV: 231,0 → 115,1 (vermelho); Transição de confirmação KAV: 231,0 → 152,8 (azul); Transição do PI: 234,2 → 199,2 (verde).....	100
Figura 24 – Grau de hemólise apresentado pelas amostras de plasma branco avaliadas na seletividade.....	101
Figura 25 – Cromatogramas obtido após análise de plasma branco de seis fontes distintas, sendo cinco amostras normais (A, B, C, D e E) e uma hemolisada (F), para avaliação da seletividade do método bioanalítico. Transição de quantificação KAV: 231,0 → 115,1 (vermelho); Transição de confirmação KAV: 231,0 → 152,8 (azul); Transição do PI: 234,2 → 199,2 (verde).....	102
Figura 26 – Curvas de calibração obtidas durante a avaliação da linearidade do método desenvolvido.....	105
Figura 27 – Relação sinal-ruído para amostra de limite de detecção.....	106
Figura 28 – Avaliação do efeito residual, sendo representado o cromatograma obtido pela injeção inicial de amostra de plasma branco (A), seguido da injeção do limite superior de quantificação (B) e ao final duas injeções de amostra de plasma branco (C e D)	108
Figura 29 – Curva de calibração, equação da reta e valor de r ² obtidos após aprovação da corrida analítica.....	111
Figura 30 – Cromatogramas obtidos após a análise de plasma de camundongo coletados 2 h após a administração por via p.o. do padrão analítico de kavaína (A) e da amostra de extrato seco de Kava-kava número 4 (B), utilizando o método bioanalítico validado.....	112

Figura 31 – Curvas de concentração plasmática média <i>versus</i> tempo, em escala linear e logarítmica, para a kavaína após administração do padrão analítico (A,C) e de amostra de extrato seco de Kava-kava número 4 (B,D).....	114
Figura 32 – Procedimento do teste de toxicidade aguda com dose inicial de 2000 mg/kg de peso corporal, de acordo com o anexo 2d do guia da OECD 423.....	121
Figura 33 – Ganho de massa corporal dos animais após catorze dias da administração por via oral dos respectivos tratamentos, durante teste de toxicidade aguda.....	123
Figura 34 – Variação do peso corporal animal (n = 6) durante catorze dias, obtidos após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, considerando a duas etapas do teste de toxicidade aguda.....	124
Figura 35 – Variação do consumo de ração diário por animal (n = 6) durante os primeiros quatro dias após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, considerando as duas etapas do teste de toxicidade aguda.....	125
Figura 36 – Variação do peso relativo dos fígados e rins dos animais (n = 6) após catorze dias do da admisnitração por via oral dos respectivos tratamentos (C = controle; E1,4 = amostras de extrato seco de Kava-kava números 1 e 4), considerando as duas etapas do teste de toxicidade aguda.....	125
Figura 37 – Imagem da necropsia de camundongos ao final do teste de toxicidade aguda, sendo em destaque: região com maior pigmentação no fígado do animal tratado com extrato 4 (A) e coágulo entre a cavidade pulmonar e o peritônio dos animais tratados com extrato 1(B).....	126
Figura 38 – Imagem das lâminas (aumento de 40x) referentes à análise histológica dos rins e fígados de animais do grupo controle (A) e dos grupos tratados com extrato 1 (B) e extrato 4 (C). Em destaque: glomérulo renal e hepático para identificação das lâminas.	127
Figura 39 – Teste de resposta nociceptiva induzida por calor em placa quente.....	138
Figura 40 – Teste de atividade motora em haste girante.....	139
Figura 41 – Tempo de latência obtido para os animais após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, durante avaliação da atividade nociceptiva induzida por calor.....	144
Figura 42 – Tempo de permanência obtido para os animais após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, durante avaliação da atividade motora em haste girante.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração das kavalactonas presentes no rizoma de Kava-kava (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).....	23
Tabela 2 – Extração de kavalactonas do rizoma de <i>P. Methysticum</i> utilizando diferentes solventes (WHITTON et al., 2003).....	23
Tabela 3 – Estudos referentes a quantificação de kavalactonas em amostras de Kava-kava utilizando CLAE como técnica principal.....	35
Tabela 4 – Estudos referentes a quantificação de kavalactonas em amostras biológicas utilizando CLAE como técnica principal.....	38
Tabela 5 – Parâmetros de validação avaliados pelos trabalhos referentes a quantificação de kavalactonas em amostras biológicas utilizando CLAE.....	38
Tabela 6 – Parâmetros e condições avaliados durante o desenvolvimento do método analítico.....	44
Tabela 7 – Níveis de concentração ($\mu\text{g/mL}$) das soluções de metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxiyangonina (DXY) avaliados durante a linearidade, juntamente com os respectivos valores de porcentagem do intervalo.....	46
Tabela 8 – Concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxiyangonina (DXY), usados para avaliação da exatidão.....	49
Tabela 9 – Lista das amostras de extrato seco de Kava-kava de acordo com informações apresentadas nos laudos dos fornecedores.....	53
Tabela 10 – Valores obtidos durante o teste de perda por dessecação das amostras de extrato seco de Kava-kava.....	55
Tabela 11 – Condições de gradiente exploratório para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,5 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm). Volume de injeção: 10 μL , comprimentos de onda de detecção: 245 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 30 °C.....	57
Tabela 12 – Condições de gradiente A para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm). Volume de injeção: 10 μL , comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 30 °C. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.....	58
Tabela 13 – Condições avaliadas de temperatura da coluna, volume de injeção e fluxo da fase móvel em gradiente A. para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm). Comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm.....	59
Tabela 14 – Condições de gradiente B para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μm). Volume de injeção: 10 μL , comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 40°C. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.....	60
Tabela 15 – Condições avaliadas utilizando coluna CIANO (125 mm x 4 mm, 5 μm) para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD. Volume de injeção: 10 μL , comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.....	63

Tabela 16 – Parâmetros e condições do método analítico desenvolvido em CLAE-DAD.....	65
Tabela 17 – Parâmetros de performance do método analítico desenvolvido em CLAE-DAD.....	65
Tabela 18 – Equações da reta e valores dos coeficientes de determinação obtidos durante a validação das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY).....	69
Tabela 19 – Dados obtidos a partir das curvas de calibração das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY); valores médios obtidos para as replicatas de cada ponto.....	72
Tabela 20 – Valores de coeficiente de variação (CV%) para repetibilidade e precisão intermediária obtidos em duas corridas: dias diferentes com analistas diferentes, para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY).....	74
Tabela 21 – Valores de coeficiente de variação (CV%) e recuperação (%) obtidos durante a avaliação da exatidão para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY).....	74
Tabela 22 – Valores de concentração ($\mu\text{g/mL}$) para os limites inferiores de quantificação (LIQ) e de detecção (LD) para as kavalactonas metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), determinados na validação.....	75
Tabela 23 – Valores de teor (média \pm DPR %) individual e total das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), presentes nas amostras de extrato seco de Kava-kava, após quantificação utilizando método analítico desenvolvido e validado para as seis kavalactonas em estudo.....	77
Tabela 24 – Valores médios de teor (%) individual e total das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), presentes nas amostras de extrato seco de Kava-kava, após quantificação utilizando método analítico desenvolvido e validado somente para KAV, assim como a diferença obtida pela comparação dos valores de teor total empregando o método validado para as seis kavalactonas e somente para KAV.....	79
Tabela 25 – Parâmetros espectrométricos (fonte) otimizados para o método bioanalítico.....	94
Tabela 26 – Parâmetros espectrométricos (composto) otimizados para o método bioanalítico.....	94
Tabela 27 – Parâmetros cromatográficos otimizados para o método bioanalítico.....	97
Tabela 28 – Valores de porcentagem de resposta obtidos durante avaliação de efeito matriz, recuperação e eficiência da extração.....	103
Tabela 29 – Dados obtidos durante a construção das curvas de calibração para avaliação da linearidade do método desenvolvido.....	104
Tabela 30 – Equações da reta e os respectivos coeficientes de determinação obtidos durante a avaliação da linearidade do método desenvolvido.....	104
Tabela 31 – Valores de coeficiente de variação (CV%) intracorrída e intercorrída para avaliação da precisão do método bioanalítico.....	109
Tabela 32 – Valores de erro padrão relativo (%) intracorrída e intercorrída para avaliação da exatidão do método bioanalítico.....	109
Tabela 33 – Valores de precisão (CV%) e exatidão (EP% = erro padrão) obtidos durante a avaliação da estabilidade.....	110

Tabela 34 – Dados obtidos durante a construção das curvas de calibração para aplicação do método bioanalítico validado.....	111
Tabela 35 – Valores de concentração plasmática da kavaína obtidos a partir da análise de amostra de plasma de camundongo coletados após a administração por via p.o. do padrão analítico de KAV e de amostra de extrato seco de Kava-kava número 4, utilizando o método bioanalítico validado.....	112
Tabela 36 – Parâmetros farmacocinéticos obtidos para a kavaína (KAV) isolada e presente em amostra de extrato seco de Kava-kava (ESK).....	114
Tabela 37 – Lista das substâncias avaliadas em relação a toxicidade aguda, juntamente com o valor de teor informado pelo laudo do fornecedor.....	119
Tabela 38 – Lista das amostras avaliadas em relação a sua atividade antimicrobiana, juntamente com o valor de teor total de kavalactonas e de KAV, obtidos a partir do método analítico validado (Capítulo 2).....	131
Tabela 39 – Lista das substâncias avaliadas em relação a sua atividade antinociceptiva, juntamente com o valor de teor total de kavalactonas e de KAV, obtidos a partir do método analítico validado (Capítulo 2).....	132
Tabela 40 – Grupos e substâncias utilizadas no teste de avaliação da atividade antinociceptiva.....	137
Tabela 41 – Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL dos extratos de kava-kava frente a duas linhagens de <i>Cryptococcus gatti</i> e de <i>C. neoformans</i>	142
Tabela 42 – Resultados obtidos para os testes de avaliação de atividade nociceptiva induzida por calor e de atividade motora em haste girante, em média ± erro padrão da média (em segundos).....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Ágar Batata Dextrose
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ASC	Área sob a curva
ASD	Ágar Saboraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BD _{REL}	Biodisponibilidade relativa
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C18	Octadecilsilano
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
CMC	Carboximetilcelulose
CQ	Controle de qualidade
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficiente de variação
CYP	Citocromo P
DHK	Dihidrokaína
DHM	Dihidrometistina
DL ₅₀	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPR	Desvio padrão relativo
DXY	Desmetóxiyangonina
EM	Espectrometria de massas
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EPR	Erro padrão relativo
ESK	Extrato seco de Kava-kava
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Fator de matriz
g	Grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GHS	<i>Globally Harmonised System</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IES	Ionização electrospray
IN	Instrução normativa
KAV	Kavaína
K _{EL}	Constante de eliminação
kg	Quilograma
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LIT	Ion trap linear
LOG	Logaritmo
LSQ	Limite superior de quantificação
MAO	Monoaminaoxidase
MET	Metistina
mg	Miligrama

MH	Mueller-Hinton
mm	Milímetro
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NC	Não consta
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.O.	<i>Per os</i>
pH	Potencial hidrogênionico
PI	Padrão interno
QqQ	Triplo quadrupolo
r ²	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SQR	Substância química de referencia
t _{1/2}	Tempo de meia vida
T _{máx}	Tempo em que a concentração plasmática máxima é atingida
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
YAN	Yangonina
α	Alfa
β	Beta
λ	Comprimento de onda de absorção
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
CAPÍTULO 1 ASPECTOS GERAIS DO TRABALHO	20
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1 <i>Piper methysticum</i> G. Forst	21
1.2 Composição fitoquímica	22
1.3 Comercialização e aspectos regulatórios da Kava-kava.....	23
1.4 Farmacodinâmica e farmacocinética das kavalactonas.....	25
1.5 Sinergismo entre os compostos presentes na Kava-kava.....	26
1.6 Toxicidade do extrato de Kava-kava	28
1.7 Atividades biológicas da Kava-kava	31
1.7.1 Atividade antinociceptiva	32
1.7.2 Atividade antimicrobiana	33
1.8 Métodos de quantificação de kavalactonas	33
1.8.1 Métodos de quantificação analíticos.....	33
1.8.2 Métodos de quantificação bioanalíticos	36
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos	39
CAPÍTULO 2 CONTROLE DE QUALIDADE DOS EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE <i>Piper methysticum</i> G. FORST	40
1. MATERIAIS	41
1.1 Insumos	41
1.2 Reagentes e acessórios	41
1.3 Colunas cromatográficas.....	41
1.4 Equipamentos e instrumentos	41
2. MÉTODOS	42
2.1 Aquisição dos extratos comerciais e avaliação macroscópica.....	42
2.2 Determinação de perda por dessecação	42
2.3 Desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM em ESKs por CLAE-DAD.....	43
2.4 Validação do método analítico para quantificação simultânea de YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM em ESKs por CLAE-DAD.....	44

2.4.1	Seletividade	45
2.4.2	Linearidade da faixa de trabalho	45
2.4.3	Efeito matriz	47
2.4.4	Precisão	47
2.4.5	Exatidão	48
2.4.6	Limites de quantificação e detecção	50
2.4.7	Robustez.....	50
2.5	Determinação do teor de kavalactonas em amostras de ESK.....	51
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1	Aquisição dos extratos comerciais.....	52
3.2	Determinação de perda por dessecação	55
3.3	Desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM em ESKs por CLAE-DAD.....	56
3.4	Validação do método analítico para quantificação simultânea de YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM em ESKs por CLAE-DAD.....	66
3.4.1	Seletividade	67
3.4.2	Linearidade da faixa de trabalho	69
3.4.3	Efeito matriz	73
3.4.4	Precisão e exatidão.....	74
3.4.5	Limites de quantificação e detecção.....	75
3.4.6	Robustez.....	75
2.3	Determinação do teor de kavalactonas em amostras de ESK.....	76
4.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	82
CAPÍTULO 3 AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DA KAVAÍNA ISOLADA E EM EXTRATO SECO DE KAVA-KAVA		83
1.	MATERIAIS	84
1.1	Insumos	84
1.2	Animais.....	84
1.3	Reagentes e acessórios	84
1.4	Coluna cromatográfica.....	84
1.5	Equipamentos e instrumentos	84
2.	MÉTODOS.....	85
2.1	Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos por CLAE-EM/EM	85

2.1.1	Determinação dos parâmetros espectrométricos.....	85
2.1.2	Determinação dos parâmetros cromatográficos.....	85
2.1.3	Determinação dos parâmetros de preparo de amostra	86
2.2	Validação de método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos por CLAE-EM/EM	86
2.2.1	Seletividade, efeito matriz e recuperação	86
2.2.2	Linearidade da curva de calibração e sensibilidade.....	87
2.2.3	Efeito residual	88
2.2.4	Precisão e exatidão.....	88
2.2.5	Estabilidade.....	89
2.3	Avaliação da biodisponibilidade da KAV isolada e em ESK.....	90
2.3.1	Quantificação da KAV em amostras reais	90
2.3.2	Determinação dos parâmetros farmacocinéticos	91
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1	Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos por CLAE-EM/EM	93
3.1.1	Determinação dos parâmetros espectrométricos.....	93
3.1.2	Determinação dos parâmetros cromatográficos.....	97
3.1.3	Determinação dos parâmetros de preparo de amostra	98
3.2	Validação de método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos por CLAE-EM/EM	101
3.2.1	Seletividade, efeito matriz e recuperação	101
3.2.2	Linearidade da curva de calibração e sensibilidade.....	103
3.2.3	Efeito residual	107
3.2.4	Precisão e exatidão.....	109
3.2.5	Estabilidade.....	109
3.3	Avaliação da biodisponibilidade da KAV isolada e em ESK.....	110
3.3.1	Quantificação da KAV em amostras reais	110
3.3.2	Determinação dos parâmetros farmacocinéticos	113
4.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	117
CAPÍTULO 4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE <i>Piper methysticum</i> G. Forst		
1.	MATERIAIS	119
1.1	Animais.....	119

1.2 Insumos	119
2. MÉTODOS.....	120
2.1 Preparo das soluções, doses e vias de administração	120
2.2 Avaliação da toxicidade aguda.....	120
2.3 Análise estatística	122
2.4 Análises histológicas	122
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
3.1 Avaliação da toxicidade aguda.....	123
3.2 Análises histológicas	127
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	129
CAPÍTULO 5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTINOCICEPTIVA DOS EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE <i>Piper methysticum</i> G. Forst.....	130
1. MATERIAIS	131
1.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	131
1.2 Avaliação da atividade antinociceptiva	132
2. MÉTODOS.....	134
2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	134
2.1.1 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima – CIM	134
2.1.2 Preparo dos inóculos de bactérias.....	134
2.1.3 Preparo dos inóculos de fungos	134
2.1.4 Preparo das placas	135
2.2 Avaliação da atividade antinociceptiva	136
2.2.1 Preparo das soluções, doses e vias de administração	136
2.2.2 Animais	137
2.2.3 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor (placa quente) em camundongos.....	138
2.2.4 Avaliação da atividade motora em haste girante	139
2.2.5 Análise estatística.....	140
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	141
3.2 Avaliação da atividade antinociceptiva	143
4. CONSIDERAÇÕES GERAIS	147
CAPÍTULO 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	148
CONCLUSÃO GERAL.....	149

REFERÊNCIAS.....	151
APÊNDICE – MANUSCRITO SUBMETIDO A PERIÓDICO CIENTÍFICO	164
ANEXO A – CERTIFICADO CEUA/UFMG, PROTOCOLO 58/2017	165
ANEXO B – CERTIFICADO CEUA/UFMG, PROTOCOLO 204/2016	166
ANEXO C – CERTIFICADO CEUA/UFMG, PROTOCOLO 176/2017	167
ANEXO D – CERTIFICADO IV ABCF CONGRESS.....	168
ANEXO E – CERTIFICADO III SINCIFAR.....	169

INTRODUÇÃO

Preparações tradicionais do extrato do rizoma da planta *Piper methysticum* G. Forst (também conhecida como Kava-kava), por nativos das ilhas do Pacífico, eram utilizadas na produção de uma bebida psicoativa com propriedades narcóticas, ansiolíticas e sedativas (BILIA et al., 2004; CÔTÉ et al., 2004). Atualmente, as preparações comerciais deste extrato são indicadas exclusivamente para uso ansiolítico, sendo o fitoterápico comercializado por farmácias magistrais por todo o Brasil (BRASIL, 2014a).

As substâncias responsáveis pela ação farmacológica da planta são chamadas de kavalactonas, sendo estas consideradas os marcadores ativos da Kava-kava. Devido a diversos fatores como colheita, secagem, armazenamento e processamento, suas concentrações podem variar entre 3 e 20% de uma planta para outra (PINTO et al., 2005), fato este que afeta diretamente a intensidade do efeito farmacológico. Esta grande variabilidade encontrada demonstra a necessidade do desenvolvimento de um método analítico para determinação do teor das kavalactonas presentes nos extratos, resultando no efetivo controle de qualidade das formulações disponíveis no mercado, principalmente entre os fornecedores e as farmácias responsáveis pela sua manipulação.

O teor de kavalactonas presente nos extratos de Kava-kava também é diretamente influenciado pelo tipo de solvente utilizado durante o processo, sendo que, juntamente com as kavalactonas, varia-se também a concentração de glutathione presente no extrato final. Estas diferenças podem estar diretamente relacionadas aos possíveis efeitos tóxicos provenientes do consumo do extrato (WHITTON et al., 2003; XUAN et al., 2008), fazendo necessária a avaliação da toxicidade aguda dos extratos em modelo animal, de maneira a garantir o uso seguro pela população.

Tendo em vista os relatos da ocorrência de sinergismo entre as kavalactonas administradas na sua forma isolada em relação a administração do extrato de Kava-kava (SPINELLA, 2002; WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009), torna-se imprescindível a avaliação do perfil farmacocinético dos marcadores isolados e presentes no extrato. Sendo então possível avaliar a existência do possível sinergismo entre os marcadores vegetais e os demais componentes presentes na matriz vegetal,

além da conseqüente influência desse sinergismo na biodisponibilidade desses compostos após sua administração oral. De maneira a obter o perfil farmacocinético da kavaína, principal marcador da planta, faz-se necessário o desenvolvimento de um método bioanalítico para a quantificação do marcador em questão em amostras biológicas.

Ainda a respeito da aplicação farmacológica dos extratos de Kava-kava, além do uso como ansiolítico preconizado na legislação vigente (BRASIL, 2014a), encontram-se relatos de uso popular para diversas patologias, principalmente relacionadas a uso antimicrobiano (GUÉRIN e RÉVEILLÈRE, 1984; LOCHER et al., 1995; PEREIRA et al., 2015) e antinociceptivo (JAMIESON e DUFFIELD, 1990; AMARAL; BERGOLD; EIFLER-LIMA, 2005). No entanto, são encontradas poucas referências na literatura a respeito destas atividades, especialmente em se tratando de estudos *in vivo*.

Em vista do amplo uso dos extratos de Kava-kava pela população e da grande variabilidade encontrada para esses extratos, seja pelo modo de cultivo ou de extração, há a necessidade de se obter maiores informações a respeito do extrato da planta e dos seus marcadores ativos. Com isso, por meio do desenvolvimento de métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação dos principais marcadores da planta, além da avaliação da sua toxicidade aguda e atividades biológicas, torna-se possível um melhor entendimento tanto das ações farmacológicas quanto dos seus possíveis efeitos adversos, trazendo assim uma maior eficácia e segurança durante seu uso.

CAPÍTULO 1
ASPECTOS GERAIS DO TRABALHO

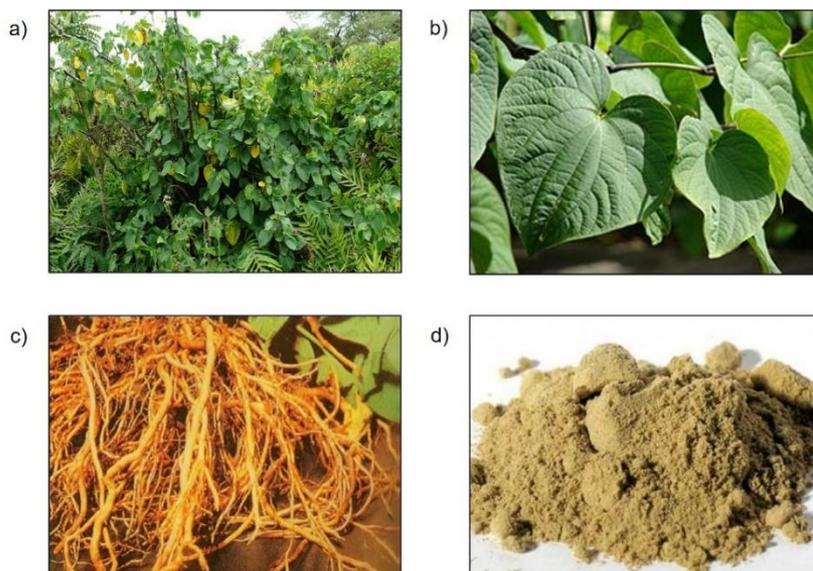
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Piper methysticum* G. Forst

O *Piper methysticum* G. Forst, pertencente à família das Piperaceae (pimentas), é popularmente conhecido como Kava-kava, também sendo denominado como ava-ava, yati, yagona e yangona. É uma planta nativa das ilhas do Pacífico (Melanésia, Micronésia e Polinésia) na Oceania, onde o extrato do seu rizoma era utilizado na produção de uma bebida psicoativa homônima, devido a suas propriedades narcóticas e de sedação, que conferiam bem-estar e redução da ansiedade e fadiga (BILIA et al., 2004; CÔTÉ et al., 2004).

A Kava-kava é um arbusto com dois a três metros de altura, apresentando folhas grandes e rígidas, possuindo de 9 a 13 nervuras principais. Seu caule é subterrâneo do tipo rizoma (**Figura 1**) podendo pesar até 10 kg, ramificado, suculento, com várias raízes, cor negro-acinzentado por fora e esbranquiçado no interior. A parte central do rizoma é bastante porosa com feixes lenhosos e finos, dando origem a malhas sob a casca. Seus extratos são preparados por meio da extração com etanol-água ou acetona-água, gerando cerca de 30% e 70% de kavalactonas, respectivamente (SCHÜLZ; HANSEL; TYLER, 2002; JUSTO e SILVA, 2008).

Figura 1– *Piper methysticum* G. Forst: arbusto (a), folha (b), rizoma (c), rizoma em pó (d).

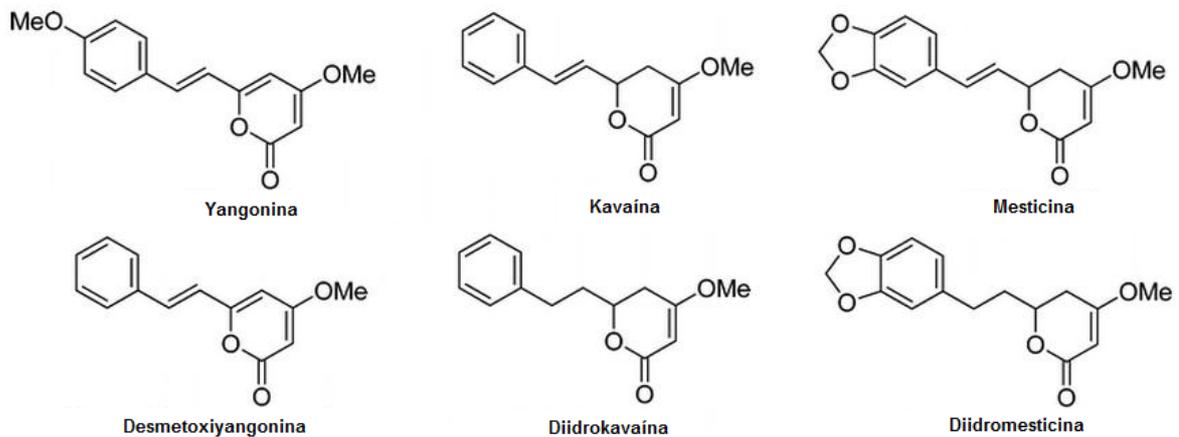


Fonte: *Google images* (a, b, d) e SCHÜLZ; HANSEL; TYLER, 2002 (c).

1.2 Composição fitoquímica

A Kava-kava apresenta em sua composição compostos como taninos, ácidos benzoicos e cinâmicos, açúcares, estigmasterol, pironas, flavocavaínas, kavalactonas, dentre outros (CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005). Sendo que as kavalactonas estão associadas à ação farmacológica e apresentam-se quimicamente como uma mistura de lactonas lipofílicas contendo um esqueleto α -pirona. Atualmente existem mais de 20 derivados de kavalactonas isolados e identificados, sendo que as seis principais são: yangonina (YAN), kavaína (KAV), metisticina (MET), desmetoxyyangonina (DXY), diidrokaína (DHK) e diidrometisticina (DHM) (**Figura 2**) (SINGH, 1992; BILIA et al., 2004; CÔTÉ et al., 2004; XUAN et al., 2008).

Figura 2 – Estrutura química das principais kavalactonas presentes no rizoma de Kava-kava.



A maior concentração de kavalactonas é encontrada nas raízes da Kava-kava (**Tabela 1**), composta principalmente por KAV e MET, diminuindo progressivamente em direção às folhas onde estão presentes em maior quantidade a DHK e a DHM. De acordo com Schülz et al (citado por JUSTO e SILVA, 2008), a planta seca deve apresentar no mínimo 3,5% de kavalactonas calculadas como KAV. Sendo que as concentrações podem variar de 3 a 20% de uma planta para outra, devido a fatores como colheita, secagem, armazenamento e processamento (PINTO et al, 2005).

Tabela 1 – Concentração das kavalactonas presentes no rizoma de Kava-kava (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

Kavalactona	Concentração média (%)
Kavaína	1,0 – 2,0
Diidrokaína	0,6 – 1,0
Metisticina	1,2 – 2,0
Diidrometisticina	0,5 – 0,8
Yangonina	1,0 – 1,7
Desmetoxyangonina	0,6 – 1,0

Preparações tradicionais dos extratos de Kava-kava são realizadas a partir de uma extração aquosa do rizoma da planta, resultando em concentrações menores de kavalactonas devido sua elevada lipossolubilidade (**Tabela 2**) (WHITTON et al., 2003). No entanto, as formas comercializadas do extrato são provenientes de uma extração utilizando solventes orgânicos (por exemplo, etanol e acetona), o que consequentemente aumenta a concentração de kavalactonas presente no extrato final. Um segundo composto que tem sua concentração influenciada pelo solvente de extração utilizado é a glutatona que, devido à sua baixa lipossolubilidade, se encontra em maior concentração em extratos aquosos (XUAN et al, 2008).

Tabela 2 – Extração de kavalactonas do rizoma de *P. Methysticum* utilizando diferentes solventes (WHITTON et al., 2003).

Solvente	% kavalactonas
Acetona	100
Etanol 96%	100
Etanol 25%	15
Água	2,97

1.3 Comercialização e aspectos regulatórios da Kava-kava

A comercialização de fitoterápicos a base de extrato de Kava-kava é muito comum em farmácias magistrais, sendo que entre os anos de 1999 a 2002, esteve entre os 10 medicamentos fitoterápicos mais vendidos no Brasil (BARBOSA; LENARDON; PARTATA, 2013). Suas cápsulas são manipuladas em doses que variam de 100 a 600 mg do extrato por dia, sendo comercializadas para diversas indicações, como por exemplo, insônia, estresse, fadiga, inflamações osteoarticulares e outras mais

(LEMNIS, 2018; FARMALIZ, 2018; DERMACARE, 2018). No entanto, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o extrato de Kava-kava é indicado somente como ansiolítico e para o tratamento da insônia, sendo as demais aplicações consideradas de uso popular (BRASIL, 2014a).

O *Piper methysticum* G. Forst. encontra-se na Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e na Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado, publicadas pela ANVISA na Instrução Normativa (IN) n° 2, de 13 de maio de 2014. De acordo a IN n° 2, a dose recomendada é de 60 à 210 mg de kavalactonas, enquanto o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira informa que a dose deve ser de 200 mg do extrato contendo 30% de kavalactonas, três vezes ao dia (BRASIL, 2014a; MEMENTO, 2016). Em 2014, a ANVISA, aprovou a bula-padrão para os medicamentos fitoterápicos obtidos a partir do extrato de *Piper methysticum*, essa norma restringe que a venda do extrato de Kava-kava deve ser realizada somente sob prescrição médica, com uso por no máximo dois meses (BRASIL, 2014c).

É possível encontrar uma monografia para o *Piper methysticum* no volume 2 da *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants*, onde são citados os testes de identificação gerais, como a cromatografia em camada delgada (CCD) para a avaliação da presença de kavalactonas, testes de pureza e ensaios químicos: espectrofotometria na região do infravermelho e cromatografia (WHO, 2004). Neste caso, a monografia cita duas referências: o Hagers Handbook de Prática Farmacêutica (*Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, 1994), em que a quantificação das kavalactonas pode ser feita utilizando fase móvel composta por hexano e dioxano, e as kavalactonas são quantificadas utilizando somente o padrão de KAV; e o estudo qualitativo desenvolvido por He e colaboradores em que se utiliza um sistema cromatográfico acoplado a um espectrômetro de massas (HE; LIN; LIAN, 1997).

A falta de uma monografia completa para a Kava-kava em compêndios oficiais atuais dificulta o controle de qualidade efetivo relacionado ao comércio de extratos de Kava-kava no Brasil. Esse fator, somado à variação da concentração de kavalactonas do extrato relacionada a variantes como: idade da planta, localização geográfica do cultivo e sazonalidade da coleta, podem levar a diferenças significativas nas formulações disponíveis no mercado.

1.4 Farmacodinâmica e farmacocinética das kavalactonas

Dentre os efeitos terapêuticos atribuídos ao extrato de Kava-kava podem ser citados, principalmente, sua ação sedativa e ansiolítica (WHO, 2004; SINGH; SINGH, 2012). No entanto, o mecanismo de ação relacionado a esses efeitos ainda não está bem definido, podendo ser encontradas na literatura informações distintas e até mesmo contraditórias a seu respeito. Devido à característica lipofílica das kavalactonas, é possível que elas atuem na membrana lipídica celular, agindo diretamente pelo bloqueio dos canais iônicos voltagem-dependentes, pela interação com sistemas monoamina levando ao bloqueio de recaptção de norepinefrina e ainda pela inibição de monoamina oxidase (MAO). Além disso, podem ter uma influência na neurotransmissão GABAérgica (ácido gama-aminobutírico, GABA), serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica (CAIRNEY; MARUFF; CLOUGH, 2002; GLEITZ; BEILE; PETERS, 1995; GLEITZ; BEILE; PETERS, 1996; BAUM; HILL; ROMMELSPACHER, 1998; SEITZ; SCHULE; GLEITZ, 1997; WALDEN et al., 1997a,b; UEBELHACK; FRANKE; SCHEWE, 1998).

Estudos farmacológicos em animais, desenvolvido por Schenkel e colaboradores, indicam que as ações sedativas da Kava-kava estariam relacionadas à ativação da transmissão dopaminérgica e serotoninérgica na região mesolímbica, gerando uma redução da excitabilidade emocional e causando alterações comportamentais (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2001). No entanto, estudos encontrados na literatura afirmam que as kavalactonas não estão relacionadas às alterações nos níveis dos neurotransmissores dopamina e serotonina (SCHÜLZ; HANSEL; TYLER, 2002). Após a administração crônica de KAV isolada não foram registradas alterações significativas nos níveis de dopamina e serotonina em ratos (BOONEN et al., 1998).

Em relação a ação das kavalactonas nos receptores GABA, ao mesmo tempo que podem ser encontrados estudos referentes a sua modulação gerando o efeito sedativo inerente ao extrato de Kava-kava (JUSSOFIE; SCHMIZ; HIEMKE, 1994; YUAN et al., 2002), também é possível encontrar estudo relatando a ausência de atividade nestes sítios e também nos sítios de ligação dos benzodiazepínicos, a partir da resina da Kava-kava e das kavalactonas propriamente ditas (DAVIES et al., 1992).

As kavalactonas são normalmente metabolizadas no fígado pelo sistema do citocromo P450 (CYP450), responsável pela degradação de fármacos e toxinas presentes no

plasma. Além disso, a glutationa possui um papel importante na conversão de fase II das lactonas, se ligando irreversivelmente e levando à abertura do anel, originando produtos residuais excretáveis pela urina e fezes (WHITTON et al., 2003; CÔTÉ et al., 2004; XUAN et al., 2008).

Em estudos desenvolvidos por Singh e, em seguida, por Robinson, após as administrações *per os* (p.o.), em camundongos, das seis kavalactonas principais isoladas, foi observado que a KAV e DHK foram rapidamente absorvidas pelo trato gastrointestinal (10 minutos), seguido da MET e DHM (30-45 minutos), enquanto que a YAN e DXY foram pouco absorvidas e rapidamente eliminadas (SINGH, 1992; ROBINSON et al., 2009). Quando somente a KAV foi administrada na sua forma isolada, foi demonstrado que após a ingestão de 200 mg, sua concentração plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) obtida foi de 18 ng/mL e alcançada em 1,8 horas ($T_{m\acute{a}x}$), com uma meia-vida ($t_{1/2}$) de 9 horas (TARBAH et al., 2003). Já Tarbah e colaboradores obtiveram valores de concentração plasmática entre 10 e 40 ng/mL, em coletas de sangue humano, dentre 1 e 4 horas após a administração de cápsulas contendo 800 mg de KAV, no entanto não foi realizado um estudo farmacocinético para a KAV (TARBAH et al., 2003).

Mathews e colaboradores avaliaram os parâmetros farmacocinéticos para o isômero (+)-KAV na sua forma isolada (100 mg/kg) ou adicionado ao extrato de Kava-kava (totalizando 100 mg/kg de KAV), ambos em dose única. Foram obtidos valores de $C_{m\acute{a}x}$ e $T_{m\acute{a}x}$ de 2,6 $\mu\text{g/mL}$ e 0,88 horas para KAV isolada e 5,4 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 horas para KAV co-administrada no extrato, respectivamente. Também foi realizada a comparação entre os parâmetros farmacocinéticos obtidos após a administração p.o. em ratos, de 100 mg/kg de (+)-KAV em dose única e em doses múltiplas (durante 7 dias). Os pesquisadores não observaram diferenças farmacocinéticas entre os dois modos de administração (MATHEWS et al., 2005).

1.5 Sinergismo entre os compostos presentes na Kava-kava

Diferente de uma substância sintetizada, as plantas medicinais contêm várias substâncias ativas que atuam em combinação, sendo que em alguns casos, o efeito terapêutico em questão só pode ser percebido por meio dessas interações, não sendo detectado ao se analisar cada constituinte isoladamente (SPINELLA, 2002).

De acordo com dados disponíveis na literatura, é possível que dois tipos de sinergismo ocorram entre os compostos presentes no extrato de Kava-kava: farmacocinético, baseado no aumento da solubilidade e da biodisponibilidade dos marcadores vegetais do extrato; e farmacodinâmico, resultante de substâncias isoladas do extrato atuando em um único alvo ou em uma variedade de alvos, levando a uma potencialização dos efeitos farmacológicos ou a uma cooperação agonista (SPINELLA, 2002; WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009).

A respeito do possível sinergismo farmacodinâmico entre os compostos presentes no extrato de Kava-kava, sabe-se que a combinação das kavalactonas KAV e DHM atuam de maneira aditiva na inibição de canais de cálcio (WALDEN et al., 1997a,b) e que a sua ação nos receptores GABA juntamente com essa inibição dos canais pode levar a um efeito depressivo aditivo (TAKAHASHI et al., 1999). O efeito da Kava-kava na norepinefrina e na MAO são menos potentes do que aqueles comumente associados aos antidepressivos, porém, sua combinação com os demais efeitos da planta pode aumentar seu efeito terapêutico no tratamento da ansiedade generalizada (BOERNER E MOLLER, 1999; RICKELS, 1993; SPINELLA, 2002).

Já em relação ao sinergismo farmacocinético, em estudo desenvolvido por Keledjian e colaboradores, foi observado que o acesso das kavalactonas ao cérebro foi maior quando estas foram administradas conjuntamente do que na sua forma isolada (KELEDJIAN et al., 1988). Esse possível sinergismo farmacocinético pode estar relacionado a maior concentração de kavalactonas disponível, levando a uma competição pelos sítios de ligação plasmáticos e consequente aumento da fração livre dos compostos presentes no extrato, resultando em um maior acesso à região cerebral (SPINELLA, 2002). Porém, há uma segunda hipótese que pode estar relacionada diretamente a esse efeito sinérgico: a regulação do metabolismo intestinal levando a um aumento da biodisponibilidade dos marcadores (YANG et al, 2014). Quando as kavalactonas YAN e DXY são administradas por via oral na sua forma isolada, elas não possuem atividade, porém quando o extrato de Kava-kava é administrado, há um aumento da absorção intestinal e consequentemente da sua potência (MEYER, 1967).

Entretanto, ainda há uma escassez de artigos na literatura científica que avaliem a biodisponibilidade relativa da KAV isolada em relação àquela presente no extrato de

Kava-kava e o sinergismo farmacocinético entre este marcador e os demais compostos presentes no extrato, principalmente empregando técnicas modernas de quantificação e detecção.

1.6 Toxicidade do extrato de Kava-kava

Vários fatores relacionados a dose, plantio, partes utilizadas e tipo de extração de uma planta medicinal podem estar relacionados aos possíveis efeitos toxicológicos decorrentes de seu uso. O impacto desses fatores sobre a toxicidade da planta está diretamente relacionado a sua influência na variação na quantidade dos princípios ativos presentes, no caso da Kava-kava, as kavalactonas (WHO 2004; EMA, 2016).

As disparidades encontradas entre os modos de preparo tradicional e comercial dos extratos de Kava-kava implicam em possíveis variações nas suas atividades biológicas e nos possíveis efeitos tóxicos, principalmente hepáticos. Essas variações encontradas estão diretamente relacionadas à quantidade de kavalactonas presentes no extrato que serão definidas conforme o solvente utilizado durante a extração. Dentre os possíveis mecanismos relacionados aos efeitos hepatotóxicos dos extratos de Kava-kava, podem ser citados a redução dos níveis de glutathione, inibição do CYP450 e possíveis contaminações dos extratos (WHITTON et al., 2003; CLOUATRE, 2004).

À medida que se tem uma maior concentração de kavalactonas disponível no organismo, há saturação das vias enzimáticas hepáticas durante sua metabolização, relacionada a possível depleção da concentração de glutathione livre, levando a uma deficiência na conversão das kavalactonas em produtos excretáveis e possivelmente à ocorrência de efeitos tóxicos (WHITTON et al., 2003; CÔTÉ et al., 2004; XUAN et al., 2008). Uma segunda possibilidade para a redução da metabolização das kavalactonas está relacionada a sua ação sobre as enzimas do CYP450. Podem ser encontrados na literatura estudos a respeito da influência de diferentes extratos, preparação tradicional, comprimidos comercializados, e de kavalactonas isoladas (KAV, MET, DHM e DXY) sobre as isoformas CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 e 4A9/11. Dentre os compostos isolados, todos apresentaram ação inibitória sobre as atividades das isoformas em questão, com exceção da KAV. Já em relação aos tipos

de extrato, percebeu-se que a inibição foi mais pronunciada nas preparações comerciais, fato provavelmente relacionado a maior concentração de kavalactonas presentes na preparação (MATHEWS; ETHERIDGE; BLACK, 2002; CÔTE et al., 2004).

Ainda em relação às enzimas do CYP, os relatos conflitantes a respeito da hepatotoxicidade de extratos de Kava-kava podem ser explicados pela ocorrência de um polimorfismo genético relacionado a uma deficiência na isoforma CYP2D6 (SINGH e DEVKOTA, 2003). De acordo com Wanwiolruk, a incidência de fenótipos com baixa metabolização pelo CYP2D6 na população polinésia aparenta ser menor do que em populações caucasianas, cerca de 1% e 7-9% respectivamente (WANWIOLRUK et al., 1998; POOLSUP; PO; KNIGHT, 2002). Visto que essa enzima é uma das principais metabolizadoras das kavalactonas, essas diferenças genéticas entre os dois grupos étnicos juntamente com a distinção entre as formas de preparo do extrato tradicional para o comercial estão diretamente relacionadas a variação da resposta tóxica pelo consumo da Kava-kava (SINGH e DEVKOTA, 2003).

As preparações de extratos de plantas encontram-se frequentemente contaminadas com metais pesados, microrganismos, substâncias tóxicas e adulterações pela adição de fármacos sintéticos e/ou o uso de diferentes partes da planta (BOGUSZ; AL TUFAIL; HASSAN, 2002), como ocorre no caso da preparação dos extratos de Kava-kava. O modo tradicional de preparo da bebida homônima utiliza principalmente as partes subterrâneas da planta, porém produtos comerciais podem conter partes aéreas como folhas e hastes. Essas partes da planta contêm alcaloides na sua composição, que podem contribuir para a ocorrência de efeitos hepatotóxicos pelo consumo do extrato. Testes *in vitro* com a exposição de células de hepatoma humano à pipermetistina, principal alcaloide da Kava-kava, sugerem que o composto é capaz de causar morte celular pela interrupção da função mitocondrial, levando a redução dos níveis celulares de ATP (NERURKAR; DRAGULL; TANG, 2004).

De acordo com o Memento Fitoterápico do *Piper Methysticum* publicado em 2016, após a administração do extrato acetônico padronizado em 70% de kavalactonas, em camundongos e em ratos, foram obtidos valores de DL₅₀ maiores que 1,5 g/kg (via oral) e 0,360 g/kg (via intraperitoneal). Estas dosagens levaram a efeitos como redução da motilidade, ataxia, sedação, inconsciência e morte por parada respiratória. Além

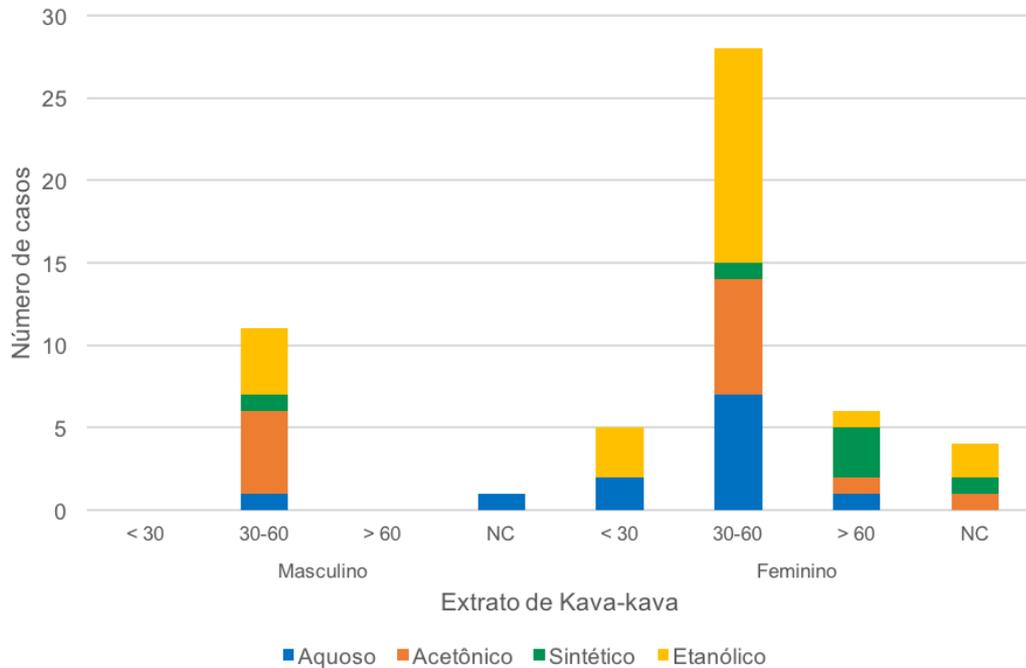
disso, foram obtidos resultados semelhantes após administração de DHM e DHK isoladas, tanto por via intraperitoneal quanto intragástrica (MEMENTO, 2016).

Dentre os estudos disponíveis na literatura relacionados a toxicidade aguda *in vivo* por via oral dos extratos de Kava-kava são encontradas informações diversas a respeito dos efeitos hepáticos possivelmente causados pelas kavalactonas. Em um primeiro momento, após a administração dos extratos aquoso (SINGH e DEVKOTA, 2003), metanólico (LIM et al., 2007) e etanólico (SORRENTINO; CAPASSO; SCHMIDT, 2006) de Kava-kava em ratos, não foram observadas alterações significativas na função hepática, sugerindo ausência de efeito hepatotóxico. Após estudo de toxicidade crônica de 3 e 6 meses desenvolvido por Sorrentino e colaboradores, também não foram observados sinais de toxicidade relacionados ao extrato de Kava-kava devido a ausência de alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, assim como nas análises macroscópicas e histológicas dos órgãos avaliados (SORRENTINO; CAPASSO; SCHMIDT, 2006).

No entanto, em estudos subsequentes, após a administração do extrato bruto de Kava-kava em ratos e camundongos foram observados efeitos dose-dependentes, como a ocorrência de sinais clínicos e aumento do peso do fígado, além de alterações nos níveis gênicos, metabolização de xenobióticos, resposta ao estresse oxidativo e na função mitocondrial, o que poderia levar aos efeitos hepatotóxicos relacionados ao consumo do extrato (GUO et al., 2010; BEHL et al., 2011).

Em relação aos estudos disponíveis na literatura a respeito dos possíveis efeitos hepatotóxicos relacionados ao consumo de extratos de Kava-kava, encontram-se relatos de caso em humanos e a avaliação dos sinais clínicos observados. Em documento publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, do inglês *World Health Organization*, WHO), foram relacionados 93 relatos de caso de hepatotoxicidade associada ao uso de produtos a base de Kava-kava (WHO, 2007). Dentre os relatos em que foi informado o tipo de extrato de Kava-kava consumido, é possível observar uma maior incidência dos efeitos hepatotóxicos após o consumo do extrato etanólico da planta, principalmente por mulheres entre 30 e 60 anos (**Figura 3**).

Figura 3 – Relação entre o tipo de extrato de Kava-kava consumido em função do sexo e idade do indivíduo, dentre os relatos de caso a respeito dos possíveis efeitos hepatotóxicos provenientes do seu consumo.



Possíveis explicações para tal fato seriam a prevalência de seu uso pela população, principalmente ocidental, e o uso concomitante de outras substâncias possivelmente relacionadas aos efeitos hepatotóxicos, visto que dentre os 23 indivíduos que fizeram uso do extrato etanólico, 14 estavam fazendo uso de substâncias passíveis de ter relação com os efeitos apresentados. Dentre as substâncias utilizadas nesses casos podem ser citadas: anticoncepcionais orais, antidiabéticos, inibidores da bomba de prótons, antiinflamatórios, antihipertensivos, antidepressivos, dentre outros; além do uso de outras plantas medicinais (valeriana).

De acordo com a OMS, as elevadas taxas de toxicidade relatadas após o consumo de extratos orgânicos de Kava-kava podem estar relacionados ao uso de partes incorretas da planta e de cultivares inapropriados, devido a ausência de padronização somado a um controle de qualidade inadequado (WHO, 2007).

1.7 Atividades biológicas da Kava-kava

Fitoterápicos a base de Kava-kava podem ser encontrados na forma de extrato seco, cápsulas, tinturas e extratos fluidos. A principal atividade farmacológica da planta é a atividade ansiolítica, sendo comparadas aos efeitos de alguns benzodiazepínicos

(PEPPING, 1999), no qual é relatada a ligação das kavalactonas aos receptores benzodiazepínicos (JUSSOFIE; SCHMIZ; HIEMKE, 1994). Outros autores atestam que os efeitos ansiolíticos são decorrentes da modulação do sistema límbico em processos emocionais (HOLM et al., 1991). Há estudos que demonstram a atividade psicotrópica das kavalactonas devido à inibição da MAO (UEBELHACK; FRANKE; SCHEWE, 1998). Apresentam ainda propriedades anticonvulsivantes por inibirem os canais de sódio voltagem dependentes (GLEITZ; BEILE; PETERS, 1995).

Na medicina popular há relatos do uso da planta nos casos de gonorreia, vaginite, problemas menstruais, doenças venéreas, incontinência urinária e doenças do trato urinário (SINGH, 1992; PEPPING, 1999; WHO, 2004; BILIA et al., 2004; CÔTÉ et al., 2004).

1.7.1 Atividade antinociceptiva

A busca por novos agentes com atividade antinociceptiva é de grande interesse tanto para a indústria farmacêutica quanto para a saúde pública e, atualmente, há um aumento no número de estudos relacionados ao uso de produtos naturais com esse tipo de atividade. Mesmo encontrando na literatura alguns indícios sobre a atividade antinociceptiva dos extratos de Kava-kava, ainda não foram conduzidos estudos *in vivo* mais aprofundados sobre este tema, principalmente relacionados à fração mais comercializada atualmente, o extrato etanólico de Kava-kava.

Dentre os estudos em modelo animal para avaliação da atividade antinociceptiva da Kava-kava, podem ser citados os trabalhos desenvolvidos por Jamieson e Duffield, em que a resina de kava e o extrao aquoso foram avaliados nos testes de imersão da cauda e constrição abdominal (por ácido acético), após administração por via intraperitoneal e oral, respectivamente. Foi observado que tanto o extrato aquoso quanto a resina apresentaram efeitos antinociceptivos em ambos os testes. Já em relação às kavalactonas purificadas, somente KAV, DHK, MET e DHM apresentaram efeito no teste de imersão de cauda, após administração por via intraperitoneal. Neste mesmo estudo, os autores observaram que a administração de doses de naloxona, suficientes para inibir a analgesia relacionada à morfina, em ambos os testes não levaram à reversão das propriedades analgésicas dos extratos de Kava-kava, demonstrando desse modo que sua analgesia ocorre por via não-opiíide (JAMIESON e DUFFIELD, 1990).

Em relação à avaliação das propriedades antinociceptivas de kavalactonas sintéticas, Amaral e colaboradores observaram que as lactonas sintetizadas pelo grupo foram capazes de inibir as contrações abdominais, induzidas por ácido acético em camundongos, após a administração de 10 mg/kg por via intraperitoneal, além de aumentar significativamente o tempo de reação dos animais no teste de placa quente (AMARAL; BERGOLD; EIFLER-LIMA, 2005).

1.7.2 Atividade antimicrobiana

Alguns indícios de atividades antifúngica e antibacteriana *in vitro*, pelo uso de extratos de Kava-kava, podem ser encontrados na literatura. Locher e colaboradores realizaram dois estudos, um relacionado à atividade antibacteriana do extrato aquoso das folhas de Kava-kava e o outro relacionado à atividade antifúngica do extrato aquoso das hastes da planta. A partir das análises realizadas, foram observados valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 1000, 125 e 1000 µg/mL para os fungos *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* e *Trichophyton rubrum*, respectivamente. No entanto, não foi observada nenhuma atividade antibacteriana frente às bactérias, sendo testadas: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (LOCHER et al., 1995).

Em um estudo mais recente, Pereira e colaboradores analisaram a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico do rizoma de Kava-kava frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*, sendo obtidos os valores de CIM de 1,0 e 125 µg/mL, respectivamente (PEREIRA et al., 2015). Ainda em relação aos extratos hidroalcoólicos, em estudo desenvolvido por Guérin & Réveillère, foi observado que os extratos inibiram o crescimento *in vitro* dos fungos: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Penicillium digitatum*, *Rhizopus nigricans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* e *Saccharomyces pastorianus* (GUÉRIN e RÉVEILLÈRE, 1984).

1.8 Métodos de quantificação de kavalactonas

1.8.1 Métodos de quantificação analíticos

Na literatura, é possível encontrar relatos de métodos para a quantificação de kavalactonas em produtos compostos por Kava-kava datando desde 1966, em que

Young e colaboradores utilizaram CCD combinada à espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) para a determinação das seis principais kavalactonas presentes no extrato de Kava-kava (YOUNG et al., 1966). Com o passar dos anos, outras técnicas cromatográficas com maior sensibilidade começaram a ser utilizadas para a avaliação do teor de kavalactonas como, por exemplo, a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). Na **Tabela 3** estão descritas as condições das metodologias analíticas utilizadas nos trabalhos encontrados na literatura que utilizam a técnica CLAE para a quantificação de kavalactonas em amostras de Kava-kava.

Como pode ser verificado na **Tabela 3**, há a ocorrência de fatores em comum nos métodos de quantificação apresentados relacionados a temperatura da coluna, fase aquosa, solventes orgânicos e comprimento de onda de detecção. Em relação a temperatura da coluna, normalmente é esperado uma menor seletividade e resolução entre os picos cromatográficos em temperaturas elevadas quando são analisados compostos não-iônicos (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). No entanto, o oposto pode ser observado nas análises de kavalactonas em que a resolução e a seletividade tem valor ótimo em temperaturas acima de 40 °C.

Em relação a fase móvel, praticamente todos os trabalhos avaliados utilizaram fase aquosa acidificada, a partir da adição de cerca de 0,1% de ácido acético ou fórmico, mesmo com a ausência de grupos ionizáveis nas moléculas avaliadas. Já a respeito da fase orgânica, nota-se que os solventes predominantemente utilizados foram a acetonitrila e o isopropanol, sendo utilizados simultaneamente na maioria das vezes. O modo de eluição em gradiente foi muito utilizado dentre os métodos com detecção por espectrometria de massas (EM), já para os artigos que fizeram uso da detecção na região do UV, ambos os modos de eluição (isocrático e gradiente) foram aplicados. No entanto, com exceção dos estudos desenvolvidos por LIU e SCHMIDT, os tempos de corrida necessários para a quantificação dos analitos foram maiores do que 20 minutos (SCHMIDT; MOLNAR, 2002; LIU et al., 2018).

Tabela 3 – Estudos referentes a quantificação de kavalactonas em amostras de Kava-kava utilizando CLAE como técnica principal.

Deteção	Eluição	Fase aquosa	Fase orgânica	λ (nm)	Temperatura (°C)	Tempo de corrida (min)	Referência	
EM	Gradiente	ácido acético 0,25%	metanol	240	45	45	HE, 1997	
		ácido acético 1% (5% acetoneitrila)	isopropanol (água)	240	60	40	JAGER, 2004	
		ácido fórmico 0,1%	acetoneitrila	240	40	25	BOBELDIJK, 2005	
	NC	ácido fórmico 0,1%	acetoneitrila	acetoneitrila	240	NC	24	LHUISSIER, 2017
			ácido acético glacial 0,1%	acetoneitrila:isopropanol	240	NC	40	GAUB, 2004
			água	isopropanol	240	60	15	SCHMIDT, 2002
UV	Gradiente	água (5% acetoneitrila)	isopropanol:acetoneitrila	240	60	32	JAGER, 2004	
		ácido acético 0,1%	isopropanol:acetoneitrila	240	30	50	MEISSNER, 2005	
		ácido fórmico 0,1%	isopropanol:acetoneitrila	240/355	55	10	LIU, 2018	
		-	dioxano/hexano	240	15	> 100	HABERLEIN, 1996	
		ácido acético 0,1%	metanol:acetoneitrila	220	40	36	SHAO, 1998	
		água	acetoneitrila:etanol	246	ambiente	40	GANZERA, 1999	
	Isocrático	-	hexano:dioxano	hexano:dioxano	246	ambiente	30	GANZERA, 1999
			ácido fosfórico 0,1%	acetoneitrila:isopropanol	220	40	< 30	DENERY, 2004
			água	acetoneitrila:metanol	240/350	40	40	CÔTÉ, 2004
			ácido acético 0,1%	isopropanol:acetoneitrila	240	60	30	HU, 2005
			ácido fórmico 0,1%	isopropanol:acetoneitrila	246	ambiente	NC	WARBURTON, 2007
			tampão fosfato 0,1%	acetoneitrila:isopropanol	246	40	> 20	GURLEY, 2006

NC = não consta

 λ = comprimento de onda de deteção

Uma observação importante a respeito dos artigos que fizeram uso de UV como modo de detecção é que muitos não apresentaram resolução entre todos os picos cromatográficos, principalmente entre os pares de marcadores estruturalmente semelhantes: MET/DHM e YAN/DXY (GANZERA; KHAN, 1999; DENERY et al., 2004; COTE et al., 2004; MEISSNER; HABERLEIN, 2005). O estudo desenvolvido por Liu e colaboradores considerou a resolução mínima aceitável de 1,0, de acordo com guia da *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* (AOAC, 2003; LIU et al., 2018).

Uma segunda deficiência comum entre os artigos encontrados, independente da técnica de detecção utilizada, está relacionada a etapa de validação. A maioria dos trabalhos não relatou a validação do método analítico utilizado (HE; LIN; LIAN, 1997; HABERLEIN; BOONEN; BECK, 1997; SCHMIDT; MOLNAR, 2002; DENERY et al., 2004; COTE et al., 2004; GAUB et al., 2004; MEISSNER; HABERLEIN, 2005; LHUISSIER et al., 2017) ou apresentou somente os dados referentes a curva de calibração (GANZERA; KHAN, 1999; JAGER et al., 2004; GURLEY et al., 2006). Dentre os que relataram a validação do método apresentado, foram avaliados os parâmetros de linearidade, precisão, recuperação e sensibilidade, no entanto, nenhum dos artigos encontrados avaliou o efeito matriz. Esse parâmetro não é obrigatório de acordo com os guias para validação analítica comumente utilizados, porém, se tratando de amostras de extrato vegetal que devem ser consideradas matrizes complexas devido a sua composição, faz-se necessária a avaliação da possível ocorrência de efeito matriz no método desenvolvido.

1.8.2 Métodos de quantificação bioanalíticos

Dentre os trabalhos disponíveis na literatura a respeito da quantificação de kavalactonas em amostras biológicas utilizando CLAE, ambas as técnicas de detecção, EM e UV, foram empregadas. A concentração dos analitos foi avaliada em diferentes matrizes: urina, sangue e plasma, de fonte humana e animal (ratos). Dentre os trabalhos encontrados, apenas o desenvolvido por Wang e colaboradores avaliou as seis principais kavalactonas em seu estudo (WANG et al., 2018), os demais avaliaram apenas a KAV, sendo esta a única substância (TARBAH et al., 2003; MATHEWS et al., 2005) ou em conjunto com substâncias de diferentes plantas (CARLIER et al., 2015) ou classes (FERNANDEZ et al., 2007).

Quando a EM foi utilizada como técnica de detecção, empregou-se fonte de ionização do tipo electrospray (IES) no modo positivo ou aquecido (Heated-IES), acoplada ao analisador do tipo triplo quadrupolo – QqQ (FERNANDEZ et al., 2007; CARLIER et al., 2015) ou quadrupolo-orbitrap (WANG et al, 2018).

Como demonstrado na **Tabela 4**, com exceção do método desenvolvido por Mathews e colaboradores que utilizou eluição isocrática, todos os trabalhos encontrados fizeram uso de eluição gradiente. Estes por sua vez utilizaram fase aquosa acidificada em sua fase móvel, com fase orgânica composta majoritariamente por acetonitrila. A partir do levantamento realizado, foi possível observar que os tempos de corrida dos métodos em questão apresentaram uma grande variação, de 10 a 25 min. No entanto, vale a pena ressaltar que os trabalhos com menor tempo de corrida avaliaram somente um analito (TARBAH et al., 2003; MATHEWS et al., 2005) ou utilizaram cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) (CARLIER et al, 2015).

Como pode ser observado na **Tabela 5**, o estudo desenvolvido por Fernandez e colaboradores foi o que avaliou o maior número de parâmetros dentre os preconizados pelos principais guias de validação bioanalítica, com exceção apenas do efeito residual. Em contrapartida, para o método apresentado por Mathews e colaboradores foi avaliada somente a curva de calibração previamente a análise das amostras reais.

Se tratando de análises de amostras biológicas, faz-se necessário o uso de padrões internos (PI), de maneira a se obter resultados mais confiáveis por meio da correção da ionização do analito e do efeito matriz da matriz biológica, além de possíveis perdas durante o preparo da amostra. Para métodos bioanalíticos, o ideal é que seja utilizado como PI o analito em estudo na forma isotopicamente marcada (STOKVIS; ROSING; BEIJNEN, 2005). Com exceção do trabalho apresentado por Wang e colaboradores, foram utilizados compostos deuterados como PI, porém estes eram de substâncias diferentes das kavalactonas avaliadas. Wang e colaboradores utilizaram como PI a DHM na sua forma deuterada, porém somente para a validação desta kavalactona (WANG et al., 2018). As demais (MET, KAV, DHK, YAN e DXY) não passaram pela etapa de validação, tendo suas concentrações estimadas através da relação da resposta obtida para cada um desses analitos com aquela da DHM.

Tabela 4 – Estudos referentes a quantificação de kavalactonas em amostras biológicas utilizando CLAE como técnica principal.

Detector	Elução	Fase aquosa	Fase orgânica	Padrão interno	Tempo	Referência
					(min)	
UV	Gradiente	tampão fosfato	acetonitrila	Protizolam	12	TARBAH, 2003
	Isocrático	água	acetonitrila	NC	10	MATHEWS, 2005
EM	Gradiente	tampão fosfato de amônio	acetonitrila:metanol	ácido ritalinico-d5	22	FERNANDEZ, 2007
		tampão fosfato de amônio	acetonitrila (ácido fórmico 0,1%)	cocaína-d3	15	CARLIER, 2014
		ácido fórmico 0,05% (1% acetonitrila)	Acetonitrila (5% água, ácido acético 0,05%)	[² H ₂]-DHM	25	WANG, 2018

NC = não consta

Tabela 5 – Parâmetros de validação avaliados pelos trabalhos referentes a quantificação de kavalactonas em amostras biológicas utilizando CLAE.

Parâmetros	TARBAH, 2003	MATHEWS, 2005	FERNANDEZ, 2007	CARLIER, 2014	WANG, 2018
Seletividade	NC	NC	VALIDADO	NC	VALIDADO
Efeito matriz	NC	NC	VALIDADO	VALIDADO	NC
Recuperação	VALIDADO	NC	VALIDADO	VALIDADO	NC
Linearidade	VALIDADO	VALIDADO	VALIDADO	VALIDADO	VALIDADO
Efeito residual	NC	NC	NC	NC	NC
Sensibilidade	VALIDADO	NC	VALIDADO	VALIDADO	VALIDADO
Precisão	VALIDADO	NC	VALIDADO	VALIDADO	VALIDADO
Exatidão	NC	NC	VALIDADO	VALIDADO	VALIDADO
Estabilidade	NC	NC	VALIDADO	NC	NC

NC = não consta

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o controle de qualidade de extratos secos comerciais do rizoma de *Piper methysticum* G. Forst, o estudo das suas atividades biológicas, assim como da toxicidade aguda. Comparar a biodisponibilidade da kavaína isolada e presente nos extratos da planta, para avaliação da existência de sinergismo farmacocinético.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos para a quantificação simultânea das kavalactonas: metisticina, dihidrometisticina, kavaína, dihidrokavaína, yangonina e desmetóxiyangonina, presentes em amostras de extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst.
- Avaliação da qualidade físico-química das amostras de extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst por meio dos testes de doseamento e perda por dessecação.
- Desenvolvimento de método bioanalítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial para a quantificação de kavaína em plasma de camundongo.
- Determinação dos parâmetros farmacocinéticos e da biodisponibilidade da kavaína isolada e presente em amostra de extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst, para avaliação da existência de sinergismo farmacocinético.
- Avaliação da toxicidade aguda de amostras de extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst por meio de testes biológicos *in vivo*.
- Avaliação das atividades biológicas atribuídas aos extratos secos de *Piper methysticum* G. Forst por meio de ensaios *in vitro* para a atividade antimicrobiana e *in vivo* para a atividade antinociceptiva.

CAPÍTULO 2
CONTROLE DE QUALIDADE DOS EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE *Piper*
***methysticum* G. FORST**

1. MATERIAIS

1.1 Insumos

- Substâncias químicas de referência (SQR): Yangonina (ChromaDex – EUA), pureza 99,4%, lote 00025010-711; Desmetoxyyangonina (ChromaDex – EUA), pureza 94,3%, lote 00004263-523; Diidrokaína (ChromaDex – EUA), pureza 94,0%, lote 00004476-706; Metisticina (ChromaDex – EUA), pureza 96,4%, lote 00013860-711; Diidrometisticina (ChromaDex – EUA), pureza 93,7%, lote 00004477-901.
- Padrão analítico D,L-Kaína (Sigma-Aldrich – Suíça), pureza 100%, lote BCBG5132V;
- Amostras: extratos secos de Kava-kava (ESKs) números 1 a 16.

1.2 Reagentes e acessórios

Acetonitrila, isopropanol e metanol grau cromatográfico; ácido acético, ácido sulfúrico e ácido fórmico grau analítico; água ultrapura; filtros para seringa de celulose regenerada e reforçada Sartorius® com tamanho de poro de 0,45 µm; pesa-filtros; cadinhos.

1.3 Colunas cromatográficas

Agela Technologies Innoval C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex® – EUA); LiChrocart® CIANO (125 mm x 4 mm, 5µm) (Merck Millipore® – Alemanha).

1.4 Equipamentos e instrumentos

Aparelho de ultrassom MaxiClean 1400, Unique®; sistema CLAE-DAD 1200, Agilent®; balança analítica Shimadzu® AUW220D com precisão de 0,01 mg; potenciômetro Metrohm® 827 pH Lab; sistema de purificação de água Milli-Q Millipore® Direct-Q3; estufa B180 Nabertherm; balança analítica Shimadzu® ATX224.

2. MÉTODOS

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Ferais.

2.1 Aquisição dos extratos comerciais e avaliação macroscópica

Primeiramente foram contatadas farmácias de manipulação localizadas em Belo Horizonte e em Montes Claros, a respeito da doação de amostras de ESKs (aproximadamente 10 g de extrato) juntamente com a cópia do laudo do fornecedor/produtor.

Após o recebimento dos extratos, estes foram identificados a partir de numeração, de maneira a manter o sigilo em relação às farmácias de manipulação doadoras. Em seguida, as amostras foram transferidas de suas embalagens originais para frascos de vidro âmbar seguido do acondicionamento em dessecadores de vidro, para proteção contra a luz e a umidade.

2.2 Determinação de perda por dessecação

Em se tratando de amostras de extrato seco de kava-kava, de elevada higroscopicidade, fez-se necessária a análise do teor de água presente, de maneira a evitar o excesso de umidade e a consequente degradação enzimática dos marcadores ativos, juntamente com o crescimento de fungos e bactérias (BRASIL, 2014b). Dentre os métodos que podem ser empregados para a determinação da quantidade de água, encontra-se o teste de perda por dessecação.

Para realização deste teste, foram analisadas as amostras de ESK de números 1, 2, 3, 5, 7, 8 e 15 (amostras representativas de cada fornecedor disponíveis em maior quantidade), de acordo com o método preconizado pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010). Inicialmente os pesa-filtros foram dessecados durante 30 minutos em estufa a 105 °C. Após o resfriamento em dessecador, o peso final do pesa-filtro tampado contendo cerca de 1 g de amostra de ESK foi aferido. Em seguida, os pesa-filtros destampados foram mantidos em estufa a 105 °C por duas horas, com subsequente resfriamento a temperatura ambiente em dessecador e pesagem. Este

processo foi repetido até obtenção de peso constante entre as pesagens. A porcentagem da perda por dessecação foi calculada de acordo com a equação 1:

$$\text{Perda por dessecação (\%)} = \frac{(P_u - P_s)}{P_a} \times 100 \quad (1)$$

Sendo que:

P_a = peso da amostra;

P_u = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação;

P_s = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

A Farmacopeia Brasileira preconiza que os extratos secos devem apresentar no mínimo 95% de resíduo seco, ou seja, no máximo 5% de constituintes voláteis (FARMACOPEIA, 2010). De acordo com a monografia da OMS para o rizoma de kava-kava, a perda por dessecação não deve ser maior do que 12% (WHO, 2004).

2.3 Desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM em ESKs por CLAE-DAD

Para o desenvolvimento do método analítico, primeiramente foi determinada a técnica analítica mais adequada a ser utilizada, levando em consideração a sensibilidade e seletividade para os seis analitos em uma quantificação simultânea, além da possível disponibilidade dos equipamentos pelas empresas responsáveis pela produção/manipulação dos ESKs, de maneira a garantir uma maior facilidade de aplicação do método pelas empresas.

Em seguida, os parâmetros cromatográficos e de detecção foram otimizados tendo como base dados encontrados na literatura (**Tabela 3**) e as características físico-químicas dos marcadores analisados. Dentre os parâmetros avaliados podem ser citados: fases estacionárias; composição da fase móvel; variações no volume de injeção, na temperatura do forno da coluna e na velocidade do fluxo da fase móvel e parâmetros de detecção (**Tabela 6**). Para otimização das condições cromatográficas foram utilizadas soluções das amostras de ESK preparadas em metanol, seguido de banho ultrassom por 20 minutos e filtração em filtros para seringa de celulose

regenerada e reforçada com tamanho de poro de 0,45 µm antes da injeção no sistema CLAE-UV.

Tabela 6 – Parâmetros e condições avaliados durante o desenvolvimento do método analítico.

Parâmetros	Condições
Fases estacionárias	C18 e CIANO
Modo de eluição	Isocrático e gradiente
Fase orgânica	Metanol, acetonitrila e isopropanol
Fase aquosa	Água ultrapura, solução de ácido acético e de ácido fórmico
Fluxo da fase móvel	0,8 e 1,0 mL/min
Temperatura da coluna	30, 40, 45 e 50 °C
Volume de injeção	10 e 20 µL
Comprimento de onda de detecção	Varredura de 200 a 400 nm

Após definição dos parâmetros cromatográficos as faixas de trabalho para MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY foram estabelecidas considerando as possíveis amplitudes de variação de teor dos marcadores avaliados encontradas nos extratos comercializados. A determinação da faixa de trabalho foi realizada com base na concentração da solução de trabalho da amostra n° 12 (disponível em maior quantidade) utilizando o método analítico desenvolvido, sendo considerado como 100% de cada marcador. Em seguida, foram preparados os pontos da curva representativos de níveis de porcentagem variando entre 30 e 140% de kavalactonas.

2.4 Validação do método analítico para quantificação simultânea de YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM em ESKs por CLAE-DAD

O método analítico desenvolvido para a quantificação simultânea das seis principais kavalactonas: YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM, em ESKs foi validado de acordo com as recomendações da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e da IN n° 4, de 18 de junho de 2014 (BRASIL, 2014b), ambas da ANVISA. Também foram utilizadas orientações contidas nos guias do *International Conference on Harmonization (ICH): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2R1* (ICH, 1996); e da *AOAC: Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals* (AOAC, 2003).

Durante a etapa de validação, realizaram-se os ensaios para a determinação da seletividade, linearidade da faixa de trabalho, efeito matriz, precisão, exatidão, limite inferior de quantificação e de detecção, e robustez do método desenvolvido. As soluções utilizadas nesta etapa foram preparadas em metanol, no dia de cada teste, a partir das SQR dos marcadores avaliados e da amostra nº 15 (disponível em maior quantidade). Todas as soluções foram mantidas em banho de ultrassom por 20 minutos e em seguida filtradas em filtros para seringa de celulose regenerada e reforçada com tamanho de poro de 0,45 µm. Os cálculos dos resultados obtidos foram realizados com auxílio do software Microsoft Excel 2010.

2.4.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método analítico desenvolvido, demonstrou-se sua capacidade inequívoca de identificar ou quantificar os analitos de interesse: MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY, sem a interferência de outros componentes presentes na matriz (ESK).

Visto que o método desenvolvido é aplicado em matrizes vegetais e que não é possível a obtenção da matriz livre dos marcadores, a avaliação da seletividade do método foi realizada por meio da análise de pureza de pico de cada um dos marcadores avaliados, com auxílio do detector DAD. Caso o fator de pureza para o analito em questão, determinado a partir da comparação dos espectros obtidos em diferentes seções de cada pico, estivesse abaixo do valor de *threshold* (desvio padrão do ruído), o pico seria considerado como puro.

2.4.2 Linearidade da faixa de trabalho

A linearidade do método foi demonstrada pela sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração das kavalactonas: MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY, em toda a faixa de trabalho estabelecida durante a etapa de desenvolvimento.

Para a avaliação da linearidade, preparou-se uma curva de calibração contendo no mínimo cinco concentrações diferentes de cada solução de padrão do analito (**Tabela 7**), preparadas em triplicata de maneira independente, englobando a faixa de trabalho determinada.

Para construção da curva foram preparadas soluções estoque isoladamente dos padrões analíticos de cada marcador, sendo realizadas diluições adequadas para atingir as concentrações da faixa de trabalho. Todas as soluções estoque e demais diluições foram preparadas em metanol, por ser um dos solventes orgânicos utilizado na fase móvel e por promover a diluição completa dos analitos. Todas as soluções foram mantidas em banho de ultrassom por 20 minutos antes de aferir o volume nos balões volumétricos e foram filtradas em filtros para seringa de celulose regenerada e reforçada com tamanho de poro de 0,45 μm antes da injeção no sistema CLAE-UV.

Tabela 7 – Níveis de concentração ($\mu\text{g/mL}$) das soluções de metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY) avaliados durante a linearidade, juntamente com os respectivos valores de porcentagem do intervalo.

Ponto	MET		DHM		KAV		DHK		YAN		DXY	
	$\mu\text{g/mL}$	%										
1	0,98	70	0,59	30	0,55	30	7,75	45	0,28	30	0,29	50
2	1,12	80	0,64	35	0,77	40	9,03	55	0,37	40	0,34	70
3	1,26	90	0,75	40	0,91	50	11,76	70	0,55	60	0,40	80
4	1,33	95	1,08	60	1,80	100	16,80	100	0,74	80	0,48	100
5	1,40	100	1,44	80	2,52	140	23,52	140	0,92	100	0,67	140
6	1,96	140	1,80	100					1,29	140		
7			2,52	140								

A partir dos dados de concentrações reais e respostas analíticas individuais para cada analito, realizaram-se análises visuais, representação gráfica das respostas em função da concentração do analito e análises estatísticas. Inicialmente, os valores dispersos (*outliers*) foram identificados por meio do teste de resíduo padronizado de Jackknife, utilizando como critério de aceitação a exclusão de, no máximo, 22% dos dados originais da curva de calibração de cada analito.

Em seguida foi avaliado se os dados da regressão linear atendem às premissas para o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (regressão linear simples), conforme procedimento desenvolvido por Souza e Junqueira (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Sendo verificado se os resíduos da regressão seguem a distribuição normal (teste de Ryan-Joiner), apresentam homocedasticidade ao longo da faixa de trabalho avaliada (teste de Levene modificado por Brown e Forsythe) e são independentes (teste de

Durbin-Watson). Após a realização das premissas, avaliou-se se a regressão e o desvio da linearidade por meio de análise de variância (ANOVA).

A faixa de trabalho proposta foi considerada linear quando todas as premissas estatísticas estivessem aprovadas utilizando um nível de significância de 5%, o valor de coeficientes de determinação (r^2) maior que 0,990 e o coeficiente angular significativamente diferente de zero.

2.4.3 Efeito matriz

Visto que o método desenvolvido tem aplicação em amostras de extrato vegetal e por essas serem consideradas matrizes complexas devido a sua composição, durante a etapa de validação avaliou-se a possível ocorrência de efeito matriz.

Para isso, foi feita a comparação entre duas curvas de calibração, com os mesmos níveis de concentração da avaliação linearidade, considerando cinco níveis preparados em triplicata. Sendo que, a primeira curva foi composta por soluções padrão das SQR das kavalactonas em estudo (MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY) e a segunda construída através da adição de quantidades conhecidas dos padrões à solução de amostra de ESK n° 15 a 20% da concentração de trabalho.

Após comparação dos coeficientes angulares das curvas de calibração em solução e adicionadas à matriz vegetal e confirmação da linearidade das curvas, primeiramente foi realizado o teste F (Fisher-Snedecor) para avaliação da variância dos desvios das curvas, em solução e matrizada, seguido do teste t de Student para comparação das inclinações e interceptos das curvas (nível de significância de 5%). O paralelismo entre as retas, observado a partir de valores de $t_{\text{calculado}}$ inferiores ao $t_{\text{crítico}}$, foi considerado indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz.

2.4.4 Precisão

A avaliação da precisão foi feita por meio da determinação dos parâmetros de repetibilidade (intracorrída) e de precisão intermediária (entre-corrídas). Em ambos os casos, foram realizadas seis determinações a 100% da concentração de solução da amostra de ESK n° 15 (0,15 mg/mL) em metanol, sendo utilizadas as equações da curva obtidas durante a avaliação da linearidade para determinação dos valores de concentração de cada marcador. Para avaliação da repetibilidade, as soluções foram

individualmente pesadas e preparadas, em triplicata, em um curto período de tempo, por um único analista, sendo analisadas em uma única corrida analítica. Em relação a precisão intermediária, as soluções foram preparadas do mesmo modo, mas em dias distintos e por analistas diferentes.

A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação (CV%), conforme a equação (2):

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100 \quad (2)$$

De acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo com o objetivo e a variabilidade intrínseca do método, além da concentração de trabalho utilizada e do analito na amostra (BRASIL, 2017). Por se tratar de amostras vegetais, a IN nº 4, de 18 de junho de 2014, que contém orientações específicas para fitoterápicos, preconiza que os valores de CV% obtidos durante sua análise não devem ser superiores a 15% (BRASIL, 2014b).

2.4.5 Exatidão

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada por meio do grau de concordância entre os resultados individuais experimentais em relação ao seu valor teórico, abrangendo o intervalo linear previamente estabelecido. Visto que o método foi desenvolvido para análise de extratos vegetais, uma matriz complexa e variável, a inexistência de um placebo da matriz sem a presença dos marcadores resulta na determinação da exatidão a partir do método de adição de padrão. Foi feita a adição de SQR de cada kavalactona em uma solução amostra de ESK (amostra número 15) a 20% da concentração de trabalho, resultando nos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), conforme pode ser observado na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyyangonina (DXY), usados para avaliação da exatidão.

Nível	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)					
	MET	DHM	KAV	DHK	YAN	DXY
CQB	1,0	0,6	0,8	9,2	0,3	0,3
CQM	1,4	1,8	1,1	16,7	0,6	0,5
CQA	2,0	2,5	2,5	23,6	1,3	0,7

Desse modo, a exatidão do método foi expressa pela recuperação obtida através da relação entre a concentração prática (valor total experimental subtraído do padrão adicionado) e teórica da amostra (Equação 3); valores de concentração obtidos através das equações da curva provenientes da linearidade; sendo calculado o CV% para cada concentração.

$$\text{Recuperação}\% = \frac{CE_t - CT_{pa}}{CT_{am}} \times 100 \quad (3)$$

Sendo que:

CE_f = concentração experimental total;

CT_{pa} = concentração teórica do padrão adicionado;

CT_{am} = concentração teórica da amostra.

Assim como para a precisão, de acordo com a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, os critérios de aceitação devem ser definidos e justificados de acordo com o objetivo e a variabilidade intrínseca do método, além da concentração de trabalho utilizada e do analito na amostra (BRASIL, 2017). Desse modo, foram utilizados dois guias para a determinação dos valores de referência de CV% e recuperação: a IN nº 4, de 18 de junho de 2014 e o *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals* da AOAC, respectivamente (BRASIL, 2014b; AOAC, 2003). De acordo com o guia da AOAC, os valores limites para a recuperação são determinados em função da porcentagem do analito em questão na amostra. Conforme a literatura disponível, as porcentagens das kavalactonas em estudo se

encontram próximas a 1% da massa total do extrato de kava-kava (**Tabela 1, Capítulo 1**). Portanto, de acordo com o guia utilizado, os valores de recuperação devem estar na faixa de 92 a 105%. Já em relação aos valores de CV%, de acordo com a IN nº 4, estes devem ser inferiores a 15%.

2.4.6 Limites de quantificação e detecção

Os limites inferiores de quantificação (LIQ) foram determinados a partir da análise de soluções contendo concentrações decrescentes dos analitos, de maneira a alcançar o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições estabelecidas. Já os limites de detecção (LD) foram calculados através da equação 4.

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC} \quad (4)$$

Sendo:

DP = desvio padrão do intercepto com o eixo Y

IC = inclinação da curva de calibração

2.4.7 Robustez

A análise de robustez de um método indica sua capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações nas suas condições analíticas, sendo avaliados para este estudo as variações no fluxo da fase móvel (0,9 e 1,1 mL/min), temperatura do forno da coluna cromatográfica (39 e 41°C) e pH da fase móvel (5,5 e 7,5), que foi preparada a partir da adição de soluções ácidas (ácido acético) e básicas (hidróxido de sódio). Para realização dos testes foram utilizadas soluções de ESK (amostra número 15) a 150 µg/mL em replicatas de: n = 4 para avaliação do fluxo e da temperatura; e n = 3 para avaliação do pH da fase móvel. Os resultados da área do pico dos analitos obtidos, frente às variações, foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0, por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey, comparando cada tratamento em relação ao grupo controle (método desenvolvido). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média, com nível de significância de 5% (P<0,05).

2.5 Determinação do teor de kavalactonas em amostras de ESK

De maneira a avaliar se os valores de teor de kavalactonas presentes nas amostras de ESK obtidas estão de acordo com o determinado no laudo dos fornecedores, realizou-se a quantificação simultânea das principais kavalactonas (MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY) presentes, empregando-se do método analítico desenvolvido e validado a partir das SQRs das seis kavalactonas em estudo. Inicialmente foram preparadas soluções de trabalho de cada uma das amostras separadamente, na concentração de 150 µg/mL em metanol. Foram feitas diluições necessárias para a preparação de soluções intermediárias e, em seguida, filtragem em membrana de celulose para *vials* âmbar. A análise das amostras foi realizada em uma única sequência analítica e as concentrações de cada marcador calculadas a partir dos dados das curvas de calibração aprovadas na etapa da linearidade durante a validação. Cada amostra foi analisada em triplicata, sendo calculado seu teor e respectivo CV%.

Em seguida, os valores de teor para as kavalactonas em estudo foram novamente calculados, porém utilizando somente o padrão de KAV, considerada o principal marcador da kava-kava (WHO, 2004). Para isso, foram calculados os valores de teor desse analito, através da equação da reta obtida durante a linearidade, em cada amostra, seguido da determinação das concentrações dos demais analitos presentes através da relação entre a área obtida para a KAV e a área obtida para as demais kavalactonas. Essa abordagem para quantificação de kavalactonas é apresentada na monografia do extrato de kava-kava da OMS (WHO, 2004) e costuma ser utilizada quando não há disponibilidade de todas as SQR necessárias para validação e análise das amostras, sendo realizada a validação de somente um marcador (KHAMIS, 2018; ROCHA, 2018).

Ao final, foi feita a comparação dos resultados de teor total e para cada kavalactona obtidos através do método validado utilizando as seis SQRs, em relação aos valores obtidos quando somente uma SQR foi utilizada, de maneira a avaliar o impacto da metodologia utilizada na quantificação desses marcadores nos extratos kava-kava.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Aquisição dos extratos comerciais

Os extratos secos do rizoma de *Piper methysticum* foram obtidos por meio de doações de farmácias de manipulação, sendo 14 farmácias localizadas em Belo Horizonte e 2 em Montes Claros (**Tabela 9** e **Figura 4**). Juntamente com as doações, foram disponibilizados os laudos dos respectivos fornecedores informando que as amostras eram referentes ao extrato seco de kava-kava contendo 30% de kavalactonas. Além disso, os laudos descreviam: lote, teor específico de ativo, aspectos macroscópicos (**Figura 4**), solubilidade e testes de controle físico-químico e microbiológico. Entretanto, é importante salientar que as informações dos testes contidas nos laudos fornecidos utilizavam como referência para os resultados as metodologias dos próprios fabricantes, demonstrando a falta de padronização nas exigências regulatórias para este tipo de extrato.

Visto que as kavalactonas possuem relação com o efeito terapêutico da kava-kava, elas são denominadas marcadores ativos. Neste caso, a legislação permite uma variação de 15% no teor do marcador no extrato, ou seja, para 30% de kavalactonas é considerada uma variação de $\pm 4,5\%$ (BRASIL, 2014b). Como pode ser observado na **Tabela 9**, o valor médio de teor declarado nos laudos dos fornecedores foi de $31,22 \pm 1,63\%$, sendo que, o extrato 12 foi o único que apresentou valor de teor acima do preconizado pela legislação, com uma variação de cerca de 22%. No entanto, visto que nos laudos não era informado o método utilizado para a quantificação dos marcadores, juntamente com a ausência de uma metodologia padronizada em um compêndio oficial, ainda não é possível fazer uma comparação real entre esses dados.

Tabela 9 – Lista das amostras de extrato seco de Kava-kava de acordo com informações apresentadas nos laudos dos fornecedores.

Extrato	Localidade	Fornecedor	Lote Fornecedor	Fabricante/Pais de origem	Lote Fabricante	Unidade (%)	Teor * (%)
1	Belo Horizonte	All Chemistry	ALL-054651	Quimer/Alemanha	NC	10,4	NC
2	Montes Claros	Valdequímica	027256	Zhejiang Chemicals/China	HK20140315	3,05	30,23
3	Belo Horizonte	Embrafarma	15689	Quimer/Alemanha	001/4091	1,71	30,60
4	Belo Horizonte	Galena	1409022102	NC/China	CKW20140402	2,5	30,10
5	Belo Horizonte	Galena	1506029903	NC/China	CKW20150126	2,2	31,00
6	Belo Horizonte	Fagron	14031609B	NC/Alemanha	14000061	1,83	30,97
7	Belo Horizonte	Fagron	14031609B	NC/Alemanha	14000061	1,83	30,97
8	Belo Horizonte	Pharmanostra	14084306F	NC/Alemanha	14000061	1,52	30,51
9	Montes Claros	Pharmanostra	13072440B	NC/Alemanha	12000129	1,37	30,40
10	Belo Horizonte	Pharmanostra	13093761B	NC/Alemanha	13000115	1,54	32,32
11	Belo Horizonte	Pharmanostra	13093761B	NC/Alemanha	13000115	1,54	32,32
12	Belo Horizonte	Gemini	NC	Finzelberg/Alemanha	11017650	3,35	36,65
13	Belo Horizonte	Gemini	NC	CHBD/China	HK20130827	3,06	30,36
14	Belo Horizonte	Gemini	NC	CHBD/China	HK20140512	3,26	30,66
15	Belo Horizonte	Gemini	NC	CHBD/China	HK20140512	3,26	30,66
16	Belo Horizonte	Gemini	NC	CHBD/China	HK20140512	3,26	30,66
Média							31,22
Desvio padrão							1,63

* teor total de kavvalactonas

NC = não consta

CHBD = Changsha Huakang Biotechnology Development

Figura 4 – Amostras de extrato seco de Kava-kava doadas, com seus respectivos aspectos macroscópicos informados nos laudos dos fornecedores.

EXTRATO 1	EXTRATO 2	EXTRATO 3	EXTRATO 4	EXTRATO 5	EXTRATO 6	EXTRATO 7	EXTRATO 8
Marrom	Amarelo claro						

EXTRATO 9	EXTRATO 10	EXTRATO 11	EXTRATO 12	EXTRATO 13	EXTRATO 14	EXTRATO 15	EXTRATO 16
Amarelo claro							

Como pode-se observar na **Figura 4**, há uma variação nas cores dos ESKs, sendo que essas variações não estão necessariamente ligadas ao fornecedor, já que os extratos 4 e 5 são do mesmo fornecedor e possuem coloração diferente, enquanto amostras de diferentes fornecedores possuem colorações semelhantes. Era esperado que amostras de um mesmo lote possuíssem os mesmos aspectos macroscópicos, no entanto, os extratos 10 e 11 são provenientes do mesmo lote e possuem aparências nitidamente diferentes. Provavelmente essas alterações podem estar relacionadas a forma de armazenamento e transporte dos extratos tanto pelo fabricante quanto pelo fornecedor e a própria farmácia de manipulação.

Mesmo ocorrendo variações praticamente todas as amostras de ESK se mantiveram dentro da coloração amarela, variando somente na tonalidade, com exceção do extrato 1 que apresentou coloração marrom. No laudo desta amostra, é informado que a extração foi realizada a partir do rizoma e da raiz da planta, diferente das demais amostras que foram extraídas somente do rizoma. É provável que essa diferença de coloração do extrato 1 em relação aos demais possa estar relacionada a parte da planta utilizada durante a etapa de extração. Vale a pena ressaltar que o extrato 12 é o único categorizado como insumo alimentício, de acordo com o laudo do fornecedor fornecido pela farmácia de manipulação.

3.2 Determinação de perda por dessecação

Como pode ser observado na **Tabela 10**, todos os valores de perda por dessecação obtidos para as amostras de ESK analisadas estão abaixo do limite preconizado na monografia da OMS para a planta (12%), no entanto, 3 amostras (extratos 1, 5 e 15) apresentaram-se acima do valor preconizado pela Farmacopeia Brasileira (máximo de 5%) (FARMACOPEIA, 2010). Observa-se ainda que, de acordo com os valores informados nos laudos dos fornecedores, todas as amostras apresentam-se dentro dos limites farmacopeicos, com exceção do extrato 1, cujo laudo apontava como limite máximo 14% de umidade, sendo utilizada uma referência interna do fabricante.

Ao comparar os resultados obtidos durante o teste de perda por dessecação com os valores indicados nos laudos dos fornecedores, é possível observar discrepâncias entre esses dados, com variações entre 0,41 e 5,28% (**Tabela 10**). Essa diferença pode ter ocorrido devido a possíveis contaminações dos extratos e/ou degradação dos seus componentes durante o armazenamento e transporte das amostras, assim como a diferenças nas metodologias utilizadas no teste de perda por dessecação. De acordo com os laudos dos fornecedores das amostras analisadas, os valores de teor das amostras foram obtidos de acordo com metodologia própria do fabricante, não sendo informados como o teste foi realizado.

Tabela 10 – Valores obtidos durante o teste de perda por dessecação das amostras de extrato seco de Kava-kava.

Amostra	Peso ESK (g)	Peso total inicial* (g)	Peso total final** (g)	Perda por dessecação (%)	Laudos (%)	Diferença (%)
1	1,005	66,933	66,881	5,17	10,40	5,23
2	1,001	28,176	28,132	4,40	3,06	-1,34
3	1,019	60,268	60,223	4,42	1,71	-2,71
5	1,006	52,467	52,415	5,17	2,20	-2,97
7	1,007	44,350	44,336	1,39	1,83	0,44
8	1,003	55,353	55,328	2,49	1,52	-0,97
15	1,018	52,483	52,404	7,76	3,26	-4,50

*Peso do pesa-filtro somado ao peso da amostra antes da dessecação

**Peso do pesa-filtro somado ao peso da amostra depois da dessecação

3.3 Desenvolvimento de método analítico para quantificação simultânea de YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM em ESKs por CLAE-DAD

Com o propósito de utilizar uma técnica analítica para a quantificação simultânea das seis kavalactonas mais acessível para os fabricantes dos ESKs, foi selecionada a CLAE-DAD para o desenvolvimento do método em questão. Essa técnica possui uma boa relação entre custo e benefício, quando comparada às demais técnicas cromatográficas, em relação à sensibilidade e reprodutibilidade durante as análises, o que possibilita uma maior disponibilidade entre os laboratórios de controle de qualidade como um todo.

De modo a desenvolver um método por CLAE-DAD capaz de quantificar simultaneamente as seis kavalactonas em questão, foi realizada uma etapa de otimização das condições cromatográficas de maneira a obter uma resolução capaz de separá-las efetivamente. Para isso, inicialmente foi feito um levantamento das condições cromatográficas utilizadas nos trabalhos encontrados na literatura.

Um dos maiores desafios encontrados a respeito da quantificação simultânea das kavalactonas MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY por CLAE-DAD está relacionado a semelhança entre as suas estruturas. Se tratando de lactonas lipofílicas contendo um esqueleto α -pirona, elas se diferenciam apenas pelo grau de insaturação da estrutura e pela presença ou ausência de grupo metóxi. Desse modo, as kavalactonas apresentam pouca variação na sua polaridade, como pode ser observado na pequena diferença entre os seus valores de coeficiente de partição (PUBCHEM, 2018), principalmente relacionada aos pares MET/DHM ($\log P = 2,4/ \log P = 2,6$), KAV/DHK ($\log P = 2,5/ \log P = 2,8$) e YAN/DXY ($\log P = 2,7/ \log P = 2,8$), o que dificulta a sua separação cromatográfica. Por se tratarem de substâncias com características não-polares, optou-se por utilizar cromatografia de fase reversa com coluna cromatográfica contendo sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18).

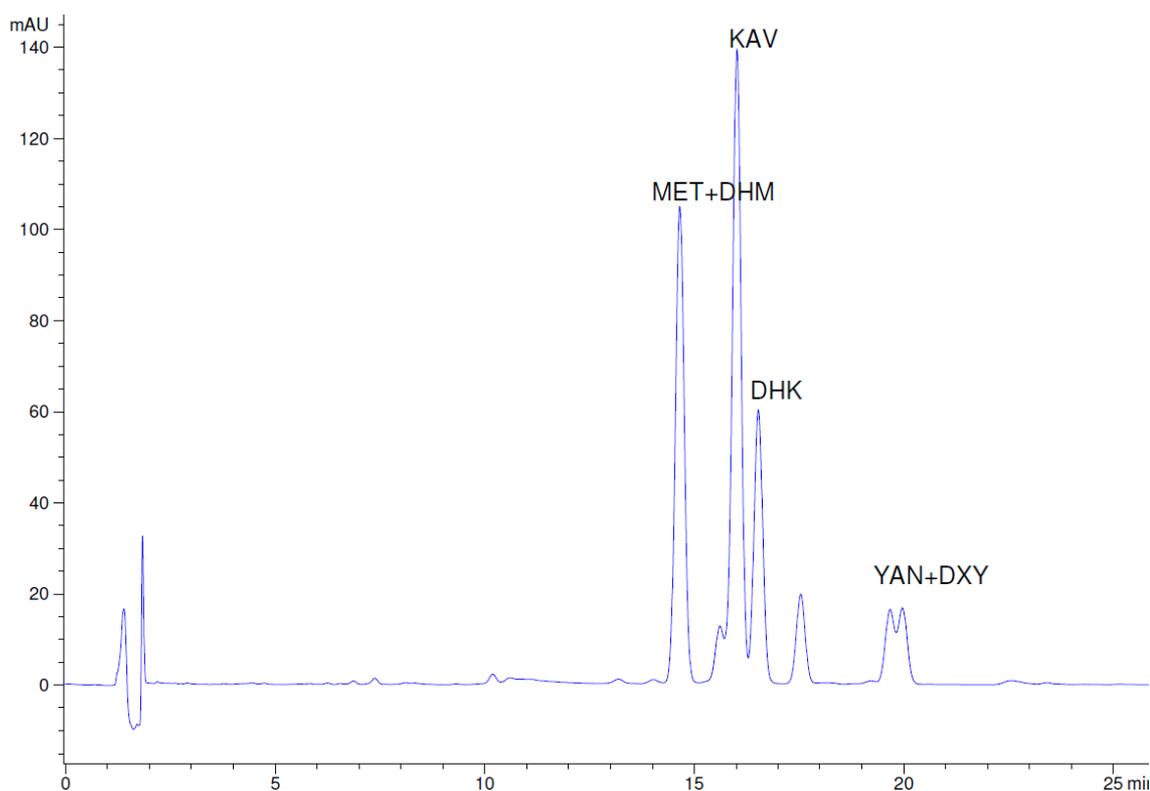
Durante a etapa de desenvolvimento utilizaram-se soluções de diferentes extratos de kava-kava, devido a maior disponibilidade de amostras, visando obter uma resposta analítica baseada no comportamento real das amostras disponíveis. As soluções foram preparadas a partir da solubilização em metanol, seguido por banho de ultrassom durante 20 minutos, obtendo concentrações variando entre 0,15 e 0,5 mg/mL.

De maneira a realizar uma avaliação inicial da amostra e do seu comportamento cromatográfico, foi realizado um gradiente exploratório (**Tabela 11**) utilizando como condição de fase móvel as fases aquosa e orgânica mais utilizadas nos artigos disponíveis na literatura (**Tabela 3**), solução de ácido acético 0,16% e acetonitrila, respectivamente. No entanto, como pode ser observado na **Figura 5**, nesta condição não foi possível a separação das seis kavalactonas.

Tabela 11 – Condições de gradiente exploratório para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,5 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 30 °C.

Tempo (min)	Acetonitrila	Ácido acético 0,16%
0	5	95
60	95	5

Figura 5 – Cromatograma obtido pela análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,5 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 30 °C. Representação dos 25 minutos iniciais da corrida analítica.



Em seguida, foram realizadas análises com pequenas variações na proporção da fase móvel e do tempo de gradiente, porém mantendo-se as demais condições do gradiente exploratório: concentração da amostra, volume de injeção, comprimento de onda de detecção, fluxo e composição da fase móvel. Visto que, em todas as condições avaliadas a separação das seis kavalactonas não era efetiva, foram testadas diferentes composições da fase móvel com alteração também na proporção entre as fases aquosa e orgânica. Inicialmente substituiu-se a acetonitrila pelo metanol ou pelo isopropanol e, em seguida, foram avaliadas combinações desses três solventes orgânicos. Observou-se então, que a fase orgânica com melhor separação entre os seis analitos era composta por metanol, acetonitrila e isopropanol (**Tabela 12**). O uso simultâneo de diferentes solventes orgânicos possibilitou uma melhor resolução entre as kavalactonas em estudo, mesmo estas possuindo grande semelhança estrutural, em função da variação de força e de seletividade da fase móvel.

Tabela 12 – Condições de gradiente A para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 30 °C. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.

Tempo (min)	Metanol	Acetonitrila	Isopropanol	Fase Aquosa
0	5	5	20	70
6	5	5,5	23,5	66
10	5	6	23,5	65,5
15	5	6	23,5	65,5

No entanto, como pode ser observado na **Figura 6**, ainda não foi possível obter a separação entre o par de kavalactonas MET e DHM, sendo então avaliada a influência da temperatura da coluna, do fluxo da fase móvel e do volume de injeção na separação desses analitos (**Tabela 13**).

Figura 6 – Cromatograma obtido pela análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD utilizando o gradiente A. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Volume de injeção: 10 μ L, comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 30 °C. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.

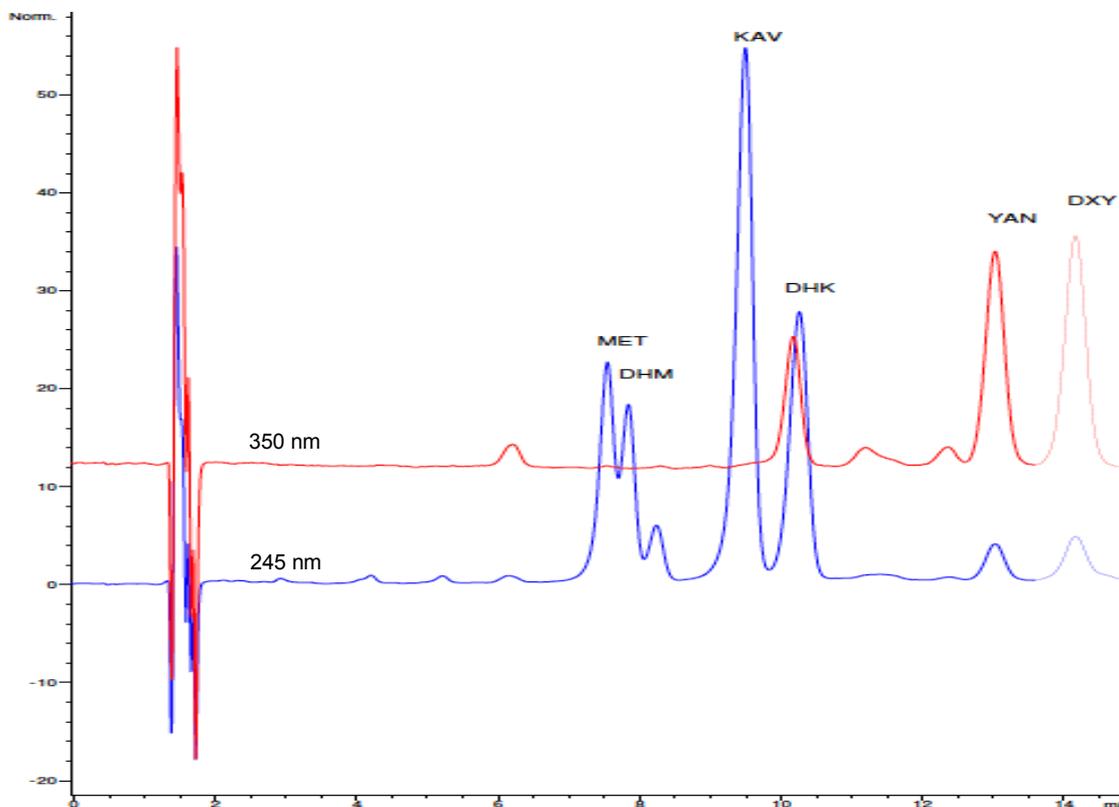


Tabela 13 – Condições avaliadas de temperatura da coluna, volume de injeção e fluxo da fase móvel em gradiente A. para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm.

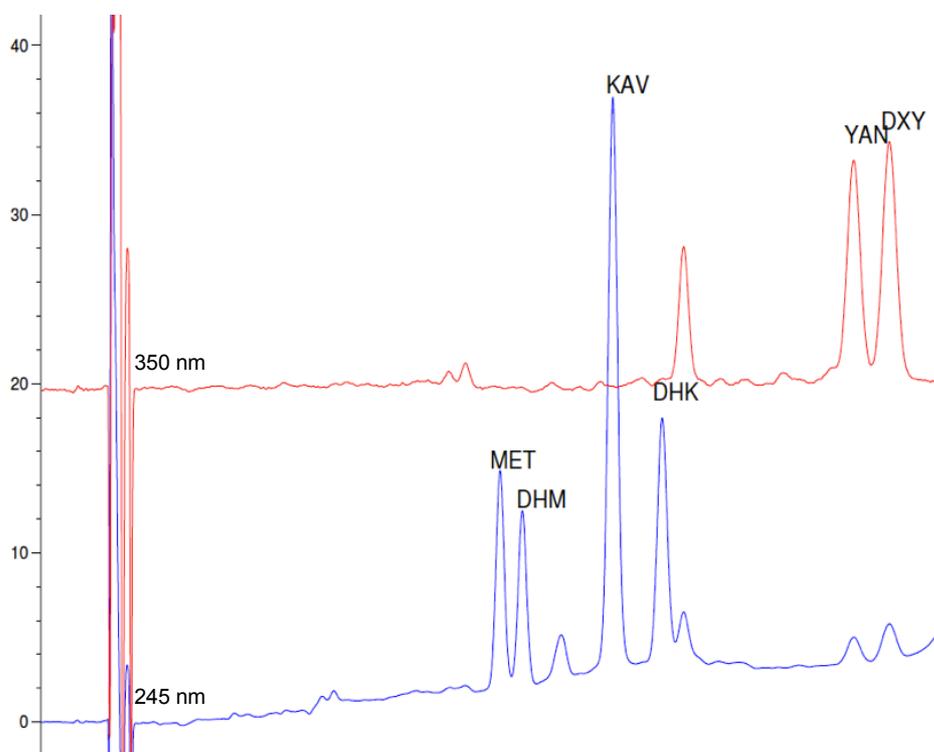
Condição	Temperatura (°C)	Volume de injeção (μ L)	Fluxo (mL/min)
1	30	10	1
2	40	10	1
3	40	20	0,8
4	40	20	1
5	45	10	1
6	50	10	1

Foi observado que a condição 4 apresentou os melhores resultados de separação das kavalactonas, porém, como estes permaneciam sem resolução aceitável para o par MET/DHM foram testadas outras proporções para a fase móvel. Dentre elas, o gradiente B (**Tabela 14**) resultou em uma melhor resolução para o par MET/DHM, porém ocorreu uma diminuição da resolução para o par YAN/DXY (**Figura 7**).

Tabela 14 – Condições de gradiente B para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 40°C. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.

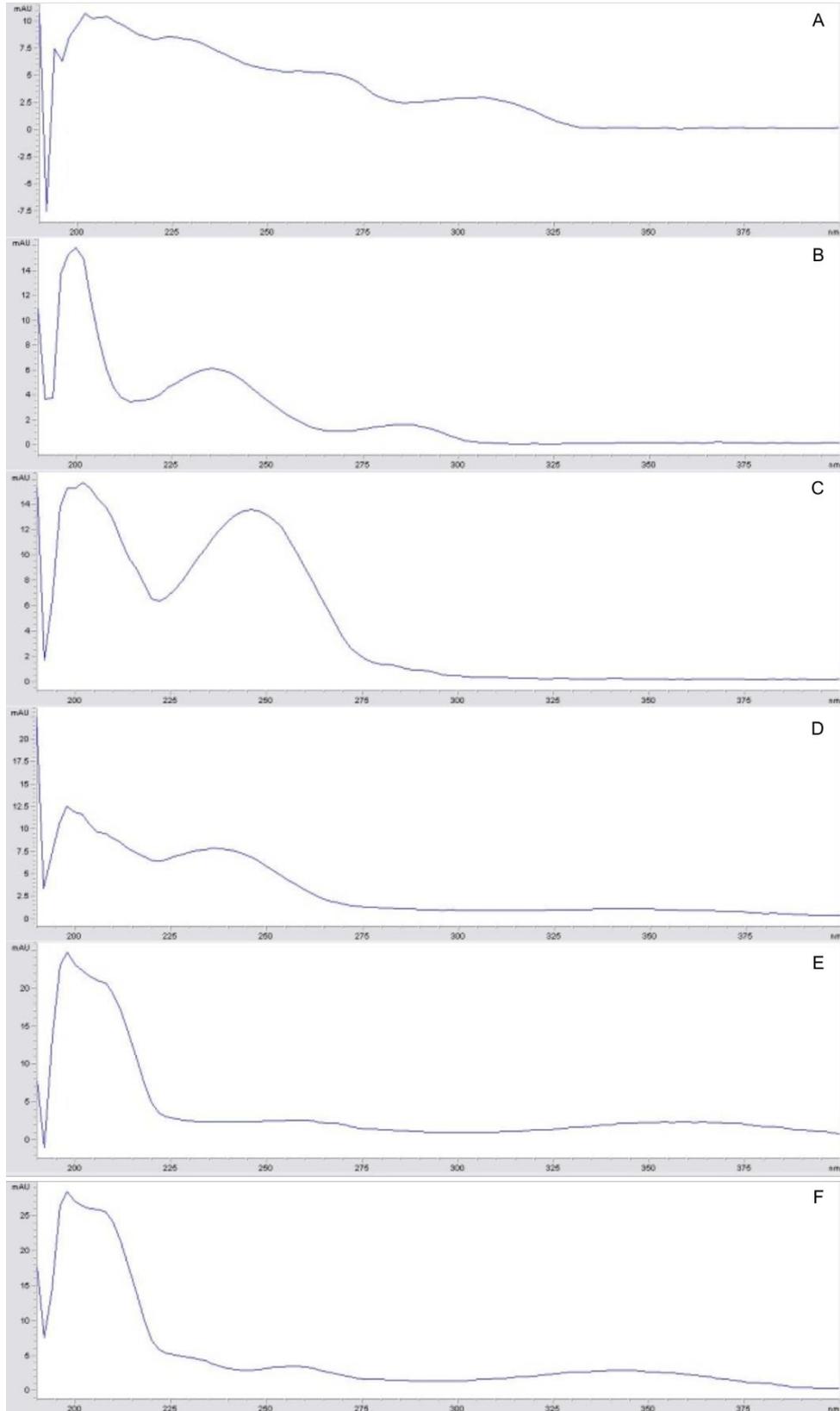
Tempo (min)	Metanol	Acetonitrila	Isopropanol	Fase Aquosa
0	8,2	8,2	13,6	70
10	10	10	15	65
15	10	10	15	65
20	10,5	10,5	16	63

Figura 7 – Cromatograma obtido pela análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD utilizando o gradiente B. Coluna cromatográfica: C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 40 °C. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.



A partir do gradiente B foi realizada a varredura na região do UV-Visível (190 a 400 nm) do padrão de cada kavalactona (concentração de 0,5 mg/mL) preparados em metanol, para a verificação do melhor comprimento de onda de detecção a ser utilizado no método em desenvolvimento. A partir destes resultados (**Figura 8**) foi possível averiguar que os pares MET/DHM e KAV/DHK eram mais bem detectados em 245 nm, enquanto que o par YAN/DXY apresentou melhores resultados em 350 nm.

Figura 8 – Espectros de varredura (190 – 400 nm) para as soluções dos padrões de metisticina (MET)^A, diidrometisticina (DHM)^B, kavaína (KAV)^C, diidro-kavaína (DHK)^D, yangonina (YAN)^E e desmetoxyyangonina (DXY)^F.



Em seguida, foi avaliado o uso de uma coluna CIANO para a análise das kavalactonas em estudo, utilizando o mesmo sistema CLAE-DAD. Para isto foram testadas condições semelhantes as que foram utilizadas com a coluna C18 (**Tabela 15**), além do gradiente B desenvolvido previamente. Como os resultados obtidos foram inferiores aos da coluna C18, optou-se por mantê-la ao longo das demais etapas do desenvolvimento do método analítico.

Tabela 15 – Condições avaliadas utilizando coluna CIANO (125 mm × 4 mm, 5µm) para análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,26 mg/mL em CLAE-DAD. Volume de injeção: 10 µL, comprimentos de onda de detecção: 245 e 350 nm, fluxo da fase móvel 1,0 mL/min. Fase aquosa: solução de ácido acético a 0,16% em água ultrapura.

Condição	Tempo (min)	Metanol	Acetonitrila	Isopropanol	Fase Aquosa
gradiente	0	-	10	-	90
exploratório	60	-	90	-	10
gradiente C	0	7	7	8	78
	30	11	11	12	66
isocrático	-	10	10	10	70
isocrático	-	11	11	15	63
isocrático	-	8	8	8	76

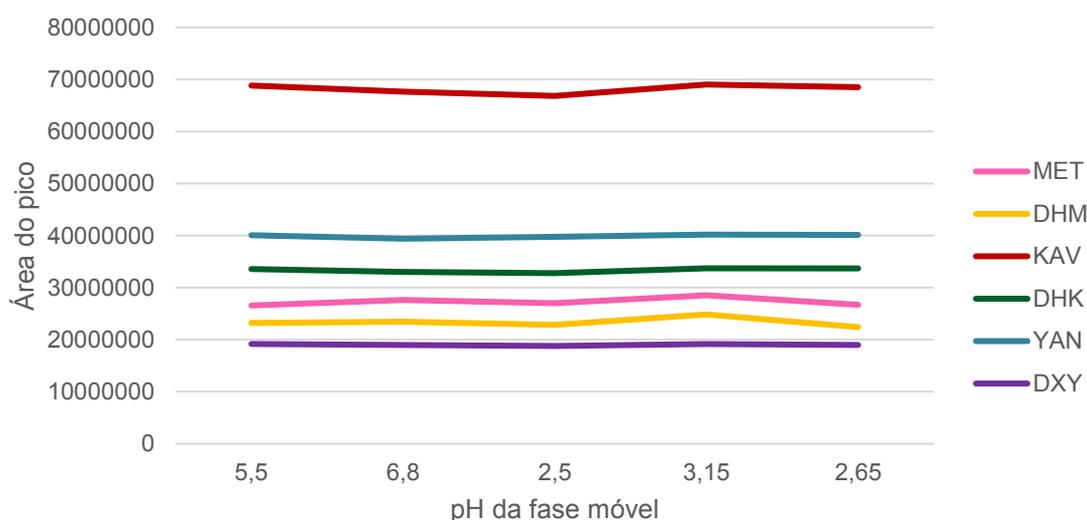
Ao longo da etapa de otimização foi observado que, independente das alterações na relação fase orgânica/aquosa realizadas, ainda era necessário cerca de 15 a 20 minutos de eluição em gradiente de maneira a se obter uma separação adequada entre os analitos, sendo que os tempos de retenção se iniciavam somente após metade da análise ter transcorrido. Além disso, constatou-se que em todas as eluições em gradiente avaliadas, os sinais cromatográficos referentes às kavalactonas em estudo se localizavam em tempos referentes a uma proporção de fase aquosa e fase orgânica de aproximadamente 66:34, respectivamente.

Em vista dessas observações, foram testados métodos com eluição isocrática mantendo essa proporção entre fase aquosa e orgânica, variando somente a porcentagem dos solventes orgânicos ou o pH da fase aquosa. Conforme pode ser observado (**Figura 2, Capítulo 1**), as estruturas de kavalactonas não possuem grupos ionizáveis, desse modo espera-se que não ocorram variações quantitativas, independente do valor de pH utilizado. De maneira a averiguar esta informação, foram

testadas diferentes condições para a fase aquosa do método até então desenvolvido. Sendo elas: solução de ácido fórmico a 0,16% (pH = 2,5), solução de ácido acético a 0,16% (pH = 3,15) e a 1,6% (pH = 2,65), água ultrapura de duas fontes diferentes (pH = 5,5 e 6,8).

Conforme pode ser observado na **Figura 9**, não ocorreu variação entre os valores de área para nenhuma das seis kavalactonas em relação a fase aquosa utilizada, confirmando que a variação no valor de pH da fase móvel não tem influência no método desenvolvido. Desse modo, optou-se por utilizar a água ultrapura como fase aquosa, devido tanto pela sua facilidade de obtenção quanto pelo menor impacto na coluna e no sistema cromatográfico como um todo.

Figura 9 – Relação entre a área do pico cromatográfico de cada kavalactona em relação ao pH da fase móvel.



Ao final dos testes realizados a respeito da proporção entre os solventes orgânicos utilizados, verificou-se que a proporção de metanol:acetonitrila:isopropanol em 07:09:18, respectivamente, foi a que apresentou melhores resultados na separação das seis kavalactonas em estudo.

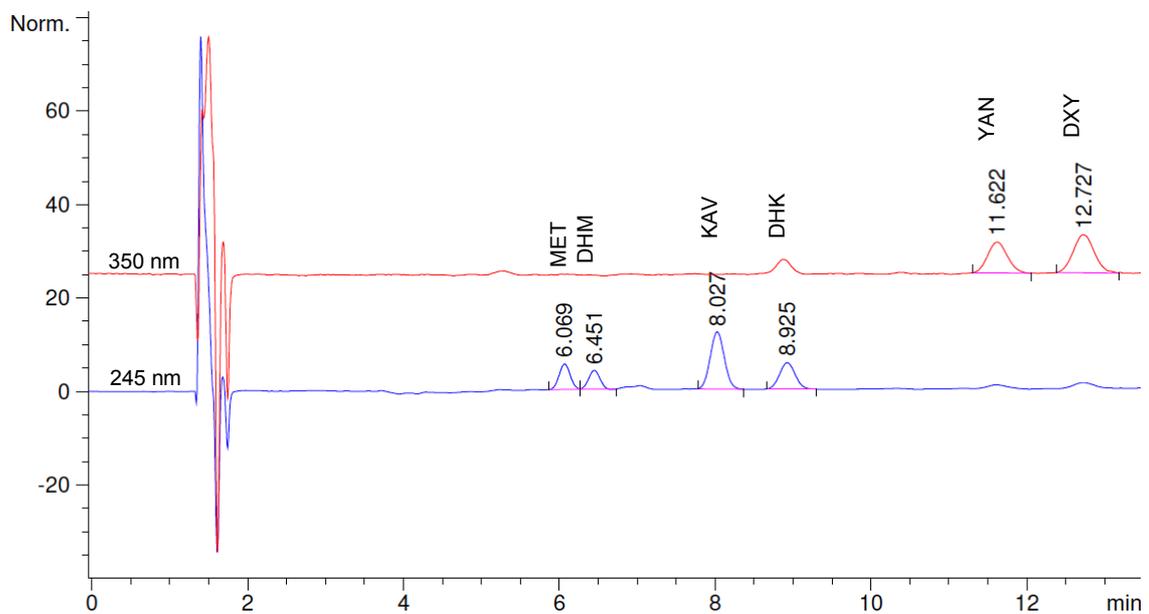
Nas **Tabelas 16** e **17** podem ser observadas os parâmetros e condições do método desenvolvido para a quantificação simultânea das principais kavalactonas em amostras de ESKs, além dos parâmetros de performance obtidos, respectivamente. Enquanto na **Figura 10** pode ser observado o cromatograma obtido pela análise de amostra de ESK a 0,15 mg/mL utilizando o método desenvolvido.

Tabela 16 – Parâmetros e condições do método analítico desenvolvido em CLAE-DAD.

Parâmetros	Condições otimizadas
Equipamento	Sistema CLAE-DAD 1200, Agilent®
Coluna cromatográfica	Agela Technologies® Innoval C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Modo de eluição	Isocrática
Fase móvel	Água ultrapura:metanol:acetonitrila:isopropanol (66:07:09:18)
Fluxo da fase móvel	1,0 mL/min
Temperatura da coluna	40 °C
Volume de injeção	10 µL
Comprimento de onda de detecção	245 e 350 nm
Tempo de corrida	15 min

Tabela 17 – Parâmetros de performance do método analítico desenvolvido em CLAE-DAD.

Analito	Tempo de retenção (min)	Resolução	Simetria	Fator de cauda	Número de pratos
MET	6,069	-	0,96	1,05	8531
DHM	6,451	1,43	1,02	0,99	9195
KAV	8,027	5,23	0,95	1,04	9334
DHK	8,925	2,57	0,94	1,05	9498
YAN	11,622	-	0,92	1,07	10016
DXY	12,727	2,31	0,94	1,04	10752

Figura 10 – Cromatograma obtido pela análise de amostra de extrato seco de Kava-kava a 0,15 mg/mL em CLAE-DAD utilizando o método desenvolvido.

Após a etapa de otimização dos parâmetros cromatográficos e de detecção, foi desenvolvido um método rápido e eficaz, utilizando CLAE-DAD com modo de eluição isocrático, capaz de quantificar simultaneamente as seis principais kavalactonas presentes nos ESKs etanólicos (MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY), com resolução adequada para todos os marcadores.

Dentre os trabalhos disponíveis na literatura a respeito da quantificação simultânea das seis principais kavalactonas, utilizando CLAE com detecção UV ou DAD, somente os estudos desenvolvidos por Jager e colaboradores e por Liu e colaboradores apresentaram resultados comparáveis aos obtidos neste estudo em relação ao tempo total de análise e à capacidade de separação dos analitos em questão (JAGER; PERFETTI; DIACHENKO, 2004; LIU et al., 2018). No entanto, mesmo com tempos de corrida semelhantes (15 e 16 minutos, respectivamente), em ambos os estudos foi necessário o emprego de eluição em gradiente, o que aumenta a complexidade do método quando comparado ao modo isocrático. Além disso, o estudo desenvolvido por Liu e colaboradores utilizou uma resolução de apenas 1,09 entre as kavalactonas MET e DHM, enquanto na análise feita por Jager, o pico referente a DHM não estava bem resolvido dos picos adjacentes não identificados. Em ambos os casos, a ausência de uma resolução efetiva entre os analitos pode ter influência direta na integração dos respectivos picos e, conseqüentemente, na sua quantificação.

Os demais trabalhos encontrados na literatura sobre o mesmo tema possuem tempo de análise superior ao deste estudo, independente do modo de eluição utilizado, variando entre 30 e 45 minutos (SHAO et al., 1998; GANZERA; KHAN, 1999; CÔTÉ et al., 2004; DENERY et al., 2004; BOBELDIJK et al., 2005; HU et al., 2005; GAUTZ et al., 2006; WARBURTON; NORRIS; GOENAGA-INFANTE, 2007). Além disso, com exceção dos estudos desenvolvidos por Côté, Hu e por Shao, todos os trabalhos apresentaram baixa resolução entre os analitos, principalmente entre o par MET/DHM.

3.4 Validação do método analítico para quantificação simultânea de YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM em ESKs por CLAE-DAD

A partir das recomendações da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e da IN nº 4, de 18 de junho de 2014 (BRASIL, 2014b) foi realizada a validação do método analítico desenvolvido para a quantificação simultânea das seis principais

kavalactonas: YAN, KAV, MET, DXY, DHK e DHM, em ESKs. Também foram levadas em consideração as orientações contidas nos guias *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* – Q2R1 (ICH, 1996) e *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals* (AOAC, 2003).

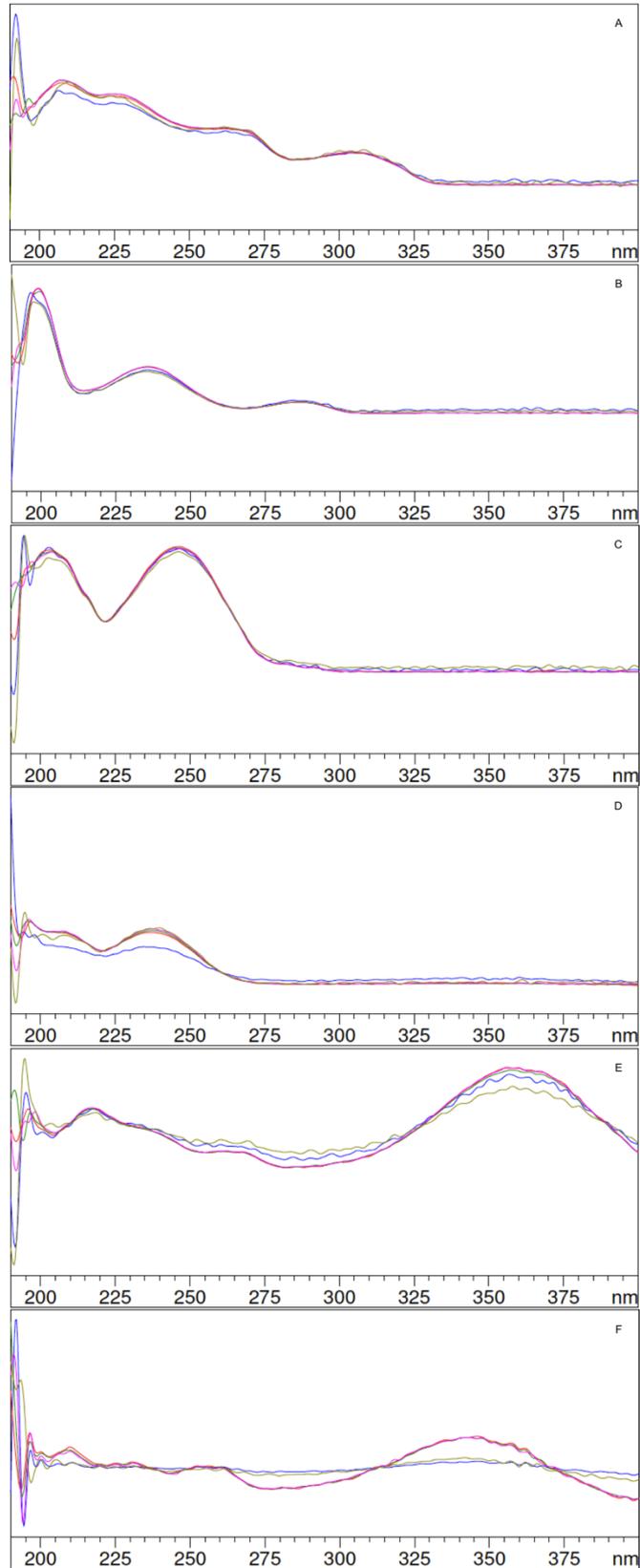
Sendo assim, foram avaliados: seletividade, linearidade da faixa de trabalho, efeito matriz, precisão, exatidão, limite inferior de quantificação e de detecção do método desenvolvido.

3.4.1 Seletividade

O método desenvolvido foi considerado seletivo, visto que, após a determinação do fator de pureza para os picos cromatográficos de cada um dos analitos observou-se que para todas as kavalactonas do estudo (MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY) os valores encontravam-se abaixo do limite de *threshold* calculado, indicando a pureza espectral dos picos de cada um dos analitos.

Além disso, é possível observar a semelhança entre os espectros obtidos durante a análise do fator de pureza (**Figura 11**), com os espectros de varredura das soluções dos padrões de MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY (**Figura 8**), um segundo fator indicativo da seletividade do método desenvolvido.

Figura 11 – Seleção automática de cinco espectros de varredura (190 – 400 nm) de solução de amostra de extrato seco de Kava-kava contendo as kavalactonas: metisticina^A, diidrometisticina^B, kavaína^C, diidrokaína^D, yangonina^E e desmetoxyyangonina^F.



3.4.2 Linearidade da faixa de trabalho

O modelo de regressão linear mais simples obtido para as seis kavalactonas analisadas foi $y = ax + b$, sendo y a resposta para a área do pico do analito em questão; a o coeficiente angular da reta; x o valor da concentração nominal do analito; b o coeficiente linear. Para nenhuma das kavalactonas deste estudo foi necessário utilizar fator de ponderação.

Em seguida, foi feita a avaliação das premissas estatísticas sobre os dados obtidos a partir da curva de calibração de cada uma das kavalactonas avaliadas. Todas as kavalactonas apresentaram normalidade e independência dos resíduos, por meio dos testes de Ryan-Joiner e Durbin-Watson, respectivamente. Por meio do teste de Levene modificado por Brown e Forsythe, juntamente com a distribuição aleatória observada visualmente nos gráficos de resíduos (**Figura 12**), comprovou-se a homocedasticidade dos resíduos.

Após a comprovação das premissas estatísticas, avaliou-se o desvio da linearidade e a significância da regressão das curvas de calibração por ANOVA, sendo que para todas as kavalactonas avaliadas, as regressões foram consideradas significativas e sem desvio de linearidade. As faixas de trabalho, juntamente com as respectivas equações da reta e valores de coeficiente de determinação (r^2), obtidos durante a validação para cada uma das kavalactonas avaliadas neste estudo, estão representados na **Tabela 18**. Os gráficos das curvas de calibração resultantes da avaliação da linearidade e os valores de concentração obtidos a partir das curvas para cada nível estão representados na **Figura 13** e na **Tabela 19**.

Tabela 18 – Equações da reta e valores dos coeficientes de determinação obtidos durante a validação das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxiyangonina (DXY).

Kavalactona	Faixa de trabalho ($\mu\text{g/mL}$)	Equação da reta	r^2
MET	0,98 – 1,96	$y = 44,53x - 18,7275$	0,9996
DHM	0,59 – 2,52	$y = 26,81x - 2,8595$	0,9999
KAV	0,55 – 2,52	$y = 85,13x - 10,1109$	0,9999
DHK	7,74 – 23,52	$y = 4,63x + 23,2537$	0,9996
YAN	0,28 – 1,29	$y = 53,68x - 2,1106$	0,9997
DXY	0,28 – 0,67	$y = 75,42x - 0,1525$	0,9983

Figura 12 – Distribuição dos resíduos obtida para cada nível de concentração das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY).

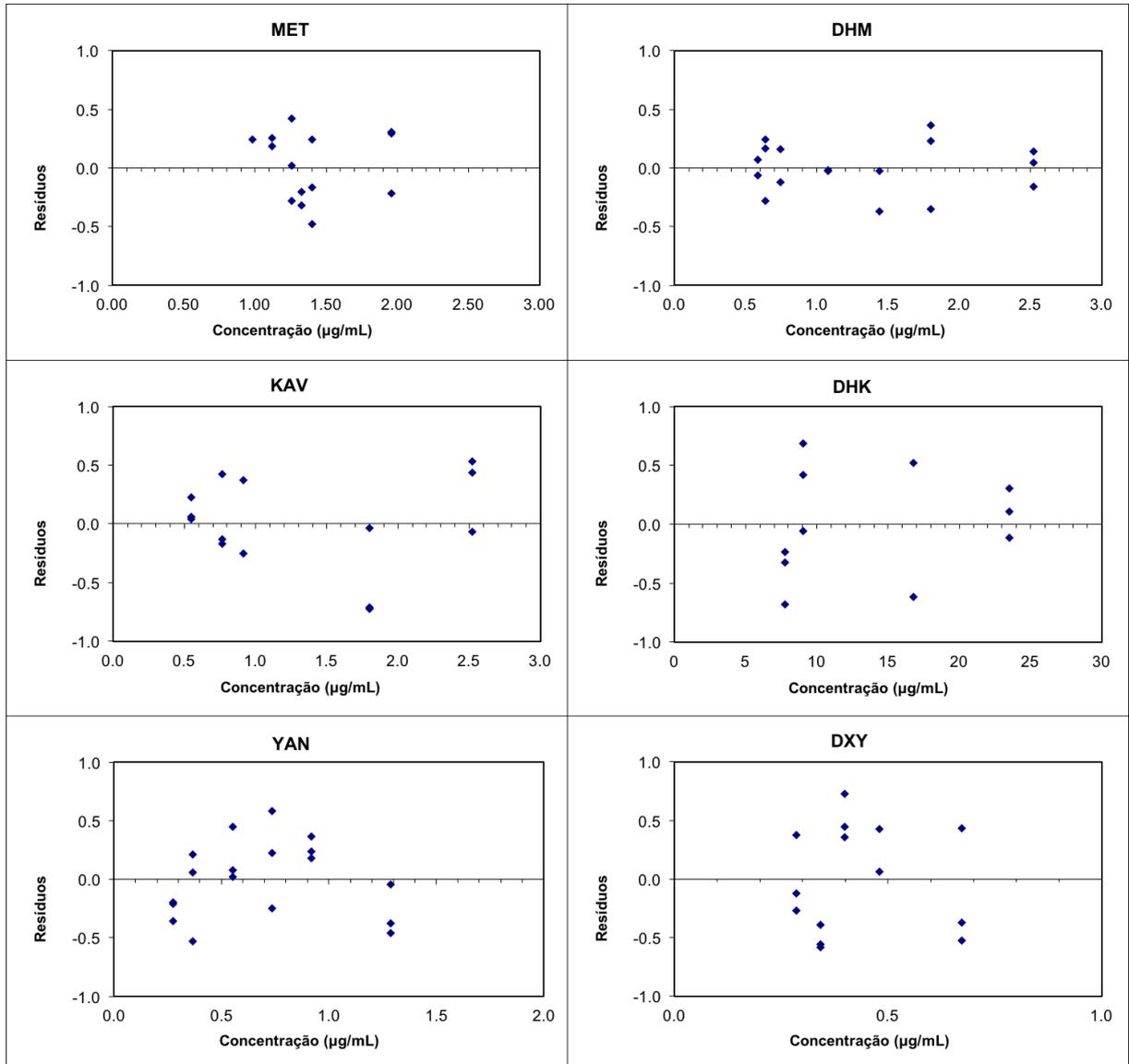


Figura 13 – Curvas de calibração obtidas para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyyangonina (DXY).

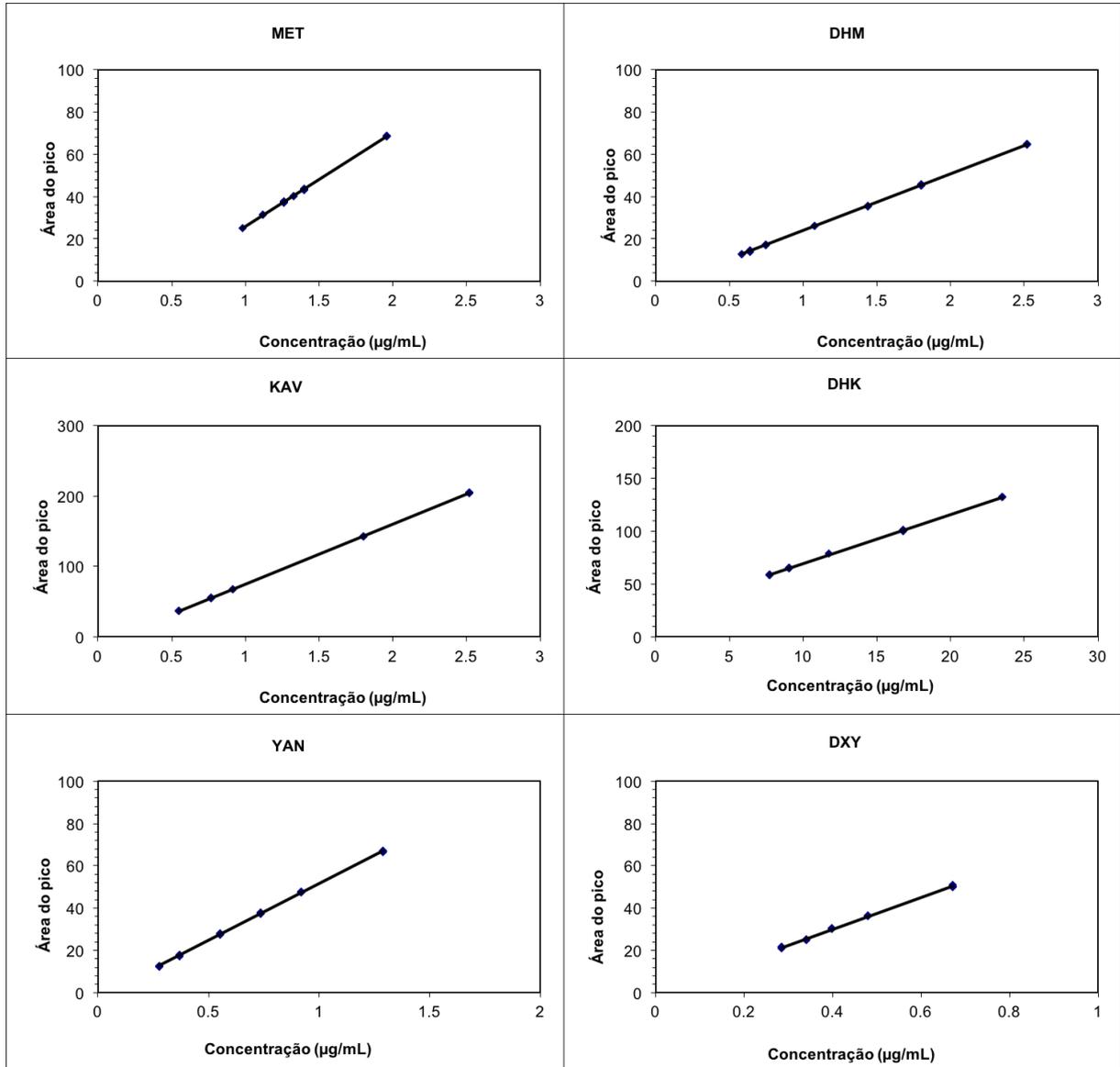


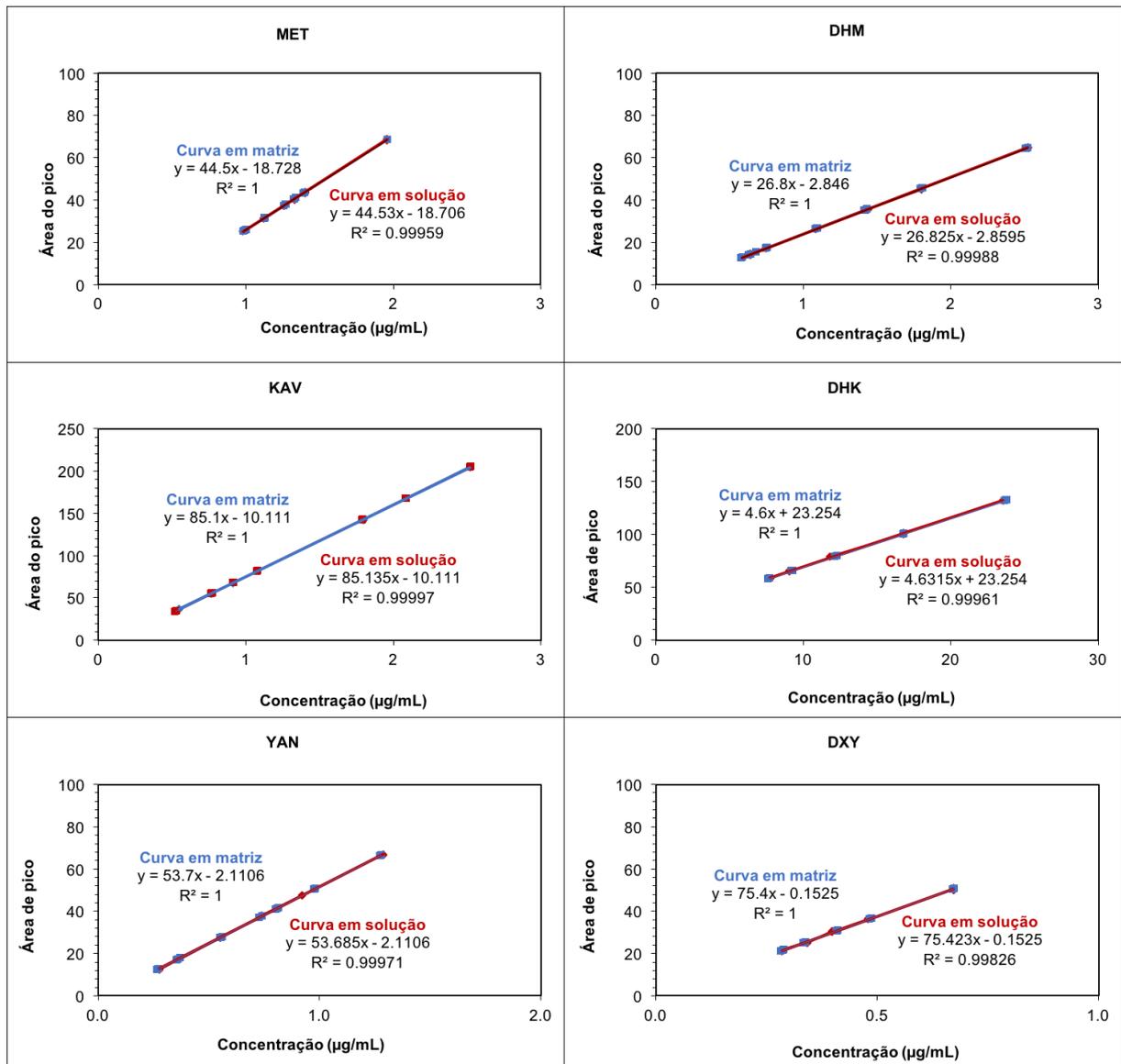
Tabela 19 – Dados obtidos a partir das curvas de calibração das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY); valores médios obtidos para as replicatas de cada ponto.

MET			DHM		
Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Desvio (%)	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Desvio (%)
0,980	0,985	0,55	0,586	0,578	-1,38
1,120	1,125	0,44	0,639	0,641	0,23
1,260	1,261	0,10	0,746	0,754	1,09
1,329	1,323	-0,44	1,080	1,087	0,61
1,400	1,397	-0,21	1,440	1,427	-0,88
1,959	1,962	0,15	1,800	1,803	0,15
			2,520	2,520	0,01
KAV			DHK		
Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Desvio (%)	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Desvio (%)
0,549	0,550	0,24	7,745	7,156	-1,12
0,768	0,768	0,07	9,033	9,112	0,86
0,913	0,914	0,08	11,760	11,984	-1,90
1,799	1,794	-0,31	16,978	16,723	-0,45
2,520	2,523	0,15	23,521	23,550	0,12
YAN			DXY		
Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Desvio (%)	Concentração Teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Desvio (%)
0,276	0,271	-1,69	0,285	0,285	-0,04
0,368	0,366	-0,43	0,341	0,335	-1,97
0,552	0,555	0,62	0,398	0,405	1,71
0,736	0,740	0,49	0,480	0,483	0,69
0,920	0,925	0,54	0,672	0,670	-0,32
1,288	1,283	0,42			

3.4.3 Efeito matriz

Com os resultados obtidos por meio do teste *F*, observou-se a existência de heteroscedasticidade entre as variâncias dos desvios das curvas em solução e matrizada. Em seguida, foram feitas as comparações entre as inclinações e interseções das curvas a partir do teste *t* com variâncias distintas. Os resultados obtidos demonstraram o paralelismo e a equivalência entre os valores obtidos para a curva matrizada em relação aos analitos em solução, indicando ausência de interferência dos constituintes da matriz vegetal (**Figura 14**).

Figura 14 – Curvas de calibração em solução e em matriz obtidas para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY).



3.4.4 Precisão e exatidão

O método analítico foi considerado preciso e exato para as kavalactonas: MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY, visto que todos os valores de CV% obtidos foram inferiores a 15% (BRASIL, 2014c) e os valores médios de recuperação estão dentro do intervalo preconizado de 92 – 105% (AOAC, 2003), como podem ser observados nas **Tabelas 20 e 21**.

Tabela 20 – Valores de coeficiente de variação (CV%) para repetibilidade e precisão intermediária obtidos em duas corridas: dias diferentes com analistas diferentes, para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY).

Corrida	MET	DHM	KAV	DHK	YAN	DXY
1 (CV%)	2,99	1,43	10,55	12,01	4,65	2,83
2 (CV%)	4,65	4,01	11,55	13,74	11,95	3,28
CV% precisão intermediária	4,63	3,01	11,01	13,26	9,51	3,11

Tabela 21 – Valores de coeficiente de variação (CV%) e recuperação (%) obtidos durante a avaliação da exatidão para as kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidro-kavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY).

Nível	CV%					
	MET	DHM	KAV	DHK	YAN	DXY
CQB	2,64	1,61	0,75	1,43	1,75	3,44
CQM	2,18	2,44	0,69	1,21	2,03	2,93
CQA	0,23	2,17	0,92	1,49	1,52	3,17
Nível	Recuperação %					
	MET	DHM	KAV	DHK	YAN	DXY
CQB	107,90	101,04	99,47	101,41	95,27	98,16
CQM	102,45	102,58	95,22	96,11	100,12	101,30
CQA	103,63	100,55	99,62	100,03	94,73	95,69
Média	104,66	101,39	98,10	99,18	96,71	98,38

3.4.5 Limites de quantificação e detecção

De acordo com a as curvas de calibração obtidas durante a avaliação da linearidade do método, determinou-se que os LIQ para as kavalactonas avaliadas, conforme pode ser observado na **Tabela 22**. Os valores obtidos para todas as kavalactonas foram menores do que os observados nos trabalhos de LIU, HU, GANZERA e SHAO, neste último com exceção da DHK que apresentou valor de LIQ de 5 µg/mL (SHAO et al., 1998; GANZERA; KHAN, 1999; HU et al., 2005; LIU et al., 2018). Os resultados demonstram que o método analítico desenvolvido apresenta sensibilidade adequada para quantificar as seis kavalactonas nas faixas de concentração propostas.

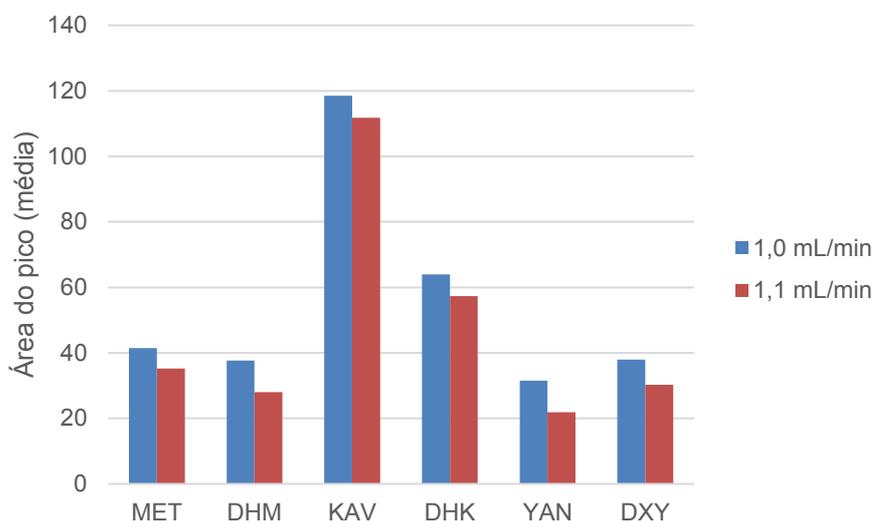
Tabela 22 – Valores de concentração (µg/mL) para os limites inferiores de quantificação (LIQ) e de detecção (LD) para as kavalactonas metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyyangonina (DXY), determinados na validação.

Kavalactona	LIQ (µg/mL)	LD (µg/mL)
MET	0,98	0,006
DHM	0,59	0,005
KAV	0,55	0,006
DHK	7,74	0,268
YAN	0,28	0,006
DXY	0,28	0,009

3.4.6 Robustez

O método desenvolvido foi considerado robusto para as variações dos parâmetros: fluxo (0,9 mL/min), temperatura do forno da coluna (39 e 41 °C) e pH da fase móvel (5,5 e 7,5), visto que não foram obtidas alterações estatisticamente significativas nas áreas dos picos ($P < 0,05$) nestas condições. No entanto, para todas as kavalactonas avaliadas neste estudo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) quando o fluxo do método desenvolvido foi alterado de 1,0 para 1,1 mL/min. Quando foi utilizado fluxo de 1,1 mL/min ocorreu uma redução dos valores de área quando comparada ao fluxo de 1,0 mL/min (**Figura 15**), sendo necessário o controle deste parâmetro de maneira a garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Essa redução ocorreu devido ao aumento do sinal cromatográfico, acarretando na perda de resolução entre os analitos e, conseqüentemente, diminuição da área do pico integrável.

Figura 15 – Comparação dos valores médios de área do pico das kavalactonas, metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokavaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyyangonina (DXY), obtidos para amostra de ESK após análise com o método analítico utilizando fluxos de 1,0 e 1,1 mL/min.



2.3 Determinação do teor de kavalactonas em amostras de ESK

Estão discriminados na **Tabela 23** os valores médios de teor obtidos para cada kavalactona presente nas amostras de ESK, assim como o valor total das seis kavalactonas avaliadas neste estudo, empregando o método analítico desenvolvido e validado. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que o conteúdo de kavalactonas variou consideravelmente entre as amostras analisadas, mesmo quando essas eram provenientes do mesmo lote de fornecedor (amostras 6/7 e 10/11) e até mesmo do mesmo lote de fabricação (amostras 6/7/8, 10/11 e 14/15/16). Esse resultado pode indicar diferenças no modo de transporte e armazenamento tanto do fabricante e do fornecedor quanto da própria farmácia de manipulação, que podem estar relacionadas a processos de degradação dos componentes do extrato, além de demonstrar a importância de uma metodologia confiável para a quantificação dos marcadores nos extratos.

Tabela 23 – Valores de teor (média±DPR %) individual e total das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), presentes nas amostras de extrato seco de Kava-kava, após quantificação utilizando método analítico desenvolvido e validado para as seis kavalactonas em estudo.

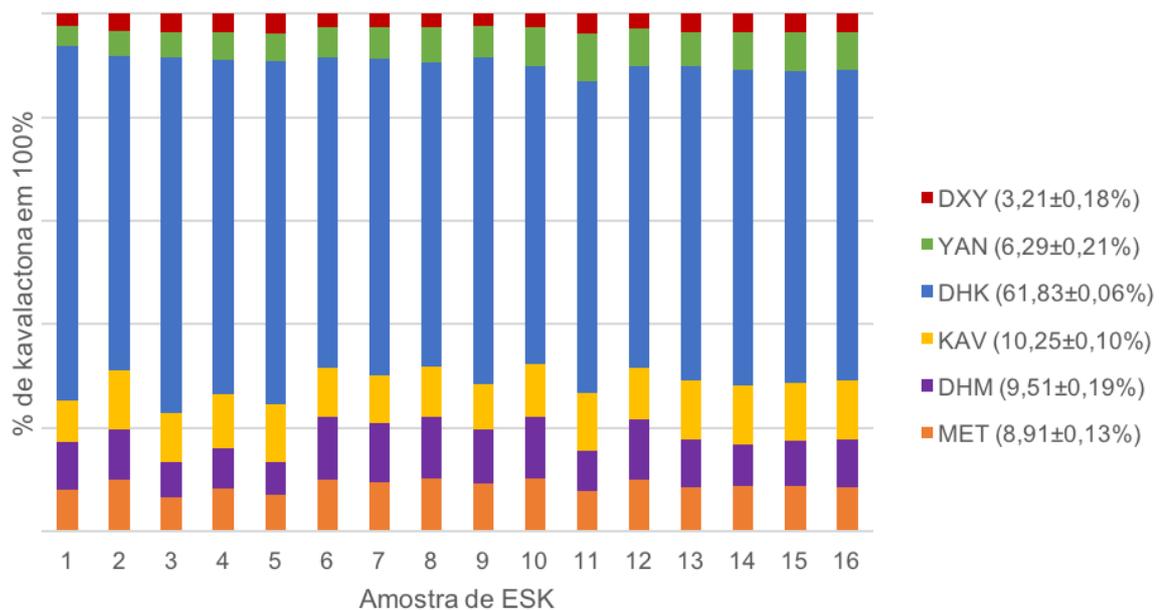
Amostra	Valores de teor (média ± DPR %)						
	MET	DHM	KAV	DHK	YAN	DXY	Total
1	1,36±0,01	1,54±0,05	1,33±0,01	11,43±0,01	0,62±0,03	0,41±0,04	16,70±0,00
2	1,14±0,03	1,08±0,01	1,30±0,01	6,85±0,05	0,53±0,02	0,39±0,01	11,30±0,03
3	2,54±0,02	2,62±0,04	3,64±0,02	26,49±0,01	1,84±0,02	1,41±0,02	38,54±0,01
4	3,92±0,03	3,60±0,07	4,88±0,00	30,02±0,06	2,51±0,02	1,66±0,04	46,60±0,03
5	2,31±0,02	2,09±0,03	3,62±0,01	21,61±0,02	1,75±0,01	1,22±0,03	32,61±0,01
6	4,74±0,01	5,64±0,02	4,45±0,01	28,13±0,03	2,71±0,02	1,22±0,02	46,89±0,02
7	4,92±0,01	5,82±0,09	4,77±0,00	31,37±0,01	3,21±0,01	1,32±0,03	51,42±0,01
8	4,84±0,01	5,64±0,08	4,61±0,01	27,81±0,02	3,25±0,02	1,28±0,02	47,43±0,01
9	4,76±0,01	5,29±0,05	4,48±0,02	32,28±0,03	3,10±0,03	1,21±0,02	51,11±0,01
10	4,88±0,02	5,58±0,11	4,70±0,00	27,08±0,02	3,44±0,01	1,28±0,02	46,95±0,02
11	1,01±0,03	1,03±0,07	1,44±0,01	7,87±0,03	1,18±0,03	0,52±0,03	13,05±0,02
12	5,27±0,01	6,02±0,01	5,18±0,00	30,21±0,01	3,78±0,02	1,48±0,02	51,94±0,01
13	1,00±0,02	1,09±0,04	1,33±0,01	7,10±0,03	0,75±0,01	0,43±0,04	11,71±0,02
14	1,17±0,01	1,08±0,01	1,51±0,01	8,11±0,02	0,95±0,01	0,48±0,02	13,31±0,01
15	0,96±0,01	0,97±0,01	1,22±0,01	6,59±0,02	0,82±0,01	0,40±0,02	10,97±0,02
16	0,93±0,02	0,99±0,02	1,21±0,00	6,46±0,02	0,76±0,03	0,40±0,01	10,74±0,02

A legislação indica que o consumo do extrato seja feito na dosagem de 200 mg de kavalactonas, três vezes ao dia, a partir de extratos contendo 30% de kavalactonas. Sendo permitida uma variação de 15% no teor de marcadores no extrato, são aceitos valores entre 25,5 e 34,5% de kavalactonas (BRASIL, 2014a,b; MEMENTO, 2016). Conforme pode ser observado na **Tabela 23**, somente o extrato 5 apresentou valor total de kavalactonas em acordo com o preconizado pela legislação vigente.

A partir dos resultados obtidos para a quantificação simultânea das seis principais kavalactonas (MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY) presentes nas amostras de ESK, utilizando o método validado, foi possível avaliar também a porcentagem desses marcadores nos extratos analisados em função do valor de teor total de cada amostra (**Figura 16**). Os valores médios de porcentagem individuais obtidos a partir da análise de 16 amostras de ESK juntamente com os baixos valores de DPR, indicam um perfil

de distribuição semelhante desses analitos, mesmo quando há variação de amostra, fabricante, fornecedor, lotes e processos de armazenamento/transporte.

Figura 16 – Porcentagem das kavalactonas metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), juntamente com o valor de média±DPR, presentes nas amostras de extrato seco de Kava-KAVA (ESK), em função do valor de teor de kavalactonas total.



Como pode ser observado na **Figura 16**, em todas as amostras analisadas a DXY é a substância presente em menor proporção e, apesar de relatos da literatura indicarem que a KAV é a kavalactona presente em maior quantidade (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002), a DHK apresentou-se em maior proporção, correspondendo a mais de 50% do teor total de kavalactonas. Esse resultado também foi observado por outros autores, em que amostras a base do rizoma de kava-kava obtiveram maiores valores de DHK do que de KAV, assim como a DXY presente em menor quantidade que os demais marcadores (GANZERA; KHAN, 1999; HU et al., 2005; LHUISSIER et al., 2017).

Em seguida, os valores de teor para as kavalactonas em estudo foram novamente calculados, utilizando somente a KAV como padrão em função dos seus valores de área, conforme metodologia para quantificação de kavalactonas informada na monografia do extrato de kava-kava da OMS (WHO, 2004). Como pode ser observado na **Tabela 24**, os valores de teor obtidos foram consideravelmente diferentes de

quando os seis padrões foram utilizados na validação, com variações entre 7,24 a 39,62% do teor total.

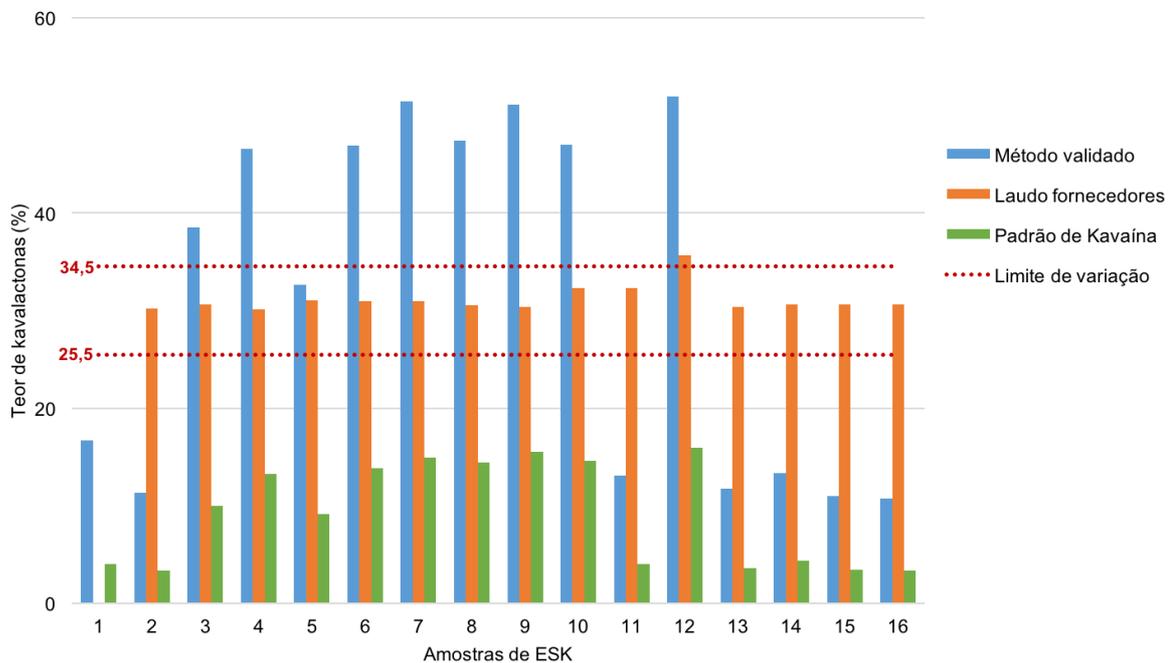
Tabela 24 – Valores médios de teor (%) individual e total das kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), presentes nas amostras de extrato seco de Kava-kava, após quantificação utilizando método analítico desenvolvido e validado somente para KAV, assim como a diferença obtida pela comparação dos valores de teor total empregando o método validado para as seis kavalactonas e somente para KAV.

Amostra	Valores de teor (%)						Total	Diferença (%)
	MET	DHM	KAV	DHK	YAN	DXY		
1	0,47	0,50	1,33	0,91	0,41	0,40	4,03	12,66
2	0,41	0,34	1,30	0,61	0,34	0,37	3,38	7,92
3	1,01	0,81	3,64	2,00	1,19	1,32	9,97	28,58
4	1,60	1,12	4,88	2,46	1,62	1,56	13,24	33,36
5	0,89	0,64	3,62	1,72	1,13	1,14	9,14	23,47
6	1,92	1,83	4,45	2,67	1,78	1,18	13,83	33,07
7	2,01	1,88	4,77	2,84	2,12	1,27	14,88	36,53
8	1,97	1,82	4,61	2,64	2,15	1,23	14,42	33,00
9	2,08	1,64	4,48	4,17	1,99	1,14	15,49	35,62
10	1,98	1,80	4,70	2,59	2,28	1,23	14,59	32,36
11	0,41	0,32	1,44	0,64	0,75	0,48	4,04	9,01
12	2,19	1,93	5,18	2,75	2,49	1,42	15,96	35,98
13	0,40	0,34	1,33	0,60	0,49	0,41	3,57	8,14
14	0,43	0,33	1,51	1,01	0,62	0,46	4,36	8,94
15	0,38	0,30	1,22	0,58	0,53	0,38	3,40	7,57
16	0,36	0,31	1,21	0,57	0,50	0,38	3,32	7,42

Essa grande variação entre os resultados obtidos pode estar relacionada a diferenças na absorvidade das kavalactonas analisadas na região do ultravioleta (**Figura 9**). Como a KAV é a kavalactona que apresenta maior absorvidade em 245 nm, sua utilização como padrão de referência único leva à subestimação do teor das demais kavalactonas. Assim, a utilização de somente um marcador padrão durante a validação não é uma abordagem adequada para esse tipo de análise, visto que os resultados de teor obtidos não correspondem ao teor real de cada marcador na amostra, podendo comprometer a avaliação da qualidade dos extratos e sua relação com a atividade farmacológica apresentada.

Como pode ser observado na **Figura 17**, quando somente o padrão de KAV foi utilizado para a quantificação das kavalactonas, nenhuma das amostras analisadas obteve valor de teor total dentro da faixa permitida para ESK, de acordo com a legislação (entre 25,5 e 34,5%) (BRASIL, 2014b). Já ao ser utilizada a metodologia validada para as seis principais kavalactonas, somente uma amostra apresentou-se dentro da faixa de limite de teor permitido, em comparação às 14 previamente aprovadas em função dos laudos dos fornecedores de cada amostra. De acordo com os laudos, todas as amostras de ESK se tratavam de extratos contendo 30% de kavalactonas, no entanto, não haviam informações referentes às metodologias de análise utilizadas para esta determinação, sendo informado apenas que eram provenientes do próprio fabricante ou de laboratórios terceirizados.

Figura 17 – Valores de teor total de kavalactonas: metisticina (MET), diidrometisticina (DHM), kavaína (KAV), diidrokaína (DHK), yangonina (YAN) e desmetoxyangonina (DXY), presentes nas amostras de extrato seco de Kava-kava (ESK), de acordo com o método analítico utilizado para quantificação. Os limites de variação de teor preconizados pela legislação estão demonstrados pelas linhas vermelhas pontilhadas (BRASIL, 2014b).



As kavalactonas avaliadas neste estudo (MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY) são consideradas os marcadores ativos da planta, ou seja, têm relação direta com efeito terapêutico (BRASIL, 2014b). A ausência de uma metodologia única e oficial para a quantificação desses marcadores em extratos de kava-kava pode levar a variações significativas nas formulações disponíveis no mercado. Visto que, a dose diária deve ser de 200 mg, três vezes ao dia, para o extrato contendo 30% de kavalactonas (BRASIL, 2014a; MEMENTO, 2016), variações nos valores de teor das formulações, decorrentes de diferenças nas metodologias analíticas, podem alterar significativamente o perfil de eficácia, além da segurança do tratamento.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Por meio de doações realizadas por farmácias de manipulação localizadas em Montes Claros e em Belo Horizonte, ambas em Minas Gerais, foi possível obter uma amostragem representativa da variabilidade encontrada no mercado, visto que dentre as ESKs doadas encontram-se diferentes farmácias, fornecedores, lotes, teor e parte da planta utilizada durante o processo de extração.

Um método analítico rápido e eficaz foi desenvolvido e validado para a quantificação simultânea dos marcadores ativos: MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY, presentes em extratos de kava-kava, utilizando um sistema CLAE-DAD. A partir da revisão de literatura realizada, sugere-se que, essa foi a primeira vez que o efeito matriz foi avaliado durante a validação, não sendo encontrados relatos da avaliação deste parâmetro.

O método desenvolvido e validado foi aplicado em amostras de extratos de kava-kava provenientes de farmácias de manipulação. A alta variabilidade evidenciada nos teores de kavalactonas indica a necessidade de melhor padronização e controle dos ESK utilizados como produtos farmacêuticos, de forma a garantir um perfil de eficácia e segurança adequado no tratamento.

A partir da análise de amostras de extrato de kava-kava foi possível observar um perfil de distribuição semelhante das kavalactonas avaliadas neste estudo, mesmo dentro da grande variabilidade encontrada no mercado. Sendo a DHK o mercador presente em maior quantidade.

Ao comparar o método desenvolvido utilizando os seis padrões de kavalactonas com o método validado somente para a KAV, foi observada uma grande diferença entre os valores de teor, demonstrando novamente a necessidade de um método padronizado para sua quantificação.

O método desenvolvido e validado pode ser aplicado por laboratórios produtores de derivados vegetais e fitoterápicos, de forma a contribuir para avaliação da qualidade dos ESK atualmente comercializados.

CAPÍTULO 3
AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DA KAVAÍNA ISOLADA E EM EXTRATO
SECO DE KAVA-KAVA

1. MATERIAIS

1.1 Insumos

- Padrão analítico: D,L-Kavaína (Sigma-Aldrich – Suíça), pureza 100%, lote BCBG5132V; Rac-kavaína-d3 (Toronto Research Chemicals – Canadá);
- Extrato seco de kava-kava (ESK) comercial contendo 30% de kavalactonas: Natural Factors Stress-Relax[®] (Coqitlam – Canadá);
- Amostra de ESK número 4

1.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com peso entre 25 e 30 g (aproximadamente 42 dias), fornecidos pelo biotério da FaFar/UFMG. Durante todo o estudo, os animais foram mantidos em condições ambientais controladas: ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada de 27 ± 1 °C (zona de termoneutralidade de roedores), ração e água disponibilizada *ad libitum*. O protocolo experimental está de acordo com as normas nacionais e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFMG, certificado nº 58/2017 (**ANEXO A**).

1.3 Reagentes e acessórios

Água, acetonitrila, isopropanol e metanol, grau LC/MS; ácido fórmico grau analítico; água ultrapura; solução NaCl 0,9%, heparina, tubos de polipropileno, filtros para seringa de membrana de Nylon, com tamanho de poro de 0,45 µm.

1.4 Coluna cromatográfica

Agela Technologies[®] Innoval C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex[®] – EUA).

1.5 Equipamentos e instrumentos

Sistema CLAE-EM/EM composto por cromatógrafo Agilent 1260 acoplado com espectrômetro de massas AB Sciex 4000 híbrido, do tipo triplo quadrupolo *ion trap* linear (QqQ-LIT), equipado com interface Turboionspray[™]. O equipamento continha o software Biosystems/MDS Sciex Analyst, versão 1.6.2).

Balança analítica Mettler Toledo XP6, com precisão de 0,001 mg; centrífuga VWR[™] micro 18R; freezer VWR[™]; micropipetas Eppendorf; refrigerador Thermo Scientific Forma série 900.

2. MÉTODOS

Os ensaios referentes a experimentação animal foram realizados no Laboratório de Farmacologia da FaFAR-UFMG, em parceria com o Professor Renes de Resende Machado e o doutorando Alyson Vinícius Braga. Os ensaios referentes ao desenvolvimento, validação e aplicação do método bioanalítico foram realizados no College of Pharmacy and Nutrition da University of Saskatchewan, Saskatoon/Saskatchewan/Canadá, em parceria com o Professor Anas El-Aneed.

2.1 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos por CLAE-EM/EM

O desenvolvimento do método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos, utilizando sistema CLAE-EM/EM, foi composto pela determinação dos parâmetros espectrométricos, cromatográficos e de preparo de amostra, sendo utilizadas amostras de plasma branco de camundongo durante esta etapa. Devido à complexidade dos procedimentos de preparo de amostra biológica foi adotada a técnica de padronização interna, utilizando substância com estrutura, característica físico-química e tempo de retenção semelhantes aos da KAV, que não reaja com componentes da matriz ou com o analito e que não esteja presente na matriz das amostras (NIESSEN, 2006).

2.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos

Inicialmente, foi realizada a otimização dos parâmetros espectrométricos para a detecção da KAV no EM por meio de infusões diretas, a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, de soluções do padrão de KAV e do padrão interno (PI) em metanol. Os seguintes parâmetros de fonte foram otimizados: temperatura da fonte, voltagem do *ion spray*, gás de cortina, nebulização e evaporação; e relacionados ao composto: íon precursor, transições de massas (íon precursor – íon produto), *declustering potential*, potencial de entrada, energia de colisão, gás de colisão e *collision exit potential*.

2.1.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos

De maneira a obter um método simples e rápido para a quantificação de KAV em amostras biológicas, foi realizada a otimização dos parâmetros cromatográficos, tendo como base o método analítico previamente desenvolvido e validado para a quantificação simultânea das kavalactonas MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY

(**Capítulo 2**). Foram realizados ajustes na proporção e no fluxo da fase móvel, assim como no volume de injeção, sendo também avaliados os modos de eluição isocrático e gradiente. A adição de solução ácida a fase móvel foi avaliada de maneira a favorecer a ionização da KAV no modo positivo.

Durante esta etapa de otimização, utilizou-se solução de ESK comercial, em metanol, para realização dos testes.

2.1.3 Determinação dos parâmetros de preparo de amostra

A última etapa do desenvolvimento do método bioanalítico consistiu na determinação dos parâmetros de preparo de amostra, visando a obtenção de uma técnica de extração eficiente do analito presente na amostra biológica com baixos índices de efeito matriz.

Dois solventes orgânicos, acetonitrila e metanol, foram avaliados como solventes precipitantes tanto em amostra de plasma branco quanto em amostra fortificada com o ESK comercial. No procedimento, o solvente era adicionado à amostra biológica na proporção de 3:1 (solvente:plasma), seguido de agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante era então coletado e filtrado para vials âmbar utilizando seringas com filtro de membrana de celulose de 0,45 µm.

2.2 Validação de método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos por CLAE-EM/EM

O método desenvolvido foi validado de acordo com os guias para validação de método bioanalítico do *Food and Drug Administration* (FDA, 2018) e da *European Medicines Agency* (EMA, 2011), sendo avaliados os parâmetros de seletividade, efeito matriz, eficiência da extração e recuperação, linearidade, sensibilidade, efeito residual, exatidão, precisão e estabilidade.

2.2.1 Seletividade, efeito matriz e recuperação

A seletividade do método foi avaliada de maneira a demonstrar a ausência de interferência de outros compostos presentes na matriz no nível do LIQ. Para isso, amostras de plasma branco de seis animais diferentes, totalizando seis fontes distintas foram analisadas, sendo a seletividade considerada adequada caso os sinais

cromatográficos apresentados nos tempos de retenção referentes ao analito e ao PI fossem menores do que 20% e 5%, respectivamente.

Por se tratar de um método bioanalítico, a quantificação do analito é realizada em uma matriz complexa, no caso o plasma de camundongos. Desse modo, é necessária a avaliação do efeito que os componentes presentes na matriz possuem sobre a resposta do analito avaliado. Para a determinação do efeito matriz, a resposta do instrumento para o padrão de KAV adicionado a amostra de plasma branco extraída (pós-fortificadas), de seis fontes diferentes, foi comparada a resposta obtida para os padrões de KAV em solução de acetonitrila. O valor de CV do fator de matriz (FM) obtido a partir da análise das amostras, conforme a equação abaixo, não deveria ser maior do que 15%.

$$\%FM = \frac{\text{Resposta em amostra de plasma}}{\text{Resposta em solvente}} \times 100 \quad (5)$$

A recuperação da técnica de extração foi avaliada por meio da comparação do sinal analítico obtido entre amostras pós-fortificadas e amostras de plasma fortificadas previamente ao processo de extração (pré-fortificadas). Enquanto a eficiência da extração foi obtida pela comparação das áreas dos picos entre amostras pré-fortificadas e o padrão de KAV em solução de acetonitrila.

O efeito matriz e a eficiência e recuperação da extração foram avaliadas em dois níveis de concentração para a KAV: 30 ng/mL (referente ao CQB) e 180 ng/mL (referente ao CQA).

2.2.2 Linearidade da curva de calibração e sensibilidade

Uma curva de calibração de seis pontos, variando entre 10 ng/mL e 200 ng/mL de KAV, foi construída por meio da relação entre a concentração da KAV e a razão entre as áreas dos picos da KAV e do PI (na concentração de 30 ng/mL). A regressão linear, com fator de ponderação de 1/x, foi aplicada para a construção da curva de calibração. O desvio máximo permitido entre a concentração nominal e a calculada experimental foi de 20% para o LIQ e de 15% para os demais pontos da curva, para no mínimo 75% dos pontos da curva.

Para a avaliação da sensibilidade do método, o LIQ foi determinado como a menor concentração com valores de precisão (CV%) e exatidão dentro da faixa de $\pm 20\%$, sendo analisadas em 3 corridas distintas com 5 replicatas. Já o LD foi determinado como a menor concentração, na faixa de 1-5 ng/mL, em que a razão sinal-ruído foi menor do que 3.

2.2.3 Efeito residual

O efeito residual é caracterizado como o aparecimento ou aumento de sinais analíticos do analito e do PI devido a contaminação de uma amostra previamente analisada comprometendo a precisão e exatidão do método. Para sua avaliação foi realizada a injeção de amostras branco após a análise do limite superior de quantificação (LSQ), sendo que o efeito residual nas amostras branco deve ser inferior a 20% da área do analito no LIQ e a 5% da área do PI.

2.2.4 Precisão e exatidão

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas pela análise de cinco replicatas de cada amostra de controle de qualidade (CQ) em uma única corrida analítica (intracorrída) e preparadas em três dias consecutivos (intercorrída). Os CQs foram preparados em cinco níveis de concentração: LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Sendo que o CQB foi determinado como três vezes a concentração do LIQ, CQM referente ao ponto médio da curva de calibração e o CQA determinado como 90% do valor do LSQ.

De maneira a avaliar se amostras biológicas diluídas apresentavam a mesma precisão e exatidão das não-diluídas, foram analisadas amostras de plasma fortificado nas concentrações de 2 $\mu\text{g/mL}$ e 19 $\mu\text{g/mL}$ de KAV, seguidos de diluição em plasma branco nas proporções 10 e 100 vezes, respectivamente, resultando em amostras de CQD nas concentrações de 200 ng/mL e 190 ng/mL do analito.

A exatidão foi demonstrada quando os valores de erro padrão relativo (**Equação 6**) para os CQs fossem menores do que 15% do valor nominal, com exceção do LIQ em que foram aceitos desvio menos do que 20%. Já em relação a precisão, não foram admitidos valores de CV (**Equação 7**) menores do que 20% para o LIQ e 15% para os demais controles, sendo calculado conforme as equações a seguir:

$$EPR = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100 \quad (6)$$

$$CV\% = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100 \quad (7)$$

2.2.5 Estabilidade

Estabilidade é o parâmetro que indica a ausência de degradação de um analito presente em uma matriz sobre condições específicas de armazenamento e uso. Para a avaliação da estabilidade da KAV no método desenvolvido, foram avaliadas quatro condições: tempo de bancada, amostras extraídas, pós-processamento e após ciclo de congelamento e descongelamento. Com exceção da estabilidade pós-processamento em que foram avaliados LIQ, CQB, CQM e CQA, para os demais testes foram avaliados CQB e CQA, todos em triplicata. A estabilidade foi demonstrada quando os valores obtidos estavam dentro dos limites preconizados para exatidão e precisão.

Para avaliação da estabilidade pelo tempo de bancada, as amostras de CQ foram dispostas sobre a bancada de trabalho a temperatura ambiente durante 5 horas, mimetizando as possíveis condições laboratoriais, seguido da sua extração e análise. De maneira a avaliar a influência desse tempo de banca em amostras já extraídas, estas permaneceram dispostas na bancada, após sua extração, durante 5 horas, sendo analisadas ao final desse tempo. A estabilidade pós-processamento foi demonstrada após a re-análise de amostras previamente analisadas, armazenadas no amostrador automático do cromatógrafo por 24 horas.

Para a avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras de CQ foram inicialmente armazenadas em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, expostas a três ciclos de congelamento e descongelamento. Em cada ciclo as amostras foram completamente descongeladas a temperatura ambiente e ao final permaneceram na bancada por pelo menos 1 hora. Ao final deste tempo, as amostras foram novamente armazenadas no freezer por 24 horas. Ao final do terceiro ciclo, as amostras de CQ foram extraídas e analisadas.

2.3 Avaliação da biodisponibilidade da KAV isolada e em ESK

2.3.1 Quantificação da KAV em amostras reais

Após a validação do método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos, este foi aplicado para o estudo farmacocinético da KAV isolada e presente em ESK, seguido da avaliação da biodisponibilidade desse marcador. Inicialmente os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n = 30 animais por grupo) de acordo com os tratamentos a serem administrados por via *per os* (p.o.) (gavagem).

A amostra de ESK (número 4) e o padrão de KAV foram suspensos utilizando como veículo solução de NaCl 0,9%. Para determinação da dose de KAV a ser administrada, foi feita uma avaliação dos valores encontrados em estudos farmacocinéticos disponíveis na literatura, sendo utilizada a dose de 50 mg/kg para o padrão de KAV. Em relação a dose para o grupo tratado com ESK, primeiramente esta foi analisada utilizando o método analítico validado (**Capítulo 2**), resultando em um teor de KAV de 4,88%. Em seguida foi feita a proporção da quantidade de extrato administrada, de maneira a se manter a dose de 50 mg/kg de KAV, totalizando a dosagem de 1024,6 mg/kg de extrato. Cada tratamento foi administrado individualmente, em volume de 8 mL/kg, através de cânulas adaptadas à seringas. As cânulas foram lavadas com solução de NaCl 0,9% entre as administrações de maneira a evitar entupimento.

Após a administração de cada tratamento, foram realizadas coletas de sangue de cada animal nos tempos: 0h, 0h15, 0h30, 0h45, 1h30, 2h, 4h, 8h, 12h e 24 horas, sendo 3 animais para cada ponto. O sangue de cada animal foi coletado após decaptação, em tubos de polipropileno contendo 10 µL de heparina e, em seguida, centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos. Foram obtidos cerca de 150 à 200 µL de sangue para cada animal. O plasma foi então coletado e refrigerado em freezer a -80 °C. No dia das análises, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, foi realizada a etapa de extração utilizando solvente precipitante (acetoneitrila) juntamente com a adição de 30 ng/mL do PI. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante coletado e filtrado para vials âmbar.

Para quantificação da KAV presente nas amostras de plasma, primeiramente foi realizada a análise dos mesmos níveis de concentração da avaliação da linearidade,

de maneira a se obter a curva de calibração e equação da reta para quantificação do analito nas amostras. A curva de calibração foi considerada linear quando o desvio obtido entre a concentração nominal e a calculada experimental foi menor do que 20% para o LIQ e do que 15% para os demais pontos da curva, com no mínimo 75% de aprovação. Em seguida foram incluídos na corrida analítica as amostras de CQB, CQM e CQA, em duplicata, e inseridas entre as amostras a cada 10 análises. O critério de aceitação dos CQs foi de no máximo 15% de desvio, com uma aprovação mínima de 50% para cada nível de concentração. Ao final da corrida analítica, os valores de resposta obtidos para cada amostra foram aplicados à equação da reta, sendo obtidas as concentrações plasmáticas de KAV.

2.3.2 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos

Após a determinação da concentração plasmática de KAV em cada amostra, foram plotadas curvas de concentração plasmática *versus* tempo para o marcador isolado e presente no ESK e, em seguida, foram calculados os parâmetros farmacocinéticos utilizando o Microsoft Office Excel:

- concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$);
- tempo em que a concentração plasmática máxima é atingida ($T_{\text{máx}}$);
- constante de eliminação (K_{EI}): inclinação da reta de concentração logarítmica *versus* tempo (obtida durante a fase de decaimento da concentração);
- meia-vida de eliminação ($T_{1/2}$), calculada através da equação:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_{EL}} \quad (8)$$

- área sob a curva do tempo zero ao último tempo de coleta quantificado (ASC_{0-24}), calculada pelo método dos trapezóides;
- área sob a curva do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$), calculada através da equação:

$$ASC_{0-\infty} = \frac{ASC_{0-24} + Cmédia_{24}}{K_{EL}} \quad (9)$$

Ao final, a biodisponibilidade relativa (BD_{REL}) da KAV foi determinada a partir da razão entre os valores de ASC_{0-24} da KAV presente no ESK e isolada, conforme a equação abaixo:

$$BD_{rel} = \frac{ASC_{0-24} \text{ KAV presente em ESK}}{ASC_{0-24} \text{ KAV isolada (padrão)}} \quad (10)$$

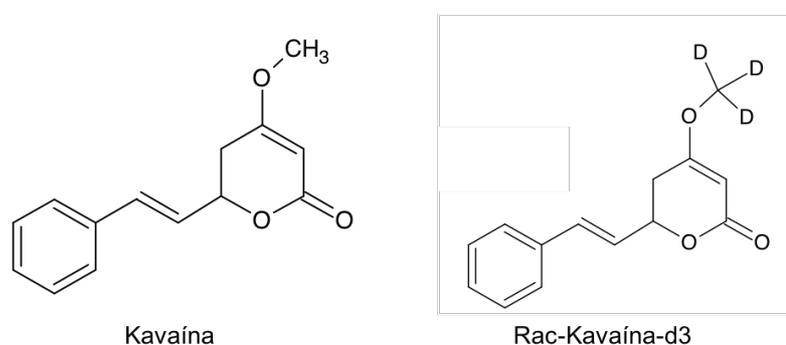
Sendo que a obtenção de valores de BD_{REL} superiores à 1 pode ser considerado indicativo da existência de sinergismo entre a KAV e os demais compostos presentes no extrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento de método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos por CLAE-EM/EM

Foi desenvolvido um método simples e rápido utilizando CLAE-QqQ/LIT, com fonte de ionização por *electrospray* positivo (IES+) para a quantificação de KAV em plasma de camundongo utilizando rac-kavaína-d3 como PI (**Figura 18**). Para análises quantitativas, utilizando detecção por EM, o ideal é que sejam utilizados padrões isotopicamente marcados dos compostos analisados. Compostos deuterados, como a rac-kavaína-d3, possuem propriedades físico-químicas semelhantes ao analito em questão, eluindo no mesmo tempo de retenção. Além disso, durante a padronização interna, essa semelhança possibilita a compensação de possíveis variações na ionização do composto analisado, assim como do efeito matriz existente no método (STOKVIS; ROSING; BEJINEN, 2005). A partir da revisão de literatura realizada, essa foi a primeira vez que o padrão isotopicamente marcado da KAV foi utilizado como PI para a quantificação deste analito em matrizes biológicas.

Figura 18 – Estrutura do analito kavaína (KAV) e do padrão interno Rac-kavaína-d3 (PI).



3.1.1 Determinação dos parâmetros espectrométricos

Visto que a KAV foi facilmente ionizada ao se utilizar a técnica de IES, esta foi escolhida como a fonte de ionização do sistema CLAE-EM/EM. Após o teste dos modos de ionização positivo (+) e negativo (-), durante infusão direta do padrão analítico, observou-se que o modo positivo apresentou melhores resultados em relação a razão sinal-ruído, sendo então selecionado para a fonte de ionização do sistema com obtenção de íon precursor $[M+H]^+$.

Após a obtenção dos parâmetros espectrométricos otimizados (**Tabelas 25 e 26**), o modo de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) foi selecionado para a quantificação do analito, de maneira a garantir a seletividade do método com redução da interferência da matriz complexa em questão (MICHEL et al., 2015).

Tabela 25 – Parâmetros espectrométricos (fonte) otimizados para o método bioanalítico.

Parâmetros	Kavaína	Rac-kavaína-d3
Temperatura da fonte (°C)	100,0	100,0
Voltagem do ion spray (volts)	5500,0	3500,0
Gás de cortina	10,0	10,0
Gás de nebulização	14,0	18,0
Gás de evaporação	40,0	10,0

Tabela 26 – Parâmetros espectrométricos (composto) otimizados para o método bioanalítico.

Parâmetros	Kavaína	Rac-kavaína-d3
Declustering potential (volts)	96,0	65,0
Potencial de entrada (volts)	10,0	10,0
Energia de colisão (volts)	17,0*/31,0**	17,0
Gás de colisão (volts)	6,0	9,0
Collision exit potential (volts)	10,0*/8,0**	11,7
Íon precursor (m/z)	231,0	234,2
Íon produto (m/z)	115,1*/152,8**	199,2

*Transição de massas para quantificação

**Transição de massas para confirmação

A partir dos íons produto obtidos pela fragmentação dos íons precursores da KAV e do PI, durante avaliação do espectro de varredura (**Figura 19**), foram selecionadas duas transições de massa para a determinação da KAV (quantificação e confirmação), como pode ser observado na **Tabela 26**. Na **Figura 20** estão representadas as propostas de fragmentação para os íons produto mais abundantes para o analito e para o PI.

Figura 19 – Espectros EM/EM para $[M+H]^+$ dos padrões de kavaína (A) e rac-kavaína-d3 (B), com energia constante de 14 e 16 volts, respectivamente.

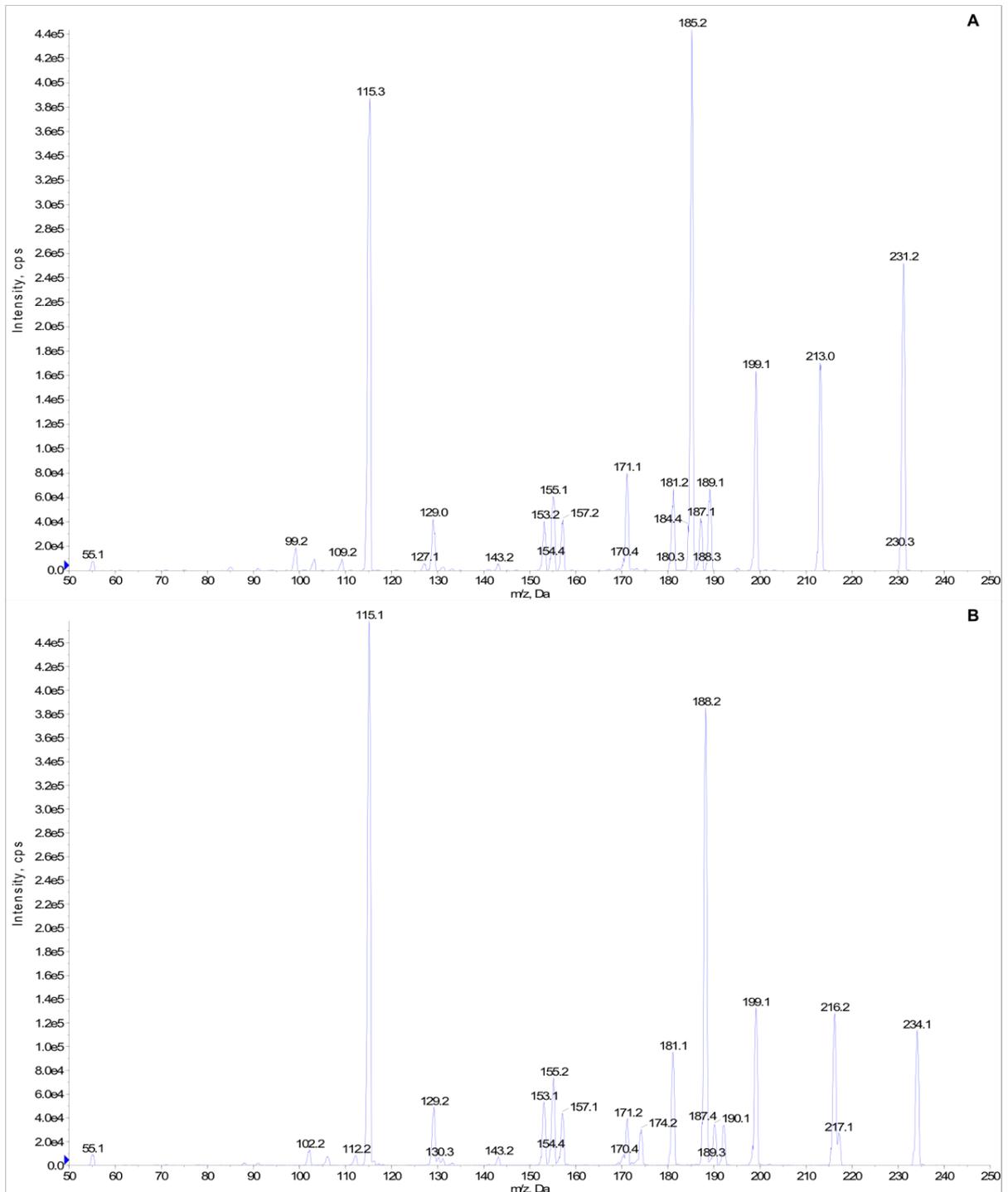
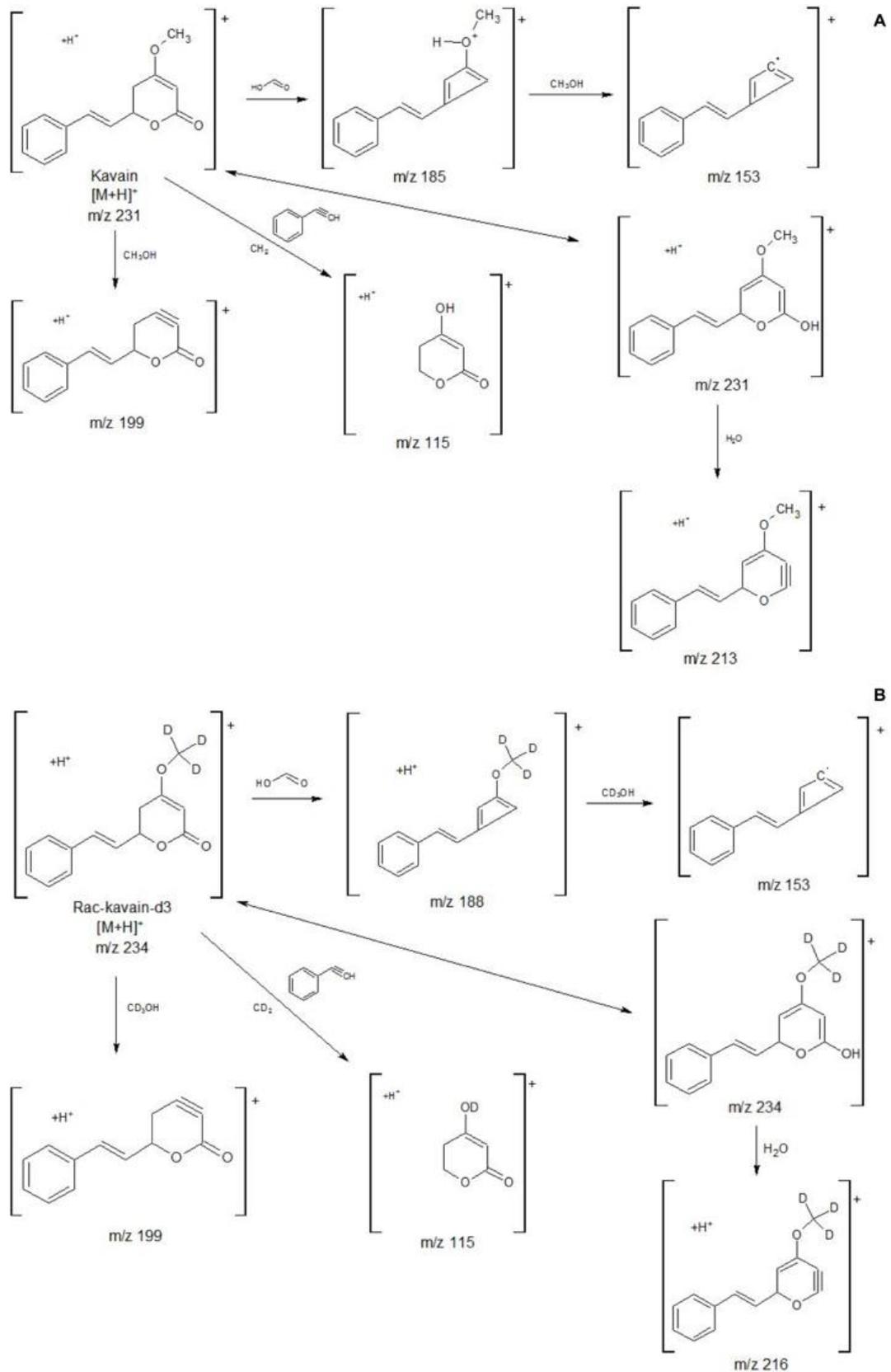


Figura 20 – Proposta de fragmentação para os íons produto mais abundantes para $[M+H]^+$ da kavaina (A) e da rac-kavaina-d3 (B), com energia constante de 14 e 16 volts, respectivamente.



3.1.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos

Devido a natureza lipofílica da KAV, a cromatografia de fase reversa, utilizando uma coluna C18, foi a técnica de escolha para a quantificação deste analito em um sistema CLAE-EM/EM. Pequenas variações no fluxo e na proporção da fase móvel do método analítico previamente validado (**Capítulo 2**) foram testadas de maneira a adequar ao novo sistema cromatográfico e à proposta de análise bioanalítica. Durante esta etapa, foi feita adição de ácido fórmico 0,1% a fase móvel aquosa e orgânica para melhor ionização da KAV no modo positivo.

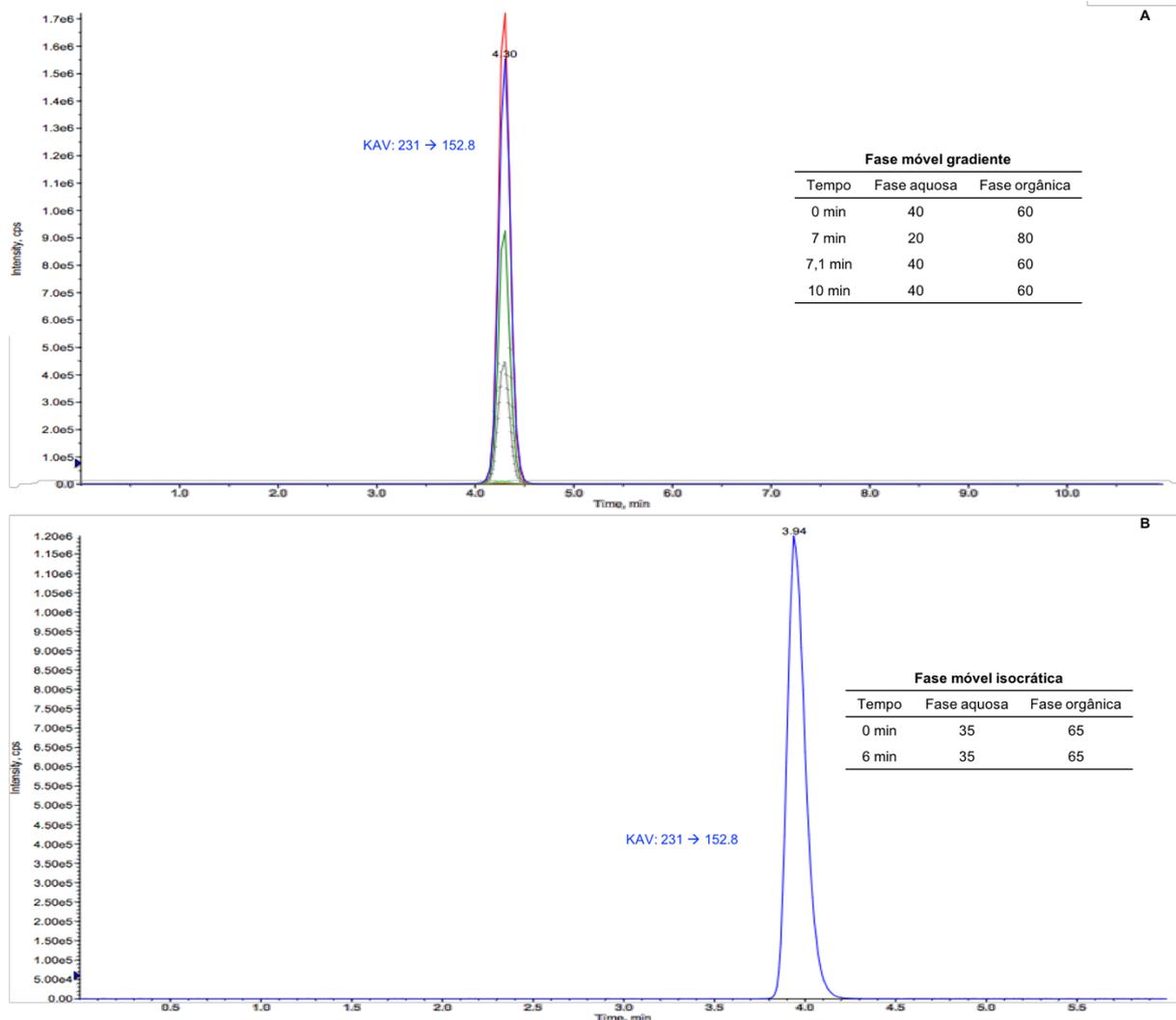
Na **Figura 21** está representada a condição com modo de eluição em gradiente com melhor resultado relacionado ao tempo de retenção do analito. Observa-se que não foram observadas melhoras significativas no tempo de retenção da KAV quando o modo de eluição gradiente foi utilizado em comparação ao modo isocrático, mesmo realizando ajustes nos valores de proporção e fluxo da fase móvel. Desse modo, de maneira a alcançar um método simples e rápido, o modo de eluição isocrático foi selecionado.

As condições cromatográficas finais obtidas após a otimização estão expressas na **Tabela 27**. Os métodos previamente descritos na literatura a respeito da quantificação da KAV em amostras biológicas utilizando sistema CLAE-ESI-EM/EM utilizaram modo de eluição gradiente com tempo de corrida variando entre 15 e 25 minutos (FERNANDEZ et al., 2007; CARLIER et al., 2015; WANG et al., 2018). Comparado aos estudos já publicados, o método desenvolvido foi mais simples e rápido, visto que obteve menor tempo de corrida (6 minutos), utilizando modo de eluição isocrático.

Tabela 27 – Parâmetros cromatográficos otimizados para o método bioanalítico.

Parâmetros	Condições otimizadas
Coluna cromatográfica	Agela Technologies® Innoval C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)
Modo de eluição	Isocrática
Fase móvel	Água ultrapura:metanol:acetonitrila:isopropanol (35:13:16,9:35,1 v/v/v/v) (0,1% ácido fórmico)
Fluxo da fase móvel	0,5 mL/min
Temperatura da coluna	40 °C
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	6 min
Tempo de retenção da KAV	3,94 min

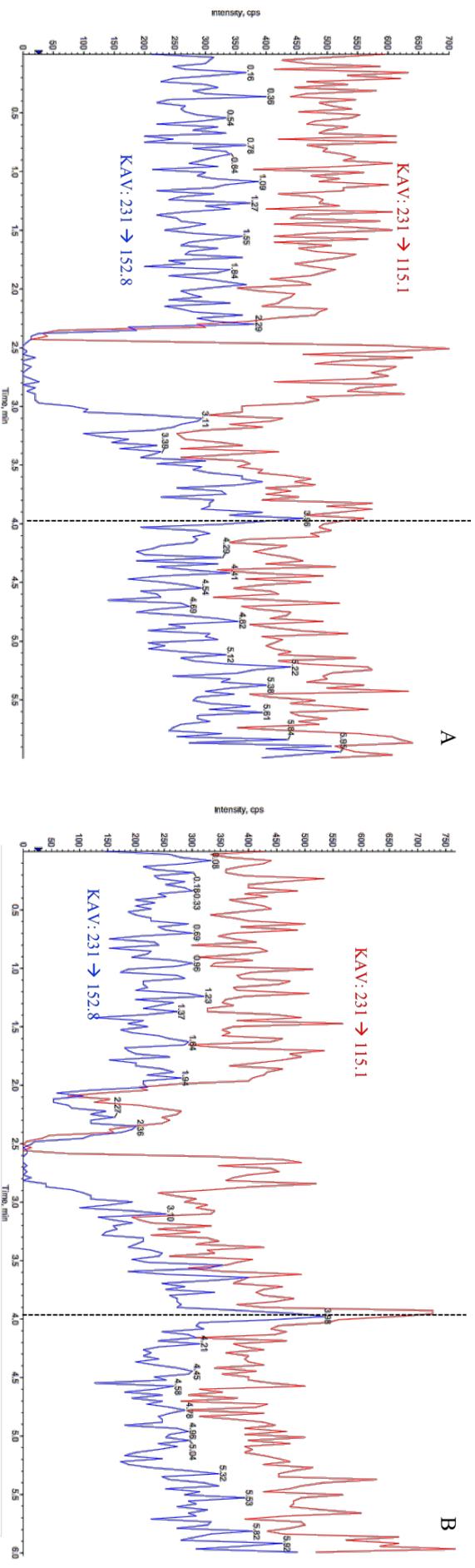
Figura 21 – Cromatogramas obtidos pela análise do padrão de kavaína (KAV: 231 → 152,8) em solução (20 ng/mL), utilizando eluição em gradiente (A) e isocrático (B).



3.1.3 Determinação dos parâmetros de preparo de amostra

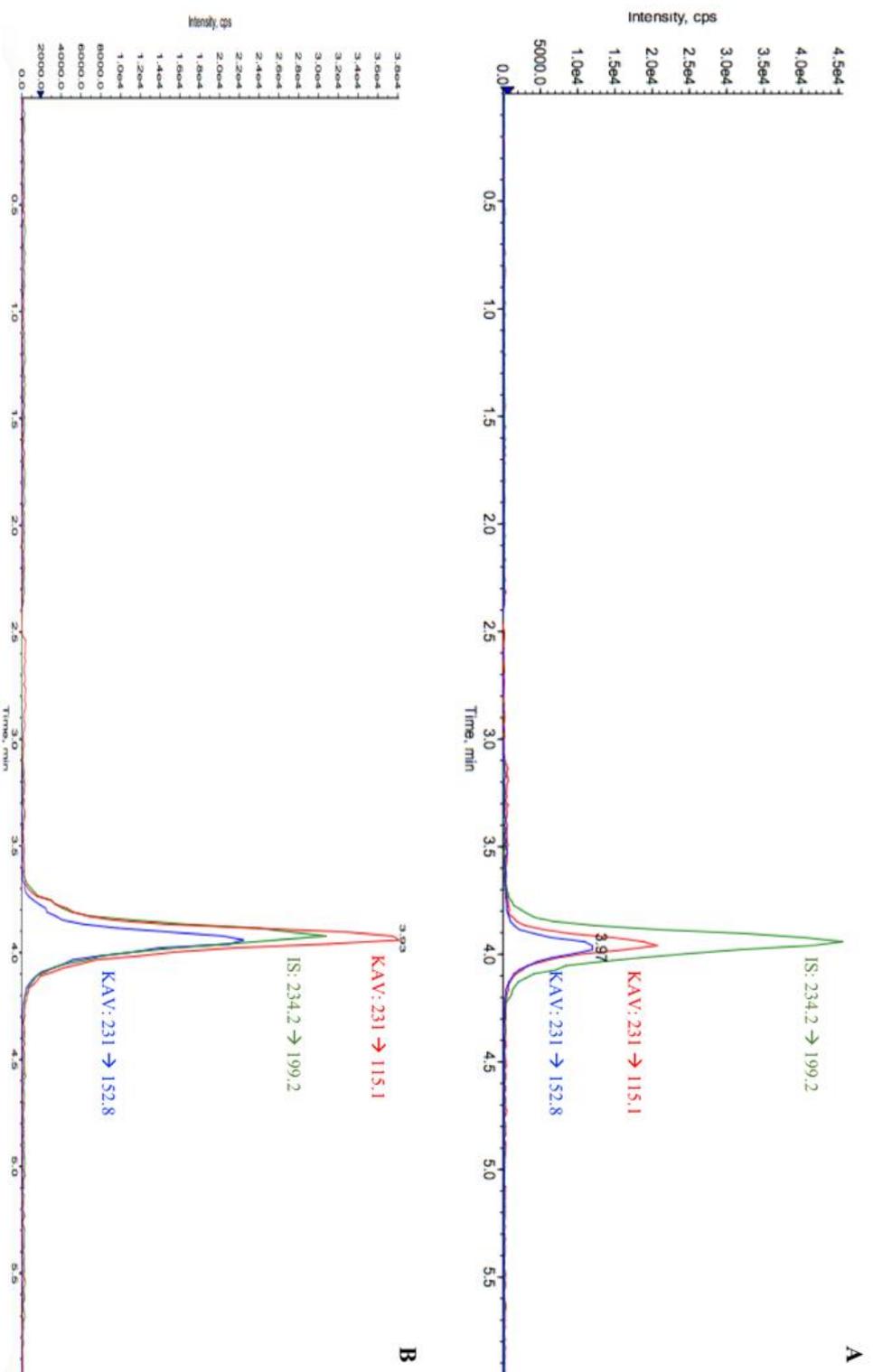
Com o objetivo de desenvolver um método bioanalítico com boa recuperação durante a etapa de extração, além de minimizar os efeitos da matriz, dois solventes orgânicos: metanol e acetonitrila, foram avaliados durante a precipitação proteica. Como pode ser observado na **Figura 22**, apesar do cromatograma obtido pela extração de plasma branco utilizando metanol apresentar menor razão sinal-ruído quando comparado ao da acetonitrila, há a presença de um sinal interferente no mesmo tempo de retenção da KAV (3,94 min) para as duas transições de massas utilizadas. Essa interferência não foi observada ao ser utilizada a acetonitrila, sendo, portanto, selecionada como solvente precipitante para a etapa de extração da amostra biológica.

Figura 22 – Cromatogramas obtidos após a extração de amostra de plasma branco utilizando acetoneitrila (A) e metanol (B) como solventes precipitantes. Linha pontilhada representando o tempo de retenção da kavaina.



Excelentes sinais cromatográficos foram obtidos, utilizando a precipitação de proteínas com a acetoneitrila, para a análise de amostras de plasma após administração *per os* da amostra 4 de ESK (Figura 23A) e de plasma branco fortificado com 200 ng/mL de padrão de KAV (Figura 23B), ambas amostras contendo 30 ng/mL de PI.

Figura 23 – Cromatogramas obtidos a partir da análise de amostras de plasma de camundongo após administração de ESK (A) e plasma branco fortificado com 200 ng/mL de padrão de KAV, utilizando acetoneitrila como solvente precipitante. Transição de quantificação KAV: 231,0 → 115,1 (vermelho); Transição de confirmação KAV: 231,0 → 152,8 (azul); Transição do PI: 234,2 → 199,2 (verde).



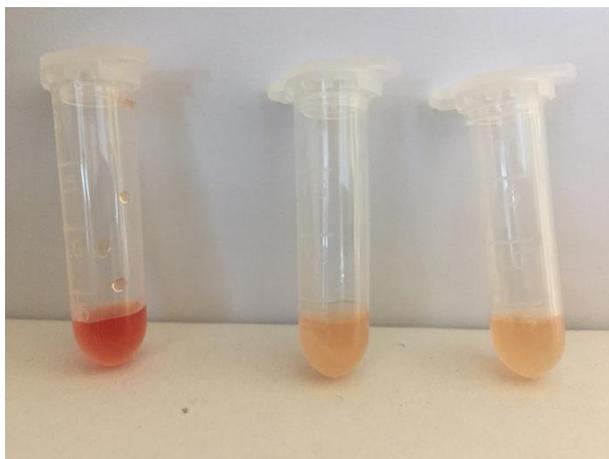
3.2 Validação de método bioanalítico para quantificação de KAV em plasma de camundongos por CLAE-EM/EM

Os resultados obtidos para a validação do método bioanalítico desenvolvido para quantificação da KAV em plasma de camundongo estão de acordo com o preconizado pelos guias para validação de método bioanalítico do FDA e EMA, sendo verificados os parâmetros de seletividade, efeito matriz, recuperação, linearidade, sensibilidade, efeito residual, precisão, exatidão e estabilidade (FDA, 2018; EMA, 2011).

3.2.1 Seletividade, efeito matriz e recuperação

De maneira a determinar a seletividade do método desenvolvido, seis amostras de plasma branco de fontes distintas foram avaliadas. Na **Figura 24** pode ser observado o grau de hemólise apresentado pelas amostras de plasma branco avaliadas, antes de passarem pela etapa de extração utilizando acetonitrila como solvente precipitante.

Figura 24 – Grau de hemólise apresentado pelas amostras de plasma branco avaliadas na seletividade.



Conforme demonstrado na **Figura 25**, não foram observados picos interferentes de compostos endógenos pertencentes a matriz biológica no mesmo tempo de retenção da KAV ou do PI (3,94 minutos), em nenhuma das amostras de plasma branco avaliadas, confirmando a seletividade do método.

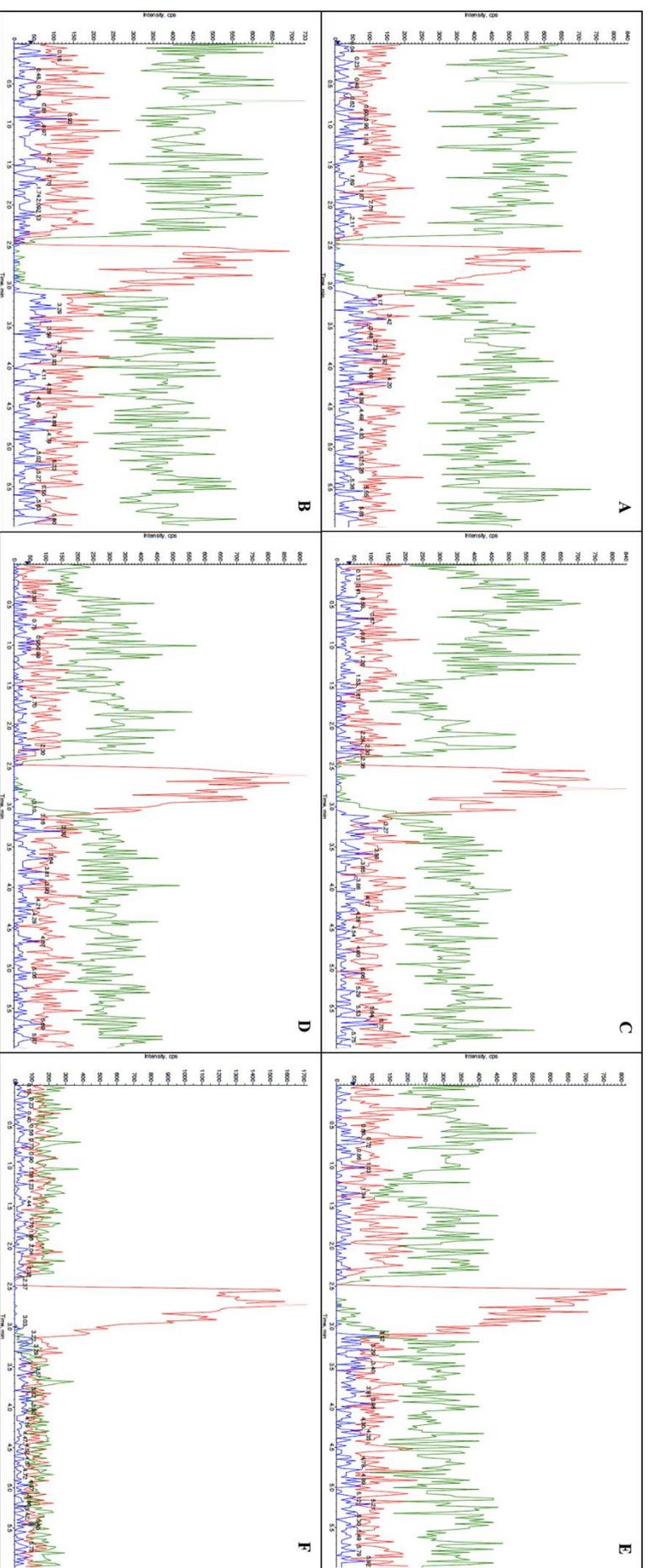


Figura 25 – Cromatogramas obtido após análise de plasma branco de seis fontes distintas, sendo cinco amostras normais (A, B, C, D e E) e uma hemolisada (F), para avaliação da seletividade do método bioanalítico. Transição de quantificação KAV: 231,0 → 115,1 (vermelho); Transição de confirmação KAV: 231,0 → 152,8 (azul); Transição do PI: 234,2 → 199,2 (verde).

Em relação ao efeito matriz, os valores de CV% dos FM obtidos entre as seis fontes de plasma distintas, para os dois níveis de concentração (CQB e CQA) foram menores do que 15% (**Tabela 28**). Demonstrando, desse modo, que nenhuma alteração ou interferência na resposta do analito está ocorrendo devido a composição da matriz biológica.

Tabela 28– Valores de porcentagem de resposta obtidos durante avaliação de efeito matriz, recuperação e eficiência da extração.

Amostra	Efeito matriz		Recuperação		Eficiência de extração	
	CQB	CQA	CQB	CQA	CQB	CQA
1	68,09	94,81	93,36	71,23	63,56	67,53
2	71,54	98,05	108,55	77,48	77,66	66,23
3	78,99	112,99	91,58	72,41	72,34	77,92
4	78,72	109,09	93,58	64,29	73,67	64,22
5	77,66	109,74	102,05	63,31	79,26	66,88
6	80,59	122,08	92,74	65,96	74,73	77,92
Média	75,93	107,79	96,98	69,11	73,54	70,12
DPR	4,95	10,00	6,80	5,52	5,51	6,15
CV%	6,52	9,28	7,01	7,99	7,50	8,76

A eficiência da técnica de extração e a sua recuperação foram consideradas reprodutíveis e consistentes tanto para o CQB quanto para o CQA (**Tabela 28**). Sendo que, as taxas de recuperação médias obtidas foram de 96,98% (CQB) e 69,11% (CQA), com valores de CV de 7,01 e 7,98%, respectivamente. Para a eficiência da extração, CQB e CQA resultaram em taxas médias de 73,54 e 70,12%, com valores de CV de 7,49 e 8,76%, respectivamente.

3.2.2 Linearidade da curva de calibração e sensibilidade

As curvas de calibração obtidas para a KAV foram consideradas lineares na faixa de concentração de 10 a 200 ng/mL, utilizando fator de ponderação de 1/x. Como pode ser observado na **Tabela 29**, os desvios obtidos entre as concentrações nominal e calculada foram menores do que 15% para todos os pontos da curva, nos três dias de análise. Os valores de equação da reta juntamente com os coeficientes de determinação (r^2) obtidos estão representados na **Tabela 30**, enquanto as curvas de calibração obtidas podem ser observadas na **Figura 26**.

Tabela 29 – Dados obtidos durante a construção das curvas de calibração para avaliação da linearidade do método desenvolvido.

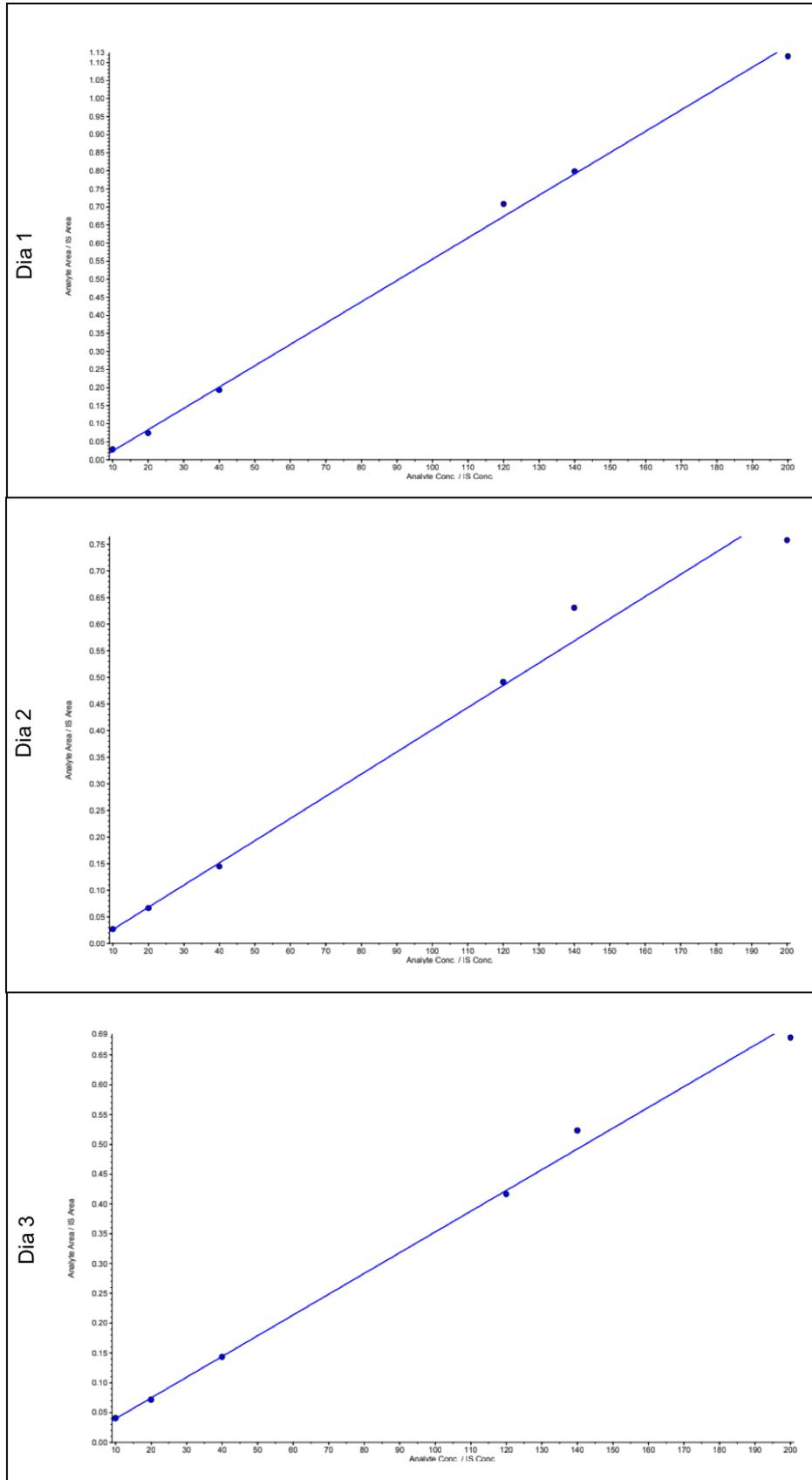
Concentração teórica (ng/mL)	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	Concentração experimental (ng/mL)	EPR (%)	Concentração experimental (ng/mL)	EPR (%)	Concentração experimental (ng/mL)	EPR (%)
10	10,8	8,0	10,1	1,0	10,3	3,0
20	18,4	-8,0	19,6	-2,0	19,1	-4,5
40	38,6	-3,5	38,4	-4,0	39,8	-0,5
120	126,0	5,0	121,0	0,8	118,0	-1,7
140	141,0	0,7	155,0	10,7	149,0	6,4
200	195,0	-2,5	185,0	-7,5	194,0	-3,0

*EPR = erro padrão relativo

Tabela 30 – Equações da reta e os respectivos coeficientes de determinação obtidos durante a avaliação da linearidade do método desenvolvido.

Curva de calibração	Equação da reta	r ²
Dia 1	$y = 0,0059x - 0,0347$	0,9982
Dia 2	$y = 0,0047x - 0,0153$	0,9920
Dia 3	$y = 0,00348x + 0,00482$	0,9976

Figura 26 – Curvas de calibração obtidas durante a avaliação da linearidade do método desenvolvido.

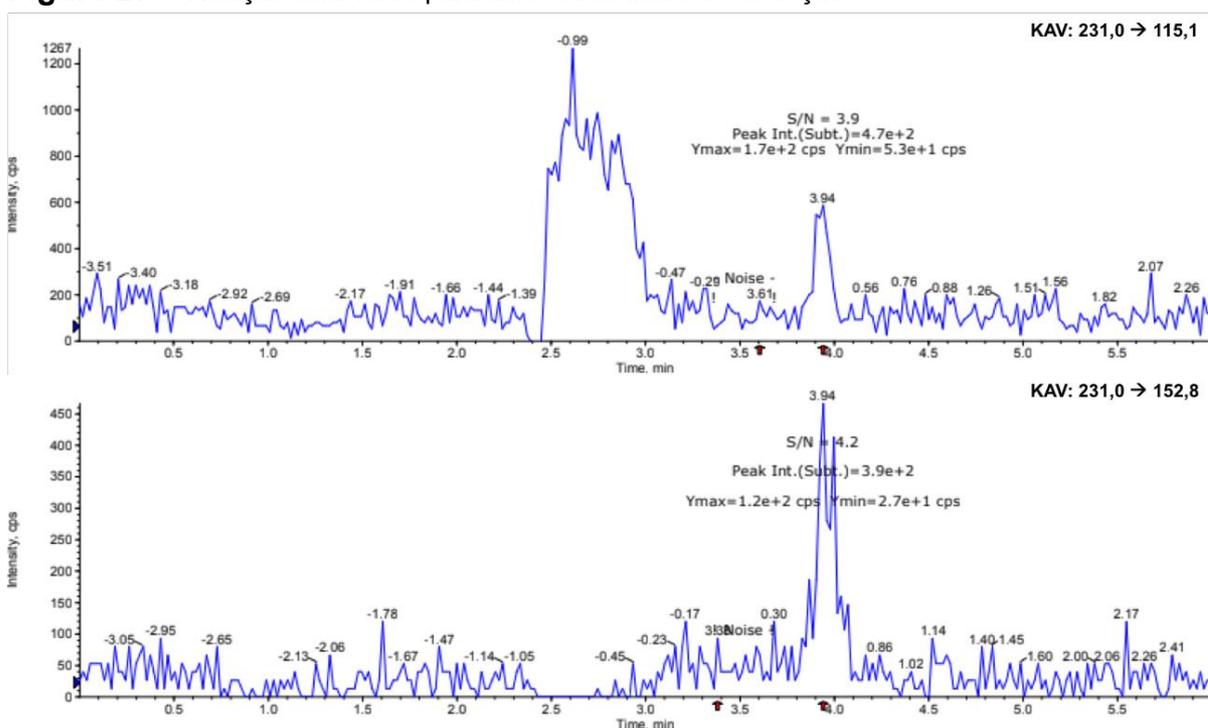


Em relação a determinação do LIQ, 10 ng/mL foi a menor concentração com precisão e exatidão de acordo com os limites preconizados de $\pm 20\%$, sendo que foram obtidos valores de CV% de 1,1; 0,5 e 5,9% para a precisão intracorrída (n = 3 dias) e de 5,2% para intercorrída; e valores de erro padrão relativo de 18,2; 16,4 e 7,6% para exatidão intracorrída (n = 3 dias) e de 14,1% para a intercorrída. O valor de LIQ encontrado foi igual ao determinado por Fernandez e colaboradores para a determinação de KAV em urina humana, utilizando sistema CLAE-IES-EM/EM (FERNANDEZ et al., 2007).

Dentre as concentrações avaliadas para o LD, 1 ng/mL foi a menor concentração em que a relação sinal-ruído foi maior do que 3 para as duas transições de massas para a KAV, como demonstrado na **Figura 27**. O resultado obtido foi próximo ao valor de LD (0,8 ng/mL) apresentado por Wang e colaboradores em estudo para avaliação de KAV em plasma de ratos (WANG et al., 2018).

A sensibilidade obtida para o método se mostrou adequada para a quantificação da KAV em plasma de camundongo após administração *per os* em camundongos. A partir da determinação do valor de LIQ, os valores de concentração para os CQs foram: CQB = 30 ng/mL; CQM = 100 ng/mL; CQA = 180 ng/mL e CQD = 190 (10x) e 200 (100x) ng/mL.

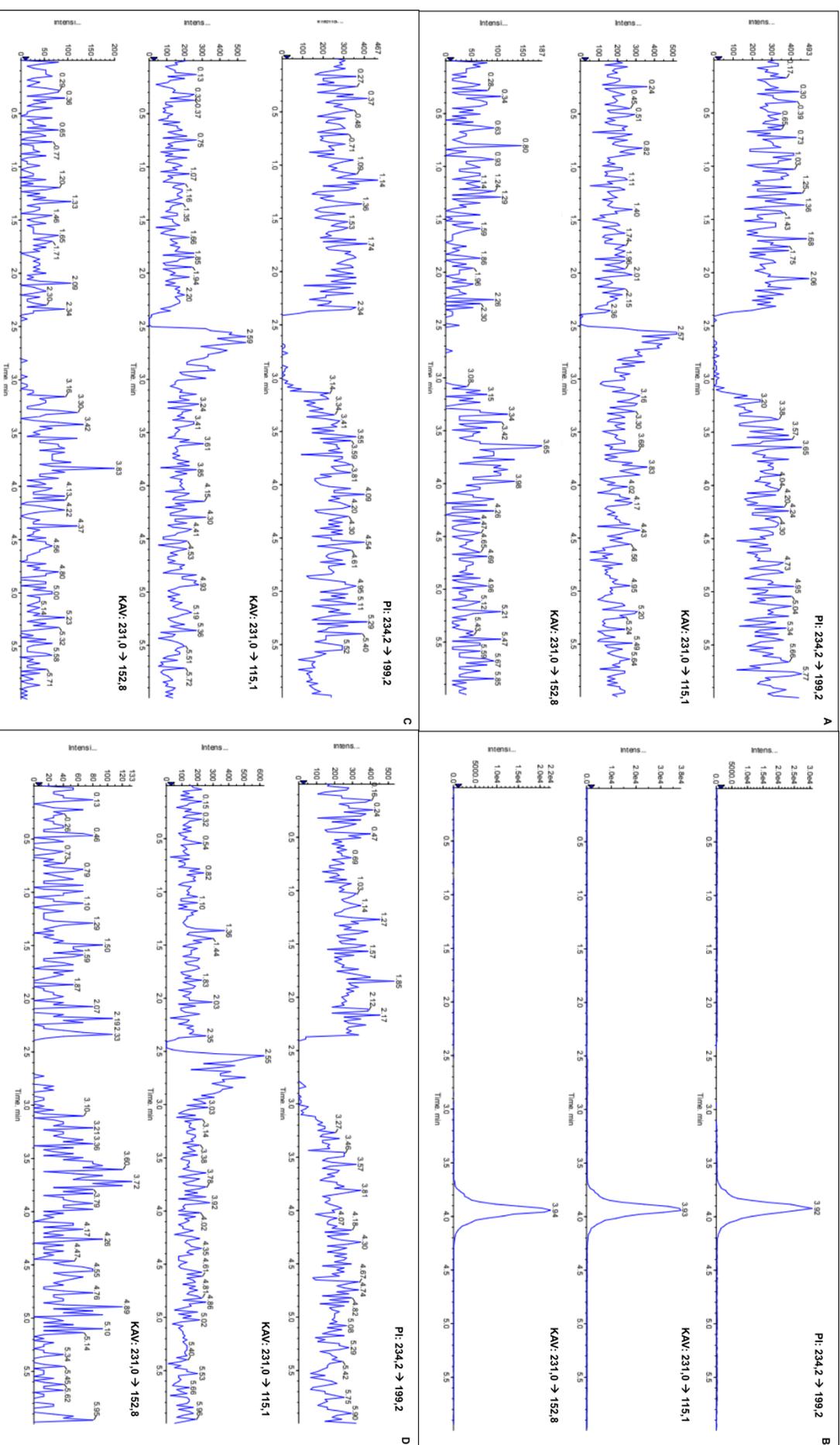
Figura 27 – Relação sinal-ruído para amostra de limite de detecção.



3.2.3 Efeito residual

A ausência de efeito residual foi confirmada pela inexistência de sinais cromatográficos para a KAV e PI em duas análises consecutivas de amostras de plasma branco realizadas após a injeção do LSQ. Os cromatogramas obtidos a partir da análise das amostras de LSQ e plasma branco estão representados na **Figura 28**.

Figura 28 – Avaliação do efeito residual, sendo representado o cromatograma obtido pela injeção inicial de amostra de plasma branco (A), seguido da injeção do limite superior de quantificação (B) e ao final duas injeções de amostra de plasma branco (C e D).



3.2.4 Precisão e exatidão

O método bioanalítico desenvolvido foi considerado preciso e exato para a quantificação de KAV em plasma de camundongos. Como pode ser observado nas **Tabelas 31 e 32**, todos os valores obtidos para CV% e para o erro padrão relativo em relação ao valor nominal estão abaixo dos valores de limite preconizados: inferiores a 20% para o LIQ e 15% para os demais níveis de concentração, tanto para as análises intracorrída como intercorrída.

Tabela 31 – Valores de coeficiente de variação (CV%) intracorrída e intercorrída para avaliação da precisão do método bioanalítico.

CV% intracorrída						
Corrída	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD (10x)	CQD (100x)
1	1,1	2,1	0,7	2,8	1,1	6,2
2	0,5	3,0	6,5	5,4	4,6	8,8
3	5,9	9,3	4,4	5,0	5,1	2,0
CV% intercorrída	5,2	8,8	10,7	11,1	6,8	10,5

Tabela 32 – Valores de erro padrão relativo (%) intracorrída e intercorrída para avaliação da exatidão do método bioanalítico.

EPR% intracorrída						
Corrída	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD (10x)	CQD (100x)
1	18,2	-9,0	-12,6	-11,1	-13,7	-8,3
2	16,4	7,1	-6,8	-8,7	-12,0	4,5
3	7,6	-2,5	9,0	10,4	-2,4	12,9
EPR% intercorrída	14,1	-1,4	-3,5	-3,1	-9,4	3,1

Como demonstrado nas **Tabela 31 e 32**, os resultados obtidos para amostras de CQD também se encontram dentro dos limites preconizados para exatidão e precisão. Demonstrando, desse modo, que a diluição de amostras reais obtidas no estudo farmacocinético, dentro da faixa de diluição avaliada, não afeta a resposta analítica do método desenvolvido.

3.2.5 Estabilidade

De maneira a assegurar a confiabilidade dos resultados das análises utilizando o método bioanalítico desenvolvido, a estabilidade da KAV foi avaliada em diferentes

condições. Como pode ser observado na **Tabela 33**, todas as amostras de estabilidade avaliadas se apresentaram precisas e exatas, com valores de CV% abaixo do que 5% para todos os CQs e com valores de erro padrão relativo variando entre -5,1 e 13% do valor nominal. Os resultados obtidos demonstram a estabilidade do método durante as etapas de preparo e análise da amostra, garantindo resultados sem alterações decorrentes de uma possível degradação do analito.

Tabela 33 – Valores de precisão (CV%) e exatidão (EP% = erro padrão) obtidos durante a avaliação da estabilidade.

Parâmetro	LIQ		CQB		CQM		CQA	
	CV%	EP%	CV%	EP%	CV%	EP%	CV%	EP%
Tempo de bancada	-	-	4,8	-2,0	-	-	1,9	13,0
Amostras extraídas	-	-	3,4	4,7	-	-	1,5	11,9
Pós-processamento	4,6	-4,1	4,9	-1,5	1,6	12,2	1,1	12,0
Ciclos de congelamento e descongelamento	-	-	3,8	-5,1	-	-	0,8	11,9

3.3 Avaliação da biodisponibilidade da KAV isolada e em ESK

3.3.1 Quantificação da KAV em amostras reais

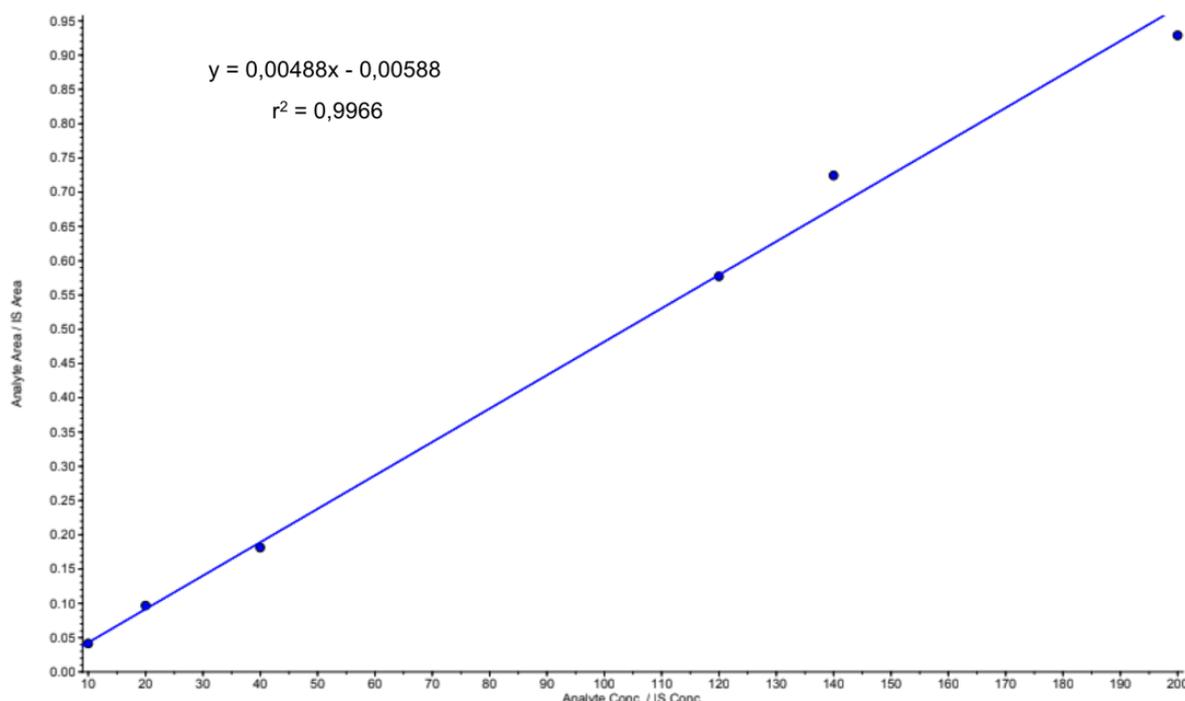
O método bioanalítico validado, utilizando CLAE-EM/EM, para quantificação de KAV foi aplicado para a análise de amostras de plasma de camundongo coletadas após administração por via p.o. do padrão analítico de KAV e da amostra de ESK número 4.

A corrida analítica foi aprovada de acordo com os guias analíticos utilizados para a validação do método bioanalítico. Como pode ser observado na **Tabela 34**, os valores de desvio entre a concentração nominal e aquela calculada para os pontos da curva de calibração foram inferiores a 7%. Em relação aos CQs, os valores de erro padrão relativo e CV% foram de: CQB = 11,99 e 2,42%; CQM = 12,65 e 2,20%; CQA = 13,00 e 3,07%, respectivamente. A curva de calibração resultante, juntamente com a equação da reta e o valor de r^2 , estão representados na **Figura 29**.

Tabela 34 – Dados obtidos durante a construção das curvas de calibração para aplicação do método bioanalítico validado.

Concentração teórica (ng/mL)	Concentração experimental (ng/mL)	EPR (%)
10	9,66	-3,44
20	21,0	5,09
40	38,4	-4,05
120	120	-0,38
140	150	6,95
200	192	-4,16

Figura 29 – Curva de calibração, equação da reta e valor de r^2 obtidos após aprovação da corrida analítica.

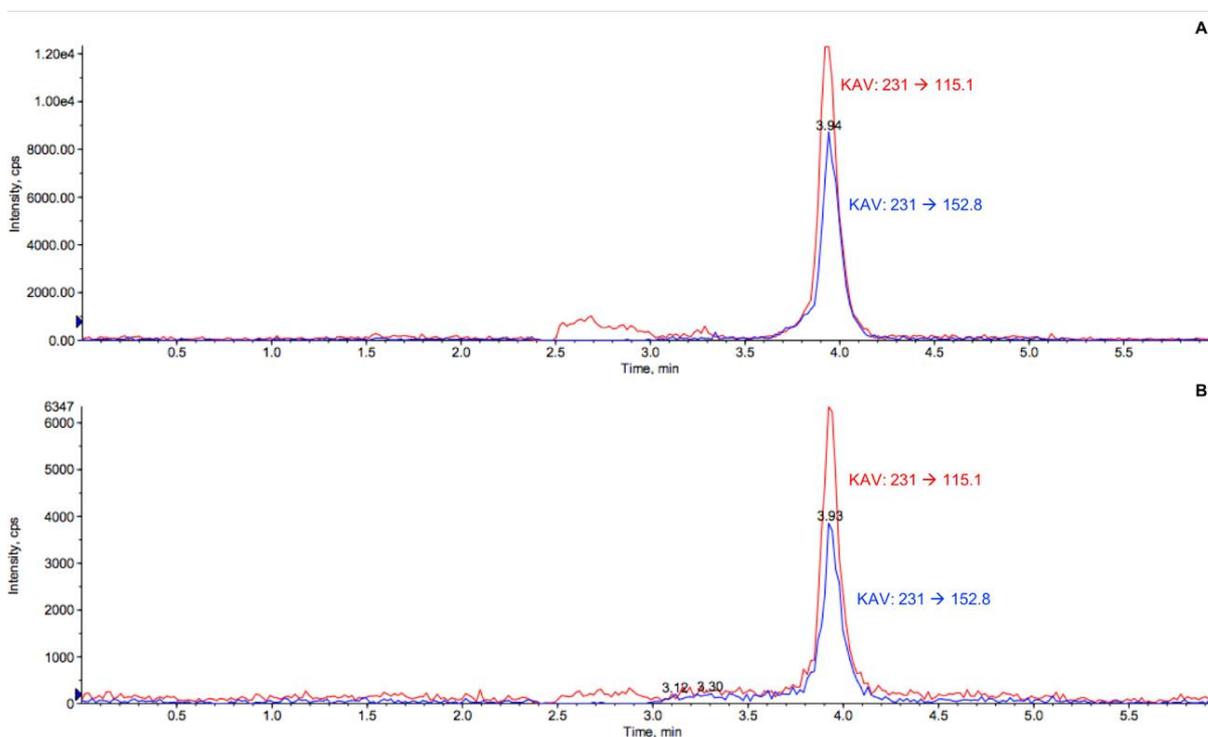


Com a obtenção da equação da reta, o valor de área do pico para a KAV e as concentrações plasmáticas do analito nas amostras reais de plasma de camundongo foram obtidas (**Tabelas 35**). Na **Figura 30** podem ser observados os cromatogramas resultantes da análise de amostras de plasma de camundongo coletadas duas horas após a administração do padrão de KAV e da amostra de ESK número 4. Visto que os valores de concentração obtidos após a administração do extrato foram maiores do que o esperado, as amostras foram diluídas conforme procedimento de diluição previamente validado (**item 3.2.4**).

Tabela 35 – Valores de concentração plasmática da kavaína obtidos a partir da análise de amostra de plasma de camundongo coletados após a administração por via p.o. do padrão analítico de KAV e de amostra de extrato seco de Kava-kava número 4, utilizando o método bioanalítico validado.

Tempo de coleta (h)	Concentração média \pm desvio padrão (ng/mL)	
	Padrão analítico	ESK número 4
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
0,25	46,53 \pm 15,35	3750 \pm 520
0,5	53,17 \pm 25,10	3702 \pm 2026
0,75	45,33 \pm 21,40	2852 \pm 794
1,5	41,77 \pm 9,25	2908 \pm 1018
2	57,80 \pm 10,27	5397 \pm 4884
4	26,90 \pm 10,67	4995 \pm 3772
8	16,00 \pm 0,87	1958 \pm 2732
12	18,80 \pm 6,47	35,33 \pm 17,29
24	11,28 \pm 4,52	20,97 \pm 18,74

Figura 30 – Cromatogramas obtidos após a análise de plasma de camundongo coletados 2 h após a administração por via p.o. do padrão analítico de kavaína (A) e da amostra de extrato seco de Kava-kava número 4 (B), utilizando o método bioanalítico validado.



3.3.2 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos

Após a quantificação da KAV nas amostras de plasma de camundongo, foi possível plotar as curvas de concentração plasmática *versus* tempo para o marcador isolado e presente na amostra de ESK (**Figuras 31A e 31B**). Observa-se que a farmacocinética da kavaína, tanto isolada quanto no ESK, tende a seguir um modelo de distribuição bicompartimental, visto que nas curvas plotadas em escala logarítmica (**Figuras 31C e 31D**), duas retas de decaimento são observadas, representando as fases α (distribuição) e β (eliminação). Nesse tipo de modelo, a distribuição do composto é mais rápida no compartimento central, composto por sangue e órgãos muito irrigados, e mais lenta no compartimento periférico, composto pelos demais tecidos (STORPIRTIS, 2011). A partir dos resultados obtidos também foi possível observar que a KAV apresentou dois máximos de absorção, entre 1 e 2 h, respectivamente, tanto para a KAV isolada quanto presente no extrato. Esta é a primeira vez que esse comportamento é reportado para a KAV, estando possivelmente relacionado a presença de dois sítios de absorção no trato gastrointestinal.

A partir das curvas de concentração plasmática média *versus* tempo obtidas, foram determinados os parâmetros farmacocinéticos para a KAV isolada e presente no extrato (**Tabela 36**). Em estudo desenvolvido por Tarbah e colaboradores, após a administração de 200 mg de KAV sintética por via oral em humanos, foi obtido um $C_{\text{máx}}$ de apenas 18 ng/mL em 1,8 h (TARBAH et al., 2003). Já em relação aos dados disponíveis na literatura sobre a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos da KAV presente no extrato de Kava-kava, Mathews e colaboradores obtiveram valor de $C_{\text{máx}}$ de 5.4 $\mu\text{g/mL}$ após a análise de plasma de ratos após a co-administração por via oral do extrato e do padrão de KAV, resultando em uma dose final de 100 mg/kg (MATHEWS et al., 2005).

Figura 31 – Curvas de concentração plasmática média *versus* tempo, em escala linear e logarítmica, para a kavaína após administração do padrão analítico (A,C) e de amostra de extrato seco de Kava-kava número 4 (B,D).

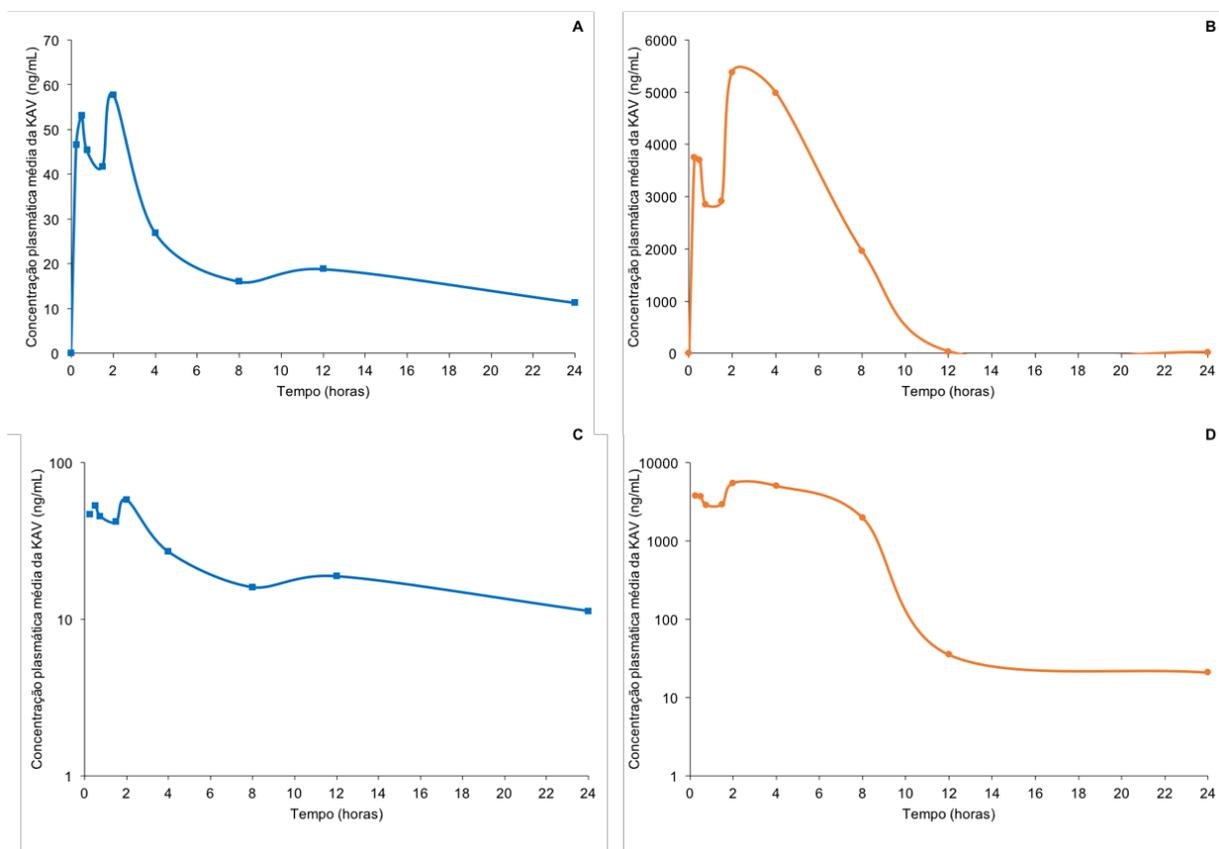


Tabela 36 – Parâmetros farmacocinéticos obtidos para a kavaína (KAV) isolada e presente em amostra de extrato seco de Kava-kava (ESK).

Parâmetro	KAV isolada	KAV presente no ESK
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	72,0	7833,0
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2,0	2,0
ASC_{0-24} (ng.h/mL)	509,0	35076,0
$ASC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	932,0	35558,0
K_{EL} (h^{-1})	-0,027	-0,043
$T_{1/2}$ (h)	26,0	15,9
BD_{REL}		68,95

Enquanto o valor de $C_{m\acute{a}x}$ da KAV presente no extrato foi consideravelmente maior do que aquele obtido para a KAV isolada, seu valor de $T_{1/2}$ foi menor, indicando que sua absorção foi em maior quantidade enquanto a eliminação foi mais rápida quando o

extrato da planta foi administrado em comparação ao marcador isolado. Em relação aos valores de ASC, observou-se que para a KAV presente no extrato o valor de ASC_{0-24} correspondeu a 98,6% da $ASC_{0-\infty}$. Já para a KAV isolada a ASC_{0-24} foi muito menor do que a $ASC_{0-\infty}$, correspondendo a 54,6%. Essa diferença ocorreu devido a eliminação da KAV isolada ter sido mais lenta do que esperado, de forma que o último ponto de coleta em 24 h não foi suficiente para caracterizar de forma adequada a sua fase de eliminação.

A obtenção de um elevado valor de BD_{REL} (**Tabela 36**), obtido quando se divide a ASC_{0-24} da KAV obtida no extrato pela ASC_{0-24} da KAV isolada, demonstra o aumento da biodisponibilidade do marcador quando presente no ESK. Tal fato pode ser considerado indicativo da ocorrência de sinergismo farmacocinético entre este marcador e os demais compostos presentes no extrato (SPINELLA, 2002). Dentre as possíveis explicações para a ocorrência do sinergismo observado pode ser citada a regulação do metabolismo intestinal, em que, por meio da inibição ou redução de processos metabólicos, há uma redução da conversão dos compostos para suas formas excretáveis (GILBERT; ALVES, 2003; JIA et al., 2009; YANG et al., 2014). No caso específico da kava-kava, essa regulação pode ocorrer também por meio da inibição da conversão de fase II das lactonas via CYP450 e suas isoformas (MATHEWS; ETHERIDGE; BLACK, 2002; CÔTE et al., 2004).

Uma segunda explicação para o sinergismo farmacocinético observado pode estar relacionada à competição pelos sítios de ligação plasmáticos entre os compostos presentes no extrato, levando a um aumento da fração livre da KAV, tornando-a mais disponível para os processos de absorção, metabolização e eliminação (SCHOENER, 1986; SPINELLA, 2002).

Além disso, o padrão analítico da KAV, utilizado durante o estudo farmacocinético, se trata de um racemato, sendo desse modo diferente da KAV presente no extrato de Kava-kava que apresenta apenas o enantiômero (R)-(+). Sendo a KAV um composto quiral, a sua ligação às proteínas plasmáticas pode exibir estereoseletividade, assim como os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, influenciando diretamente o perfil farmacocinético e, conseqüentemente, a atividade farmacológica (SHEN et al., 2003; BROCKS, 2006).

Devido aos resultados obtidos indicando a existência de um sinergismo farmacocinético entre a KAV e os demais compostos presentes no extrato, juntamente com a possível influência da estereoseletividade da KAV no seu comportamento, faz-se necessário um estudo do perfil farmacocinético dos seus enantiômeros, de maneira a comprovar sua influência na biodisponibilidade deste marcador.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Um método bioanalítico simples e rápido foi desenvolvido e validado para a quantificação da KAV em amostras de plasma de camundongo utilizando sistema CLAE-ESI-QqQ-LIT. A partir da revisão de literatura realizada, acredita-se que essa foi a primeira vez que o padrão isotopicamente marcado da KAV foi utilizado como PI durante a validação de um método bioanalítico para sua quantificação, além de ser a primeira validação completa realizada de acordo com os guias regulatórios internacionais.

O método desenvolvido e validado foi aplicado em amostras de plasma de camundongo coletadas após a administração por via p.o. do padrão analítico de KAV e de amostra de ESK para um estudo farmacocinético. A partir dos resultados obtidos foi possível obter a curva de concentração plasmática *versus* tempo para a KAV isolada e presente no extrato, assim como determinar os parâmetros farmacocinéticos para analito em cada condição.

Em vista dos resultados obtidos durante o estudo farmacocinético, foi possível observar que a absorção da KAV foi maior e sua eliminação mais rápida quando o extrato da planta foi administrado. Este fator somado ao aumento da biodisponibilidade da KAV quando presente no ESK, podem ser considerados indicativo da ocorrência de sinergismo farmacocinético entre este marcador e os demais compostos presentes no extrato. Tais resultados podem substanciar a utilização de ESK em detrimento da KAV isolada, visando obter maior biodisponibilidade oral deste marcador e conseqüentemente, maior eficácia terapêutica.

Visto que o extrato de Kava-kava apresenta apenas o enantiômero (R)-(+ da KAV, faz-se necessária a avaliação da influência da estereoseletividade na farmacocinética e biodisponibilidade deste marcador.

CAPÍTULO 4
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE
***Piper methysticum* G. Forst**

1. MATERIAIS

1.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com idade entre 8 e 12 semanas (peso aproximado de 30 g), fornecidos pelo biotério da FaFar/UFMG. Durante todo o estudo, os animais foram mantidos em condições ambientais controladas: ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 22 ± 3 °C, ração comercial em pellet (Nuvilab®) e água potável disponibilizada *ad libitum*. Ao final do período de observação, os animais foram anestesiados, eutanasiados por deslocamento cervical e necropsiados.

O protocolo experimental está de acordo com as normas nacionais e aprovado pelo CEUA/UFMG, certificado nº 204/2016 (**ANEXO B**).

1.2 Insumos

Dentre as amostras de ESKs obtidas através de doação pelas farmácias de manipulação, foram selecionadas amostras de dois fornecedores do extrato (**Tabela 37**) em função do teor de kavalactonas declarado no laudo do fornecedor: não declarado e próximo aos 30% descritos nas informações do produto.

Tabela 37 – Lista das substâncias avaliadas em relação a toxicidade aguda, juntamente com o valor de teor informado pelo laudo do fornecedor.

Extrato	Localidade	Fornecedor	Lote	Teor (%)
1	Belo Horizonte	All Chemistry	ALL-054651	NC
4	Belo Horizonte	Galena	1409022102	30,1

NC = não consta

Durante a parte experimental foram utilizados dimetilsulfóxido (DMSO), solução salina estéril, cetamina e xilazina, hematoxilina e eosina.

2. MÉTODOS

A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Toxicologia da FaFar-UFMG, em parceria com o Professor Carlos Alberto Tagliati e a mestrandia Larissa Souza. As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, em parceria com o Professor Geovanni Dantas Cassali.

2.1 Preparo das soluções, doses e vias de administração

Os extratos avaliados foram solubilizados em 2% de DMSO e diluídos em solução salina estéril, resultando em uma concentração final de 20 mg/mL. As soluções foram administradas p.o., em volume de 10 mL/kg, utilizando contenção manual.

2.2 Avaliação da toxicidade aguda

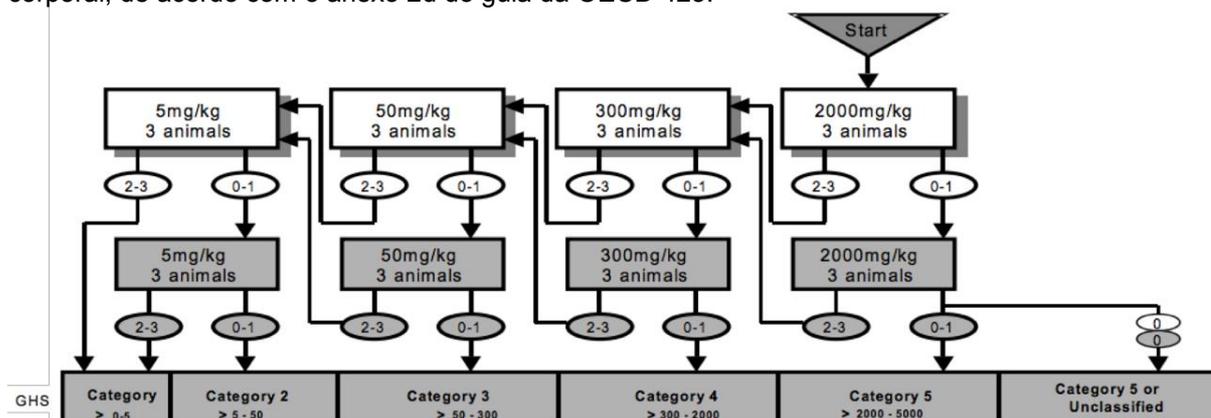
O método de classes para avaliação de toxicidade aguda oral é descrito no guia da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) número 423 (OECD, 2002). Este procedimento é reprodutível e capaz de avaliar substâncias de maneira similar a outros métodos para avaliação de toxicidade aguda, utilizando um menor número de animais do mesmo sexo, gerando informação suficiente para obter a toxicidade aguda de determinada substância. Assim, é possível sua classificação de acordo com a dose tóxica, segundo o *Globally Harmonised System* (GHS), sendo:

- Categoria 1: maior que 0 mg/kg e menor que 5 mg/kg
- Categoria 2: maior que 5 mg/kg e menor que 50 mg/kg
- Categoria 3: maior que 50 mg/kg e menor que 300 mg/kg
- Categoria 4: maior que 300 mg/kg e menor que 2000 mg/kg
- Categoria 5: maior que 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg
- Categoria 5 ou sem classificação: a substância não possui toxicidade identificada até a dose de 2000 mg/kg, portanto a dose é superior a esta.

De acordo com o método, a dose inicial a ser administrada via p.o. deve ser escolhida a partir de testes anteriores ou pelo conhecimento de uso popular da substância a ser administrada, devendo variar entre quatro doses pré-determinadas: 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg de peso corporal. Em cada etapa do teste, são utilizados três animais de um único sexo, preferencialmente fêmeas visto que alguns estudos demonstraram que este modelo é mais sensível em estudos de toxicidade. As fêmeas devem ser nulíparas, não prenhas e adultas jovens. A ausência ou presença de mortalidade

(números localizados dentro dos círculos na **Figura 32**) relacionada ao composto irá determinar a próxima etapa do teste, observando o esquema de etapas descrito no anexo 2d da OECD 423 (**Figura 32**).

Figura 32 – Procedimento do teste de toxicidade aguda com dose inicial de 2000 mg/kg de peso corporal, de acordo com o anexo 2d do guia da OECD 423.



Após o transporte dos animais provenientes do biotério, estes foram divididos aleatoriamente em três grupos (n = 3 animais): controle (administração do veículo composto por solução salina e 2% de DMSO), extrato 1 e extrato 4. Os animais foram mantidos em gaiolas por um período de três dias antes do início dos experimentos para aclimação às condições laboratoriais. Após jejum prévio de três horas, os animais foram pesados e cada grupo recebeu a administração p.o., em dose única, dos respectivos tratamentos.

Nesta primeira etapa do teste, foi realizada a administração dos extratos na dose de 2000 mg/kg de peso corporal. Após o tratamento, os animais foram observados quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos, 2, 3, 4 e 8 horas. Passado o primeiro dia, os animais foram observados duas vezes ao dia até completar um período de 14 dias após o início do teste. Todas as observações (peso, consumo de ração e comportamento) foram devidamente anotadas. O consumo de ração foi verificado nos dias 1, 2, 3 e 4, enquanto o peso corporal foi verificado nos dias 1 a 4, 8, 12 e no dia da eutanásia (14º dia). As alterações comportamentais foram determinadas como ausentes ou presentes. As possíveis alterações comportamentais foram descritas e graduadas através de sinal positivo (+), sendo que um sinal aponta pequena alteração e quatro sinais indicam uma alteração exacerbada de determinado comportamento.

Devido à ausência de mortalidade dos animais ao final da primeira etapa do teste de toxicidade aguda, de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 12, foi realizada a segunda etapa do teste. Para esta segunda etapa foram mantidas as mesmas condições da primeira, assim como a dose administrada, em mais 3 animais para cada grupo (n = 3). Ao final de todos os experimentos, os animais das duas etapas foram eutanasiados por deslocamento cervical após anestesia com cetamina e xilazina, seus órgãos foram observados macroscopicamente quanto a alteração de cor, formato e tamanho, e então o fígado e os rins foram removidos para pesagem e fixados em formaldeído 10%.

2.3 Análise estatística

Os dados de ganho de massa corporal, variação de peso relativo dos fígados e rins foram analisados com o programa estatístico GraphPad Prism 5.0, por meio da análise de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey, que compara cada tratamento em relação ao grupo controle. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, com nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

2.4 Análises histológicas

As amostras de fígado e rins coletadas foram fixadas em formaldeído 10% e em seguida, desidratadas em álcool e incluídas em blocos de parafina. Seções de 4 μm foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram avaliadas por patologistas treinados e as respectivas imagens foram obtidas através de uma câmera conectada ao microscópio óptico (Olympus BX-40; Olympus, Tóquio, Japão).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

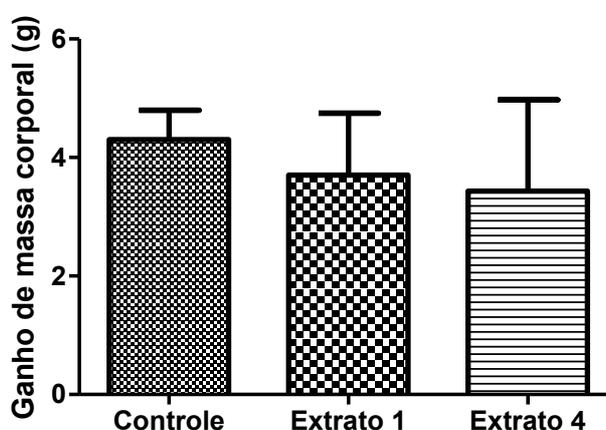
3.1 Avaliação da toxicidade aguda

A partir do procedimento utilizado para o teste de toxicidade aguda, preconizado pela OECD, foi possível observar que a dose administrada de 2000 mg/kg dos extratos de kava-kava números 1 e 4 (contendo cerca de 30% de kavalactonas) não ocasionou óbito aos animais durante as duas etapas do estudo. Devido à ausência de mortalidade durante o teste, os ESK avaliados neste estudo podem ser classificados na categoria 5 ou “sem classificação” pelo critério do GHS, ou seja, não possuem toxicidade identificada até a dose de 2000 mg/kg, sendo a dose tóxica superior a esta.

Em estudo disponível na literatura, o valor de DL₅₀ observado após a administração de extrato de kava-kava, por via oral em camundongos e ratos, foi menor do que 2000 mg/kg (1500 mg/kg) (BRASIL, 2014c). No entanto nesse estudo foi avaliado o extrato acetônico da planta, contendo cerca de 70% de kavalactonas. A maior porcentagem dos marcadores no extrato acetônico, quando comparada ao etanólico (30% de kavalactonas), pode estar diretamente relacionada a obtenção de um valor de DL₅₀ menor do que 2000 mg/kg (WHO, 2004; EMA, 2016).

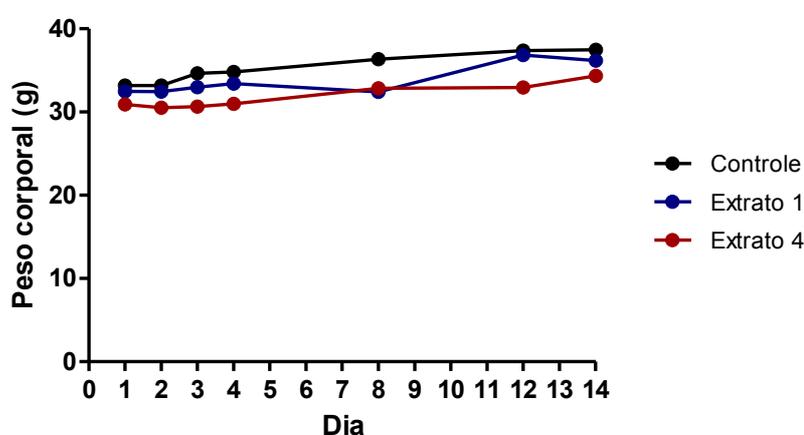
A dose administrada aos animais de cada um dos extratos não influenciou no ganho de massa corporal em relação ao grupo controle, não apresentando diferença estatística entre a sua média com as obtidas para cada extrato avaliado (**Figura 33**).

Figura 33 – Ganho de massa corporal dos animais após catorze dias da administração por via oral dos respectivos tratamentos, durante teste de toxicidade aguda.



Além disso, a administração dos ESKs também não influenciou na variação de massa corporal, sendo esta constante ao longo dos 14 dias de acompanhamento (**Figura 34**). No 8º dia de tratamento dos animais tratados com o extrato 1, foi observada uma diminuição do seu peso médio, no entanto essa diferença foi revertida até a próxima aferição não alterando a variação de peso final.

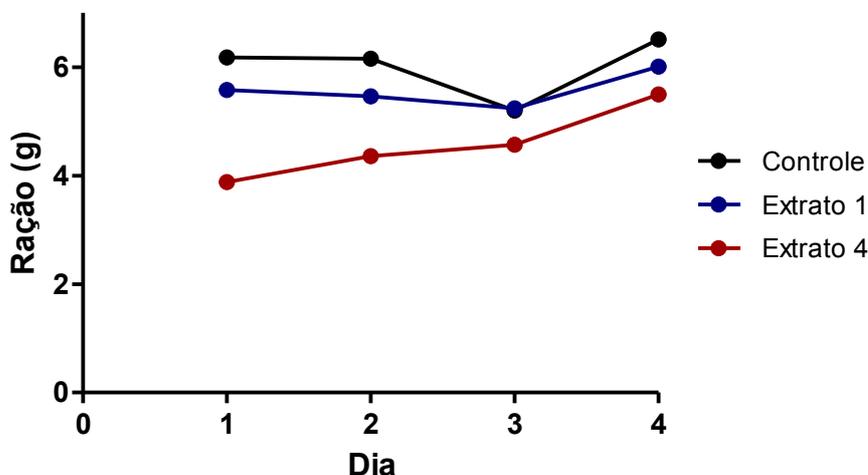
Figura 34 – Variação do peso corporal animal (n = 6) durante catorze dias, obtidos após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, considerando a duas etapas do teste de toxicidade aguda.



Quanto ao consumo de ração dos grupos tratados e controle (**Figura 35**), observou-se uma pequena diferença entre a alimentação do terceiro dia em relação aos dois primeiros, sendo esta reestabelecida nos dias subsequentes. Essa variação pode ser explicada pelo estresse causado durante as administrações dos tratamentos e manuseio dos animais. Como a alteração também foi observada para o grupo controle, sugere-se que não está relacionada a administração dos extratos e seus efeitos.

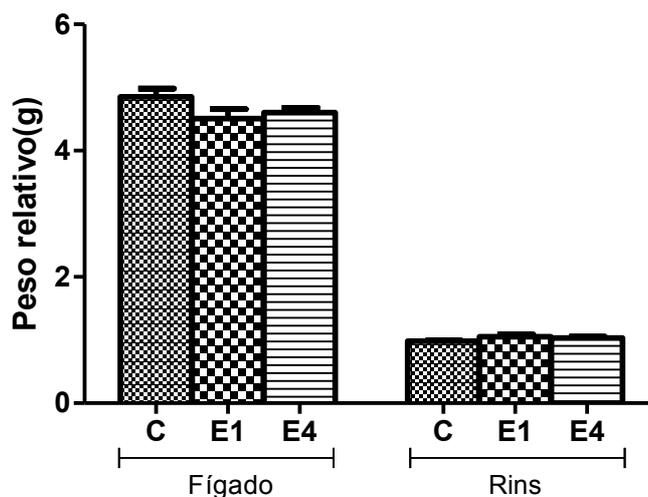
Ainda a respeito dos hábitos alimentares do grupo tratado com veículo, foi observada uma queda no consumo de ração no terceiro dia de acompanhamento (**Figura 35**). Esta diminuição pode estar relacionada a algum problema comportamental entre os animais da gaiola no dia em questão, previamente ao horário da pesagem, visto que, o consumo foi rapidamente normalizado até a aferição do dia seguinte.

Figura 35 – Variação do consumo de ração diário por animal (n = 6) durante os primeiros quatro dias após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, considerando as duas etapas do teste de toxicidade aguda.



Em relação ao peso relativo dos rins e dos fígados dos animais, não foi observada diferença significativa entre os valores obtidos para nenhum dos grupos (**Figura 36**), o que demonstra uma ausência de sinais de toxicidade aguda pela administração p.o. de extrato seco de kava-kava.

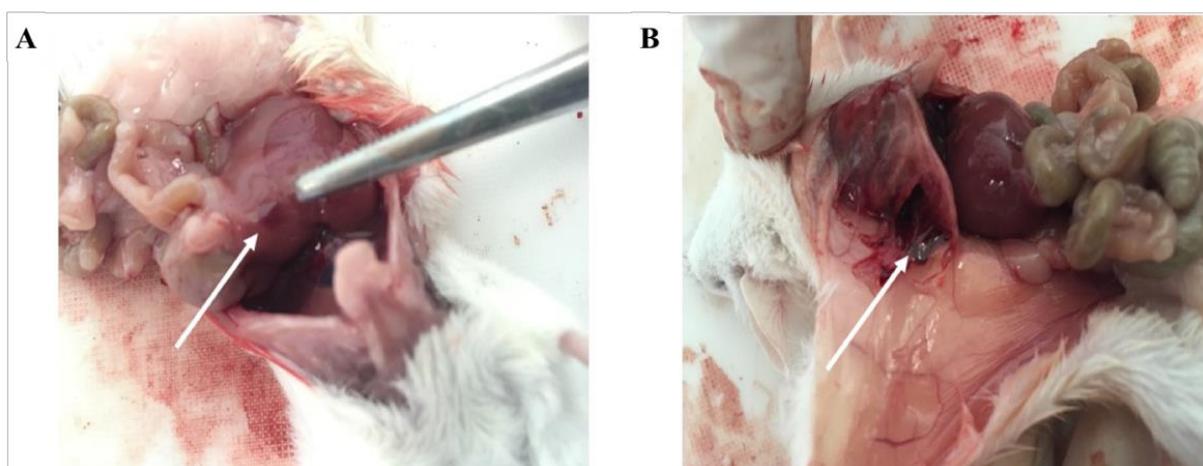
Figura 36 – Variação do peso relativo dos fígados e rins dos animais (n = 6) após catorze dias da administração por via oral dos respectivos tratamentos (C = controle; E1,4 = amostras de extrato seco de Kava-kava números 1 e 4), considerando as duas etapas do teste de toxicidade aguda.



Nas primeiras horas após a administração dos tratamentos, observou-se que o grupo tratado com o extrato 4 apresentou sinais de sedação e fraqueza nas patas traseiras. Como esse quadro foi gradualmente revertido em menos de uma hora, entende-se que esses sinais podem ser explicados pela ação sedativa da kava-kava (BILIA et al., 2004; CÔTÉ et al., 2004), não devendo ser considerados como uma alteração comportamental relacionada a possível toxicidade aguda do extrato.

Durante a necropsia, foi possível observar o escurecimento do baço dos animais tratados com ambos os extratos quando comparados aos animais do grupo controle. Observou-se também a presença de uma região com maior pigmentação no fígado de um animal tratado com o extrato 4 (**Figura 37a**) e uma palidez leve nos rins de três animais tratados com o extrato 1 e quatro animais tratados com o extrato 4. Além disso, nos animais tratados com o extrato 1 houve a presença de um coágulo entre a cavidade pulmonar e o peritônio, do lado direito, que ultrapassava as costelas mais próximas (**Figura 37b**). Entretanto, as alterações morfológicas observadas poderiam estar mais relacionadas à variabilidade interindividual entre os animais do que ao tratamento pelos extratos de kava-kava. Para uma avaliação mais minuciosa do impacto do tratamento nos órgãos em questão, procedeu-se a análise histológica dos mesmos.

Figura 37 – Imagem da necropsia de camundongos ao final do teste de toxicidade aguda, sendo em destaque: região com maior pigmentação no fígado do animal tratado com extrato 4 (A) e coágulo entre a cavidade pulmonar e o peritônio dos animais tratados com extrato 1(B).

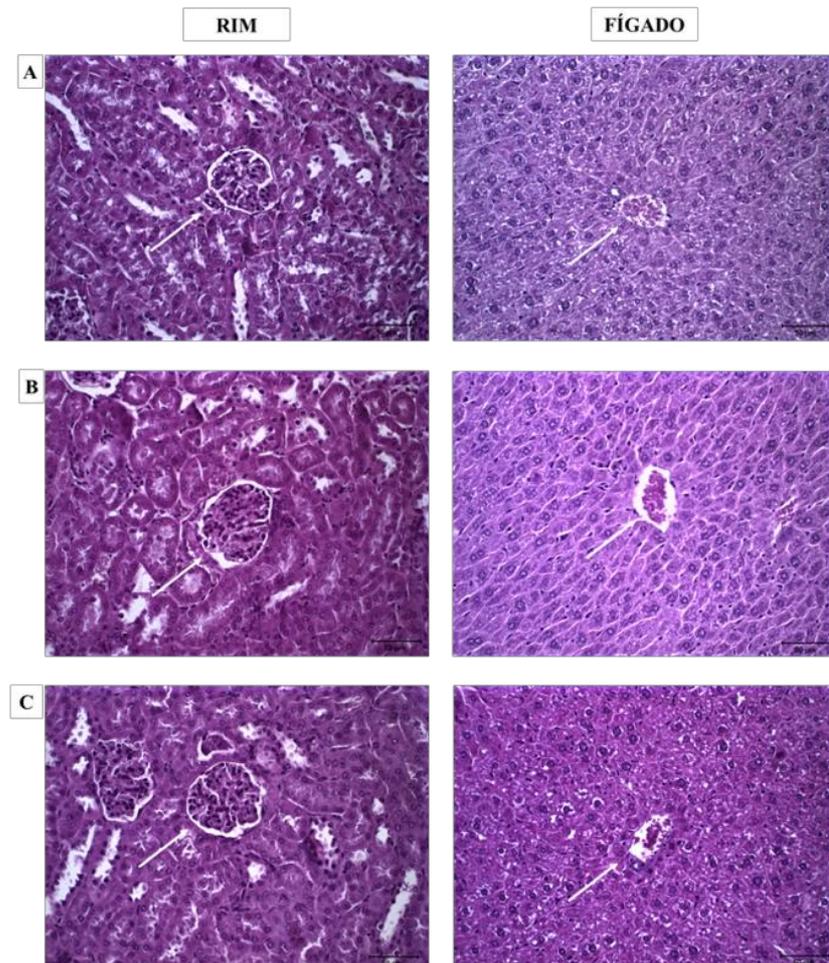


Visto que, a administração de elevadas doses do extrato de kava-kava estão comumente relacionadas ao aparecimento de efeitos hepatotóxicos, com exceção do animal que apresentou uma região com maior pigmentação no fígado, as anomalias macroscópicas observadas (baços e rins) não são condizentes com os eventos tóxicos geralmente relatados pelo uso do extrato (WHITTON *et al.*, 2003; WHO, 2007).

3.2 Análises histológicas

Após a realização das análises histológicas dos rins e fígados coletados, observou-se que não haviam alterações aparentes em nenhum dos órgãos analisados. Sendo que todas as lâminas se apresentaram com histologia semelhante entre si e de acordo com as características morfológicas de cada órgão (**Figura 38**).

Figura 38 – Imagem das lâminas (aumento de 40x) referentes à análise histológica dos rins e fígados de animais do grupo controle (A) e dos grupos tratados com extrato 1 (B) e extrato 4 (C). Em destaque: glomérulo renal e hepático para identificação das lâminas.



Tais resultados demonstram que as alterações macroscópicas observadas anteriormente não tinham relação com possíveis efeitos patológicos tóxicos decorrentes do tratamento com os extratos de kava-kava avaliados neste estudo, mas sim com características inerentes aos animais. Os resultados obtidos estão condizentes com os relatados na literatura, em que as administrações dos extratos aquoso, metanólico e etanólico, em animais, não geraram alterações significativas das funções hepáticas, sugerindo ausência de efeito hepatotóxico (SINGH e DEVKOTA, 2003; LIM et al., 2007; SORRENTINO; CAPASSO; SCHMIDT, 2006).

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir do teste de método de classes utilizado foi possível classificar os ESKs em relação a sua toxicidade aguda. Devido à ausência de mortalidade nas duas etapas do teste, os extratos secos de kava-kava avaliados neste estudo podem ser classificados na categoria 5 ou “sem classificação” pelo critério do GHS.

Essa constatação juntamente com ausência de alterações comportamentais moderadas ou graves indica que os extratos avaliados podem ser considerados de baixa toxicidade aguda. A partir da revisão de literatura realizada, acredita-se que essa é a primeira vez que a toxicidade aguda do extrato de Kava-kava etanólico é avaliada em modelo murino.

A ausência de alterações aparentes durante a análise histológica dos órgãos dos animais tratados com extrato de kava-kava indicam ausência de toxicidade aguda nesses órgãos relacionados à administração dos extratos por via oral.

De maneira a assegurar o uso seguro dos extratos de kava-kava pela população, além do teste de toxicidade aguda em dose única, faz-se necessária a determinação dos parâmetros bioquímicos, assim como a realização de estudos adicionais. De acordo com Guia para condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica da ANVISA, podem ser citados os testes de toxicidade de doses repetidas, toxicidade crônica, hemostasia e carcinogênese, dentre outros (BRASIL, 2013).

CAPÍTULO 5
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTINOCICEPTIVA DOS
EXTRATOS SECOS DO RIZOMA DE *Piper methysticum* G. Forst

1. MATERIAIS

1.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Foram utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana: amostras de ESKs, de cada um dos fornecedores obtidos após a doação pelas farmácias de manipulação, e o padrão analítico de KAV (**Tabela 38**); ponteiras de 200, 1000 e 10000 µL; pipetas automáticas, tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL; tubos para inóculo, berços, alças, microplacas de poliestireno de 96 poços, solução salina, dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 20 0,1%.

Tabela 38 – Lista das amostras avaliadas em relação a sua atividade antimicrobiana, juntamente com o valor de teor total de kavalactonas e de KAV, obtidos a partir do método analítico validado (**Capítulo 2**).

Extrato	Localidade	Fornecedor	Teor total de kavalactonas (%)	Teor de KAV (%)
1	Belo Horizonte	All Chemistry	16,70	1,33
2	Montes Claros	Valdequímica	11,30	1,30
3	Belo Horizonte	Embrafarma	38,54	3,64
4	Belo Horizonte	Galena	46,60	4,88
6	Belo Horizonte	Fagron	46,89	4,45
8	Belo Horizonte	Pharmanostra	47,43	4,61
12	Belo Horizonte	Gemini	51,94	5,18
P	-	Sigma-Aldrich	-	≥ 95,0

P = padrão de KAV

Os meios de cultura utilizados foram: *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640, ágar Sabouraud Dextrose (ASD), caldo Mueller-Hinton (MH), ágar Batata Dextrose (ABD) e *Brain Heart Infusion* (BHI). Todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados em autoclave, além de ter sido preparado controles de crescimento negativos para os meios de cultura. Os microrganismos testados foram:

- Bactérias (*American Type Culture Collection*, ATCC): *Salmonella entérica* subespécie *entérica* sorovar Typhimurium 14028; *Pseudomonas aeruginosa* 27853; *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) 25922; *Enterococcus faecalis* 19433, *Acinetobacter baumannii* 19606, *Staphylococcus aureus* 33591, *Klebsiella pneumoniae* 13882 e *Shigella flexnelli* 12022;

- Fungos: *Candida albicans* ATCC18804, *Candida krusei* ATCC20298, *Cryptococcus gattii* R265, *C. gatti* ATCC24, *C. neoformans* H99, *C. neoformans* TCC62066, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton interdigitale* ATCC 9533, *T. rubrum* ATCC40051 e *Microsporium gypseum*.

Os microrganismos que não possuem número de referência eram pertencentes à Coleção de Cultura de Microrganismos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, com exceção do *M. gypseum* que era proveniente do Laboratório de Micologia, ambos do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG.

1.2 Avaliação da atividade antinociceptiva

Foram utilizados para a avaliação da atividade antinociceptiva: amostras de ESKs representativas de valores de teor de kavalactonas baixo, médio e alto, obtidos por meio de análise das amostras utilizando o método analítico validado (**Capítulo 2**), assim como do padrão analítico de KAV (**Tabela 39**). Utilizaram-se seringas; solução de carboximetilcelulose (CMC) 0,5%, cetamina, xilazina, dipirona sódica e fenobarbital. Dentre os equipamentos, citam-se: cronômetro, placa quente (Modelo EFF 361, Insight, Brasil) e haste girante (2,3 cm de diâmetro, 14 rpm).

Tabela 39 – Lista das substâncias avaliadas em relação a sua atividade antinociceptiva, juntamente com o valor de teor total de kavalactonas e de KAV, obtidos a partir do método analítico validado (**Capítulo 2**).

Extrato	Localidade	Fornecedor	Teor total de kavalactonas (%)	Teor de KAV (%)
1	Belo Horizonte	All Chemistry	16,70	1,33
5	Belo Horizonte	Galena	32,61	3,62
12	Belo Horizonte	Gemini	51,94	5,18
P	-	Sigma-Aldrich	-	≥ 95,0

P = padrão de KAV

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso entre 25 e 30 g (aproximadamente 42 dias), fornecidos pelo biotério da FaFar/UFMG. Durante todo o estudo, os animais foram mantidos em condições ambientais controladas: ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura controlada de 27 ± 1 °C (zona de termoneutralidade

de roedores), ração e água disponibilizada *ad libitum*. O protocolo experimental está de acordo com as normas nacionais e aprovado pelo CEUA/UFMG, certificado nº 176/2017 (**ANEXO C**).

2. MÉTODOS

2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Micologia do ICB/UFMG, em parceria com o Professor Daniel de Assis Santos e os doutorandos Rafael Wesley Bastos e Paulo Fonseca.

2.1.1 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

A susceptibilidade dos microrganismos frente aos extratos de kava-kava avaliados foi determinada segundo metodologia de microdiluição em caldo, em placa de poliestireno de 96 poços, conforme proposto pelos documentos M7-A9 para bactérias, M27-A3 para leveduras, M38-A2 para fungos filamentosos, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e M38-A2 modificado para fungos dermatófitos (CLSI, 2008a,b e 2012; BARROS; SANTOS; HAMDAN, 2007).

2.1.2 Preparo dos inóculos de bactérias

Os inóculos das bactérias analisadas foram preparados a partir do crescimento das amostras em BHI com incubação a 37 °C por, aproximadamente, 24 horas. Padronizou-se a concentração da suspensão bacteriana por meio da comparação da turbidez do inóculo, em relação ao padrão 0,5 da escala de *MacFarland*, em espectrofotômetro com leitura a 625 nm. Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorvância deve estar entre 0,08 e 0,10, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após a padronização, a suspensão bacteriana foi homogeneizada em vórtex e diluída na proporção 1:50, seguida da diluição de 1:20, ambas em caldo MH, para obtenção do inóculo concentrado usado no teste entre $1,0 \times 10^5$ e $2,0 \times 10^5$ UFC/mL (CLSI, 2012).

2.1.3 Preparo dos inóculos de fungos

As amostras de levedura foram previamente cultivadas em meio ASD por 24 horas (*Candida* spp.) ou 48 horas (*Cryptococcus* spp.), a temperatura de 35 °C. As colônias coletadas foram suspendidas em solução salina, agitadas em vórtex por 15 segundos e, em seguida, suas porcentagens de transmitância foram lidas no espectrofotômetro a 530 nm. Foram efetuadas diluições necessárias com solução salina estéril, de maneira que fossem obtidas porcentagens de transmitância entre 77 e 75%, gerando

desse modo, suspensões estoque com concentrações finais de $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, de cada fungo testado. A partir dessas suspensões, foram preparadas suspensões de trabalho de cada fungo, pela diluição de 1:50 seguido de diluição de 1:20 da suspensão de trabalho em meio RPMI-1640, resultando em suspensões finais com concentração entre $5,0 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^3$ UFC/mL.

Em relação às amostras de fungos filamentosos, estas foram previamente cultivadas em meio ABD por 7 dias a temperatura de 35°C . Em seguida, adicionou-se 3 mL de solução salina e Tween 20 0,1% à cultura de cada fungo para suspensão dos conídios. Estes foram então coletados e seus níveis de transmitância foram lidos no espectrofotômetro a 530 nm. Foram realizadas diluições necessárias de maneira a se obter um valor entre 80 e 82%. Em seguida, essa suspensão foi diluída de 1:50 em meio RPMI-1640, resultando em uma suspensão final com concentração de $1,0 \times 10^3$ esporos/mL.

Inicialmente, as amostras de fungos dermatófitos foram cultivadas em meio ABD por 7 dias a temperatura de 28°C para induzir sua esporulação. Após o tempo de crescimento, as colônias foram cobertas com água destilada e tiveram sua superfície raspada com uma alça estéril para coleta dos conídeos e fragmentos de hifas. Em seguida, essa mistura foi filtrada em filtro com diâmetro de poro de $8\ \mu\text{m}$ para remoção das hifas, produzindo um inóculo composto majoritariamente por esporos. A turbidez do inóculo final foi ajustada pela leitura de transmitância em espectrofotômetro a 520 nm. Foram realizadas diluições necessárias de maneira a se obter um valor entre 70 e 72%. Em seguida, essa suspensão foi diluída de 1:50 em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de glicose, resultando em uma suspensão final com concentração entre $2,0 \times 10^4$ e $4,0 \times 10^4$ esporos/mL.

2.1.4 Preparo das placas

Primeiramente, 205 μL da solução final de cada extrato solubilizado foram adicionados nos respectivos tubos tipo Falcon contendo 4 mL de meio RPMI-1640 (fungos) ou de caldo MH (bactérias). Após a adição, foram realizadas diluições sucessivas em 2 mL do respectivo meio, gerando soluções com as concentrações finais de 512, 256, 128, 64 e 32 $\mu\text{g/mL}$. Para as análises referentes a avaliação antifúngica, foram testadas todas as concentrações preparadas, enquanto para as análises referentes a atividade antibacteriana utilizou-se somente a maior concentração, visto que na literatura não

há relatos de uso popular dos extratos de kava-kava para o tratamento de infecções bacterianas.

Após as diluições, 100 µL das soluções finais de cada concentração dos extratos avaliados foram adicionadas nos poços correspondentes de cada microplaca, já contendo 100 µL do respectivo meio de cultura, com exceção de uma fileira pré-definida em que não foi adicionado nenhum extrato para controle de crescimento positivo de cada fungo a ser testado. As análises foram realizadas em duplicata tanto para os fungos e bactérias quanto para os extratos avaliados.

Após a preparação dos inóculos, 100 µL da suspensão de trabalho de cada microrganismo foram adicionados aos respectivos poços das microplacas, em duplicata. Por fim, as placas referentes aos fungos dermatófitos foram incubadas a temperatura de 28 °C e as leituras foram realizadas após 7 dias de crescimento. Enquanto isso, as demais placas foram incubadas a temperatura de 35 °C e as leituras foram realizadas após 24 horas para as bactérias, 48 horas para *Candida* spp. e *Aspergillus fumigatus* e 72 horas para *Cryptococcus* spp. Em seguida, os crescimentos dos microrganismos foram comparados visualmente com o controle positivo utilizado em cada microplaca, de maneira a determinar a CIM de cada extrato frente aos microrganismos avaliados. Os valores foram determinados como a menor concentração do extrato sem crescimento aparente do microrganismo quando comparado ao controle positivo de crescimento.

2.2 Avaliação da atividade antinociceptiva

A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Farmacologia da FaFar-UFMG, em parceria com o Professor Renes de Resende Machado e o doutorando Felipe Fernandes Rodrigues.

2.2.1 Preparo das soluções, doses e vias de administração

Soluções das amostras de ESK e do padrão analítico de KAV foram preparados em CMC 0,5% a 20 mg/mL e 0,93 mg/mL, respectivamente. A escolha das doses para os extratos e para o padrão de kavaína foram baseadas em dados encontrados na literatura, sendo administrados 150 mg/kg de ESK ou 7 mg/kg do padrão de kavaína (correspondendo a um teor de 4,66% do extrato). As soluções de dipirona sódica e

fenobarbital também foram preparadas em CMC 0,5%, nas concentrações de 500 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente.

Na noite antecedente a cada experimento, os animais foram deixados em jejum de 10 horas, tendo em vista que os tratamentos seriam administrados por via *per os* (p.o.), em volume de 8 mL/kg, com contenção manual. Os testes de placa quente e haste girante foram realizados 2 h após a administração de cada tratamento, sendo este o valor de $T_{máx}$ obtido para a KAV durante o estudo farmacocinético (**Capítulo 3**).

Após a realização de todos os testes, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após sedação/anestesia com solução contendo cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg).

2.2.2 Animais

Antes do início dos experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas por um período de três dias para aclimação às condições laboratoriais, sendo divididos aleatoriamente em 6 grupos (**Tabela 40**). Para o teste de placa quente, a divisão foi feita de maneira que as massas corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Já para o teste de haste girante, os animais foram divididos aleatoriamente de maneira que os tempos basais médios, obtidos durante a etapa de ambientação no equipamento, dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes.

Tabela 40 – Grupos e substâncias utilizadas no teste de avaliação da atividade antinociceptiva.

Grupos	Placa quente (n = 5 animais por grupo)	Haste girante (n = 5 animais por grupo)
1	Controle negativo – CMC 0,5%	Controle negativo – CMC 0,5%
2	Extrato 1*	Extrato 1
3	Extrato 5*	Extrato 5
4	Extrato 12	Extrato 12
5	Padrão de KAV	Padrão de KAV
6	Controle positivo – Dipirona sódica	Controle positivo – Fenobarbital

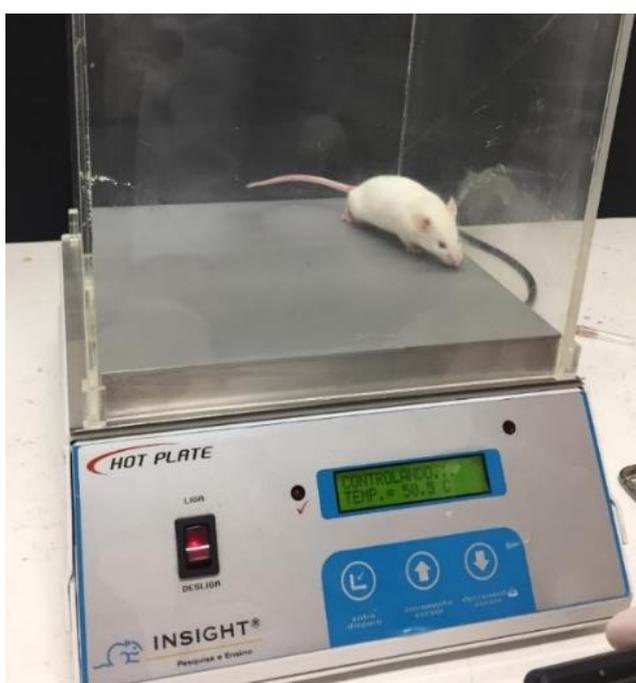
*n = 4 animais

2.2.3 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor (placa quente) em camundongos

De maneira a avaliar a resposta antinociceptiva dos extratos, assim como do padrão de KAV, inicialmente foi avaliada a resposta nociceptiva induzida por calor, em placa quente. O modelo utilizado para a realização deste teste foi originalmente descrito por Woolfe e MacDonald em 1944, em que, no dia anterior à realização do experimento, os camundongos são colocados individualmente sobre a superfície não aquecida da placa durante 120 segundos para ambientação (WOOLFE; MACDONALD, 1944).

No dia da realização do experimento, os animais receberam a administração dos seus respectivos tratamentos, por via p.o., e após 2 h foram colocados, individualmente, sobre a placa metálica aquecida a temperatura de 50 °C (**Figura 39**). Visto que a resposta antinociceptiva da dipirona já é bem estabelecida, sua avaliação foi realizada com o tempo de 1 h após a administração. O tempo para que os animais exibissem comportamentos indicativos de desconforto (início da lambida das patas traseiras) foi cronometrado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. De maneira a evitar a ocorrência de lesão tecidual, foi determinado um tempo de corte de 40 segundos para retirada dos animais da placa.

Figura 39 – Teste de resposta nociceptiva induzida por calor em placa quente.



Os resultados obtidos para as amostras de ESK e para o padrão de KAV foram comparados ao controle negativo (CMC 0,5%) e ao controle positivo (dipirona sódica) através de análise estatísticas dos dados.

2.2.4 Avaliação da atividade motora em haste girante

Após a avaliação da resposta nociceptiva das amostras de ESK e do padrão analítico de KAV, utilizando modelo de placa quente, foi avaliada a influência desses tratamentos na atividade motora dos camundongos. Para isso foi utilizado procedimento proposto por Vaz e colaboradores, em que a atividade é avaliada em haste girante (**Figura 40**) após treinamento dos animais no aparato, nos dois dias que antecedem o experimento, durante 120 segundos (VAZ et al., 1996).

No dia do experimento, os animais foram colocados sobre o aparato após 2 h da administração dos respectivos tratamentos por via p.o.. O tempo de permanência na haste girante foi determinado, utilizando como tempo de corte 120 segundos. Os resultados obtidos para as amostras de ESK e para o padrão de KAV foram comparados ao controle negativo (CMC 0,5%) e ao controle positivo (fenobarbital) através de análise estatísticas dos dados.

Figura 40 – Teste de atividade motora em haste girante.



2.2.5 Análise estatística

Os dados de tempo de latência para o teste de placa quente e tempo de permanência na haste giratória foram analisados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0, por meio do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, seguido ANOVA de uma via, com pós-teste de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média com nível de significância de 5% ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Após a avaliação visual das microplacas, foi possível observar que tanto os extratos secos do rizoma de kava-kava quanto o padrão de kavaína avaliados não possuem atividade antibacteriana frente às bactérias utilizadas neste estudo (valores de CIM maiores que 512 µg/mL). Esse resultado está condizente com o encontrado por Locher e colaboradores em 1995 (LOCHER et al., 1995). Já em relação aos estudos desenvolvidos por Pereira em 2015, em foi encontrada atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *E. coli*, a diferença no resultado obtido pode ser explicada pelo modo de extração dos extratos avaliados (PEREIRA et al, 2015). Enquanto neste estudo foram avaliados os extratos etanólicos secos, no estudo acima citado foram avaliados extratos hidroalcoólicos. Essa diferença no modo de extração pode influenciar diretamente na composição quali e quantitativa dos marcadores ativos dos extratos (SCHÜLZ et al., 2002).

A respeito da atividade antifúngica, com exceção dos fungos *Cryptococcus* spp, nenhum dos fungos avaliados teve seu crescimento inibido pelos extratos em teste. Em comparação aos demais estudos encontrados na literatura, referente a atividade antifúngica de extratos de kava-kava, essa é a primeira vez em que é relatada sua atividade frente a espécie *Cryptococcus* spp. Além disso, por mais que os estudos encontrados relatem uma atividade antifúngica da kava-kava para outras espécies de fungo, estes são referentes a análises realizadas com o extrato aquoso do rizoma de kava-kava (GUÉRIN e RÉVEILLÈRE, 1984; LOCHER et al, 1995), e novamente a diferença na forma de extração da planta pode influenciar diretamente a composição do extrato e conseqüentemente as suas atividades biológicas.

Em relação à atividade antifúngica apresentada frente aos fungos *Cryptococcus* spp, na **Tabela 41** podem ser observados os valores de CIM determinados para cada um dos extratos frente as linhagens avaliadas. Nela é possível verificar que os extratos 1 e 2, que possuem os menores valores de teor total de kavalactonas dentre as amostras em estudo, não foram capazes de promover a inibição de crescimento em nenhum dos fungos testados. Já os extratos 3, 4, 6, 8 e 12 apresentaram valor de CIM de 512 µg/mL para as duas linhagens de *C. neoformans*. Em relação às linhagens de *C. gatti*, os extratos 6 e 8 apresentaram valor de CIM de 256 µg/mL somente em

relação à linhagem R265, enquanto o extrato 4 foi o único que apresentou valor de CIM de 256 µg/mL para as duas linhagens de *C. gatti* avaliadas.

Tabela 41 – Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL dos extratos de kava-kava frente a duas linhagens de *Cryptococcus gatti* e de *C. neoformans*.

Fungos		CIM (µg/mL)							Padrão
		Extrato de Kava-Kava							
		1	2	3	4	6	8	12	
<i>Cryptococcus gattii</i>	R265	>512	>512	512	256	256	256	512	>512
	ATCC 24065	>512	>512	512	256	512	512	512	>512
<i>Cryptococcus neoformans</i>	H99	>512	>512	512	512	512	512	512	>512
	ATCC 24067	>512	>512	512	512	512	512	512	>512

Após a determinação dos valores de CIM para *C.gatti*, foi possível observar que estes valores foram menores para a linhagem R265 quando comparados aos obtidos para a linhagem ATCC 24065. Essas duas linhagens de *C. gattii* apresentam origens diferentes, enquanto ATCC 24065 é uma linhagem de referência comercializada, R265 foi isolada de um paciente, responsável por um surto de criptococose na Ilha de Vancouver. Visto que R265 possui fatores de virulência mais bem definidos, como a capacidade de sintetizar melanina, produzir uma cápsula polissacarídica, além de sobreviver e proliferar a 37 °C (CHENG; SHAM; KRONSTAD, 2009), seria esperado que os valores de CIM obtidos no teste fossem maiores do que para a linhagem ATCC 24065, ou seja, o oposto do que foi observado.

No entanto, estudos desenvolvidos no Laboratório de Micologia da UFMG com linhagens de *C. gatti* demonstraram que uma linhagem mais virulenta também pode ser mais susceptível ao tratamento com antifúngicos em comparação a uma menos virulenta. Neste estudo, os autores cultivaram a linhagem L27/01 em fluconazol até obter uma linhagem resistente, chamada de L27/01_F, ou seja, com menor susceptibilidade ao tratamento com fluconazol. Porém, a análise da L27/01_F indicou que esta era menos virulenta do que a sua linhagem inicial (SANTOS et al., 2014). Este mesmo resultado foi observado em relação a inibição do crescimento das linhagens R265 e ATCC 24065 pelos extratos de kava-kava avaliados, em que a linhagem mais virulenta (R265) foi mais susceptível ao tratamento.

Dentre as amostras que apresentaram atividade antifúngica, os extratos 4, 6 e 8, além de apresentar valor de teor total de kavalactonas semelhante, foram as amostras com menores valores de CIM frente aos fungos avaliados. Já as amostras 3 e 12, apresentaram valores de CIM iguais mesmo possuindo valores de teor de kavalactonas distintos, com uma diferença de 13,4%. Visto que não foi observada inibição de crescimento de nenhum dos fungos pelo padrão de kavaína, há um indicativo de que a inibição gerada pelos extratos não tenha sido causada por esta kavalactona. Como a atividade antifúngica foi observada em 5 dos 7 extratos avaliados, pode-se inferir que o efeito esteja relacionado a mais de um composto presente no extrato, devido a ausência de relação direta entre o efeito inibitório e os valores de teor total das kavalactonas avaliadas neste estudo (MET, DHM, KAV, DHK, YAN e DXY).

3.2 Avaliação da atividade antinociceptiva

Ao final dos testes de avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor em placa quente, foram determinados os valores de latência médios para cada grupo tratado (**Tabela 42**). Após a transformação matemática dos valores obtidos, usando a função $\log(Y+1)$, comprovou-se que os resultados seguem a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

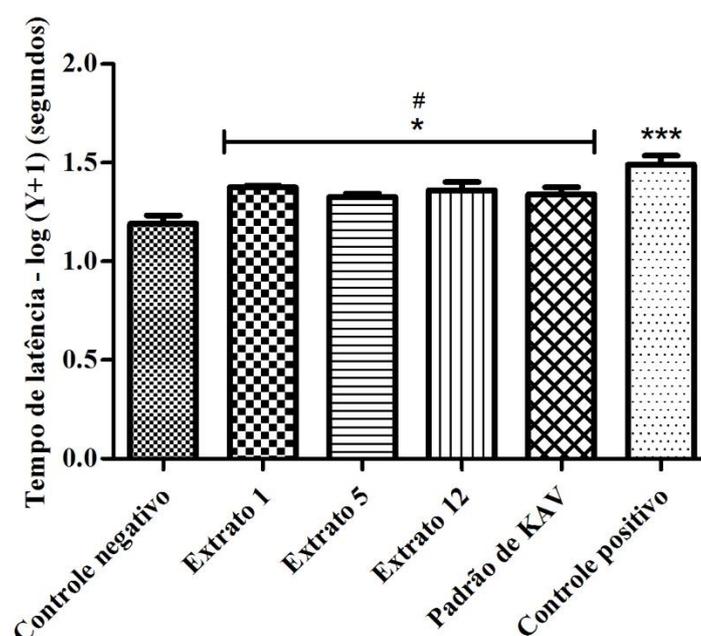
Tabela 42 – Resultados obtidos para os testes de avaliação de atividade nociceptiva induzida por calor e de atividade motora em haste girante, em média \pm erro padrão da média (em segundos).

Grupo	Placa quente	Haste girante
Controle negativo	14,80 \pm 1,46	120 \pm 0,00
Extrato 1	22,75 \pm 0,47	120 \pm 0,00
Extrato 5	20,25 \pm 0,85	120 \pm 0,00
Extrato 12	22,40 \pm 2,52	120 \pm 0,00
Padrão de KAV	21,20 \pm 1,77	120 \pm 0,00
Controle positivo	30,60 \pm 3,18	8,60 \pm 1,66

Após a realização de ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls, observou-se que todos os extratos avaliados apresentaram valores de latência com diferença estatisticamente significativa (**Figura 41**) em relação ao grupo tratado com veículo (controle negativo), demonstrando a atividade antinociceptiva desses extratos em modelo de calor induzido. Essa diminuição de resposta nociceptiva pela kava-kava

também foi observada por Jamieson e Duffield, em modelo animal de constrição abdominal após a injeção de ácido acético. No entanto, neste estudo os testes foram realizados 1 e 55 minutos após administração por via oral de 200 mg/kg de resina de kava-kava e 250 mg/kg de extrato aquoso, respectivamente (JAMIESON e DUFFIELD, 1990). No entanto, os valores de latência obtidos para os animais tratados com os extratos, assim como o padrão de KAV, também apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo (dipirona sódica). Desse modo, entende-se que a atividade antinociceptiva observada para os extratos e para o padrão ainda não é comparável a da dipirona, fazendo-se necessária a avaliação da resposta em doses mais elevadas tanto do extrato quanto da KAV.

Figura 41 – Tempo de latência obtido para os animais após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, durante avaliação da atividade nociceptiva induzida por calor.



* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo (controle negativo) ($P < 0,05$);

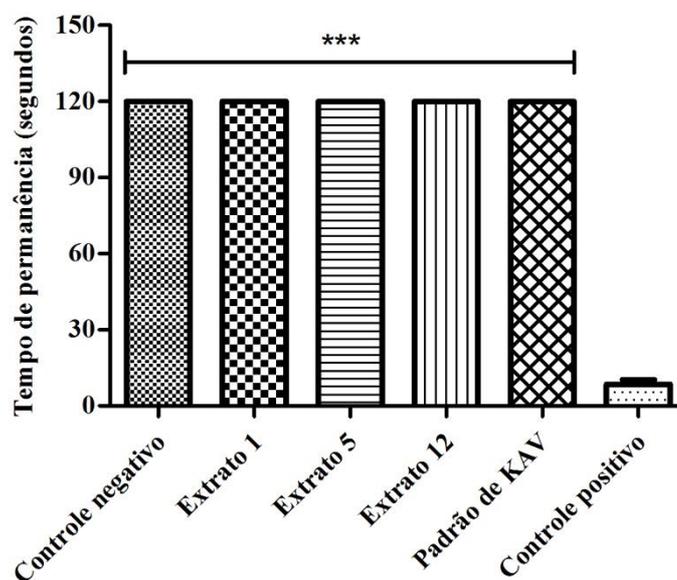
*** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo (controle negativo) ($P < 0,001$).

indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com dipirona sódica (controle positivo) ($P < 0,05$);

Visto que o padrão de KAV também apresentou diferença estatística em relação aos tempos de latência do veículo (**Figura 41**), há o indicativo que a atividade antinociceptiva do extrato está relacionada à presença desta kavalactona. No entanto, não é possível concluir que o efeito esteja relacionado exclusivamente a este composto, devido a ausência de diferença estatística entre os resultados obtidos para os extratos e para o padrão de KAV, juntamente com a amplitude encontrada entre os valores de teor de KAV e total de kavalactonas (**Tabela 39**) das amostras analisadas.

De maneira a excluir a possibilidade do efeito antinociceptivo observado estar relacionado a alterações na resposta motora, os animais foram submetidos ao aparato de haste girante 2 h após os tratamentos por via p.o.. Após realização de ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de Newman-Keuls, dos resultados obtidos (**Tabela 19**), observou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com extrato e com padrão de KAV em relação ao controle negativo (**Figura 42**). Indicando, desse modo, não haver comprometimento da atividade motora capaz de alterar a resposta do tempo de latência no teste de placa quente.

Figura 42 – Tempo de permanência obtido para os animais após a administração por via oral dos respectivos tratamentos, durante avaliação da atividade motora em haste girante.



*** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com fenobarbital (controle positivo) ($P < 0,001$).

Desta forma, comprova-se que a atividade antinociceptiva observada não ocorre devido a efeito sedativo ou comprometimento da resposta motora dos animais pelos extratos de kava-kava e padrão de kavaína.

Jamieson e Duffield demonstraram que a analgesia dos extratos de kava-kava ocorre por via não-opiíide, visto que seu efeito antinociceptivo não foi bloqueado pela administração de naloxona, antagonista da morfina (JAMIESON e DUFFIELD, 1990). Sendo assim, futuros estudos são necessários para determinar a via pela qual a analgesia observada ocorre.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos pela análise da atividade antimicrobiana do extrato seco de kava-kava, foi possível verificar que os extratos avaliados não apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias avaliadas neste estudo.

Em relação à atividade antifúngica, foi verificada a inibição do crescimento de duas espécies de *Cryptococcus*, na presença de cinco amostras de ESK. Visto que o padrão de KAV não apresentou efeito inibitório, pressupõe-se que a atividade apresentada pelos extratos não está relacionada a esta kavalactona. Devido a ausência de relação direta entre efeito inibitório e o teor das principais kavalactonas presentes no extrato de kava-kava, há o indicativo de que a atividade antifúngica apresentada esteja relacionada a mais de um composto presente no extrato.

No entanto, mesmo frente a valores de CIM pelos extratos, estes ainda são considerados elevados, tornando a continuidade dos testes desnecessária, visto que a dose a ser utilizada para os ensaios *in vivo* seria muito alta quando comparada aos antifúngicos convencionalmente usados na terapêutica.

A partir da revisão de literatura realizada, acredita-se que esta é a primeira vez a atividade antimicrobiana do extrato seco de Kava-kava etanólico foi demonstrada frente aos micro-organismos avaliados neste estudo.

A atividade antinociceptiva de diferentes extratos de kava-kava, assim como do padrão analítico da KAV, foi comprovada por meio de modelo de calor induzido (placa quente), após 2 h da administração dos tratamentos por via p.o..

Por meio do teste em haste girante, comprovou-se que o efeito antinociceptivo não está relacionado a comprometimento da resposta motora dos animais após o tratamento.

A partir da revisão de literatura realizada, acredita-se que esta é a primeira vez a atividade antinociceptiva do extrato etanólico seco de kava-kava foi demonstrada em modelo murino, após administração por via p.o., em estímulo de calor induzido (placa quente).

CAPÍTULO 6
CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÃO GERAL

O método analítico por CLAE-DAD desenvolvido e validado permitiu a quantificação simultânea das seis kavalactonas em ESK de forma seletiva e eficiente. A análise de 16 amostras de ESK obtidas de farmácias magistrais demonstrou elevada variabilidade no teor das kavalactonas, sendo que apenas uma amostra atendeu aos limites de variação de 15% do teor de kavalactonas (30%) especificação na legislação (BRASIL, 2014b), demonstrando a necessidade de melhor controle e padronização destas amostras.

O método bioanalítico por CLAE-ESI-QqQ-LIT desenvolvido e validado se mostrou rápido, sensível e seletivo para quantificação de kavaína em plasma de camundongo e permitiu a realização de um estudo farmacocinético para a KAV isolada e presente em amostras de ESK. Os resultados obtidos demonstraram uma maior biodisponibilidade da KAV presente no extrato em comparação a sua forma isolada, sendo considerado indicativo da ocorrência de sinergismo farmacocinético entre este marcador e os demais compostos presentes no extrato.

O ensaio de toxicidade aguda empregando o método de classes possibilitou a classificação dos extratos avaliados na categoria 5 ou “sem classificação” que, somado à ausência de alterações aparentes durante a análise histológica dos órgãos dos animais tratados, indica que os extratos podem ser considerados de baixa toxicidade aguda.

Empregando o método de microdiluição em caldo, foi verificada ausência da atividade antibacteriana tanto para as amostras de extrato quanto para o padrão de KAV. A atividade antifúngica foi observada para alguns extratos frente ao fungo *Cryptococcus ssp*, no entanto, a ausência de atividade pelo padrão de KAV sugere que o efeito observado pode estar ligado a outros compostos presentes no extrato. A atividade antinociceptiva em modelo murino de calor induzido foi demonstrada tanto para os extratos quanto para o padrão de KAV, sendo comprovada a ausência de influência da atividade sedativa inerente da planta na resposta motora dos animais.

O presente trabalho contribuiu para a disponibilização de métodos analítico e bioanalítico para a quantificação de kavalactonas, que podem ser empregados para a realização de um controle de qualidade efetivo dos produtos a base de kava-kava e

de futuros estudos farmacocinéticos com a planta. Além disso, foi possível agregar mais informações a respeito das atividades terapêuticas e da segurança dos extratos de kava-kava, que podem ser úteis durante a utilização destes produtos pela população.

REFERÊNCIAS

AMARAL, P. A.; BERGOLD, A. M.; EIFLER-LIMA, V. L. Antinociceptive effects of some synthetic δ -valerolactones. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 1, p. 69-75, 2005.

AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. **Association of Official Analytical Chemists**, Maryland, 2003.

BARBOSA, D. R.; LENARDON, L.; PARTATA, A. K. Kava-kava (*Piper methysticum*): uma revisão geral. **Revista Científica do ITPAC**, v. 6, n. 3, pub. 3, 2013.

BARROS, M. E. S.; SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of susceptibility of Trichophyton mentagrophytes and Trichophyton rubrum clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 514–518, 2007.

BAUM, S. S.; HILL, R.; ROMMELSPACHER, H. Effect of kava extract and individual kavapyrones on neurotransmitter levels in the nucleus accumbens of rats. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 22, n. 7, p. 1105-1120, 1998.

BEHL, M.; NYSKA, A.; CHHABRA, R.S.; TRAVLOS, G.S.; FOMBY, L.M.; SPARROW, B.R. et al. Liver toxicity and carcinogenicity in F344/N rats and B6C3F1 mice exposed to Kava Kava. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2820-2829, 2011.

BILIA, A. R.; SCALISE, L.; BERGONZI, M. C.; VINCIERI, F. F. Analysis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 203-214, 2004.

BOBELDIJK, I.; BOONZAAIJER, G.; SPIES-FABER, E.J.; VAES, W.H.J. Determination of kava lactones in food supplements by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 107–114, 2005.

BOERNER, R. J.; MOLLER, H. J. The importance of new antidepressants in the treatment of anxiety/ depressive disorders. **Pharmacopsychiatry**, v. 32, p.119-126, 1999.

BOGUSZ, M. J.; AL TUFAIL, M.; HASSAN, H. How natural are “natural herbal remedies”? A Saudi perspective. **Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews**, v. 21, p. 219-229, 2002.

BOONEN, G.; FERGER, B.; KUSCHINSKY, K.; HÄBERLEIN, H. In vivo effects of the kavapyrones (+)-dihydromethysticin and (+/-)-kavain on dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in striatal and cortical brain regions. **Planta Medica**, v. 64, n. 6, p. 507-510, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 02 de 13 de maio de 2014. Publica a Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 04 de 18 de junho de 2014. Publica a Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Bulas Padrão de Medicamentos Fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349597/Piper%2Bmethysticum%2BProfissional%2Bde%2BSa%C3%BAde.docx/8e6b5da2-2c3c-4b08-b556-972ad6cf21b1>. Brasília, 2014c. Acessado em: 6 de fevereiro de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017.

BROCKS, D.R. Drug disposition in three dimensions: an update on stereoselectivity in pharmacokinetics. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 27, n. 8, p. 387-406, 2006.

CAIRNEY, S.; MARUFF, P.; CLOUGH, A.R. The neurobehavioural effects of kava. **The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 36, p. 657–662, 2002.

CARLIER, J.; GUITTON, J.; ROMEUF, L.; BEVALOT, F.; BOYER, B.; FANTON, L. et al. Screening approach by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the blood quantification of thirty-four toxic principles of plant origin. Application to forensic toxicology. **Journal of Chromatography B**, v. 975, p. 65-76, 2015.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immunology Journal**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, 2009.

CIRILLI, R.; FERRETTI, R.; GALLINELLA, B.; BILIA, A.R.; VINCIERI, F.F.; TORRE F.L. Enantioseparation of kavain on Chiralpak IA under normal-phase, polar organic and reverse-phase conditions. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 2206-2210, 2008.

CLOUATRE, D. L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v. 150, p.85-96, 2004.

CLSI. Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. M38-A2. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 28, n. 16, p. 1-35, 2008a.

CLSI. Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. M27-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 28, n. 14, p. 1-25, 2008b.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. M7-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 32, n. 2, p. 1-68, 2012.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272-278, 2005.

CÔTÉ, C. S.; KOR, C.; COHEN, J.; AUCLAIR, K. Composition and biological activity of traditional and commercial kava extracts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, p. 147-152, 2004.

DAVIES, L. P.; DREW, C.A.; DUFFIELD, P.; JOHNSTON, G.A.; JAMIESON, D.D. Kava pyrones and resin: studies on GABA-A, GABA-B and benzodiazepine binding sites in rodent brain. **Pharmacology and Toxicology**, v. 71, n. 2, p. 120-126, 1992.

DENERY, J. R.; DRAGULL, K.; TANG, C. S.; LI, Q. X. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. **Analytica Chimica Acta**, v. 501, p. 175-181, 2004.

DERMACARE Farmácia de Manipulação. Disponível em: <https://www.dermacarelojavirtual.com.br/ansiolitico-natural?filter_name=kava>. Acesso em: 06 de fevereiro. 2018.

EMA. Guideline on bioanalytical method validation. **European Medicines Agency – Science Medicines Health**, Londres, jul, 2011.

EMA. Assessment report on Piper methysticum G. Forts, rhizome. **European Medicines Agency – Science Medicines Health**, Londres, nov, 2016.

FARMACOPEIA Brasileira, 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FARMALIZ Farmácia de Manipulação. Disponível em: <<http://farmaliz.com.br/produto/kava-kava/>>. Acesso em: 6 de fevereiro. 2018.

FDA. Guidance for industry – bioanalytical method validation. **Food and Drug Administration**, Rockville, set, 2013.

FERNANDEZ, M.M.R.; LALOUP, M.; WOOD, M.; BOECK, G.; LOPEZ-RIVADULLA, M.; WALLEMACQ, P. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of multiple hallucinogens, chlorpheniramine, ketamine, ritalinic acid, and metabolites, in urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, p. 497-504, 2007.

GANZERA, M; KHAN, I. A. Analytical Techniques for the Determination of Lactones in *Piper methysticum* Forst. **Chromatographia**, v. 50, n. 10/11, p. 649-653, 1999.

GAUB, M.; VON BROCKE, A.; ROOS, G.; KOVAR, K. A. High-performance Liquid Chromatography–Coordination Ion Spray–Mass Spectrometry (HPLC-CIS/MS): a New Tool for the Analysis of Non-polar Compound Classes in Plant Extracts Using the Example of *Piper methysticum* Forst. **Phytochemical Analysis**, v. 15, p. 300-305, 2004.

GAUTZ, L. D.; KAUFUSI, P.; JACKSON, M. C.; BITTENBENDER, R. H; CHUNG-SHIH, T. Determination of Kavalactones in Dried Kava (*Piper methysticum*) Powder Using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy and Partial Least-Squares Regression. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6147-6152, 2006.

GILBERT, B.; ALVES, L.F. Synergy in plant medicines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 13-20, 2003.

GLEITZ, J.; BEILE, A.; PETERS, T. (\pm)-Kavain inhibits veratridine-activated voltage dependent Na^+ -channels in synaptosomes prepared from rat cerebral cortex. **Neuropharmacology**, v. 34, n. 9, p. 1133-1138, 1995.

GLEITZ, J.; BEILE, A.; PETERS, T. (+/-)-kavain inhibits the veratridine- and KCl-induced increase in intracellular Ca^{2+} and glutamate-release of rat cerebrocortical synaptosomes. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 2, p. 179-186, 1996.

GUÉRIN, J. C.; RÉVEILLÈRE, H. P. Antifungal activity of plant extracts used therapeutically. I. Study of 41 extracts against 9 fungi species. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 42, n. 6, p. 553-559, 1984.

GUO, L.; SHI, Q.; DIAL, S.; XIA, Q.; MEI, N.; LI, Q. et al. Gene expression profiling in male B6C3F1 mouse livers exposed to kava identifies – Changes in drug metabolizing genes and potential mechanisms linked to kava toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 686-696, 2010.

GURLEY, B.J.; SWAIN, A.; BARONE, G.W.; WILLIAMS, D.K.; BREEN, P.; YATES, C.R. et al. Effect of Goldenseal (*Hydrastis canadenses*) and Kava-kava (*Piper methysticum*) supplementation on digoxin pharmacokinetics in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 2, p. 240-245, 2006.

HÄBERLEIN, H.; BOONEN, G.; BECK, M. Piper methysticum: Enantiomeric Separation of Kavapyrones by High Performance Liquid Chromatography. **Planta Medica**, v. 63, p. 63-65, 1997.

HE, X.; LIN, L.; LIAN, L. Electrospray High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Phytochemical Analysis of Kava (*Piper methysticum*) Extract. **Planta Medica**, v. 63, p. 70-74, 1997.

HOLM, E.; STAEDT, U; KORTSIK, C.; BEHNE, F.; KASKE, A.; MENNICKE, I. The action profile of D, L-kavain cerebral sites and sleep-wakefulness-rhythm in animals. **Arzneimittel-Forschung**, v. 41, n. 7, p. 673-683, 1991.

HU, L.; JHOO, J.; ANG, C. Y. W.; DINOVI, M.; MATTIA, A. Determination of six kavalactones in dietary supplements and selected functional foods containing *Piper methysticum* by isocratic liquid chromatography with internal standard. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 1, p. 16-25, 2005.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Methodology – Q2B. Geneva, nov. 1996. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

JAGER, L. S.; PERFETTI, G. A.; DIACHENKO, G. W. LC-UV and LC-MS analysis of food and drink products containing kava. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 10, p. 921–934, 2004.

JAMIESON, D. D; DUFFIELD, P. H. The antinociceptive actions of kava components in mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 17, p. 495-508, 1990.

JIA, J.; ZHU, F.; MA, X.; CAO, Z.W.; LI, Y.X.; CHEN, Y.Z. Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p.111-128, 2009.

JUSSOFIE, A.; SCHMIZ, A.; HIEMKE, C. Kavapyrone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 469-474, 1994.

JUSTO, S. C.; SILVA, C. M. *Piper methysticum* G. Forster (Kava-kava): Uma abordagem geral. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, p. 73-82, 2008.

KELEDJIAN, J.; DUFFIELD, P. H.; JAMIESON, D. D.; LIDGARD, R. R.; DUFFIELD, A. M. Uptake into mouse brain of four compounds present in the psychoactive beverage kava. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p.1003-1006, 1988.

KHAMIS, M.; ADAMKO, D.; EL-ANEED, A. Comparison of accuracy and precision between multipoint calibration, single point calibration and relative quantification for targeted metabolomics analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 5899-5913, 2018.

LEMNIS Farmácia de Manipulação. Disponível em: <<http://www.lemnismfarmacia.com.br/kava-kava-ansiolitico-e-sedativo-que-melhora-o-rendimento-cerebral-e-qualidade-sono/>>. Acesso em: 06 de fevereiro. 2018.

LHUISSIER, T.; MERCIER, P.; MICHALET, S.; LEBOT, V.; LEGENDRE, L. Colorimetric assessment of kava (*Piper methysticum* Forst.) quality. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.59, p. 27-34, 2017.

LIM, S.T.S.; DRAGULL, K.; TANG, C.; BITTENBENDER, H.C.; EFIRD, J.T.; NERURKAR, P.V. Effects of kava alkaloid, pipermethystine, and kavalactones on oxidative stress and cytochrome P450 in F-344 rats. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 214-221, 2007.

LIU, Y.; LUND, J.A.; MURCH, S.J.; BROWN, P.N. Single-lab validation for determination of kavalactones and flavokavains in *Piper methysticum* (Kava). **Planta Medica**, v. 84, n. 16, p. 1213-1218, 2018.

LOCHER, C. P.; BURCH, M. T.; MOWER, H. F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 23-32, 1995.

MATHEWS, J.M.; ETHERIDGE, A.S.; BLACK, S.R. Inhibition of human cytochrome P450 activities by kava extract and kavalactones. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, p. 1153-1157, 2002.

MATHEWS, J. M.; ETHERIDGE, A. S.; VALENTINE, J. L.; BLACK, S. R.; COLEMAN, D. P.; PATEL, P.; SO, J.; BURKA, L. T. Pharmacokinetics and disposition of the kavalactone kawain: interaction with kava extract and kavalactones in vivo and in vitro. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 10, p. 1555-1563, 2005.

MEISSNER, O.; HABERLEIN, H. Hplc analysis of flavokavins and kavapyrones from *Piper methysticum* Forst. **Journal of Chromatography B**, v. 826, p. 46-49, 2005.

MEMENTO Fitoterápico Farmacopeia Brasileira, 1ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016.

MEYER, H.J. Pharmacology of Kava. In: Efron, D.H. *et al.*, ed. **Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs**. New York, NY: Raven; p. 133-140, 1967.

MICHEL, D.; GAUNT, M.C.; ARNASONC, T.; EL-ANEED, A. Development and validation of fast and simple flow injection analysis–tandem mass spectrometry (FIA–MS/MS) for the determination of metformin in dog serum. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 107, 229-35, 2015.

NERURKAR, P.V.; DRAGULL, K.; TANG, C.S. In vitro toxicity of kava alkaloid, pipermethystine, in HepG2 cells compared to kavalactones. **Toxicological Sciences**, v. 79, p. 106-111, 2004.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid Chromatography – Mass Spectrometry**, 3 ed. New York: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PEPPING, J. Kava: *Piper methysticum*. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 56, p. 957-960, 1999.

PEREIRA, N.; RODRIGUES, J.; VIEIRA, L.; TEÓFILO, K.; FIGUEIREDO, F. J. B.; DIAS-SOUZA, M.V. Antimicrobial potential of *Passiflora alata* and *Piper methysticum* hydroalcoholic extracts, Phytotherapics of anxiolytic-like activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 31-33, 2015.

PINTO, V. M *et al.* Avaliação do uso de *Piper methysticum* quanto ao desenvolvimento de hepatotoxicidade em ratos Wistar. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 1, p. 21-26, 2005.

POOLSUP, N.; PO, L.; KNIGHT, T. Pharmacogenetics and psychopharmacotherapy. **Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 5, p. 197-220, 2002.

RICKELS, K.; DOWNING, R.; SCHWEIZER, E.; HASSMAN, H. Antidepressants for the treatment of generalized anxiety disorder. A placebo controlled comparison of imipramine, trazodone, and diazepam. **Archives of General Psychiatry**, v. 50, p. 884-895, 1993.

ROBINSON, V.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; KLAASSEN, C. D.; MARKS, J.G. JR; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; COSMETIC INGREDIENT REVIEW EXPERT PANEL; ANDERSEN, F.A. Final report on the safety assessment of *Piper methysticum* leaf/root/stem extract and *Piper methysticum* root extract. **International Journal of Toxicology**, v. 28, p. 175S-188S, 2009.

SANTOS, J. R. A.; HOLANDA, R. A.; FRASES, S.; BRAVIM, M.; ARAUJO, G. D. S.; *et al.* Fluconazole Alters the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus gattii* and Leads to Distinct Behaviors in Murine Cryptococcosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, e112669, 2014.

SCHENKEL, L. C.; GOSMANN, G.; PETROVICK P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 301-330, 2001.

SCHMIDT, A. H.; MOLNAR, I. Computer-assisted optimization in the development of a high performance liquid chromatographic method for the analysis of kava pyrones in *Piper methysticum* preparations. **Journal of Chromatography A**, v. 948, p. 51-63, 2002.

SCHOENER, E.P. Mecanismos of depressant drug action/interaction. **Recent Developments in Alcoholism**, v. 4, p. 39-60, 1986.

SCHÜLZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional - Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4° ed. Barueri: Manole, 2002.

SEITZ, U.; SCHÜLE, A.; GLEITZ, J. [3H]-monoamine uptake inhibition properties of kava pyrones. **Planta Medica**, v. 63, n. 6, p. 548-549, 1997.

SHAO, Y.; HE, K.; ZHENG, B.; ZHENG, Q. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for quantitative analysis of the six major kavalactones in *Piper methusticum*. **Journal of Chromatography A**, v. 825, p. 1-8, 1998.

SHEN, Q.; WANG, L.; ZHOU, H.; JIANG, H.; YU, L.; ZENG, S. Stereoselective binding of chiral drugs to plasma proteins. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 8, p. 998-1006, 2013.

SINGH, Y. N. Kava: An overview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 13-45, 1992.

SINGH, Y.N.; DEVKOTA, A.K. Aqueous kava extracts do not affect liver function tests in rats. **Planta Medica**, v. 69, p. 496-499, 2003.

SINGH, Y.N.; SINGH, N.N. Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders. **CNS Drugs**. v. 16, n. 11, p. 731-743, 2012.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3° ed. Estados Unidos da América, 2010.

SORRENTINO, L.; CAPASSO, A.; SCHMIDT, M. Safety of ethanolic kava extract: results of a study of chronic toxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 13, p. 542-549, 2006.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25 - 35, 2005.

SPINELLA, M. The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. (Herbal synergy review). **Alternative Medicine Review**, v. 7, n. 2, p. 130-137, 2002.

STOKVIS, E.; ROSING, H.; BEIJNEN, J.H. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v. 19, p. 401-417, 2005.

STORPITIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J.E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. 1° ed. Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

TAKAHASHI, H.; YOSHIMOTO, M.; HIGUCHI, H.; SHIMIZU, T.; HISHIKAWA, Y. Different effects of L-type and T-type calcium channel blockers on the hypnotic potency of triazolam and zolpidem in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 317-321, 1999.

TARBAH, F.; MAHLER, H.; KARDEL, B.; WEINMANN, W.; HAFNER, D.; DALDRUP, TH. Kinetics of kavain and its metabolites after oral application. **Journal of Chromatography B**, v. 789, p. 115-130, 2003.

UEBELHACK, R; FRANKE, L; SCHEWE, H. J. Inhibition of platelet MAO-B by kavapyrone-enriched extract from *Piper methysticum* Forster (Kava-kava). **Pharmacopsychiatry**, v. 31, n. 5, p. 187-192, 1998.

VAZ, Z.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a novel Xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304-312, 1996.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICHB, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97-110, 2009.

WALDEN, J.; VON WEGERER, J.; WINTER, U.; BERGER, M.; GRUNZE, H. Effects of kawain and dihydromethysticin on field potential changes in the hippocampus. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 21, n. 4, p. 697-706, 1997a.

WALDEN, J.; VON WEGERER, J.; WINTER, U.; BERGER, M. Actions of kavain and dihydromethysticin on ipsapirone-induced field potential changes in the hippocampus. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 12, p. 265-270, 1997b.

WANG, Y.; EANS, S.O.; STACY, H.M.; NARAYANAPILLAI, S.C.; SHARMA, A.; FUJIOKA, N. et al. A stable isotope dilution tandem mass spectrometry method of major kavalactones and its applications. **PlosOne**, v. 13, n. 15, p. 1-16, 2018.

WANWIOLRUK, S.; BHAWAN, S.; COVILLE, P.F.; CHALCROFT, S.C.W. Genetic polymorphism of debrisoquine (CYP2D6) and proguanil (CYP2C19) in South Pacific Polynesian populations. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, n. 5, p. 431-435, 1998.

WARBURTON, E.; NORRIS, P. L.; GOENAGA-INFANTE, H. Comparison of the Capabilities of Accelerated Solvent Extraction and Sonication as Extraction Techniques for the Quantification of Kavalactones in Piper methysticum (Kava) Roots by High Performance Liquid Chromatography with Ultra Violet Detection. **Phytochemical Analysis**, v. 18, p. 98-102, 2007.

WHITTON, P.A.; LAU, A.; SALISBURY, A.; WHITEHOUSE, J.; EVANS, C.S. Kava lactones and the Kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v. 64, p. 673-679, 2003.

WHO. World Health Organization – **WHO monographs on selected medicinal plants**, v. 2. Geneva, World Health Organization, 2004.

WHO. World Health Organization – **Assessment of the risk of hepatotoxicity with kava products**, Geneva, World Health Organization, 2007.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307, 1944.

XUAN, T. D.; FUKUTA, M.; WEI, A. C.; ELZAAWELY A. A.; KHANH T. D.; TAWATA, S. Efficacy of extracting solvents to chemical components of kava (*Piper methisticum*) roots. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 188-194, 2008.

YANG, Y.; ZHANG, Z.; LI, S.; YE, X.; LI, X.; HE, K. Sinergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamics basis. **Fitoterapia**, v. 92, p. 133-147, 2014.

YOUNG, R. L.; HYLIN, J. W.; PLUCKNETT, D. L.; KAWANO, Y.; NAKAYAMA, R. T. Analysis for kavapyrones in extracts of *Piper methisticum*. **Phytochemistry**, v. 5, p. 795-798, 1966.

YUAN, C. S.; DEY, L.; WANG, A.; MEHENDELE, S.; XIE, J.T.; AUNG, H.H.; ANG-LEE, M.K. Kavalactones and dihidrokavain modulate GABAergic activity in a rat gastric-brainstem preparation. **Planta Medica**, v. 68, p. 1092-1096, 2002.

APÊNDICE – MANUSCRITO SUBMETIDO A PERIÓDICO CIENTÍFICO

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry bioanalytical method for the determination of kavain in mice plasma: application for a pharmacokinetic study

Juliana Veloso Ferreira^a, Alyson Vinícius Braga^a, Renes de Resende Machado^a, Deborah Michel^b, Gerson Antônio Pianetti^a, Anas El-Aneed^{b*}, Isabela Costa César^{a*}

^aDepartamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil 31270-901

^bCollege of Pharmacy and Nutrition, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada S7N5E5

ABSTRACT

A simple and fast bioanalytical method for the quantification of kavain in mice plasma was developed using liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS). A full method validation was performed, according to regulatory guidelines, employing isotopically labeled kavain as the internal standard (rac-kavain-d3). For the quantification, $[M+H]^+$ was formed using an electrospray ionization (ESI) source in the positive ion mode and multiple reaction monitoring (MRM) was employed using a quadrupole-linear ion trap (4000 QTRAP[®]) instrument. The monitored MRM transitions were 231.0→115.1 and 231.0→152.8 for kavain; and 234.2→199.2 for the internal standard. A linear response was obtained at the concentration range of 10 to 200 ng/mL with intra- and inter-day variations within the acceptable criteria for all quality control samples. After validation, the method was successfully applied for the quantification of kavain in mice plasma after oral administration of the kavain standard and Kava-kava extract. The plasma concentration over time results were applied for a pharmacokinetics study. The obtained pharmacokinetic parameters indicated a considerably higher bioavailability for kavain when Kava-kava extract was administered due to a pharmacokinetic synergism between the analyte and the other compounds present in the extract.

KEYWORDS: LC-MS/MS, method validation, kavain, kava-kava, pharmacokinetic study.

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA/UFMG, PROTOCOLO 58/2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DE KAVÁINA EM EXTRATOS SECOS DE KAVA-KAVA", protocolo do CEUA: 58/2017 sob a responsabilidade de Isabela da Costa Cesar que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/05/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	01/07/2017 a 30/06/2019
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	32
Peso/Idade	20g / 40(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	32
Peso/Idade	20g / 40(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	32
Peso/Idade	20g / 40(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Faculdade de Farmácia

Considerações posteriores:

08/05/2017	Aprovado na reunião do dia 08/05/2017. Validade: 08/05/2017 à 07/05/2022
------------	--

Belo Horizonte, 07/08/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha

ANEXO B – CERTIFICADO CEUA/UFMG, PROTOCOLO 204/2016**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **204/2016**, relativo ao projeto intitulado “*Avaliação da toxicidade aguda de extratos secos de produtos naturais*”, que tem como responsável **Isabela da Costa César**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 04/07/2016. Este certificado expira-se em 04/07/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº **204/2016**, related to the Project entitled “*Evaluation of acute toxicity of dry extracts of natural products*”, under the supervision of **Isabela da Costa César**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 07/04/2016. This certificate expires in 07/04/2021.

Belo Horizonte, 05/07/2016.


Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenadora da CEUA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha- Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516 – Fax: (31) 3409-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetua/ceua - cetua@ppps.ufmg.br

ANEXO C – CERTIFICADO CEUA/UFMG, PROTOCOLO 176/2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

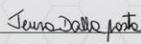
Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da atividade antinociceptiva de extratos secos do rizoma de Piper methysticum", protocolo do CEUA: 176/2017 sob a responsabilidade de Isabela da Costa Cesar que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/08/2017.

Vigência da Autorização	07/08/2017 a 06/08/2022
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 42(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 42(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 42(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 42(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério da Faculdade de Farmácia
*Espécie/linhagem	Camundongo heterogênico / Swiss
Nº de animais	7
Peso/Idade	25g / 42(dias)

ANEXO D – CERTIFICADO IV ABCF CONGRESS**CERTIFICATE**

We certify that the work **EVALUATION OF THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF KAVA-KAVA DRIED EXTRACTS**, authorship of **JULIANA VELOSO FERREIRA, JULIANA MACHADO BRÊTAS, RAFAEL WESLEY BASTOS, DANIEL DE ASSIS SANTOS, ISABELA DA COSTA CÉSAR**, was presented as **POSTER PRESENTATION** at the **IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care**, held in São Paulo (SP), Brazil, from September 6 to 8, 2018.


Maria José Soares Mendes Giannini
President Congress


Teresa Dalla Costa
President ABCF



ABCF - 2018
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES
Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care
September 06 to 08, 2018
CENTRO FECOMÉRCIO DE EVENTOS, SÃO PAULO, SP

ANEXO E – CERTIFICADO III SINCIFAR



Certificado

Certificamos que Isabella Campolina Pierotte apresentou o trabalho intitulado **AVALIÇÃO DA QUALIDADE DE EXTRATOS SECOS DE KAVA-KAVA COMERCIALIZADOS EM FARMÁCIAS MAGISTRAS DE MINAS GERAIS** do(s) autor(es) **PIEROTTE, LC; FERREIRA, J.V.; CÉSAR, LC** na modalidade de pôster durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR**

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.

Lucas Antônio Miranda Ferreira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Faculdade de Farmácia – UFMG

Saulo Rehelberg Pinto Braga
Membro da Comissão Organizadora
III SINCIFAR

UFMG

