

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**DISPOSIÇÃO CINÉTICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* DE
DITERPENOS CLERODÂNICOS DE *Casearia sylvestris* Swartz E DE SEUS
PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

FERNANDO BOMBARDA ODA

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos
Coorientadores: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes
Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara – SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**DISPOSIÇÃO CINÉTICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* DE
DITERPENOS CLERODÂNICOS DE *Casearia sylvestris* Swartz E DE SEUS
PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

FERNANDO BOMBARDA ODA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos
Coorientadores: Profa. Dra. Natália Valadares de Moraes
Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini

Araraquara – SP
2021

O251d

Oda, Fernando Bombarda.

Disposição cinética e atividade anti-inflamatória *in vitro* de diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* Swartz e de seus produtos de degradação / Fernando Bombarda Oda. – Araraquara: [S.n.], 2021.
210 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.

Coorientadora: Natália Valadares de Moraes.

Coorientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.

1. Diterpenos clerodânicos. 2. Casearinas. 3. *Casearia sylvestris*. 4. Farmacocinética. 5. Metabolização. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Moraes, Natália Valadares de, coorient. III. Peccinini, Rosângela Gonçalves, coorient. IV. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DISPOSIÇÃO CINÉTICA E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO* DE DITERPENOS CLERODÂNICOS DE *Casearia sylvestris* Swartz E DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

AUTOR: FERNANDO BOMBARDA ODA

ORIENTADOR: ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

COORIENTADORA: ROSANGELA GONCALVES PECCININI

COORIENTADORA: NATÁLIA VALADARES DE MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP

Prof. Dr. GERARDO MAGELA VIEIRA JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. EDUARDO JOSÉ CREVELIN (Participação Virtual)
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. HELEN MARIANA BALDAN CIMATTI (Participação Virtual)
Centro Universitário Central Paulista - UNICEP

Prof. Dr. ROGÉRIO CARDOSO DE CASTRO (Participação Virtual)
Centro Universitário de Votuporanga - UNIFEV

Araraquara, 28 de junho de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois reconheço que tudo o que sou e tenho vem Dele.

Ao apoio de todos os meus familiares, meus pais Roberto e Claudia e à minha avó Sidney. Agradeço em especial à minha querida mãe Claudia, que como uma excelente professora nunca poupou esforços para me estimular e para dar oportunidades onde eu pudesse estudar.

Agradeço a todo o apoio e paciência da minha esposa Larissa.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, que pra mim é um exemplo pessoal e profissional desde a minha graduação. Agradeço pela oportunidade concedida a mim, a todos os ensinamentos e dedicação.

Ao Prof. Alberto José Cavalheiro e ao Prof. Michel Leandro dos Campos pelas discussões e sugestões pertinentes para o desenvolvimento desse trabalho.

Às minhas coorientadoras Profa. Natália Valadares de Moraes e Profa. Dra. Rosângela Gonçalves Peccinini pelo compartilhamento de conhecimento e também de materiais.

A todos alunos e ao técnico Caio do Laboratório de Farmacognosia e Laboratório de Toxicologia da FCFAr, em especial ao doutor Flávio e doutorando Jonatas que me apoiaram na realização desse trabalho.

Ao prof. Fábio Perazzo pelas contribuições nos ensaios anti-inflamatórios.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais (INCT-BioNat) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de pesquisa durante o desenvolvimento de fármacos.....	21
Figura 2. <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>syvestris</i> (São Miguel Arcanjo-SP), altura aproximada: 12 m.....	29
Figura 3. <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> (Estação Experimental de Araraquara, Araraquara-SP), altura aproximada: 2,5 m.....	30
Figura 4. Rota biosintética dos terpenos.	31
Figura 5. Estrutura geral dos diterpenos clerodânicos de <i>C. sylvestris</i> (FERREIRA et al., 2011). Os substituintes R ₁₋₅ dos diterpenos são apresentados na Tabela 1.	33
Figura 6. Gráfico representativo da cinética enzimática de Michaelis-Menten. V _{max} : velocidade máxima; [S]: concentração de substrato; K _M : constante de Michaelis-Menten.	36
Figura 7. Estrutura química dos dialdeídos oriundos das casearinas J (A), O (B) e X (C) após degradação ácida ou metabolização por enzimas hepáticas (MOREIRA DA SILVA et al., 2018; ODA et al., 2019).....	44
Figura 8. Cromatograma da F 2 (3,0 mg/mL) obtida por EFS do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> . Análise em LC-DAD/UV, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeCN 55-100% (v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min; 235 nm.	64
Figura 9. Cromatograma (TIC, ESI ⁺) da F 2 (3,0 mg/mL) obtido por análise em LC-MS. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), em gradiente linear com MeCN 55-100% (v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min.	65
Figura 10. Cromatoplaça (sílica gel; 0,25 mm) das subfrações SF 1-36 (5,0 mg/mL) obtidas por CC. Fase móvel: hexano: acetato de etila: isopropanol 60:37:03 (v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico (110° C por 10 min).	67
Figura 11. Cromatogramas analíticos, preparativo e analítico pós-preparativo da subfração SF 20-23.1. t _R P1: 32,7 min; t _R P2: 39,7 min; t _R P1: 45,8 min.....	68
Figura 12. Estruturas químicas da casearina K, caseargrewiina F e casearina B. ...	70
Figura 13. Cromatograma ESI ⁺ (TIC) da casearina K (t _R de 15,77 min).....	71
Figura 14. Espectro de massas ESI ⁺ (MS ¹) da casearina K. m/z 585,2679 [M + Na] ⁺	71
Figura 15. Cromatograma ESI ⁺ (TIC) da caseargrewiina F (t _R de 16,81 min).	73
Figura 16. Espectro de massas ESI ⁺ (MS ¹) da caseargrewiina F.	74
Figura 17. Cromatograma ESI ⁺ (TIC) da casearina B (t _R de 19,38 min).....	76

Figura 18. Espectro de massas LC-MS/MS (ESI ⁺ , MS ¹) da casearina B. <i>m/z</i> 599,2818 [M + Na] ⁺	76
Figura 19. Cromatograma ESI ⁺ (SIM) da casg F (<i>m/z</i> 527) e casearina B (<i>m/z</i> 599) a 0,612 µg/mL (CQM) em acetonitrila. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.	78
Figura 20. Cromatogramas ESI ⁺ (SIM) da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) a 0,039 µg/mL (LIQ) em acetonitrila. Legenda: Linha azul: amostra branco e linha preta: casg F (t _R de 7,1 min) e cas B (t _R de 7,9 min). Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.	79
Figura 21. Cromatogramas ESI ⁺ (SIM) da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) a 0,039 µg/mL (LIQ) em tampão Hank's. Legenda: Linha azul: Amostra branco e linha Preta: casg F (t _R 7,1 min) e cas B (t _R de 7,9 min). Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.	82
Figura 22. Cromatograma ESI ⁺ (SIM) do padrão interno timol (50 µg/mL; t _R de 6,0 min), da caseargrewiina F (0,039 µg/mL; t _R de 7,1 min) e da casearina B (0,039 µg/mL; t _R de 7,9 min). Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.	84
Figura 23. Cromatogramas ESI ⁺ (TIC) após extração em plasma humano da caseargrewiina F (casg F, t _R de 7,1 min) e casearina B (cas B, t _R de 7,9 min) a 0,039 µg/mL com padrão interno (PI, 50 µg/mL; t _R de 5,9 min). Legenda: Linha azul: amostra branco; Linha verde: amostra zero e Linha Preta: casg F, cas B e PI. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.	85

Figura 24. Cromatogramas ESI ⁺ (TIC) após extração em meio microssomal hepático humano da caseargreina F (casg F, t _R de 7,1 min) e casearina B (cas B, t _R de 7,9 min) a 0,039 µg/mL com padrão interno (PI, 50 µg/mL; t _R de 5,9 min). Legenda: Linha azul: amostra branco; Linha verde: amostra zero e Linha Preta: casg F, cas B e PI. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.	87
Figura 25. Curva analítica log P × log K das substâncias de referência.....	89
Figura 26. Estabilidade da caseargreina F (casg F) e casearina B (cas B) no meio de fluido gástrico simulado (pH 1,2) (n = 3).	92
Figura 27. Estabilidade da caseargreina F (casg F) e casearina B (cas B) no tampão Hank's (pH 7,4) (n = 3).	94
Figura 28. Estabilidade da caseargreina F (casg F) e casearina B (cas B) no tampão TRIS (pH 8,8) (n = 3).	96
Figura 29. Estabilidade da caseargreina F (casg F; 1,0 µg/mL) e casearina B (cas B; 1,0 µg/mL) em plasma humano (n = 3).	98
Figura 30. Estabilidade da caseargreina F (casg F; 1,0 µg/mL) e casearina B (cas B; 1,0 µg/mL) em meio microssomal hepático humano (0,2 mg/mL) (n = 3).	102
Figura 31. Cromatogramas do controle da caseargreina F (casg F, t _R de 16,9 min, PBS 0,1 M) e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-F) em FGS por 60 min. Amostras: 500 µg/mL. Análise em LC-DAD/UV, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% em 42 min; vazão de 0,8 mL/min; 235 nm.	105
Figura 32. Cromatogramas do controle da casearina B (cas B, t _R de 20,9 min, PBS 0,1 M) e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-B) em FGS por 60 min (500 µg/mL). Amostras: 500 µg/mL. Análise em LC-DAD/UV, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% em 42 min; vazão de 0,8 mL/min; 235 nm.	107
Figura 33. Cromatogramas (LC-DAD/UV) do controle do extrato e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-EetCs) em FGS por 60 min (3,0 mg/mL). Amostras: 3,0 mg/mL. Análise em LC-DAD/UV, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% em 42 min; vazão de 0,8 mL/min; 235 nm.	109

Figura 34. Cromatograma (TIC) ESI ⁺ da caseargrewiina F (casg F, t _R de 15,0 min) e casearina B (cas B, t _R de 18,9 min) a 10,0 µg/mL em acetonitrila. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min.....	110
Figura 35. Cromatogramas (TIC) ESI ⁺ do controle da caseargrewiina F (casg F, t _R de 16,8 min, PBS 0,1 M) e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-F) em FGS por 60 min. Identificação: dialdeído da caseargrewiina F (casg F dialdeído, t _R de 15,5 min). Amostras: 500 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min.	112
Figura 36. Estrutura química do dialdeído da caseargrewiina F (402 Da).	112
Figura 37. Cromatogramas (TIC) ESI ⁺ do controle da casearina B (cas B, t _R de 21,0 min, PBS 0,1 M) e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-B) em FGS por 60 min. Identificação: dialdeído da casearina B (cas B dialdeído, t _R de 19,2 min). Amostras: (500 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min.	113
Figura 38. Estrutura química do dialdeído da casearina B (474 Da).	114
Figura 39. Cromatogramas (TIC) ESI ⁺ do controle da caseargrewiina F (casg F, t _R de 17,09 min, PBS 0,1 M) e dos produtos obtidos após degradação ácida (PDA-F) em FGS por 60 min (100 µg/mL). Identificação: dialdeído da caseargrewiina F (casg F dialdeído, t _R de 15,89 min). Amostras: 100 µg/mL. Análise em LC-MS/MS, coluna C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 µm), gradiente linear de 30-90% MeCN (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente por 5 min, vazão 0,25 mL/min.....	115
Figura 40. Espectro de massas ESI ⁺ (MS ¹) do dialdeído da caseargrewiina F (t _R de 15,89 min) nos PDA-F.....	115
Figura 41. Estrutura química das moléculas (C ₂₄ H ₃₆ O ₆ , 420 Da) de casg F após a hidrólise ácida (casg F deacetilada) e da molécula referente ao dialdeído da casg F com uma hidratação no C-18 ou C-19 (casg dialdeído hidratada).	116
Figura 42. Cromatograma (TIC) ESI ⁺ do controle da casearina B (t _R de 19,51 min) e dos produtos obtidos após degradação ácida (PDA-B) em FGS por 60 min. Identificação: dialdeído da casearina B (cas B dialdeído, t _R de 18,17 min). Amostras: 100 µg/mL. Análise em LC-MS/MS, coluna C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 µm), gradiente	

linear de 30-90% MeCN (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente por 5 min, vazão 0,25 mL/min.	119
Figura 43. Espectro de massas ESI ⁺ (MS ¹) do dialdeído da casearina B (t _R de 18,17 min) nos PDA-B.....	120
Figura 44. Estrutura química das moléculas (C ₂₄ H ₃₆ O ₆ , 420 Da) da casg F após a hidrólise ácida dos 2 substituintes acetato (casg F deacetilada) e da molécula referente ao dialdeído da casg F com uma hidratação no C-18 ou C-19 (casg dialdeído hidratada).....	121
Figura 45. Cromatogramas (TIC) ESI ⁺ do controle da caseargrewiina F (casg F, t _R de 7,1 min) e dos produtos obtidos após metabolização por microsossoma hepático humano (PME-F) por 30 min. Identificação: dialdeído da casg F (casg F dialdeído, t _R de 7,0 min), demais picos correspondem a componentes da matriz microsossomal. Amostras: 10,0 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.	125
Figura 46. Cromatograma (TIC) ESI ⁺ do controle da casearina B (cas B, t _R de 7,9 min) e dos produtos obtidos após metabolização por microsossoma hepático humano (PME-B) por 30 min. Identificação: dialdeído da cas B (cas B dialdeído, t _R de 7,7 min), demais picos correspondem a componentes da matriz microsossomal. Amostras: 10,0 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.	127
Figura 47. Gráfico da cinética enzimática (V ₀ × S) da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) em meio microsossomal hepático humano (n = 3).....	129
Figura 48. Gráfico de Eadie-Hofstee (V ₀ × V ₀ /S) da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) em microsossomas hepáticos humanos (n = 3).	131
Figura 49. Gráfico de <i>clearance</i> (V ₀ /S × S) da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) em microsossoma hepático humano (n = 3).....	133
Figura 50. Perfis de concentração plasmática da caseargrewiina F e casearina B simulados através do modelo PBPK em humanos em doses únicas (via oral). Linha azul clara: dose de casg F de 0,5 mg/kg. Linha azul escura: dose de casg F de 2,5	

mg/kg). Linha verde clara: dose de cas B de 0,5 mg/kg. Linha verde escura: dose de cas B de 2,5 mg/kg. Software: PK-Sim® 136

Figura 51. Perfis de concentração plasmática da caseargrewiina F e casearina B simulados através do modelo PBPK em humanos em 2 doses diárias durante 7 dias (via oral). Linha azul clara: dose de casg F de 0,5 mg/kg. Linha azul escura: dose de casg F de 2,5 mg/kg). Linha verde clara: dose de cas B de 0,5 mg/kg. Linha verde escura: dose de cas B de 2,5 mg/kg. Software: PK-Sim®. 137

Figura 52. Efeito da caseargrewiina F e casearina B e seus produtos de degradação ácida (PDA) sobre a atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e fosfolipase A₂ (sPLA₂). Concentração: 100 µg/mL. 140

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Diterpenos clerodânicos das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> . Os substituintes R ₁ a R ₅ referem-se à estrutura representada na Figura 1 (FERREIRA et al., 2011; XIA et al., 2015).....	33
Tabela 2. Informações farmacocinéticas sobre alguns produtos naturais. ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. (Fonte: o autor)	39
Tabela 3. Informações farmacocinéticas sobre diterpenos clerodânicos (Fonte: o autor). ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.	43
Tabela 4. Valores de concentrações da casg F e cas B utilizados nos ensaios de cinética enzimática com microssomas hepáticos de humanos (µg/mL e µM).	60
Tabela 5. Valores de massas das subfrações a partir do fracionamento da F 2 por CC em fase normal.	66
Tabela 6. Dados espectrométricos de RMN de ¹³ C (150 MHz) e ¹ H (600 MHz) obtidos para a casearina k, em pentadeuteropiridina.....	72
Tabela 7. Dados espectrométricos de RMN de ¹³ C (150 MHz) e ¹ H (600 MHz) obtidos para a caseargrewiina F, em pentadeuteropiridina.....	75
Tabela 8. Dados espectrométricos de RMN de ¹³ C (150 MHz) e ¹ H (600 MHz) obtidos para a casearina B, em pentadeuteropiridina.	77
Tabela 9. Ensaios de confiança para os modelos lineares ponderados da casg F e cas B, com nível de significância p = 0,05.....	80
Tabela 10. Exatidão e precisão do método analítico em acetonitrila da caseargrewiina F (n = 3).....	81
Tabela 11. Exatidão e precisão do método analítico em acetonitrila da casearina B (n = 3).....	81
Tabela 12. Parâmetros de validação do método analítico ponderado (1/y ²) para quantificação da caseargrewiina F e casearina B em tampão Hank's (n = 3, p = 0,05).	83
Tabela 13. Parâmetros de validação do método bioanalítico ponderado (1/y ²) para quantificação da caseargrewiina F e casearina B em plasma humano (n = 5, p = 0,05).	86
Tabela 14. Parâmetros de validação do método bioanalítico ponderado (1/y ²) para quantificação da caseargrewiina F e casearina B em microssoma humano (n = 5, p = 0,05).	88
Tabela 15. Valores de log P obtidos para cada substância.	88

Tabela 16. Taxa de ligação a proteínas de plasma e de microsomas humanos das caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) nas concentrações de 1 e 10 µg/mL pelo método de ultracentrifugação (n = 2). Média (desvio padrão).	100
Tabela 17. Dados obtidos por espectrometria de massas (ESI ⁺) dos produtos de degradação ácida da caseargrewiina F. Análise em LC-MS/MS, coluna C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 µm), gradiente linear de 30-90% MeCN (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente por 5 min, vazão 0,25 mL/min.....	117
Tabela 18. Dados espectrométricos de RMN de ¹³ C (150 MHz) e ¹ H (600 MHz) obtidos para a caseargrewiina F e seu dialdeído, em deuteroclorofórmio.	118
Tabela 19. Dados obtidos por espectrometria de massas (ESI ⁺) dos produtos de degradação ácida da casearina B. Análise em LC-MS/MS, coluna C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 µm), gradiente linear de 30-90% MeCN (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente por 5 min, vazão 0,25 mL/min.	121
Tabela 20. Dados espectrométricos de RMN de ¹³ C (150 MHz) e ¹ H (600 MHz) obtidos para a casearina B e seu dialdeído, em deuteroclorofórmio.....	122
Tabela 21. Parâmetros cinéticos de metabolismo <i>in vitro</i> da casg F e cas B em microsoma hepático humano. Média (desvio padrão), n = 3.	132
Tabela 22. Parâmetros da extrapolação <i>in vitro-in vivo</i> da casg F e cas B pelo modelo farmacocinético <i>well-stirred</i> , incorporando dados de ligações a proteínas plasmáticas e microsomais correspondente.....	134
Tabela 23. Efeito da caseargrewiina F e casearina B e seus produtos de degradação ácida (PDA) sobre a atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e fosfolipase A ₂ (sPLA ₂) (n = 3).....	139

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt: acetato de etila

ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

AINE: anti-inflamatório não-esteroidal

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Cas B: casearina B

Casg F: caseargrewiina F

C18: sílica octadecilsilano

CC: cromatografia em coluna

CCD: cromatografia em camada delgada

Cl: *clearance*

LC-DAD: *Liquid Chromatography coupled to Diode Array Detector* (Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos)

LC-UV: *Liquid Chromatography coupled to UltraViolet Detector* (Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta/visível)

LCprep: cromatografia líquida de alta eficiência preparativa

C_{max}: concentração plasmática máxima

COX: ciclo-oxigenase

COX-1: ciclo-oxigenase tipo 1

COX-2: ciclo-oxigenase tipo 2

CQA: Controle de qualidade alto

CQB: Controle de qualidade baixo

CQM: Controle de qualidade médio

CYP: Citocromo

d: duplete

dd: duplo duplete

DEPT: *Distortionless Enhancement Polarization Transfer* (Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização)

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)

DMAPP: *dimethylallyl diphosphate* (dimetilalil difosfato)

DIC: dissociação induzida por colisão

DMSO: dimetilsulfóxido

DV: droga vegetal

EFS: extração em fase sólida

EM: espectrômetro de massas

EMA: agência Europeia de Medicamentos

ESI: ionização por eletrospray

EetCs: extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*

EtOH: etanol

F 1: fração 1 da EFS

F 2: fração 2 da EFS

F 3: fração 3 da EFS

FE: fase estacionária

FGS: fluido gástrico simulado

FM: fase móvel

FN: fase normal

FR: fase reversa

HepG2: células de carcinoma hepático humano

HMBC: *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation* (Correlação Heteronuclear de ^1H e ^{13}C a múltiplas ligações)

HTC: hepatoma de *Rattus norvegicus*

IPP: isopentenil difosfato

J : constante de acoplamento

$\lambda_{\text{máx}}$: comprimento de onda máximo

LC-MS: *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas)

LC-DAD/UV: *Liquid Chromatography coupled to Photodiode Array and Ultraviolet Detector* (Cromatografia Líquida acoplada à detector de arranjo de diodos e ultravioleta)

LIQ: Limite inferior de quantificação

LSQ: Limite superior de quantificação

m : multiplete

Me: metila

MeCN: acetonitrila

MeOH: metanol

MEP: metileritritol fosfato

MVA: ácido mevalônico

NADP/NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

nm: nanômetro

OAc: acetato

OBu: butanoato

OMe: metoxila

PBPK: *physiology-based pharmacokinetic modeling* (modelo farmacocinético baseado na fisiologia)

PBS: tampão fosfato salina

PDA: produto de degradação ácida

PDAME: produto de degradação ácida e metabolização enzimática

PLA₂: fosfolipase A₂

PME: produto de metabolização enzimática

PGE₂: prostaglandina E₂

PI: padrão Interno

PVDF: fluoreto de polivinildieno

q: quadrupeto

R_f: fator de retenção

RMN: ressonância magnética nuclear

s: simpleto

s/: simpleto largo

SF: subfrações da CC

SRN: sistema regenerador de NADPH

Sw.: Swartz

t: tripleto

t_R: tempo de retenção

V_m: volume morto

UV/VIS: ultravioleta/visível

UPLC-QTOF-MS/MS: *Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida de Ultra Performance Acoplada a Espectrometria de Massas com Analisador do Tipo Quadrupolo - Tempo De Voo)

RESUMO

Os diterpenos clerodânicos do tipo das casearinas são marcadores ativos (ações anti-inflamatória e antiulcerogênica) das folhas da planta medicinal *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). Entretanto, os dados farmacocinéticos para avanço nas pesquisas envolvendo essas substâncias são escassos. Assim, foram realizados ensaios *in vitro* para compreender a absorção oral e biotransformação desses diterpenos. Os diterpenos caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) foram submetidos à degradação gástrica simulada (FGS) e ao metabolismo por microsomas hepáticos de humanos. Os produtos foram identificados por LC-DAD/UV, LC-MS, UPLC-QTOF-MS/MS e RMN. Foram determinadas propriedades físico-químicas e biológicas dos dois diterpenos: log P (LC-UV), estabilidade química, estabilidade em plasma, ligação a proteínas plasmáticas e microsomais e cinética enzimática usando microsomas. Esses dados foram utilizados nos modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) para simulação do perfil farmacocinético. Os parâmetros da cinética enzimática velocidade máxima (V_{max}), K_M (constante de Michaelis-Menten), e *clearance* intrínseco *in vivo* (Cl'_{int}) da casg F e cas B foram usados para estimar o *clearance* hepático (Cl_H). Para isso, métodos analíticos e bioanalíticos de quantificação (LC-MS) foram desenvolvidos e validados de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Agência Europeia de Medicamentos. Os dois diterpenos apresentaram maior instabilidade ($p < 0,05$) em fluido gástrico simulado (pH 1,2), seguido do tampão TRIS (pH 8,8) e Hank's (pH 7,4). A casg F e a cas B foram estáveis em plasma ($p < 0,05$) até 60 e 270 min de incubação, respectivamente. Nos ensaios de metabolismo *in vitro* o decaimento de ambos diterpenos não foi influenciado pela ausência do sistema regenerador de NADPH. O decaimento foi inibido ($p < 0,05$) na presença de NaF (200 mM), inibidor de esterases, sugerindo que o metabolismo hepático e das enzimas plasmáticas da casg F e cas B é dependente de esterases. A ligação da casg F a proteínas plasmáticas e microsomais foi de 74,0 e 77,2%, respectivamente, e da cas B foi de 86,7 e 87,4%, respectivamente. Os produtos de degradação ácida majoritários da casg F e cas B foram os seus respectivos dialdeídos, que constituíram mais de 50% dos produtos (normalização das áreas dos picos; LC-DAD/UV). Ambos diterpenos e seus dialdeídos apresentaram log P de 3,6 a 4,0, o que sugere boa permeabilidade celular. Os diterpenos apresentaram perfil cinético de Michaelis-Menten, sendo que a V_{max} da casg F foi 2 vezes maior do que a da cas B. O K_M da casg F ($66,4 \pm 6,5 \mu M$) foi próximo ao da cas B ($61,4 \pm 5,1 \mu M$), indicando que a afinidade aparente das enzimas microsomais humanas por ambos diterpenos é semelhante. A extrapolação *in vitro-in vivo* resultou em Cl_H da casg F e cas B (19,6 e 19,2 mL/min/kg, respectivamente), portanto ambos foram considerados compostos de alta razão de extração hepática (98,0 e 96,0 %, respectivamente). Os resultados demonstraram que a casg F é mais suscetível à degradação química do que a cas B, mas ambas possuem similar susceptibilidade à metabolização por microsomas hepáticos de humanos. Assim, pode-se inferir que a biodisponibilidade oral dos dois diterpenos é reduzida em razão da extensa degradação gástrica e da elevada fração metabolizada na passagem pelo fígado. Os modelos de PBPK indicam que os diterpenos apresentam diferente disposição cinética em humanos. Os diterpenos e seus produtos de degradação exerceram baixa inibição ($< 50\%$) da COX-1, COX-2 e sPLA₂. A via de ação anti-inflamatória dos diterpenos provavelmente não está envolvida com essas enzimas.

Palavras-chave: diterpenos clerodânicos, casearinas, *Casearia sylvestris*, farmacocinética, metabolização.

ABSTRACT

Casearin-like clerodane diterpenes are active markers (anti-inflammatory and antiulcerogenic actions) of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Sw. (Guaçatonga). However, pharmacokinetic data for advances in research concerning these substances are scarce. Thus, *in vitro* tests were performed to understand their oral absorption and biotransformation. The diterpenes caseargrewiin F (casg F) and casearin B (cas B) were submitted to simulated gastric degradation (SGF) and metabolism by human liver microsomes. These data were used in physiology-based pharmacokinetic modeling (PBPK) to simulate the diterpenes pharmacokinetic profile. The products were identified by LC-DAD/UV, LC-MS, UPLC-QTOF-MS/MS and NMR. Physicochemical and biological diterpenes properties were determined: log P, chemical stability, stability in plasma, plasma proteins binding and enzymatic kinetics using human liver microsomes. The enzymatic kinetics parameters maximum speed ($V_{\max}$), K_M (Michaelis-Menten constant), and intrinsic clearance *in vivo* (C'_{int}) of casg F and cas B were used to estimate hepatic clearance (Cl_H) by *in vitro-in vivo* extrapolation. The analytical and bioanalytical quantification methods (LC-MS) were developed and validated in accordance with the National Health Surveillance Agency and the European Medicines Agency. Both diterpenes have shown greater instability ($p < 0.05$) in SGF (pH 1.2), followed by the TRIS buffer (pH 8.8) and Hank's (pH 7.4). Casg F and cas B were stable in plasma ($p < 0.05$) up to 60 and 270 min of incubation, respectively. The *in vitro* metabolism decay of both diterpenes was not influenced by the absence of the NADPH regenerating system. The decay was inhibited ($p < 0.05$) in the presence of NaF (200 mM), an esterase inhibitor, suggesting that the hepatic and plasma enzymes metabolism of casg F and cas B is esterase dependent. The plasma and microsomal proteins binding of casg F was 74.0 and 77.2%, respectively, and cas B was 86.7 and 87.4%, respectively. The major acid degradation products of casg F and cas B were their respective dialdehydes, which constituted more than 50% of the products (normalization of peak areas; LC-DAD/UV). Both diterpenes and their dialdehydes showed log P of 3.6 to 4.0 (HPLC-UV), which suggests good cell permeability. The diterpenes had a Michaelis-Menten kinetic profile, and the casg F $V_{\max}$ was 2 times greater than the cas B. The casg F K_M ($66.4 \pm 6.5 \mu\text{M}$) was close to the cas B ($61.4 \pm 5.1 \mu\text{M}$), so the apparent affinity of human microsomal enzymes for both diterpenes is similar. The *in vitro-in vivo* extrapolation resulted in Cl_H of casg F and cas B (19.6 and 19.2 mL/min/kg, respectively), so both have a high hepatic extraction ratio (98.0 and 96.0%, respectively). Casg F is more susceptible to chemical degradation than cas B, but both have similar susceptibility to metabolism by human liver microsomes. Thus, their oral bioavailability is reduced due to the gastric degradation and the high fraction metabolized in the liver passage. PBPK models indicate that diterpenes have different kinetic disposition in humans. Diterpenes and their degradation products have shown low inhibition ($< 50\%$) of COX-1, COX-2 and sPLA2. The anti-inflammatory action pathway of diterpenes is probably not involved with these enzymes.

Keywords: clerodane diterpenes, casearins, *Casearia sylvestris*, pharmacokinetics, metabolism.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	26
3. REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 <i>Casearia sylvestris</i> Swartz	27
3.2 Estudos ADME e de farmacocinética	34
3.2.1 Produtos naturais	36
3.2.2 Diterpenos clerodânicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Material e equipamentos	46
4.2 Coleta e preparo do material vegetal.....	47
4.3 Obtenção do extrato etanólico de folhas de <i>C. sylvestris</i> (EetCs).....	48
4.3.1 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>C. sylvestris</i>	48
4.3.2 Análises cromatográficas do extrato e frações	48
4.3.3 Purificação e determinação estrutural de diterpenos clerodânicos	49
4.4 Identificação e quantificação das substâncias por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas	50
4.5 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para a quantificação de diterpenos por LC-MS	51
4.5.1 Desenvolvimento de métodos analíticos	52
4.5.2 Desenvolvimento de métodos bioanalíticos	52
4.5.3 Parâmetros de validação	53
4.6 Determinação de propriedades físico-químicas e biológicas dos diterpenos caseargrewiina F e casearina B	54
4.6.1 Determinação do coeficiente de partição octanol / água (log P)	54
4.6.2 Ensaio de estabilidade química dos diterpenos em soluções aquosas de pHs 1,2; 7,4 e 8,8	55
4.6.3 Ensaio de estabilidade <i>ex vivo</i> dos diterpenos em plasma humano	55

4.6.4 Determinação da fração de diterpenos livre em plasma e em meio microssomal humanos.....	56
4.6.5 Ensaio de estabilidade metabólica dos diterpenos em microssoma humano	57
4.7 Estudo de degradação do EetCs e diterpenos em fluido gástrico simulado.....	58
4.8 Estudo de metabolização <i>in vitro</i> dos diterpenos utilizando microssomas hepáticos de humanos	58
4.8.1 Cinética enzimática dos diterpenos.....	59
4.8.2 Extrapolação <i>in vitro-in vivo</i> (IVIVE)	60
4.9 Estudo de modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) para predição do perfil farmacocinético da caseargrewiina F e casearina B em humanos	61
4.10 Investigação da ação anti-inflamatória <i>in vitro</i> dos diterpenos clerodânicos caseargrewiina F e casearina B	61
4.10.1 Investigação da ação dos diterpenos sobre a inibição da atividade <i>in vitro</i> das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-I e COX-II)	62
4.10.2 Investigação da ação dos diterpenos sobre a inibição da atividade <i>in vitro</i> da fosfolipase A2 secretada humana do grupo V recombinante (sPLA ₂)	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1 Preparação do extrato etanólico das folhas de <i>C. sylvestris</i> (EetCs)	63
5.2 Purificação e identificação estrutural de diterpenos clerodânicos	63
5.2.1 Fracionamento do EetCs e da fração 2 (F 2)	63
5.2.2 Cromatografia líquida semi-preparativa da SF 20-23.1	68
5.2.3 Identificação estrutural de diterpenos clerodânicos da SF 20-23.1	69
5.2.3.1 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P1.....	70
5.2.3.2 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P2.....	73
5.2.3.3 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P3.....	75
5.3 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para a quantificação de diterpenos por LC-MS	78

5.3.1 Método analítico	78
5.3.1.1 Matriz acetonitrila.....	78
5.3.1.2 Matriz tampão Hank's	81
5.3.2 Método bioanalítico	83
5.3.2.1 Matriz plasma humano	84
5.3.2.2 Matriz microssoma hepático humano	86
5.4 Determinação de propriedades físico-químicas e biológicas da caseargrewiina F e casearina B	88
5.4.1 Determinação do coeficiente de partição octanol / água (log P)	88
5.4.1.1 Determinação <i>in sílico</i>	88
5.4.1.2 Determinação por método cromatográfico.....	89
5.4.2 Ensaio de estabilidade química da casg F e cas B em soluções aquosas de pHs 1,2; 7,4 e 9,0	90
5.4.2.1 Estabilidade em pH 1,2 (FGS).....	91
5.4.2.1 Estabilidade em pH 7,4 (Hank's)	93
5.4.2.2 Estabilidade em pH 8,8 (TRIS)	95
5.4.3 Ensaio de estabilidade <i>ex vivo</i> da casg F e cas B em plasma humano	97
5.4.4 Determinação da fração de diterpeno livre em plasma (f_{up}) e em meio microssomal humano (f_{um})	99
5.4.5 Ensaio de estabilidade metabólica dos diterpenos em microssomas hepáticos de humanos	101
5.5 Estudo de degradação do EetCs e diterpenos em fluido gástrico simulado...	104
5.5.1 Análises dos PDA por LC-DAD/UV	104
5.5.2 Análises dos PDA por LC-MS	110
5.5.3 Análises dos PDA por UPLC-QTOF-MS/MS e RMN	114
5.6 Estudo de metabolização <i>in vitro</i> dos diterpenos em microssomas hepáticos de humanos.....	123
5.6.1 Análises dos PME por LC-MS	123

5.6.2 Cinética enzimática dos diterpenos	128
5.6.3 Extrapolação <i>in vitro-in vivo</i> (IVIVE)	133
5.7 Estudo de modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) para predição do perfil farmacocinético da caseargrewiina F e casearina B em humanos	135
5.8 Investigação da ação anti-inflamatória <i>in vitro</i> dos diterpenos clerodânicos caseargrewiina F e casearina B sobre a inibição da das ciclo-oxigenases 1 e 2 de ovinos (COX-1 e COX-2) e fosfolipase A2 (sPLA ₂)	138
6. CONCLUSÃO.....	141
7. REFERÊNCIAS.....	143
8. APÊNDICES.....	163
9. ANEXOS	204

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, o uso de plantas esteve atrelado a medicina tradicional das diversas comunidades. O acesso a plantas medicinais é universal e fácil, sendo que elas podem ser encontradas em feiras livres, mercados populares, Farmácias-vivas ou até mesmo cultivadas em residências. As plantas medicinais geralmente possuem diferentes substâncias que juntas atuam em diferentes alvos e sinergicamente desempenham a ação terapêutica (fitocomplexo), o que é uma alternativa eficiente para o tratamento de muitas doenças crônicas e complexas do que a terapia simples baseada em fármacos sintéticos. Além disso, as plantas também são importantes como fonte para o desenvolvimento de medicamentos (XIN et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Apesar do avanço científico na síntese de fármacos, a natureza continua sendo uma fonte importantíssima para o desenvolvimento de medicamentos. Recentes dados da literatura indicam que mais de 40% dos 1881 novos agentes terapêuticos registrados de 1981 a 2019 (fármacos, extratos vegetais, macromoléculas biológicas e vacinas) foram desenvolvidos baseados em produtos naturais. Nesse contexto, o Brasil se destaca pois é um país territorialmente amplo que engloba vários biomas, o que o faz detentor de uma flora muito diversificada com mais de 30 mil espécies de plantas já catalogadas, sendo 20 mil endêmicas (NEWMAN; CRAGG, 2020; STEHMANN; SOBRAL, 2017). *C. sylvestris* é uma destas espécies vegetais, popularmente conhecida como guaçatonga, sendo distribuída em 22 estados brasileiros (MARQUETE, 2001).

O interesse por estudá-la deve-se, principalmente, pelos seus diversos usos na medicina popular, pois é utilizada como cicatrizante, antisséptico, anti-inflamatório, antirreumático, antiulceroso, febrífugo, depurativo, anestésico tópico, antidiarreico e antiofídico, sendo que este foi o primeiro relato literário com finalidade terapêutica no Brasil, em 1877 (CAMINHOÁ, 1877; FERREIRA et al., 2011). Muitos desses usos foram comprovados por estudos científicos, mostrando que extratos de folhas da *C. sylvestris* ou seus componentes podem apresentar ação antitumoral, antiulcerogênica, antiofídica, anti-inflamatória e cicatrizante (DE FORD, 2016; FELIPE et al., 2014; FERREIRA et al., 2011; FERREIRA et al., 2016; PIERRI et al., 2017; SERTIÉ et al., 2018; SPOSITO et al., 2019; HEYMANNS et al., 2020).

Estudos demonstraram também que os diterpenos clerodânicos presentes nas folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* são responsáveis pelas suas principais atividades farmacológicas: cicatrizante, antitumoral, antiulcerogênica e anti-inflamatória, especialmente a casearina B e caseargrewiina F (SANTOS, 2008; FERREIRA et al., 2014; PIERRI et al., 2017; SERTIÉ et al., 2018). Além disso, derivados vegetais ou substâncias isoladas dessa espécie têm baixa toxicidade quando administrados oralmente em modelos animais ou em ensaios *in vitro* (BASILE et al., 1990; FERREIRA et al., 2014; PRIETO et al., 2013; AMENI et al., 2015).

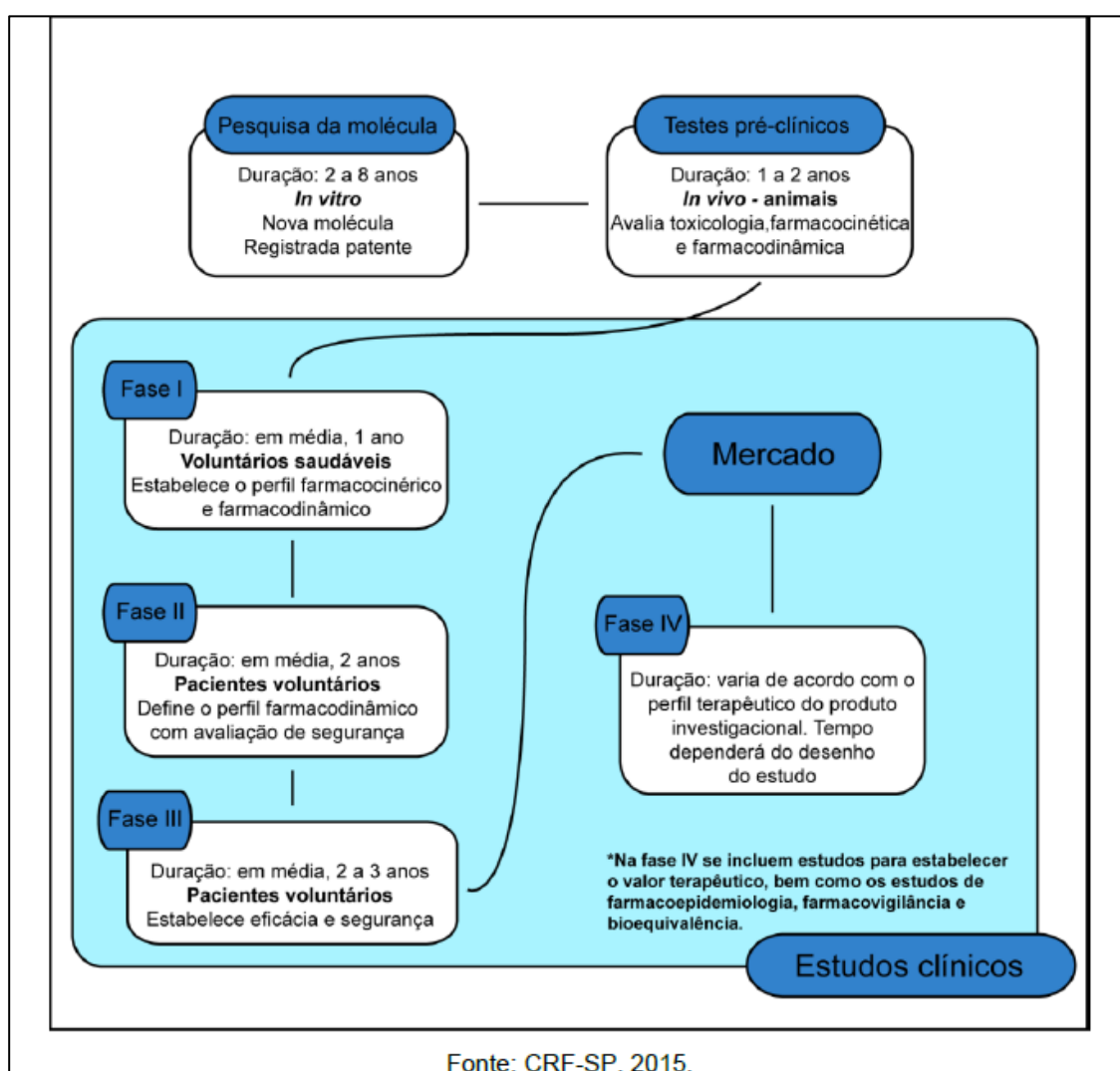
Tendo em vista os resultados de estudos farmacológicos e toxicológicos em conjunto com sua tradição de uso, *C. sylvestris* está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e já faz parte do Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, publicado em 2011 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Tal formulário estabelece a padronização de fitoterápicos, garantindo sua segurança, eficácia e qualidade, o que torna mais confiável o seu uso terapêutico. Vale lembrar que neste formulário está incluída uma preparação extemporânea por infusão (produto tradicional fitoterápico do tipo chá medicinal) de folhas de *C. sylvestris*, indicado apenas como antidiarréico, cuja segurança e eficácia está baseada principalmente no uso tradicional (BRASIL, 2011).

Entretanto, é evidente que a espécie possui grande potencial terapêutico, o qual poderia ser regulamentado para o desenvolvimento de um fitoterápico à base do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* com indicação como anti-inflamatório ou para o tratamento de gastrites e úlceras pépticas (SANTOS, 2008; FERREIRA et al., 2011; PIERRI et al., 2017; SERTIÉ et al., 2018; ODA et al., 2019; SPOSITO et al., 2019). Apesar disso, essa planta não foi incluída na última lista de medicamentos ou produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado e atualmente não há nenhum fitoterápico à base de *C. sylvestris* ou de seus derivados registrados na ANVISA, sendo necessários mais estudos relativos à padronização de seus derivados vegetais, especialmente farmacológicos e farmacocinéticos (BRASIL, 2014).

Grande parte do insucesso na produção de novos medicamentos está relacionado com propriedades farmacocinéticas inadequadas, como a absorção e

biodisponibilidade. Para resolver isso e diminuir os gastos investidos nas diversas etapas do desenvolvimento de fármacos (Figura 1), têm sido utilizados estudos *in vitro* para investigar as propriedades físico-químicas e os parâmetros cinéticos pela via oral, a qual é a mais utilizada nas terapias farmacológicas devido à segurança, facilidade e custo. Esses ensaios fornecem um *screening* de forma mais rápida e econômica para otimização dos ensaios pré-clínicos e clínicos (ABRAHAMSSON; LENNERNAS, 2005; JIA; LIU, 2007; LEXCHIN, 2018). Nesse sentido, é importante a avaliação das propriedades físico-químicas e cinéticas que simulam a administração via oral envolvendo os marcadores químicos ativos da *C. sylvestris*, diterpenos clerodânicos, o que justifica a realização desse trabalho.

Figura 1. Fases de pesquisa durante o desenvolvimento de fármacos.



Os ensaios *in vitro* são adequados para a investigação inicial pois eles são capazes de determinar algumas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas

dos fármacos, as quais podem ser usadas para estimar as propriedades *in vivo* em estudos de extrapolação *IVIVE* (*In Vitro-In Vivo Extrapolation*), além de auxiliar na avaliação da toxicidade, etapas imprescindíveis na cadeia de desenvolvimento de um novo medicamento. Desse modo, a utilização de sistemas *in vitro* simulando as interferências que os fármacos sofrem no trato gastrointestinal e no fígado é mais simples, rápida, geralmente não envolve considerações éticas e tem menor custo financeiro, evitando caminhos errôneos que poderiam levar à realização de ensaios *in vivo* desnecessários. Ademais, métodos de mimetização tem mostrado alta correlação com ensaios em animais e humanos (HOUSTON, 1994; OBACH et al., 1997; LOHMANN; KARST, 2008; SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

Outra grande vantagem é que os ensaios *in vitro* requerem menores quantidades de amostra, fator muitas vezes limitante em ensaios com produtos naturais. Aliados a técnicas de cromatografia e espectrometria de massas, os produtos de degradação e/ou metabolização podem ser identificados e purificados de maneira relativamente simples para sua caracterização e uso em ensaios farmacológicos. Geralmente, correspondem aos mesmos produtos e metabólitos que são encontrados *in vivo*. Por esse motivo, a investigação deles torna-se relevante, com destaque para os majoritários formados (LIN; LU, 1997). Estes debates sobre o estudo dos metabólitos vêm ganhando cada vez mais importância pelos principais órgãos de vigilância e regulamentação de medicamentos do mundo (EMA, 2009).

Apesar de começar a ser desenvolvida há mais de 50 décadas, a simulação *in silico* através de modelos farmacocinéticos tem se mostrado como uma ótima opção para a predição dos parâmetros farmacocinéticos. Com a sofisticação desses modelos graças aos avanços tecnológicos de engenharia computacional e biomédica, podem ser uma ferramenta muito eficiente na predição da farmacocinética de fármacos. A modelagem PBPK utiliza a combinação de dados específicos do fármaco (físico-químicos, de permeabilidade e de biotransformação) que podem ser obtidos de estudos *in vitro* com dados computacionais que descrevem a fisiologia e a anatomia do corpo humano (como a massa ou volume dos órgãos e o fluxo sanguíneo venoso e arterial através dos órgãos e tecidos, o particionamento entre os tecidos, a captação mediada por transportadores de influxo/efluxo; e do modelo estrutural, o qual compreende a disposição anatômica dos tecidos e órgão do corpo humano), considerando todos os processos

moleculares e bioquímicos, além das variáveis populacionais intrínsecas e extrínsecas (fatores demográficos, anatômicos, genéticos e fisiológicos) (ZHAO et al., 2011; JONES, et al., 2012; ZHUANG; LIU, 2016; CHARMAN et al., 2020).

As grandes agências de saúde, assim como no campo da academia e indústrias farmacêuticas já consideram o modelo de PBPK, quando utilizado de forma correta, como uma ferramenta confiável na predição dos parâmetros cinéticos durante o desenvolvimento de fármacos. Assim, uso de dados gerados em estudos *in vitro* e *in silico*, combinados com informações farmacocinéticas clínicas, pode ser uma ótima forma de triagem para entender o comportamento do fármaco no organismo para auxiliar o planejamento dos estudos *in vivo* ou até mesmo substituí-los. Além disso, as técnicas de PBPK podem ser aplicadas em diversas etapas do desenvolvimento de fármacos para aumentar a eficiência e a compreensão da farmacocinética. Vale ressaltar que a fidedignidade desses resultados depende diretamente da fonte de dados para a modelagem. O maior desafio desses resultados é prever com exatidão o *clearance* humano dos fármacos. Para isso, métodos de simulação *in vitro* utilizando microssomas hepáticos ou hepatócitos são eficientes para predição de fármacos metabolizados (JONES, 2012; ZHUANG; LIU, 2016).

Visto que em estudos anteriores alguns ensaios *in vitro* de hidrólise ácida e metabolização hepática envolvendo diterpenos clerodânicos ocorreu a formação de vários produtos oriundos de diferentes mecanismos de formação, é importante também conhecer o comportamento de outros diterpenos comprovadamente ativos (como da caseargrewiina F e casearina B) simulando a administração oral, a via mais utilizada na administração medicinal de derivados de *C. sylvestris* (FERREIRA et al., 2011; MOREIRA DA SILVA et al., 2018; ODA et al., 2019). Isso indica que os diterpenos clerodânicos possuem distintos sítios moleculares vulneráveis à degradação ácida e metabolização hepática, sendo importante encontrar um padrão desses fenômenos e verificar se os dialdeídos correspondentes, seus principais produtos e metabólitos, serão formados a partir de outros diterpenos clerodânicos. Nesse sentido, também é possível utilizar outros ensaios que simulem as influências químicas durante a passagem desses diterpenos pelo intestino, como a incubação no tampão TRIS (pH 8,8) (USP, 2015).

Muitas propriedades físico-químicas intrínsecas das substâncias que influenciam na sua disposição cinética podem ser obtidas por ensaios *in vitro*, destacando-se a determinação do coeficiente de partição ($\log P$) e estabilidade química, as quais podem ser aplicadas aos diterpenos. Esses parâmetros estão relacionados com a capacidade de um fármaco em atravessar as membranas celulares por meio de difusão passiva, além de prever de uma maneira geral o comportamento da substância nos diferentes pHs do trato gastrointestinal e fluídos corporais, e a distribuição após a administração oral apresentando informações importantes na correlação *in vivo*. Assim, quando há uma instabilidade não desejável, pode-se recorrer à utilização de recursos farmacotécnicos para utilizar formulações que protejam a substância da degradação do trato gastrointestinal (CHEN et al., 2006; KERNS; DI, 2007; DI; KERNS, 2009; KWONG, 2015).

Quando estão na corrente sanguínea os xenobióticos podem ser encontrados em fração livre ou ligado às proteínas plasmáticas. Essas proteínas auxiliam na distribuição dos fármacos, o qual somente estará disponível para sofrer metabolização na forma livre, sendo que a quantidade que está ligada às proteínas plasmáticas não é metabolizada e eliminada. Assim, é importante conhecer a taxa de ligação dos xenobióticos a essas proteínas, uma vez que elas influenciam diretamente na ação e eliminação do fármaco (Cl e meia vida de eliminação) (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

O fígado humano é o principal órgão de metabolismo de xenobióticos. Em relação aos ensaios de metabolização *in vitro*, o uso de microssomas hepáticos é mais eficiente quando comparado às enzimas recombinantes (por exemplo, CYP e UDP-glicuronosiltransferases), frações subcelulares (fração citosólica e fração S9) e cultura de hepatócitos, amostras de tecido hepático e fígado perfundido. Isso porque as microssomas apresentam maior rendimento metabólico, são mais estáveis e oferecem a possibilidade de avaliar grupos isolados de enzimas utilizando inibidores seletivos (LOOHMAN; KARST, 2008; HE et al., 2010; MOREIRA DA SILVA, 2016; MOREIRA DA SILVA et al., 2018). Dentre as frações do fígado, os microssomas são as mais utilizadas na avaliação do metabolismo *in vitro* de fármacos e uma vez determinada a cinética de metabolização envolvida - velocidade máxima da reação ($V_{\max}$), constante de Michaelis-Menten (K_M) e *clearance* intrínseco (Cl_{int}) - é possível aplicar modelos *IVIVE* para estimar *clearance* hepático (Cl_H), verificando o papel do

fígado na depuração total *in vivo*. Para isso, o modelo *well-stirred* é o mais comumente utilizado pois apresenta maior simplicidade em sua aplicação. Este modelo considera o fígado como um compartimento único com perfusão homogênea, assumindo que a distribuição do fármaco pelo órgão é rápida, que a concentração do fármaco no tecido está em equilíbrio com a concentração no sangue e que a distribuição das enzimas metabólicas no fígado é homogênea. (EMOTO et al., 2010; OBACH et al., 2011; SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

Esses estudos são importantes para conhecer o comportamento dos diterpenos no trato gastrointestinal e avaliar a eliminação pré-sistêmica após administração oral, determinando assim quais os tipos e a influência das transformações, de forma compartimentalizada, tanto em relação à atividade farmacológica (ou tóxica) quanto aos parâmetros cinéticos que influenciam a biodisponibilidade das substâncias. Assim, essas propriedades devem ser avaliadas visando novos medicamentos eficazes e seguros. Desse modo, o uso do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (EetCs) nesses ensaios é importante para constatar se o comportamento dos marcadores ativos (diterpenos clerodânicos) foram os mesmos, uma vez que as interferências do meio podem ser diferentes quando estão em uma matriz complexa.

Outra propriedade farmacocinética importante de ser avaliada é a permeabilidade intestinal, a qual está relacionada com a absorção do fármaco. Para uma análise geral utiliza-se o modelo celular Caco-2, o qual é o modelo *in vitro* mais utilizado para previsão da absorção de fármacos, tanto por pesquisas acadêmicas quanto por indústrias farmacêuticas. Além de possuir a vantagem de simular rotas ativas e passivas de transporte, esse método possui alta correspondência com os ensaios *in vivo* (HUBATSCH et al., 2007; MOREIRA DA SILVA et al., 2018).

Nesse contexto, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos para determinação quantitativa de fármacos é necessário para garantir que os métodos empregados assegurem credibilidade e confiabilidade quando utilizados. A validação analítica no Brasil é normatizada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166 de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Já a validação bioanalítica no Brasil é normatizada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 27 de 2012 (ANVISA) (BRASIL, 2012; 2017).

Há destaque para a utilização de diterpenos clerodânicos em distúrbios inflamatórios, pois eles também apresentam atividade antiulcerogênica e não causam gastroenterites (PIERRI et al., 2017), ao contrário dos anti-inflamatórios mais utilizados, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) (GROSSER; FITZGERALD, 2011). Em relação aos prováveis mecanismos da atividade anti-inflamatória da *C. sylvestris*, a literatura é relativamente escassa, mas sugere que pode estar associado à redução da produção de prostaglandinas (PG) por inibição da ciclo-oxigenase (COX) ou da fosfolipase A2 secretada (sPLA₂), sendo que dentre os dez diferentes grupos, o grupo V é o principal envolvido com a reação inflamatória em macrófagos (BORGES et al., 2000; SASSIOTO et al., 2004; DENNIS et al., 2011). Apesar das casearinas J e O e seus produtos de degradação ácida e metabolização hepática não apresentarem inibição da liberação de óxido nítrico (ODA et al., 2019), o mecanismo anti-inflamatório de outros diterpenos pode estar relacionado com o NO, o qual é um importante sinalizador do processo inflamatório. Dessa forma, a quantificação direta ou indireta da atividade dessas enzimas e de NO pode ser relacionada proporcionalmente à resposta inflamatória (GREENHOUGH et al., 2009; BOGDAN, 2015).

Visto que os diterpenos podem sofrer grandes modificações estruturais ao serem submetidos a ensaios *in vitro* de simulação da administração oral, é interessante a avaliação da atividade anti-inflamatória por diferentes mediadores dos produtos de degradação ácida e enzimática formados, a fim de elucidar as vias de ação dos diterpenos e verificar se essas modificações podem influenciar a ação biológica (EMA, 2009).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar estudos *in vitro* de simulação da administração oral que contribuam para a compreensão do comportamento farmacocinético de diterpenos clerodânicos do tipo das casearinas e do papel de seus produtos de degradação na ação anti-inflamatória.

Objetivos Específicos

- I. Purificar e identificar dois diterpenos (casearina B e caseargrewiina F) a partir do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* e obter os seus produtos de degradação gástrica (PDA) submetidos em meio de fluido gástrico simulado sem enzimas e identificar o principal produto de degradação de cada diterpeno;
- II. Investigar o metabolismo dos diterpenos por microssomas hepáticos de humanos, identificar os metabólitos obtidos (PME) e estimar os parâmetros de cinética enzimática dos diterpenos para extrapolação *in vitro-in vivo*;
- III. Investigar propriedades físico-químicas, biológicas e farmacocinéticas de diterpenos e de seus produtos majoritários: coeficiente de partição (log P), ligação a proteínas plasmáticas e microssomais hepáticas;
- IV. Desenvolver *in silico* (utilizando o software PK-Sim[®]) um modelo farmacocinético baseado na fisiologia (PBPK) para simular o perfil farmacocinético dos diterpenos caseargrewiina F e casearina B em humanos;
- V. Avaliar a ação anti-inflamatória *in vitro* (inibição de COX I e II e PLA₂) dos diterpenos e de seus produtos (PDA e PME) e elucidar as suas vias de ação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Casearia sylvestris* Swartz

A espécie vegetal *C. sylvestris* foi descrita pela primeira vez por Swartz em 1797, sendo classificada na família Bixaceae, e posteriormente na Flacourtiaceae. Através de estudos de sequenciamento genético, a espécie foi reclassificada como Salicaceae (ABSY; SCAVONE, 1973; SLEUMER, 1980; KLEIN; SLEUMER, 1984; SOUZA; LORENZI, 2005). Ela possui de 1,5 a 20 m de altura, tronco de 10 a 50 cm, ramos com extremidade glabra a pubescente, e folhas simples e pecioladas com limbo medindo de 4 a 14 cm de comprimento por 1 a 4 cm de largura, herbáceo a subcoriáceo, glabro, de forma oblonga a elíptica, com bordas serrilhadas e por vezes acrescidas de ondulações, ápice acuminado, base simétrica a oblíqua; a enervação é reticulada; há pecíolo com cerca de 0,5 cm de comprimento, cilíndrico e sulcado na sua porção adaxial. Há relatos de que ela floresce nos meses de junho a março e produz frutos entre setembro e novembro. As flores são numerosas, pequenas, actinomorfas, esverdeadas, hipóginas e diclamídeas; com botão floral globoide de cinco sépalas levemente unidas na base e cerca de 4,0 x 2,0 mm. Os seus frutos

são globulosos, angulosos, verde escuro a vermelho com 1 a 7 sementes oblongas e arilo franjado e carnosos, com coloração avermelhada / alaranjada e endosperma crasso (KLEIN; SLEUMER, 1984; TORRES; YAMAMOTO, 1986; MARQUETE; VAZ, 2007; CARVALHO, 2019).

Por ser amplamente distribuída no território brasileiro, *C. sylvestris* apresenta grande variabilidade morfoanatômica que está relacionada à variabilidade na composição química. Desse modo, estudos demonstraram que extratos de folhas de espécimens de *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* originados da Mata Atlântica (Figura 2) e *Casearia sylvestris* var. *lingua* (Cambess.) Eichler originados do Cerrado (Figura 3) apresentam perfil químico com maior expressão de diterpenos e de flavonoides, respectivamente. Neste trabalho, no entanto, os exemplares utilizados foram de *C. sylvestris* var. *sylvestris*, já que o objetivo está relacionado diretamente com os diterpenos clerodânicos e seus derivados (CLAUDINO et al., 2013; BUENO et al., 2015).

Figura 2. *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* (São Miguel Arcanjo-SP), altura aproximada: 12 m



Fonte: CARVALHO, 2019.

Figura 3. *Casearia sylvestris* var. *lingua* (Estação Experimental de Araraquara, Araraquara-SP), altura aproximada: 2,5 m.



Fonte: CARVALHO, 2019.

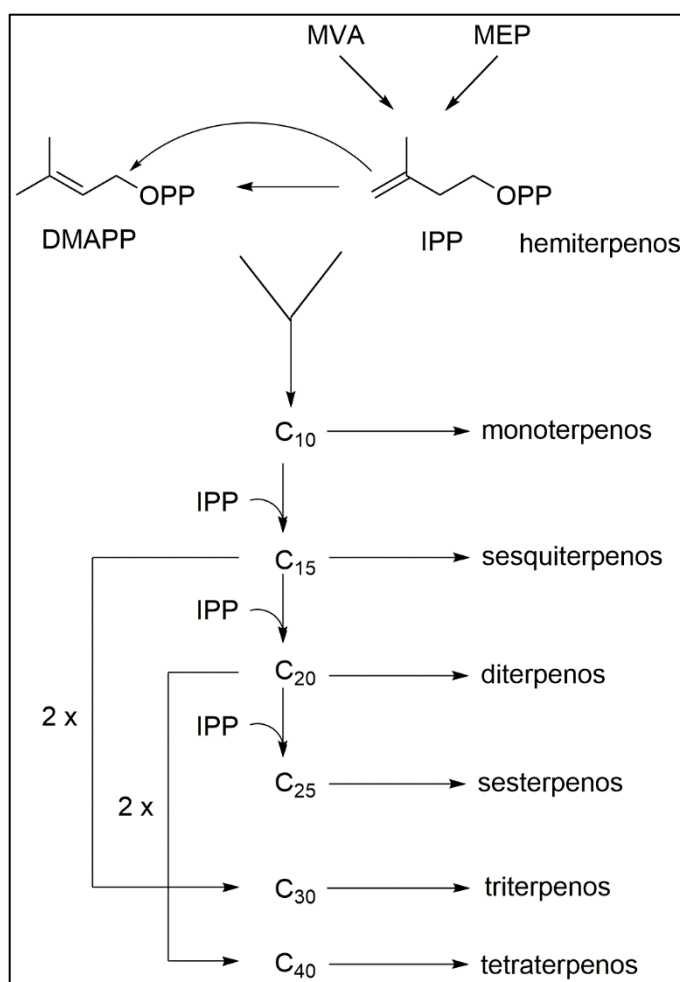
Metabólitos secundários presentes em *C. sylvestris* incluem monoterpenos e sesquiterpenos componentes do óleo essencial das folhas, *nor*-isoprenoides, triterpenos, flavonoides, neolignanas, ésteres derivados do ácido gálico, derivados do ácido elágico e outros compostos fenólicos simples como ácido cafeico e ácido clorogênico. Dentre estes metabólitos secundários destacam-se os diterpenos clerodânicos, considerados marcadores quimiotaxonômicos para o gênero *Casearia*. (XIA et al., 2015; DANUELLO et al., 2020).

A rota biossintética dos terpenos, cuja estrutura é composta por unidades de isopreno (2-metil-buta-1,3-dieno), ocorre por duas vias: do ácido mevalônico (MVA), que tem origem a partir de moléculas de acetil-CoA e ocorre no citosol, e do fosfato metileritritol (MEP), que tem origem a partir do ácido pirúvico e ocorre nos plastídios.

Os precursores de ambas as vias passam por uma série de reações de hidrólise, condensação, reduções enzimáticas e fosforilações até resultar nos

hemiterpenos isômeros (C_5) 3,3'-dimetilalil difosfato (DMAPP) e 3-isopentenil difosfato (IPP), os quais podem ser interconvertidos por isomerases da planta. Em geral, os hemiterpenos advindos da via do MEP se combinam aos pares ou entre si através da ação de enzimas, formando os monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) e tetraterpenos (C_{40}). Já os hemiterpenos oriundos da via do MVA se combinam dando origem a sesquiterpenos (C_{15}), triterpenos (C_{30}), esteroides de C_{27-29} e suas saponinas (Figura 4) (DEWICK, 2009; BERGMAN; DAVIS; PHILLIPS, 2019) (Figura 4).

Figura 4. Rota biosintética dos terpenos.



Fonte: (DEWICK, 2009).

A rota biossintética dos terpenos indica que os diterpenos são biossintetizados através de precursores IPP e DMAPP advindos da via do MEP.

Embora nem todas as posteriores reações específicas e complexas para formação de diterpenos com atividade biológica ocorram no plastídio, como acetilações, acilações, oxigenações e hidroxilações, são nessas organelas que ocorrem as etapas iniciais que levam ao precursor dos diterpenos geranylgeranyl difosfato (GGPP), além da importante ação de ciclização olefínica por enzimas terpeno sintase (BERGMAN; DAVIS; PHILLIPS, 2019).

As etapas de síntese dos diterpenos clerodânicos da *C. sylvestris* não foram especificadamente elucidadas, entretanto geralmente nas plantas as primeiras reações relacionadas à formação desse tipo de diterpeno são controladas por enzimas diterpenos sintase de classe II. Estas enzimas facilitam a ciclização e rearranjo iniciados por protonação do precursor (GGPP) para formar diferentes difosfatos prenitados bicíclicos. Sabe-se também que o controle enzimático sobre a configuração estereoquímica e oxigenação distintas dos intermediários dessas reações são fatores críticos para determinarem as configurações funcionais e consequentemente a bioatividade dos diterpenos (PELOT et al., 2018; BATHE; TISSIER, 2019; BERGMAN; DAVIS; PHILLIPS, 2019).

As modificações estruturais induzidas pelas enzimas do CYP (CYP71, CYP85 e CYP72) como hidroxilações, rearranjos, fechamentos de anéis e principalmente oxidações também são importantes na diversidade dos diterpenos. Entretanto, não há uma regra geral para a atribuição da função catalítica dos CYPs nessa classe de substâncias, o que está relacionado ao fato de que algumas das subclasses estruturais de diterpenos são metabólitos especializados e restritos a certas famílias ou gêneros de plantas, como os diterpenos clerodânicos no gênero *Casearia*. (BATHE; TISSIER, 2019).

Dos 42 diterpenos clerodânicos identificados em *C. sylvestris*, 27 são do tipo das casearinas e apresentam a mesma estrutura básica (Figura 5, Tabela 1). Foram também identificados em extratos etanólicos das folhas de *C. sylvestris* outros tipos de diterpenos clerodânicos, com estruturas menos complexas, o (-)-ácido hardwickiico e a 15-hidróxi-3-cleroden-2-ona, além de diterpenos *ent*-kauranos (FERREIRA et al., 2011; XIA et al., 2015).

Figura 5. Estrutura geral dos diterpenos clerodânicos de *C. sylvestris* (FERREIRA et al., 2011). Os substituintes R₁₋₅ dos diterpenos são apresentados na Tabela 1.

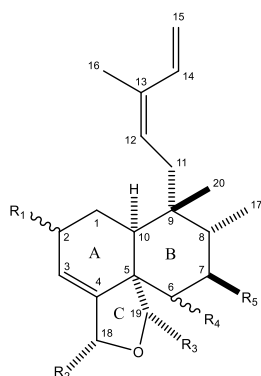


Tabela 1. Diterpenos clerodânicos das folhas de *Casearia sylvestris*. Os substituintes R₁ a R₅ referem-se à estrutura representada na Figura 1 (FERREIRA et al., 2011; XIA et al., 2015).

Diterpenos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Casearina A	α -OCH ₃	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina B	α -OCH ₃	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina C	α -OH	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₉ H ₁₉ CO ₂
Casearina D	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina E	α -OH	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₉ H ₁₉ CO ₂
Casearina F	α -OH	OCH ₂ CH ₃	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina G	α -OCH ₃	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina H	α -OH	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina I	α -OH	CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina J	α -OCH ₃	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina K	α -CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina L	α -OCH ₃	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -CH ₃ CO ₂	OH
Casearina M	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	α -CH ₃ CO ₂	OH
Casearina N	α -OCH ₃	CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	α -CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina O	α -OCH ₃	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina P	α -OCH ₃	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂
Casearina Q	α -OH	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina R	= O	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina S	α -OCH ₃	= O	CH ₃ CO ₂	H	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina T	α -OCH ₃	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	β -CH ₃ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina U	α -OCH ₃	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina V	α -OH	OCH ₃	CH ₃ CO ₂	α -OH	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂
Casearina X	α - <i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	<i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	H
Casearvestrina A	β -(CH ₃) ₂ CHCO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	H
Casearvestrina B	β -CH ₃ CH ₂ CH(CH ₃)CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	H
Casearvestrina C	β - <i>n</i> -C ₅ H ₁₁ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	H
Caseargreuiina F	α - <i>n</i> -C ₃ H ₇ CO ₂	CH ₃ CO ₂	CH ₃ CO ₂	α -OH	H

3.2 Estudos ADME e de farmacocinética

Ao ser administrado no organismo, o comportamento de um novo xenobiótico - como os produtos naturais oriundos de plantas - é desconhecido, pois pode sofrer inúmeras influências desde a sua absorção até a chegada e manutenção de concentrações apropriadas nos sítios de ação. Portanto, é de suma importância conhecer a sua farmacocinética, a qual pode ser definida como o estudo do curso temporal do fármaco no organismo, envolvendo os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (SMITH; WATERBEEMD; WALKER, 2012).

Apesar de avaliarem separadamente cada processo, os estudos ADME podem ser realizados através de modelos *in silico* (avaliações computacionais), que envolvem a modelagem de dados ou de moléculas; ensaios *in vitro* ou ainda modelos preditivos que podem combinar diversas informações como solubilidade, permeabilidade e assim indicar as perspectivas cinéticas sobre determinadas substâncias (WATERBEEMD; GIFFORD, 2003.). Assim, visando a diminuição de tempo e de gastos, muitas indústrias farmacêuticas têm aderido ensaios *in vitro* de ADME para que através de uma previsão racional dos parâmetros cinéticos, os ensaios posteriores *in vivo* possam ser otimizados (VAN BREEMEN; LI, 2005; JIA; LIU, 2007; SMITH; WATERBEEMD; WALKER, 2012;).

A absorção de um fármaco ocorre quando há a passagem do local de administração para a circulação sistêmica. Em relação à via oral, a qual é a mais comumente utilizada em plantas medicinais, a absorção se dá quando a substância atravessa as diversas membranas celulares do epitélio gastrointestinal com acesso à circulação sistêmica. A redução na carga corpórea do fármaco decorrente de reações de biotransformação ou outros processos ativos que ocorrem na passagem pelos enterócitos, circulação portal e no fígado, antes que o mesmo alcance a circulação sistêmica recebe o nome de eliminação pré-sistêmica (ABRAHAMSSON; LENNERNAS, 2005; STORPIRTIS et al. 2011).

A distribuição está relacionada com a movimentação do fármaco no organismo entre os fluídos biológicos e tecidos. Este processo está relacionado com diversas propriedades físico químicas e biológicas dos fármacos, como Log P, estabilidade química, pKa, etc (STORPIRTIS et al. 2011; DI; KERNS, 2016). Por sua vez, o metabolismo ou biotransformação é a conversão do fármaco em outros

compostos, em geral, mais hidrofílicos através da ação de enzimas. As reações de biotransformação são classificadas em duas fases, sendo que a fase I envolve as reações de oxidação, redução, hidratação, hidrólise e isomerização, as quais geralmente promovem um grande incremento de hidrossolubilidade e a formação de grupos funcionais que servem de sítios ativos para as reações de fase II. Esta envolve reações de conjugação como: glicuronidação, metilação, sulfonação e acetilação sendo envolvidas com a inativação das moléculas (LOOHRMAN; KARST, 2008; GIBSON; SKETT, 2001; TESTA; KRAMER, 2006). Embora alguns xenobióticos possam ser eliminados de forma inalterada, comumente as reações de biotransformação facilitam a sua eliminação no organismo. A principal via de excreção em humanos é a urinária, mas pode também ocorrer pelas fezes, bile, leite, suor e ar exalado dos pulmões (STORPIRTIS et al. 2011).

Em geral, os processos metabólicos ocorrem seguindo a cinética não-linear após administração de doses terapêuticas. As reações de catálise envolvendo as enzimas microssomais humanas geralmente obedecem a cinética enzimática estabelecida por Leonor Michaelis e Maud Menten. Eles confirmaram trabalhos anteriores através de modelos experimentais, e provaram que a velocidade inicial de uma reação enzimática é diretamente proporcional à concentração da enzima e que a velocidade de reação é dependente da concentração de substrato até a saturação, conforme a Equação 1. V_0 é a velocidade inicial da reação (ou velocidade no estado estacionário), $[S]$ é a concentração do substrato, V_{max} é a velocidade máxima da reação e K_M é a constante de Michaelis-Menten (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012; SEIBERT; TRACY, 2014; ZVEREVA et al. 2016).

Equação 1.

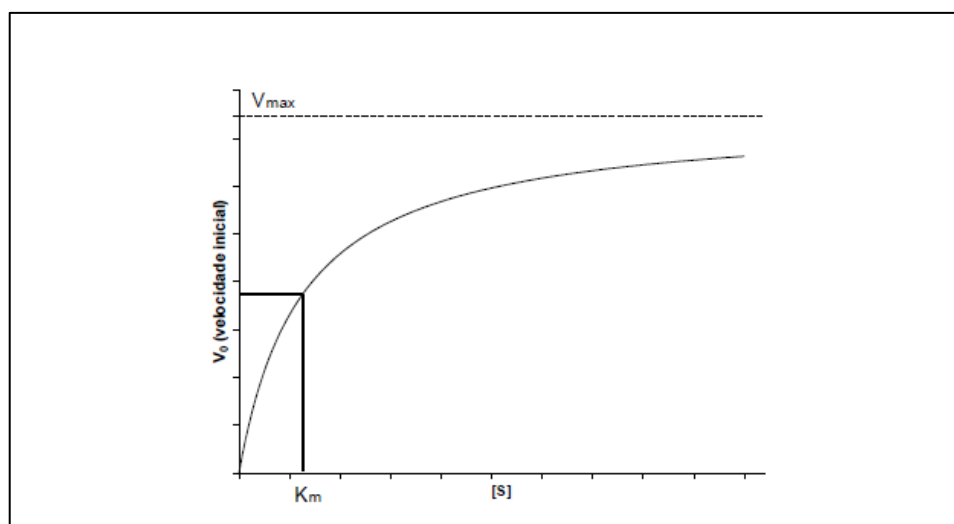
$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

A V_{max} indica a capacidade de depuração de um fármaco e é estimada em ensaios de metabolismo *in vitro* em condições de saturação enzimática. O parâmetro K_M indica de forma inversamente proporcional a afinidade da enzima pelo substrato e é definido como a $[S]$ na qual a velocidade da reação é metade da V_{max} . Através do gráfico de $V_0 \times [S]$ nas condições de estado estacionário das enzimas microssomais há a formação de uma hipérbole (Figura 6). A partir desse gráfico, é possível obter

esses dois parâmetros cinéticos $V_{\max}$ e K_M e determinar o *clearance* intrínseco (Cl_{int}) do substrato.

A *IVIVE* permite prever o *clearance* hepático (Cl_H) a partir dos dados de Cl_{int} e da fração livre no plasma e em meio microsomal e usando dados da fisiologia humana. Uma vez que o fígado é o principal órgão de biotransformação no corpo humano, a determinação do Cl_H é primordial para indicar a capacidade do corpo em eliminar os diterpenos (SUBRAMANIAN; TRACY, 2012; SEIBERT; TRACY, 2014; ZVEREVA et al. 2016).

Figura 6. Gráfico representativo da cinética enzimática de Michaelis-Menten. $V_{\max}$: velocidade máxima; $[S]$: concentração de substrato; K_M : constante de Michaelis-Menten.



Fonte: HOUSTON; KENWORTHY, 2000.

3.2.1 Produtos naturais

Apesar do extenso uso de plantas medicinais, principalmente no Brasil, muitas delas ainda têm a sua segurança e eficácia farmacológica baseada na tradicionalidade de uso, uma vez que não são obrigatórios estudos para alguns tipos de indicação desses produtos. Embora essa estratégia mostra ser de fato relevante e confiável, o potencial de prescrição desses produtos naturais pode não ser explorado de forma completa. Isso porque se houvessem mais estudos de ADME gerando conhecimentos farmacocinéticos acerca dos produtos naturais que já possuem atividades farmacológicas conhecidas, certamente estes poderiam ser

utilizados com mais eficiência. Ademais, podem ocorrer interações medicamentosas com outros fármacos sintéticos, gerando alterações na absorção, distribuição, metabolismo e excreção, o que pode prejudicar as terapias ou até causar efeitos tóxicos (BUTTERWECK et al., 2004; HE et al., 2010; BRASIL, 2011).

Os medicamentos fitoterápicos geralmente possuem vários tipos de substâncias que são responsáveis pela ação terapêutica, que no seu conjunto podem ser referidas como fitocomplexo. Nesse contexto, os metabólitos secundários das plantas, ou seja, as substâncias orgânicas que as plantas produzem que não estão diretamente envolvidas no crescimento normal, desenvolvimento ou reprodução delas, são de grande interesse na busca de novos medicamentos pois geralmente possuem atividade farmacológica e servem como marcadores (HE et al., 2010; ANULIKA et al., 2016). Entretanto, na literatura há relativamente um baixo número de dados farmacocinéticos quando se trata de produtos naturais. Isso pode estar relacionado com a dificuldade de identificar as substâncias bioativas, com o alto custo do isolamento, além de pequenas quantidades disponibilizadas pelas plantas, o que poderia aumentar ainda mais os gastos durante a cadeia de desenvolvimento de medicamentos, inviabilizando o investimento nesses produtos. Todavia, as plantas medicinais são uma fonte de agentes terapêuticos, e certamente seria interessante ao menos ensaios de *screening* que dispendem menos gastos, como os *in silico* ou *in vitro* (VAN BREEMEN; LI, 2005; JIA; LIU, 2007; XIN et al., 2011).

Dados da literatura sobre farmacocinética de produtos naturais deixam evidente que a maioria dos estudos foca em um número restrito de plantas medicinais, como cúrcuma (*Curcuma longa* L.), equinácea (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), ginseng (*Panax ginseng* C.A.Mey.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), hipérico (*Hypericum perforatum* L.), copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng.), danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). Entretanto, com os avanços analíticos nos últimos 10 anos houve um aumento do número de estudos nesse assunto envolvendo outras plantas medicinais. Essas investigações algumas vezes são incoerentes (devido às diferentes vias de administração, por exemplo) e geralmente envolvem ensaios de estabilidade metabólica, sem realizar a identificação dos metabólitos, deixando lacunas para o

avanço nas pesquisas cinéticas de produtos naturais (Tabela 2) (BUTTERWECK et al., 2004; HE et al., 2010; XIN et al., 2011).

É fato que conhecer o metabolismo das substâncias bioativas das plantas é muito importante, pois ele está envolvido com as complexas biotransformações e excreção de fármacos. Todavia, a fim de otimizar a seleção de novos agentes terapêuticos, é necessário realizar precocemente a identificação dos seus metabólitos e também de outros parâmetros como: absorção *in vitro*, estimativa da farmacocinética *in vivo*, identificação das enzimas envolvidas no metabolismo da molécula e toxicidade associada ao seu metabolismo. Além disso, as propriedades físico-químicas das moléculas como log P, estabilidade química, estabilidade *ex vivo* (plasma) têm papel fundamental no comportamento cinético e nas atividades biológicas que essas moléculas irão desempenhar, uma vez que interferem diretamente na solubilidade e estabilidade dos fármacos, principalmente durante a sua distribuição no organismo. Nesse contexto, mais uma vez destacam-se os estudos de ADME *in vitro* (HE et al., 2010; EMA, 2020; JIA; LIU, 2007).

Tabela 2. Informações farmacocinéticas sobre alguns produtos naturais. ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. (Fonte: o autor)

Produto natural (classe)	Ocorrência	Ação farmacológica	Modelos experimentais	ADMET	Referências
α-amirina (triterpeno)	<i>Protium</i> sp. (pau-de-incenso)	Anti-inflamatória, analgésica, gastroprotetora e hepatoprotetora	<i>In vitro</i> : oxidação biomimética catalisada por FeTFPP e <i>m</i> -CPBA como agente oxidante, microsossomas hepáticos de ratos <i>In vivo</i> : Administração em ratos via oral (gavagem) e endovenosa. Monitoramento plasmático, fecal e urinário.	AMET	RODRIGUES (2014); MOREIRA et al. (2013)
β-amirina (triterpeno)	<i>Protium</i> sp. (pau-de-incenso)	Anti-inflamatória, analgésica, gastroprotetora e hepatoprotetora	<i>In vitro</i> : oxidação biomimética catalisada por FeTFPP e <i>m</i> -CPBA como agente oxidante, microsossomas hepáticos de ratos <i>In vivo</i> : Administração em ratos via oral (gavagem) e endovenosa. Monitoramento plasmático, fecal e urinário.	ADMET	RODRIGUES (2014); MOREIRA et al. (2013)
ácido caurenico (diterpeno)	<i>Copaifera</i> spp. e <i>Mikania</i> sp (copaíba, guaco)	antimicrobiana, anti-inflamatória, antialérgica, imunossupressiva e atividade indutora de apoptose.	<i>In vitro</i> : estabilidade em meios tamponados de pH biológico e permeabilidade intestinal em células Caco-2. <i>In vivo</i> : estudo pré-clínico em ratos, estudo clínico em 10 humanos	ADMET	MAURO et al. (2019); MATOS et al. (2018); GASPARETTO et al. (2015); CHOI et al. (2016)

Produto natural (classe)	Ocorrência	Ação farmacológica	Modelos experimentais	ADMET	Referências
ácido copálico (diterpeno)	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. (copaíba)	antimicrobiana, anti- inflamatória, antialérgica, imunossupressora e atividade indutora de apoptose.	<i>In vitro</i> : estabilidade em meios tamponados de pH biológico e permeabilidade intestinal em células Caco-2.	AT	MAURO et al. (2019)
Ácido rosmarínico (fenólico)	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (alecrim) <i>Mentha</i> spp. (hortelã)	Estimulante, anti-inflamatório, antioxidante, anticâncer, antimicrobiano e antidiabético	<i>In vivo</i> : estudo pré-clínico em ratos, estudo clínico em humanos fase I e II	ADMET	KONISHI et al. (2005); NOGUCHI-SHINOHARA et al. (2015); NUNES et al. (2017); AMOAH et al. (2016); WANG et al. (2017).
ácido ursólico (triterpeno)	<i>Sambucus chinensis</i> L. (lu- ying)	Sedativa, antibacteriana, anti- inflamatória, hepatoprotetora, antiviral, antitumoral.	<i>In vivo</i> : estudo pré-clínico em ratos, estudo clínico fase I em humanos.	ADMET	LIAO, 2005; CHEN et al. (2011); YAN et al. (2013); SHANMUGAN et al. (2013); ZHANG et al. (2017)
budleína A (sesquiterpeno)	<i>Vigueira robusta</i> Gardner (falsa-seringueira)	Analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, citotóxica, inibidora da motilidade de espermatozoides e relaxante de musculatura lisa	<i>In vitro</i> : Metabolização por oxidação biomimética catalisada por metaloporfirina, microsomas de rato e metabolização com ceco de porco.	M	SARTORI, (2014)

Produto natural (classe)	Ocorrência	Ação farmacológica	Modelos experimentais	ADMET	Referências
cannabidiol (cannabinoide)	<i>Cannabis sativa</i> L. (maconha)	Analgesica, neuroprotetora, anticonvulsivante, antiespasmódica, anti- inflamatória, antiemética	<i>In vitro</i> : degradação em fluido gástrico simulado, metabolização por microsomas de ratos e humanas <i>In vivo</i> : estudo pré-clínico em ratos, camundongos e cachorros, estudo clínico em humanos.	ADMET	JIANG et al. (2011); MERRICK et al. (2016); LUCAS et al. (2018); MILLAR et al. (2018) FOSTER et al. (2019) XU et al. (2019);
eritralina (espiroalcalóide)	<i>Erythrina verna</i> Vell. (mulungu)	Sedativa e ansiolítico	<i>In vitro</i> : metabolização com ceco de porco e oxidação biomimética com catalisador de Jacobsen <i>In vivo</i> : estudo pré-clínico em ratos	ADMET	GUARATINI et al. (2014); MARQUES et al. (2015); DEMARQUE et al. (2020)
Geniposideo (glicosídeo iridoide)	<i>Gardenia jasminoides</i> J.Ellis (gardênia)	Anti-inflamatório, antidiabético, efeitos antioxidantes, neuroprotetores, hepatoprotetores e coleréticos	<i>In vitro</i> : distribuição, permeabilidade intestinal em células Caco-2 <i>In vivo</i> : ensaios de absorção e metabolismo hepático em ratos	ADMET	HOU et al. (2008). CHEN et al. (2015); SHAN et al. (2017)
(-)-grandisina (lignana)	<i>Piper solmsianum</i> C.DC. (caapeba)	Anticancerígena, anti- inflamatória, antinoceptiva, larvicida, tripanocida	<i>In vitro</i> : metabolização por microsomas de rato.	MT	RAMOS et al. (2008); VIEIRA et al. (2011) MESSIANO et al. (2013)
hoodigogenina A (esteróide)	<i>Hoodia gordonii</i> (Masson) Sweet ex Decne. (hoodia)	Antiespasmódico, anti- hemorroidas, antituberculosa, antidispéptico, Anti-hipertensivo e antidiabético	<i>In vitro</i> : degradação em fluido gástrico simulado, fluido intestinal simulado, metabolização por microsomas e fração S9 de humanos e permeabilidade intestinal em células Caco-2 e ligação a proteínas plasmáticas.	AMT	MADGULA et al. (2010)

Produto natural (classe)	Ocorrência	Ação farmacológica	Modelos experimentais	ADMET	Referências
lapachol (naftoquinona)	<i>Tabebuia</i> sp. (ipê)	Antimalárico, antiviral, citotóxica, moluscicida e trypanocida	<i>In vitro</i> : metabolismo por oxidação biomimética com catalisador de Jacobsen e agente oxidante PhIO. <i>In vivo</i> : estudo pré-clínico em ratos, avaliação da distribuição no cérebro	ADME	NIEHUES et al. (2012); BAI et al. (2017)
piplartina (alcalóide)	<i>Piper tuberculatum</i> Jacq. (pimenta-longa)	Antiagregante plaquetário, antidepressiva, antifúngica, ansiolítica e citotóxica	<i>In vitro</i> : Solubilidade, ligação à albumina, permeabilidade intestinal em células Caco-2, metabolização por microsomas de rato.	ADMET	BEZERRA et al. (2012); MARQUES et al. (2014); FOFARIA et a. (2015)
solamargina (glicoalcalóide)	<i>Solanum palinacanthum</i> Dunal (joá)	Inibidora do crescimento de células tumorais	<i>In vitro</i> : avaliação da capacidade mutagênica <i>In vivo</i> : estudo pré-clínico em ratos	ADMET	ZHENG et al. (2011); ALMEIDA et al. (2010)

3.2.2 Diterpenos clerodânicos

Em relação a classe dos terpenos, os diterpenos são a subclasse com maior número de estudos relacionados à sua farmacocinética, provavelmente devido à sua grande variedade estrutural e de ações farmacológicas. No gênero *Casearia* já foram caracterizados 152 diterpenos clerodânicos, os quais são marcadores quimiotaxonômicos do gênero. Na espécie *C. sylvestris* foram encontrados 42 tipos de diterpenos clerodânicos (XIA et al., 2015). Porém, há apenas três estudos publicados que estão relacionados com a farmacocinética dos diterpenos clerodânicos da *C. sylvestris*. Eles exploraram os ensaios de cinética *in vitro* para determinação de parâmetros farmacocinéticos e extrapolação *in vivo* (Tabela 3).

Tabela 3. Informações farmacocinéticas sobre diterpenos clerodânicos (Fonte: o autor). ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.

Diterpeno clerodânico	Ação farmacológica	Modelos experimentais	ADMET	Referências
casearina X	Cicatrizante, antiulcerosa, antitumoral	<i>In vitro</i> : metabolismo com microsomas hepáticos de ratos e humanos, permeabilidade células Caco-2	AME	MOREIRA DA SILVA et al. (2016); MOREIRA DA SILVA et al. (2019)
casearinas J e O	Cicatrizante, anti-inflamatória, antitumoral, antiulcerosa	<i>In vitro</i> : degradação ácida em FGS, metabolismo com fração S9 hepáticas de ratos, identificação de metabólitos, toxicidade em macrófagos	MT	ODA et al. (2019)

Através de um estudo de mestrado desenvolvido no laboratório de Farmacognosia da FCF-Unesp foram definidos os perfis dos produtos formados simulando a administração oral das casearinas J e O através de ensaios *in vitro* em fluido gástrico simulado (FGS) e em metabolização hepática por enzimas da fração S9 de ratos (fração microsomal e citosólica). Além da informação sobre os sítios moleculares mais vulneráveis à degradação, também foram obtidas novas substâncias com possibilidade de terem diferentes atividades (ODA, 2017).

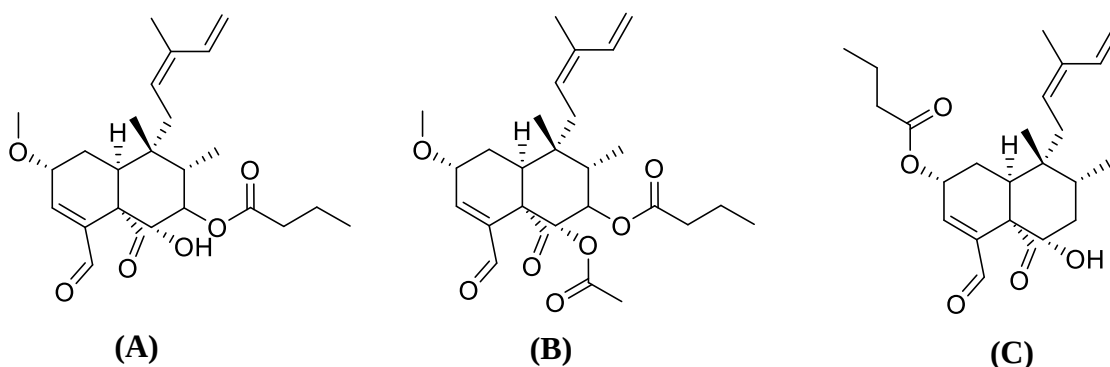
Ocorreu extensa formação de produtos de degradação e/ou metabolização das casearinas J e O, os quais foram identificados por cromatografia líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos acoplada a espectrometria de massas (LC-DAD/UV-MS/MS) e as estruturas dos produtos majoritários foram confirmadas

por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H . Foram identificadas dez substâncias formadas após degradação ácida da casearina J, além da própria casearina J remanescente (5,1%) e seu epímero. As estruturas propostas desses produtos resultaram da hidrólise dos grupamentos ésteres em C-18 e C-19, formação de dialdeído após quebra do anel diacetálico C (majoritário), adições nesses grupos aldeídos de uma molécula de água, uma ou duas de etanol e hidrólise do éster em C-7. A partir da casearina O, foram identificadas nove substâncias formadas, a maioria de forma análoga à casearina J, além da casearina O remanescente (13,1%) (ODA et al., 2019).

Após a metabolização da casearina J pela fração S9 foram formadas duas substâncias correspondentes à perda do butanoato em C-18 e formação do seu epímero, permanecendo 36,8% íntegra. Em relação à metabolização da casearina O, 36,5% permaneceu íntegra, e ocorreu a formação de uma molécula resultante da hidrólise dos substituintes esterificados em C-18 e C-19 e de outra molécula com dialdeído no anel C. As análises indicaram que os produtos formados após a metabolização também foram formados na degradação ácida (ODA et al., 2019)

Tanto a degradação em FGS quanto a metabolização por enzimas hepáticas da fração S9 geraram os dialdeídos das casearinas J e O (Figura 7). Tais produtos merecem destaque uma vez que foram formados em grande proporção e já foram relatados por pesquisadores, os quais atribuíram essa formação à degradação ácida (WILLIAMS, et al., 2007; SANTOS et al., 2010; ODA et al., 2019) e à metabolização de enzimas de fígado de ratos e humanos (MOREIRA DA SILVA et al., 2016; MOREIRA DA SILVA et al., 2019; ODA et al., 2019).

Figura 7. Estrutura química dos dialdeídos oriundos das casearinas J (A), O (B) e X (C) após degradação ácida ou metabolização por enzimas hepáticas (MOREIRA DA SILVA et al., 2018; ODA et al., 2019).



No estudo realizado por Moreira da Silva (2016) foi caracterizado o metabolismo da casearina X por microssomas hepáticos de rato e humanos e a absorção intestinal com células Caco-2. Para isso foram desenvolvidos e validados um método analítico (LC-UV) e bioanalítico (LC-MS/MS) para quantificação de cas X em microssomas e Caco-2, respectivamente. Os resultados mostraram que o metabolismo da casearina X é independente de NADP/NADPH pois ela é metabolizada por carboxilesterases. Além disso, também foi encontrada a casearina X dialdeído como metabólito. Foram estimados os parâmetros de V_{max} e K_M , demonstrando que o *clearance* intrínseco em microssomas hepáticos de humanos foi 1,7 vezes maior que o de ratos, e a depuração hepática humano foi de 90% (eliminação) (MOREIRA DA SILVA et al., 2016; MOREIRA DA SILVA et al., 2018).

A casearina X foi capaz de permear a monocamada de células Caco-2 provavelmente por transporte ativo, sem efluxo, mas com significativa retenção da substância dentro das células (esterases), sendo necessária a utilização de inibidor de esterases NaF (200 mM). Desse modo, a sua biodisponibilidade oral *in vivo* possivelmente é comprometida pelo metabolismo de primeira passagem, tanto no intestino, quanto no fígado, e provavelmente são os metabólitos da casearina X que chegam nos sítios de ação para desempenhar a ação farmacológica. Apesar de serem obtidas informações sobre a absorção, metabolismo hepático e excreção das casearinas em estudos *in vitro*, ainda não há estudos *in vivo* em modelos animais envolvendo farmacocinética de casearinas (MOREIRA DA SILVA et al., 2016; MOREIRA DA SILVA et al., 2018).

É evidente que apenas as informações farmacocinéticas de absorção (Caco-2), metabolismo (microssomas e fração S9) e toxicidade obtidas através de ensaios *in vitro* não permitem que os diterpenos tenham o seu potencial terapêutico já comprovado totalmente explorado. Assim, são necessários mais estudos que avaliem suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas para o avanço nas pesquisas até gerar informações suficientes para promover a qualidade exigida pelas agências regulatórias de saúde para utilização de fitoterápicos à base de *C. sylvestris* ou de medicamentos com diterpenos isolados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e equipamentos

Balança analítica: Marte®, modelo AY220 (Max 220 g. min 0,01 g; d = 0,0001 g).

Cartucho para extração em fase sólida: Agilent SampliQ® C18 (15 x 10 mm; 55 µm).

Coluna cromatográfica de bancada: colunas de vidro com d.i. de 2,0; 5,0 e 10 cm; equipadas com torneira teflon.

Coluna cromatográfica para LC: Macherey-Nagel® (C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm); Agilent® Eclipse XDB C18 (250 x 21,20 mm, 7 µm, Zorbax).

Coluna cromatográfica para UPLC: BEH C18 Waters® (150 x 2,1 mm; 1,7 µm).

Cromatografia em camada delgada: placas em alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®, 20 x 20 cm, 15-40 µm, 0,25 mm).

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 1 (LC-DAD/UV, Perkin Elmer Flexar®, modo analítico e semipreparativo): bomba quaternária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne® de 6 pórticos com *loop* de 20 e 1.000 µL, detector UV/VIS de comprimento de onda variável, detector PDA/UV, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromera® 4.1.0.6386.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (LC-UV, Thermo®, modo analítico): bomba binária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne de 6 pórticos com *loop* de 20 µL, detector UV de comprimento de onda variável UltiMate 3000 VWD, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromeleon™ CDS 6x.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 3 (LC-MS, Waters®, modo analítico): bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático, acoplado com detector quadrupolo simples (Acquity UPLC-QDa, Waters®).

Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência (UPLC-QTOF-MS/MS, Waters®, modo analítico): bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático, Acquity UPLC Waters® acoplado com detector quadrupolo/tempo de voo (XEVO-QToF, Waters®).

Estufa de secagem de material vegetal com circulação de ar: Fanem®, modelo 315 SE.

Espectrômetro de RMN: Bruker®, Fourier 600 7,0 T, operando a 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C.

Fases estacionárias utilizadas em EFS e CC:

a) **Sílica gel:** Sigma-Aldrich®, 63-200 µm; 60 Å; Sigma-Aldrich®, 40-63µm.

b) **Sílica C-18:** Sigma-Aldrich® 40-60 µm.

c) **Carvão ativado em pó:** Carlo Erba®.

d) **Sílica C-18:** Discovery®, 40-63 µm; DSC-18.

Moinho de facas: TecnaI®, modelo TE 148.

Padrões de diterpenos: caseargrewiina F (98,6%) e casearina B (95,7%) isoladas nesse trabalho.

Placa Aquecedora com agitação magnética: IKA® Modelo C-MAG HS7, com controlador de temperatura ETS-D5.

Programa de análise de dados e construção de gráficos: GraphPad Prism® 5 e Microsoft® Excel 2016.

Rotaevaporador: Heidolph®, Germany.

Solventes:

a) **Água deionizada:** GEHAKA®, obtida em sistema purificador de água, modelo DG 300.

b) **Água ultrapura:** Merck Millipore®, obtida em modelo Direct® – Q 3 UV.

c) **Solventes grau P.A.:** acetato de etila, etanol, hexano, metanol Qhemis® e Synth®.

d) **Solvente grau cromatográfico:** etanol, metanol e acetonitrila J.T. Baker®.

e) **Solvente para análise por RMN:** MERCK®, pentadeuteropiridina e deuteroclorofórmio.

Ultrassom: Unique®, modelo USC – 2800, frequência 40 KHz.

4.2 Coleta e preparo do material vegetal

As folhas dos 10 espécimens foram coletadas em quantidades iguais (25 g) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP em junho de 2017. As exsiccatas de cada indivíduo estão depositadas no Herbário Científico do Estado "Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo" do Instituto Botânico do Governo do Estado de São Paulo. Após coletadas, as folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40° C por 3 dias e, posteriormente, fragmentadas em moinhos de facas (CARVALHO et al., 2018). Este projeto foi desenvolvido mediante autorização

do Sistema de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado sob certificado cadastrado pelo o Nº AC1CEE6 (Anexo I).

4.3 Obtenção do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (EetCs)

O *pool* de 250 g de folhas secas e moídas de *C. sylvestris* (droga vegetal, DV) foi submetido à extração com etanol por maceração à 40° C com agitação ocasional. A maceração foi realizada durante 5 dias, substituindo o solvente em 24 e 72 h. A proporção entre droga vegetal e líquido extrator foi de 1:15 (3,75 L; m/v) (ODA et al., 2019).

4.3.1 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*

O EetCs foi submetido ao fracionamento por extração em fase sólida (EFS) empregando-se coluna de vidro (20 x 10 cm) contendo sílica gel (63-200 µm e carvão ativo em pó (1:1). Foram obtidas três frações com os seguintes eluentes: 1) hexano: acetato de etila 95:05 (v/v) (fração F 1); 2) acetato de etila (F 2); 3) metanol (F 3). As frações foram concentradas em evaporador rotativo e, em seguida, secas sob fluxo de ar em capela e em dessecador com sílica gel sob vácuo. A fração concentrada em diterpenos (F 2) foi submetida a outro fracionamento por cromatografia em coluna (20 x 7,5 cm), utilizando como fase estacionária sílica gel (40-60 µm) e como fase móvel um gradiente com seis diferentes misturas dos solventes hexano: acetato de etila: isopropanol (85:14:01 a 60:37,3:2,7) gerando 54 subfrações (SF 1-54) (ODA et al., 2019). Os eluentes das subfrações de SF 11 a 25 foram coletados em duas porções, originando duas subfrações cada (SF 11.1 a SF 25.1).

4.3.2 Análises cromatográficas do extrato e frações

A caracterização química do extrato (identificação e quantificação dos marcadores químicos) e das frações obtidas foram realizadas pelas técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta com arranjo de diodos (LC-DAD/UV) (ODA et al., 2019).

O EetCs e as SF 1-36 obtidas foram analisadas por CCD (sílica gel; hexano: acetato de etila: isopropanol 60:37:03, v/v). As SF que possuíam perfil em CDD

semelhantes foram agrupadas e posteriormente analisadas por LC-DAD/UV. O pré-tratamento das amostras (F2 e SF) foi feito através de EFS com sílica de fase reversa, em cartucho Agilent SampliQ® (C18, 15 x 10 mm, 55 µm), solubilizando as amostras (10,0 mg) em 1,0 mL de MeOH 98 % e eluídas com 4,0 mL de MeOH 98 %, sob pressão. As amostras foram secas em capela sob fluxo de ar e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, solubilizadas em MeOH na concentração de 1,0 mg/mL e filtradas em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Thermo® equipado com coluna Macherey-Nagel® (C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm) operando nas mesmas condições acima e no gradiente linear com MeCN 55% para 100% (v/v) em 42 min, mantendo isocraticamente MeCN 100% por 8 min, vazão 0,8 mL/min, detecção em 235 e 254 nm, volume de injeção 40 µL.

4.3.3 Purificação e determinação estrutural de diterpenos clerodânicos

Foram utilizados padrões de caseargrewiina F e casearina B do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia para a busca dessas substâncias através da comparação do t_R de ambos diterpenos (padrões previamente purificados) nos cromatogramas das subfrações (LC-DAD/UV). A SF 20-23.1 possuiu o perfil cromatográfico com picos no t_R correspondente à casg F e cas B, e por isso foi submetida a pré-tratamento (447,0 mg) e à LCprep visando obtenção desses diterpenos com alto grau de pureza e rendimento suficiente para os ensaios propostos. As condições de análise foram otimizadas no modo analítico (alterando a proporção de MeOH de 65 a 80%, isocrático) até que os picos possuísem resolução maior do que 2,0, para que a separação fosse eficaz quando transferida ao modo preparativo (SNYDER et al., 2010).

A purificação destes diterpenos foi realizada por LC-UV preparativa utilizando o mesmo cromatógrafo acoplado a coluna de fase reversa Agilent® Eclipse XDB C18 (250 x 21,20 mm, 7 µm, Zorbax), modo isocrático com MeOH 73% por 70 min, vazão 8 mL/min, volume de injeção 0,8 mL, monitoramento 235 nm.

A determinação estrutural dos diterpenos foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C unidimensional e bidimensional (Bruker® 7,0 Tesla, 600 MHz) utilizando os solventes pentadeuteropiridina e deuteroclorofórmio, e

as técnicas hífenadas LC-DAD/UV (cromatógrafo Shimadzu® C18, 250 x 4,6 mm x 5 µm) e LC-MS bem como consulta aos dados da literatura (MORITA et al., 1991).

4.4 Identificação e quantificação das substâncias por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

Os ensaios de identificação dos diterpenos e seus produtos e os ensaios de quantificação para validação dos métodos analítico e bioanalíticos da casg F e cas B por LC-MS foram realizados no Centro de Farmacometria e Análises Toxicológicas. Foi utilizado um cromatógrafo Waters® HPLC ACQUITY QDa equipado com coluna Nucleosil® C18 Macherey-Nagel (250 x 4,6 mm x 5 µm); gradiente linear de 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) para 100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min, volume de injeção 10 µL. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização ESI foram: voltagem do capilar: 1,8 kV, voltagem do cone: 5 V, temperatura da fonte ESI (modo positivo): 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂: 350 °C, vazão do gás de dessolvatação: 600 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise full-scan foi de 300 a 700 unidades de massa (m/z) sendo que a casg F e cas B foram monitoradas pelas massas das moléculas cationizadas com sódio $[M + Na]^+$ de m/z 527 e 599 (quantificação), respectivamente. O equipamento foi controlado pelo programa Empower 3 (Waters® Corporation) no qual foram feitas a aquisição e análise de dados. A otimização do método foi realizada a partir da variação da composição da fase móvel (ajuste de força de eluição e de seletividade) utilizando MeOH ou MeCN com água (ác. fórmico 0,1% como aditivo) em diferentes proporções (40 a 100%) e da vazão entre 0,5 a 0,8 mL/min. Para otimização da ionização, foi avaliada a variação da voltagem do capilar (0,6-2,4 kV) e do cone (0-30 V) na fonte de ESI⁺.

Já os ensaios de identificação de diterpenos e dos seus produtos por UPLC-QTOF-MS/MS foram realizados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Fortaleza/CE, em colaboração com o Dr. Guilherme Julião Zucolo, utilizando o cromatógrafo Acquity UPLC Waters® acoplado a quadrupole/time of flight system (XEVO-QToF, Waters®), equipado com coluna BEH C18 Waters® (150 x 2.1 mm; 1.7 µm); modo gradiente linear de 30% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) para 90% de MeCN (ácido fórmico 0,1%) (v/v) em 30 min, vazão 0,25 mL/min,

volume de injeção 5 µL. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização ESI foram: voltagem do capilar: 2,6 kV, voltagem do cone: 0.5 V, temperatura da fonte ESI (modo positivo): 120 °C, temperatura de dessolvatação do gás: 350 °C, vazão do gás de dessolvatação: 500 L/h. A faixa de massas usada no modo de análise full-scan foi de 300 a 700 unidades de massa (m/z). O programa MassLynx (Waters® Corporation) foi usado para controle do equipamento, aquisição e análise de dados (BUENO et al., 2015; ODA et al., 2019).

4.5 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para a quantificação de diterpenos por LC-MS

Para a validação dos métodos analíticos e bioanalíticos e a constatação das suas aplicações, foram utilizadas a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) ANVISA nº 166 de 2017 e a RDC nº 27 de 2012, que dispõem sobre os requisitos mínimos para a validação desses métodos (BRASIL, 2012; 2017). Para os métodos bioanalíticos também foram consideradas as recomendações do *Guideline on bioanalytical method validation* (EMA, 2011). Desse modo, foram considerados os parâmetros seletividade, efeito residual, linearidade, precisão, exatidão, efeito matriz e estabilidade.

O plasma humano foi obtido através de doação de voluntários sadios, os quais foram convidados a doar sangue no Hemonúcleo Regional de Araraquara. Foram considerados os mesmos critérios de inclusão e exclusão vigentes para a doação convencional de sangue no Hemonúcleo: estar bem de saúde, ter entre 18 e 65 anos e pesar mais de 50 kg, não estar em jejum, evitar alimentos gordurosos nas três horas que antecedem a doação. Todo protocolo foi realizado após a aprovação do projeto e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-Unesp (CAAE nº. 96952918.3.0000.5426, Anexos II e III).

Os padrões de diterpenos foram obtidos a partir da purificação realizada conforme item 4.3.3. A pureza de 98,6% (λ 235 nm, normalização de áreas) para casg F e 95,7% (λ 235 nm, normalização de áreas) para cas B foram utilizadas para normalização das concentrações. A solução estoque de cada casearina (5.000

µg/mL) foi preparada em acetonitrila e armazenada em freezer a -20° C. O sistema cromatográfico e as condições de análise por LC-MS estão descritas no item 4.4.

4.5.1 Desenvolvimento de métodos analíticos

A solução estoque de 5.000 µg/mL de casg F e cas B em acetonitrila foi diluída nesse solvente ou em tampão Hank's (fisiológico) para obtenção da solução de trabalho de 100 µg/mL, a qual foi utilizada para a construção das curvas de calibração nas concentrações de 0,039 (LIQ); 0,078 (CQB); 0,156; 0,3125; 0,625 (CQM); 1,0 (CQA); e 1,25 (LSQ) µg/mL a partir de diluição seriada com cada matriz. Todas as soluções foram filtradas em filtro de seringa de PTFE (0,22 µm, 13 mm) e colocados em *vials* para análise no sistema cromatográfico LC-MS.

4.5.2 Desenvolvimento de métodos bioanalíticos

A solução estoque de 5000 µg/mL de casg F e cas B em acetonitrila foi diluída em plasma com 1% de glicerina ou meio microssomal sem cofatores e com 200 mM de NaF (inibidor de esterases) para obtenção da solução de trabalho de 100 µg/mL, a qual foi utilizada para a construção das curvas nas concentrações de 0,039 (LIQ); 0,078 (CQB); 0,156; 0,3125; 0,625 (CQM); 1,0 (CQA); e 1,25 (LSQ) µg/mL a partir de diluição seriada com cada matriz.

Para o processamento das amostras de plasma e microssomas hepáticos foi utilizada a precipitação de proteínas por solvente orgânico, o qual garante uma recuperação > 95% de diterpenos e padrão interno (timol, PI) (MOREIRA DA SILVA et al., 2016). As amostras de plasma (150 µL) foram acrescidas desse mesmo volume de acetonitrila com PI a 50 µg/mL, misturados em agitador por 10 s e centrifugados a 13.000 *g* por 15 min. O sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtro de seringa de PTFE (0,22 µm) e colocados em *vials* para análise no sistema cromatográfico LC-MS. A estabilidade da casg F e cas B foi avaliada após o processamento de amostra durante 24 h no auto injetor, utilizando as concentrações CQA e CQB (quintuplicata), sendo aceitos desvios de até 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal (EPR).

4.5.3 Parâmetros de validação

Seletividade

Para avaliação da seletividade do método a análise de amostras de matriz branco foram comparadas com a matriz adicionada da amostra (LIQ) e PI. Para aceitação da seletividade dos métodos as respostas de picos interferentes próximos ao tempo de retenção do analito e do PI devem ser inferiores a 20% e 5%, respectivamente.

Efeito residual

O efeito residual (*carryover*) foi avaliado pela injeção de três amostras brancas, uma antes e duas depois da injeção de uma amostra processada do LSQ (1,25 µg/mL). Admitiu-se como aceitável a resposta de interferentes nos mesmos tempos de retenção para os analitos e o PI de até 20% e 5%, respectivamente, em comparação com amostras analisadas do LIQ.

Linearidade

As curvas analíticas foram construídas em triplicata a partir da área do pico do analito contra concentração nominal do analito enquanto que a curva de calibração bioanalítica foi feita a partir da razão da área do pico do analito e do PI (área do analito/área do PI) contra a concentração nominal do analito (quintuplicata). A correlação linear entre as respectivas respostas e concentrações nominais foi avaliada por análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados (equação da reta e coeficiente de correlação r). Os critérios de aceitação da curva levaram em consideração os que tiveram coeficiente de correlação (r) maior do que 0,99 para métodos analíticos e 0,98 para métodos bioanalíticos. Foi necessário aplicar modelo de ponderação $1/y^2$, o qual foi avaliado pela análise de variância ANOVA, calculando os valores de F e p , para um nível de confiança de 95% e graus de liberdade $n-1$. Os cálculos estatísticos foram realizados empregando os programas Prism GraphPad® 5.

Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação (CV%), calculado pelo desvio padrão das replicatas (3 para analítico, 5 para bioanalítico) pela concentração média determinada. A exatidão foi avaliada como erro padrão relativo (EPR) das replicatas (3 para analítico, 5 para bioanalítico). As amostras foram avaliadas em uma única corrida analítica (intra-corrida) e em três dias consecutivos (inter-corrida), mantendo a mesma instrumentação, mesmo analista e as mesmas condições de operação. Foram utilizadas 5 concentrações diferentes: 0,039 (LIQ); 0,078 (CQB); 0,625 (CQM); 1,0 (CQA); e 1,25 (LSQ) µg/mL, além do PI 50 µg/mL.

O LIQ foi considerado como a concentração cuja resposta foi, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no t_R do analito. Para os métodos analíticos a variabilidade aceitável na precisão e exatidão foi de $\pm 15\%$. Para os métodos bioanalíticos a variabilidade aceitável no CV e EPR foi de $\pm 15\%$, exceto para o LIQ, para o qual não se admitiu valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal.

4.6 Determinação de propriedades físico-químicas e biológicas dos diterpenos caseargrewiina F e casearina B

4.6.1 Determinação do coeficiente de partição octanol / água (log P)

Foi utilizado o método baseado na *OECD Guideline for the Testing of Chemicals n°117 – Partition coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method* (2004), o qual possui precisão aceitável e é indicado para substâncias com log P de 0 a 6 (TAKÁCS-NOVÁK, 2012). As condições cromatográficas em LC-UV foram otimizadas utilizando cromatógrafo Thermo® equipado com coluna Nucleosil® C18 Macherey-Nagel (250 × 4,6 mm, 5 µm) e diferentes proporções de metanol: água (v/v) (60 a 80% de MeOH) e vazão (0,6 a 1,0 mL/min). A condição escolhida foi a eluição em modo isocrático com MeOH 75% (v/v) em 50 min, vazão 0,8 mL/min, monitorado a 210 nm, volume de injeção 40 µL. As sete substâncias de referência com valores de log P conhecidos (acetanilida, benzeno, tolueno, naftaleno, bifenila, fenantreno e trifetilamina) e que foram utilizadas para a construção da curva analítica log P × log k (k: fator de

retenção) foram escolhidas de modo que compreendiam os valores de log P das amostras (diterpenos e seus produtos majoritários em mistura), anteriormente calculados por programa computacional (ChemBioDraw® Ultra 14.0).

4.6.2 Ensaio de estabilidade química dos diterpenos em soluções aquosas de pHs 1,2; 7,4 e 8,8

Foi realizado o estudo da estabilidade química em soluções aquosas com valores de pH 1,2 (fluido gástrico simulado, FGS, 200 mg NaCl + 0,7 mL HCl 37%, 100 mL, pH 1,2), correspondente ao pH do suco gástrico (1,5 a 2) e pH 8,8 (18,17 mg de tris(hidroximetil)aminometano, Tris + NaOH 2 M), correspondente ao pH do intestino delgado (8,0 a 9,0). Foi realizado também o estudo da estabilidade em tampão Hank's (9,83 g de sal Hank's Sigma® em 1 L água MiliQ®, adição de 0,35 g de NaHCO₃ e ajuste do pH com HCl 1 N, pH 7,4) o qual possui pH equivalente ao dos fluídos corporais.

Para tais estudos, foram utilizados os controles de qualidade baixo e alto (CQB e CQA) de cada substância (CQB = 0,039 µg/mL e CQA = 1,0 µg/mL casg F e cas B). Durante o ensaio, as soluções foram mantidas em incubadora com agitação constante de 100 rpm e temperatura de 37 °C, sendo as coletas em triplicatas nos tempos de 0; 2,5; 5,0; 10; 15; 20; 30; 45; 60; 120; 240 min para o pH 1,2 e nos tempos de 0; 5,0; 10; 15; 30; 45; 60; 120; 240; 480; 960; 1440 min para o pH 7,4 e 8,1. Após filtração em filtro de seringa PTFE (0,22 µm, 13 mm) os diterpenos remanescentes foram quantificados por LC-MS (item 4.4).

Para a determinação da estabilidade de cada analito foi realizada a comparação entre a concentração final nos tempos de coleta estabelecidos nas 3 soluções de pHs diferentes e a concentração inicial (%), observando a degradação através do seu decaimento. Para constatar a estabilidade química das substâncias foi realizada a análise de variância (ANOVA de medidas repetidas) com pós teste de Tukey em nível de significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando o software Prism GraphPad® 5.

4.6.3 Ensaio de estabilidade *ex vivo* dos diterpenos em plasma humano

A estabilidade *ex vivo* dos diterpenos foi avaliada em plasma humano (*pool* de 6 indivíduos) para calcular a estabilidade da casg F e cas B durante o tempo

equivalente ao ensaio de ligação a proteínas plasmáticas (4,5 h). A concentração utilizada foi de 1,0 µg/mL, o equivalente a 1,98 µM para casg F e 1,73 µM para cas B. O controle da estabilidade foi avaliado com a pré-incubação (10 min) do plasma com o inibidor enzimático NaF (200 mM). (DI et al., 2005).

As soluções do experimento foram obtidas separadamente a partir da solução de trabalho de casg F e cas B (100 µg/mL) em plasma com 1,0% de glicerina, sendo que a porcentagem final de solvente orgânico foi menor do que 1,0%. As soluções foram mantidas em placa de 12 poços (volume final 1,5 mL) a 37° C em agitação de 100 rpm em incubadora Ethik® 430. A quantificação foi feita através das concentrações de cada casearina remanescente avaliadas nos tempos de 0; 5; 10; 15; 30; 60; 120; 270 min por LC-MS (item 4.4) após o pré-tratamento (item 4.5.2). As respostas (relação das áreas dos picos dos diterpenos remanescentes dividida pela área do PI) foram expressas como média e desvio padrão, e plotadas no software Prism GraphPad® 5 para visualização gráfica e análise estatística. Para constatar a estabilidade *ex vivo* das substâncias foi realizada a análise de variância (ANOVA de medidas repetidas) com pós teste de Tukey em nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4.6.4 Determinação da fração de diterpenos livre em plasma e em meio microssomal humanos

A fração livre de casg F e cas B em plasma e em meio microssomal humanos foi investigada pelo método de ultracentrifugação (HOWARD et al., 2010; MOREIRA DA SILVA et al., 2018), utilizando ultracentrífuga Beckman Coulter Optima™, com rotor SW 41 Ti equipado com 6 tubos de polipropileno para ultracentrifugação Beckman Coulter 14 × 89 mm (13 mL). Foram adicionados em cada tubo exatamente 11,0 mL de plasma branco humano ou meio microssomal (preparado de acordo com o item 4.8). Após 10 min de pré-incubação com NaF (200 mM), os tubos foram enriquecidos com a casg F e cas B em concentrações finais de 1,0 e 10,0 µg/mL a partir das soluções de trabalho de 100 µg/mL (1,0% glicerina + plasma ou microssoma) de cada diterpeno (solvente orgânico ≤ 1,0 %). Após 30 min de pré-incubação a 37° C e 100 rpm, as amostras foram ultracentrifugadas a 217.000 g (4° C) por 4,5 h. Depois da ultracentrifugação, uma alíquota de 150 µL da camada intermediária do plasma (“água do plasma” entre a camada superior lipoproteica e a

inferior proteica) ou do sobrenadante do meio microssomal foram processadas (item 4.5.2) e a concentração dos analitos foi determinada por LC-MS pelo método previamente validado (item 4.4).

Como controle, os diterpenos nas mesmas concentrações foram incubados em plasma ou meio microssomal após 10 min de pré-incubação com NaF (200 mM), processados e analisados simultaneamente sem serem submetidos à ultracentrifugação. A fração de diterpenos livre no plasma (f_{up} , fração intermediária) e em microssoma (f_{um} , fração sobrenadante) foi determinada pela razão entre a concentração do diterpeno nas amostras e nos respectivos controles (média e desvio padrão). Todos os processos foram analisados em duplicata.

4.6.5 Ensaio de estabilidade metabólica dos diterpenos em microssoma humano

Os microssomas humanos foram obtidos comercialmente da MOLTOX[®] (Molecular Toxicology, Inc. USA). As enzimas foram diluídas em tampão fosfato salino PBS (Sigma[®]) a 0,1 M (pH 7,4) e o sistema regenerador de NADPH (SRN) foi composto pela mistura de NADP⁺ (2,89 mM), glicose-6-fosfato desidrogenase (0,89 U/mL), glicose-6-fosfato (7,34 mM) e MgCl₂ (7,34 mM). (MOREIRA DA SILVA et al., 2018).

Os microssomas foram diluídos em PBS 0,1 M e adicionados em placas de 12 poços com o SRN, mantidos a 37° C e em agitação 100 rpm durante 10 min para pré-incubação. As reações foram iniciadas quando as amostras, dissolvidas em PBS + 1,0% de glicerina (casg F e cas B), foram adicionadas separadamente em cada poço na concentração final de 1,0 µg/mL (triplicata, solvente orgânico ≤ 0,1 %). O controle positivo das enzimas e SRN foi avaliado empregando o diclofenaco a 2 µM. O controle negativo foi feito em poços com apenas os diterpenos e PBS 0,1 M. O controle do metabolismo dependente de SRN foi avaliado em meio microssomal na ausência de SRN e o controle do metabolismo de esterases foi avaliado com a pré incubação do inibidor enzimático NaF (200 mM) no meio microssomal. O volume final nos poços de todos os experimentos foi de 1,5 mL e a concentração de enzimas foi definida de acordo com Moreira da Silva et al. (2018), o qual utilizou 0,2 mg/mL de proteínas microssomais humanas, correspondente a metade da faixa linear de depleção de diterpenos (0-0,4 mg/mL).

A reação foi encerrada com a adição de ACN gelada conforme o pré-tratamento (item 4.5.2).

A estabilidade metabólica foi avaliada pelo decaimento de cada diterpeno (concentração remanescente em relação à concentração inicial) por LC-MS (item 4.4) nos tempos de 0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 30 min (média e desvio padrão). Para constatar a estabilidade metabólica das substâncias foi realizada a análise de variância (ANOVA de medidas repetidas) com pós teste de Tukey em nível de significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando o software Prism GraphPad® 5. A meia vida metabólica ($t_{1/2}$) *in vitro* de ambos diterpenos foi calculada através da razão entre o $\ln_2$ (0,693) e a constante de eliminação kel (coeficiente angular da equação obtida entre o logaritmo a quantidade de substrato remanescente e o tempo de incubação).

4.7 Estudo de degradação do EetCs e diterpenos em fluido gástrico simulado

O EetCs, casg F e cas B foram submetidos ao FGS, sem enzimas, de acordo com a United States Pharmacopeia (2015). As amostras (casg F, cas B e EetCs) dissolvidas em PBS + 1,0% de glicerina foram adicionadas no meio FGS a 37°C na concentração final de 10,0 µg/mL, mantidas sob agitação 100 rpm em incubadora Ethik® 430. O controle da degradação dos diterpenos e extrato consistiu na adição desses em solução tampão PBS 0,1 M (pH 7,4) nas mesmas condições e analisadas concomitantemente com as amostras. Foram avaliados diferentes intervalos de tempo 0; 15; 30; 120 min (duplicata). Posteriormente, o pH foi ajustado para 7,0 com carbonato de sódio e após concentração por extração em fase sólida (EFS, 10 mL MeCN 98%, C18, 2,0 x 2,0 cm) e filtração em filtro de seringa PTFE (0,22 µm, 13 mm) os produtos de degradação ácida (PDA) foram identificados por LC-DAD/UV, UPLC-QTOF-MS/MS e RMN de ^1H e ^{13}C (item 4.4) comparando-se com o controle de degradação. (ODA et al., 2019).

4.8 Estudo de metabolização *in vitro* dos diterpenos utilizando microssomas hepáticos de humanos

Para esse estudo foram utilizados microssomas hepáticos humanos obtidos comercialmente da MOLTOX® (Molecular Toxicology, Inc. USA). As reações foram

iniciadas quando as amostras (casg F e cas B) dissolvidas em PBS + 1,0% de glicerina foram adicionadas separadamente em meio microssomal sem SRN (0,2 mg/mL) na concentração final de (10,0 µg/mL, duplicata, solvente orgânico ≤ 0,1 %). O controle do metabolismo dos diterpenos foi realizado nas mesmas condições do ensaio, com a pré-incubação do inibidor de esterases NaF (200 mM) no meio microssomal por 10 min (MOREIRA DA SILVA, et al., 2018). A extração dos metabólitos formados foi realizada por precipitação de proteínas com acetonitrila (item 5.3.2). A investigação dos metabólitos formados foi feita através da análise dos PME por LC-MS (itens 4.3.2), comparando-se o tempo final de metabolização (30 min) com o controle do metabolismo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e analisados concomitantemente.

4.8.1 Cinética enzimática dos diterpenos

As condições de metabolismo da casg F e cas B foram pré-estabelecidas a partir dos resultados do estudo de estabilidade metabólica em microssomas hepáticos previamente realizados (item 4.6.5). Assim, os parâmetros cinéticos foram avaliados a partir da depleção de diterpenos metabolizados (relação entre a concentração inicial e a concentração remanescente) em 17 valores de concentração entre 0,5 e 100 mg/mL (Tabela 4), em triplicata. Considerando que o intervalo linear de depleção da casg F foi de até 10 min e da cas B de até 15 min (estado estacionário), a velocidade inicial da reação (V_0) foi avaliada de 0 a 5 min. A V_0 (média e desvio padrão) foi determinada a partir da razão entre a concentração de diterpeno metabolizado pela concentração de enzimas microssomais (0,2 mg/mL) e tempo de incubação (5 min). Foi utilizado o programa GraphPad Prism® 5 para o tratamento não linear e obtenção dos parâmetros cinéticos V_{max} e K_M . O Cl_{int} dos diterpenos foi determinado pelo cálculo da razão entre os respectivos parâmetros V_{max} e K_M .

Tabela 4. Valores de concentrações da casg F e cas B utilizados nos ensaios de cinética enzimática com microssomas hepáticos de humanos (µg/mL e µM).

Concentração de casearina (µg/mL)	Concentração de casg F (µM)	Concentração de cas B (µM)
0,5	0,99	0,87
1,0	1,98	1,73
2,0	3,96	3,46
3,0	5,94	5,19
4,0	7,92	6,92
5,0	9,90	8,65
8,0	15,84	13,84
10,0	19,80	17,30
12,0	23,76	20,76
15,0	29,7	25,95
20,0	39,6	34,60
30,0	59,4	51,90
40,0	79,2	69,20
50,0	99,0	86,50
60,0	118,8	103,80
80,0	158,4	138,40
100,0	198,0	173,0

4.8.2 Extrapolação *in vitro-in vivo* (IVIVE)

O escalonamento dos dados observados *in vitro* foi feito a partir do Cl_{int} *in vitro* e levou em conta a quantidade de enzimas microssomais nos ensaios *in vitro*, a taxa de ligação a proteínas plasmáticas e microssomais, o peso do fígado em relação ao peso corporal (equação), e também a partir dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos estabelecidos na literatura (peso do fígado / kg de peso corporal: 20 g; conteúdo de proteínas microssomais / g de fígado: 45 mg; fluxo sanguíneo hepático: 20 mL/min/kg) (Equação 2, SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

Equação 2.

$$Cl'_{int} = Cl_{int} \times \frac{\text{mg de proteínas microssomais}}{\text{g de fígado}} \times \frac{\text{g de fígado}}{\text{kg corporal}}$$

A IVIVE foi conduzida para predição do Cl_H em humanos pelo modelo farmacocinético *well-stirred* (Equação 3), onde Cl_{int} é o *clearance* intrínseco *in vitro*, Cl'_{int} é o *clearance* intrínseco *in vivo* obtido por extrapolação, Cl_H é o *clearance*

hepático, Q é o fluxo sanguíneo, F_{up} é a fração de casearina livre no plasma e F_{um} é a fração de casearina livre em microssomas.

Equação 3.

$$Cl_H = \frac{Q \times F_{up} \times \frac{Cl'_{int}}{F_{umic}}}{Q + F_{up} \times \frac{Cl'_{int}}{F_{umic}}}$$

4.9 Estudo de modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) para predição do perfil farmacocinético da caseargrewiina F e casearina B em humanos

Foram desenvolvidos modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) para a predição do perfil farmacocinético da caseargrewiina F e casearina B utilizando o software PK-Sim®. Esses modelos foram projetados a partir dos dados cinéticos *in vitro* deste estudo ($\log P$, $f_{uplasma}$ e f_{umic} , $t_{1/2}$), bem como dados experimentais da literatura ou preditos pelo próprio software (peso molecular, constante de dissociação (pK_a), solubilidade em água em condições de pH definidos, permeabilidade intestinal). Os modelos foram avaliados (administração oral em capsulas gastrorresistentes) considerando uma população de 100 indivíduos caucasianos saudáveis (50% homens e 50% mulheres). O protocolo de administração foi avaliado simulando uma administração única e em duas vezes ao dia durante 7 dias, utilizando doses de 0,5 e 2,5 mg/kg de casg F e cas B, cujos valores foram baseados em estudos farmacológicos anteriores envolvendo casearinas (PIERRI et al., 2017).

4.10 Investigação da ação anti-inflamatória *in vitro* dos diterpenos clerodânicos caseargrewiina F e casearina B

A atividade anti-inflamatória dos diterpenos clerodânicos caseargrewiina F e casearina B foi investigada através da inibição *in vitro* da atividade de enzimas ciclo-oxigenases I e II e fosfolipase A_2 (grupo V), as quais estão envolvidas com o processo inflamatório no organismo. As amostras utilizadas foram casg F, cas B,

PDA-F e PDA-B testadas em triplicata nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL. Os PME não foram utilizados pois os seus perfis químicos foram similares aos dos seus respectivos PDA (substância majoritária dialdeído). Como controle negativo foi utilizado apenas solvente (metanol).

4.10.1 Investigação da ação dos diterpenos sobre a inibição da atividade *in vitro* das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-I e COX-II)

Esta investigação foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit COX (ovine) Inhibitor Screening Assay da Cayman Chemical (Item N°. 560101). O ensaio foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante (CAYMAN CHEMICAL, 2017a). As amostras (casg F, cas B, PDA-F e PDA-B) foram dissolvidas em metanol para preparar uma concentração de estoque de 10 mg/ml. Esse ensaio de triagem do inibidor de COX mede diretamente a quantidade de prostaglandina F_{2α} produzida na reação da ciclo-oxigenase. O diclofenaco (296,14 g/mol) foi utilizado como o controle positivo para a inibição de COX-1 e COX-2. 10 µL de cada amostra e de veículo foi diluído em 20 µL com Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) e pré-incubado com a enzima a 37 °C por 15 minutos antes da adição de ácido araquidônico (AA). A reação foi iniciada pela adição de 10 µL de AA 10 mM e o tubo foi incubado a 37 °C por exatamente 2 min. A reação foi encerrada pela adição de 50 µL de HCl 1 N e cloreto de estanho (SnCl₂). Uma alíquota foi removida e o prostanoide produzido foi quantificado em espectrofotômetro (405 nm) via ensaio imunoenzimático com reagente de Ellman's. Foram conduzidos 2 experimentos independentes, com as concentrações e controles testados em triplicata, e a porcentagem de inibição das enzimas foi calculada baseada na concentração de prostaglandina F_{2α} do controle positivo.

4.10.2 Investigação da ação dos diterpenos sobre a inibição da atividade *in vitro* da fosfolipase A2 secretada humana do grupo V recombinante (sPLA₂)

Esta investigação foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit sPLA₂ (Type V) Inhibitor Screening Assay da Cayman Chemical (Item N°. 10004883). O ensaio foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante (CAYMAN CHEMICAL, 2017b). A sPLA₂ GV foi escolhida porque dentre os dez

diferentes grupos, o GV é o principal envolvido com a reação inflamatória em macrófagos e mastócitos (DENNIS, et al., 2011). As amostras (casg F, cas B, PDA-F e PDA-B) foram dissolvidas em metanol para preparar uma concentração de estoque de 10 mg/ml. Fosfatidilcolina tioester foi usado como controle positivo. 10 µL de cada amostra e veículo foram pré-incubados com tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) contendo 10 µL de enzima em uma placa de 96 poços. A reação foi iniciada pela adição de 200 µL de diheptanoiltio fosfatidilcolina 1,66 mM e a placa foi agitada por 30 segundos e incubada a 25 °C por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a adição de 10 µL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) para interromper a reação enzimática e permitir o desenvolvimento da cor. A placa foi colocada em agitador orbital durante um minuto e a absorbância foi medida a 405 nm utilizando um leitor de placas. Foram conduzidos 2 experimentos independentes, com as concentrações e controles testados em triplicata, e a porcentagem de inibição da enzima foi calculada baseada na concentração de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico do controle positivo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* (EetCs)

O volume total de solvente utilizado para a maceração de 250 g de DV foi de 11,250 L, na proporção DV e solvente de 1:15 (m/v). O rendimento foi de 29,5 g de extrato etanólico seco (11,8%, m/m).

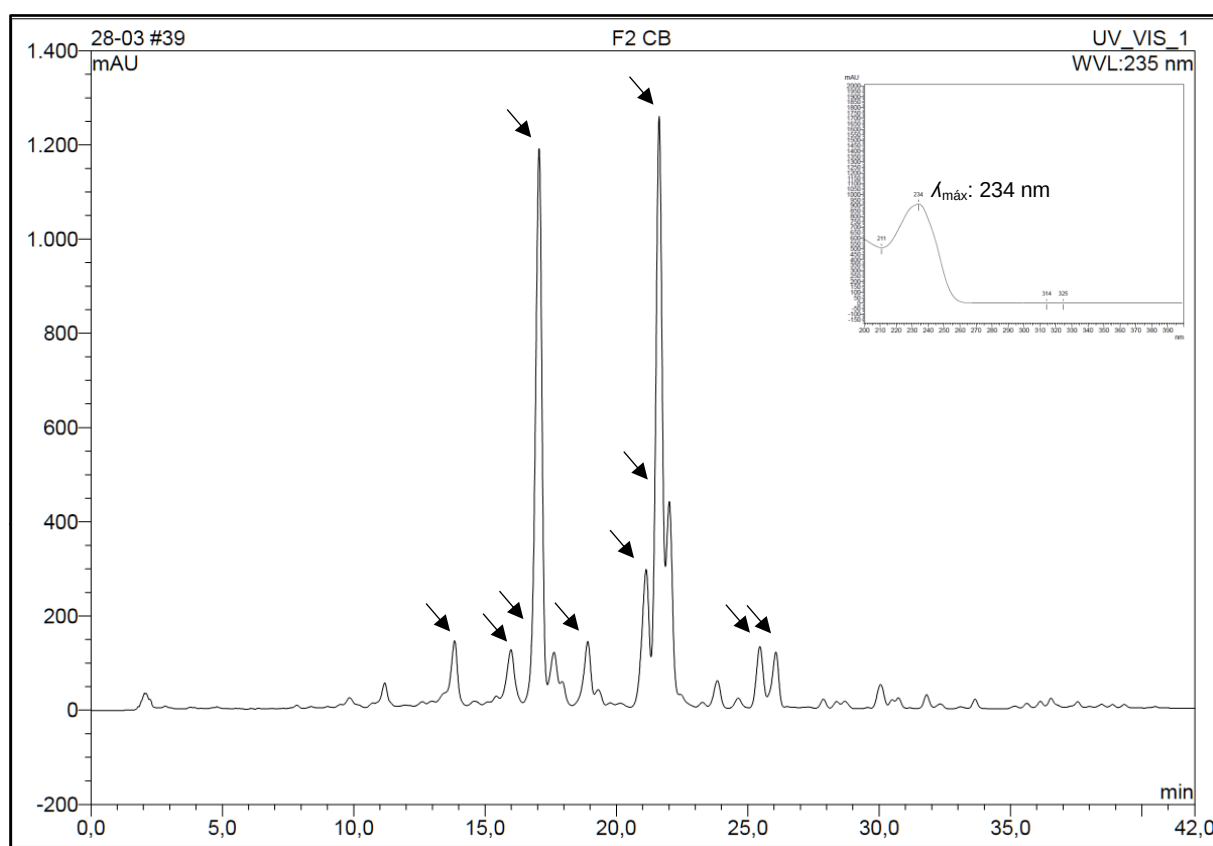
5.2 Purificação e identificação estrutural de diterpenos clerodânicos

5.2.1 Fracionamento do EetCs e da fração 2 (F 2)

A purificação dos diterpenos foi realizada a partir do fracionamento de cerca de 25,0 g do ECS por extração em fase sólida em coluna de vidro (20 x 10 cm) contendo sílica gel (60-200 µm) e carvão ativo em pó (1:1, m/m), obtendo F1-3. A F 2 (eluída com acetato de etila) concentrada em casearinas rendeu um total de 4,0 g (16,0%) e foi analisada por LC-DAD/UV. Os 10 picos majoritários foram classificados como casearinas (Figura 8), pois apresentaram espectro de absorção UV típico

dessa classe de metabólitos secundários oriundos de folhas de *C. sylvestris* ($\lambda_{\text{máx}}$: 232-235 nm) (CARVALHO et al., 2009; ODA et al., 2019).

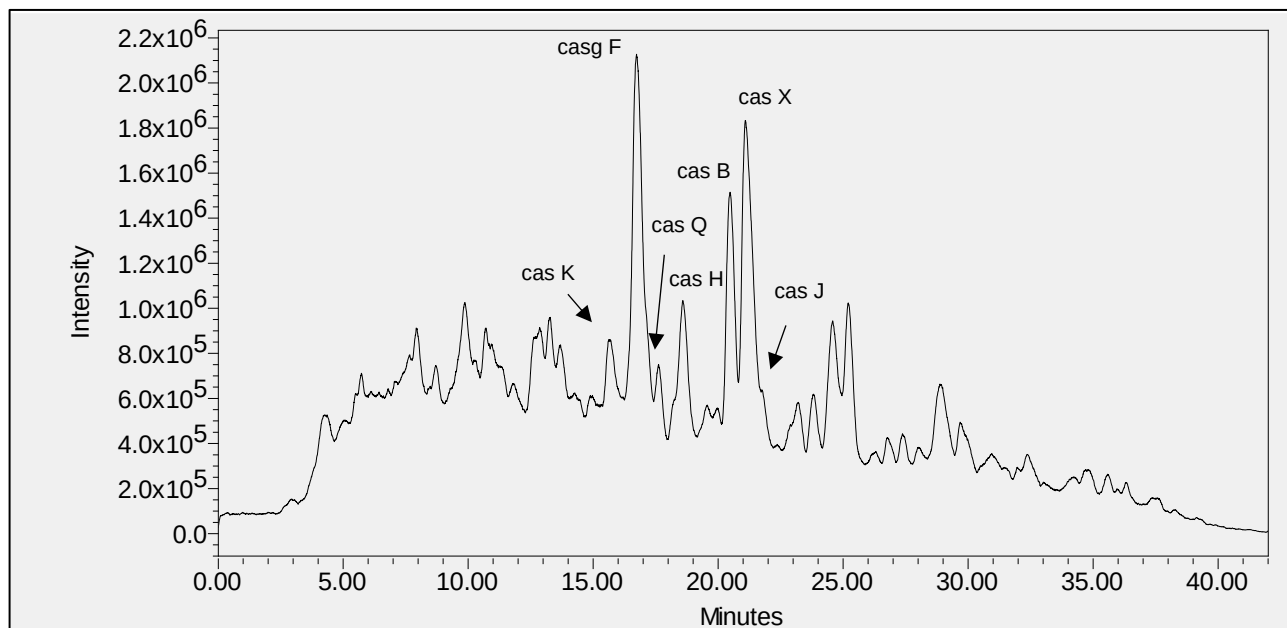
Figura 8. Cromatograma da F 2 (3,0 mg/mL) obtida por EFS do extrato etanólico de *C. sylvestris*. Análise em LC-DAD/UV, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm), em gradiente linear com MeCN 55-100% (v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min; 235 nm.



A F 2 também foi analisada por LC-MS (Figura 9) e os espectros de massas (ESI^+) dos 10 picos majoritários foram condizentes com as características dos diterpenos, pois apresentaram fragmentações típicas, com perdas de fragmentos neutros de água (18 Da), ceteno (42 Da), ácido acético (60 Da) e butanoico (88 Da), corroborando com os dados de LC-DAD/UV. Através das massas moleculares, do estudo de fragmentação (fragmentação na fonte de ionização) e comparações com padrões, 7 das substâncias correspondentes aos 10 picos majoritários foram identificados: no t_R de 15,6 min a casearina K com pico base de 585 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; no t_R de 16,7 min a caseargrewiina F com pico base de 527 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; no t_R de 17,6 min a casearina Q com pico base de 585 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; no t_R de 18,5 min a casearina H com

pico base de 543 $[M + Na]^+$; no $t_R = 20,4$ min a casearina B com pico de 599 $[M + Na]^+$; no $t_R = 21,1$ min a casearina X com pico base de 555 $[M + Na]^+$; no $t_R = 21,3$ min a casearina J com pico de 585 $[M + Na]^+$ (DANUELLO et al., 2020) (Apêndice 1).

Figura 9. Cromatograma (TIC, ESI⁺) da F 2 (3,0 mg/mL) obtido por análise em LC-MS. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), em gradiente linear com MeCN 55-100% (v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min.



A partir desses dados, 4,0 g da F 2 foi submetida a cromatografia em coluna com sílica gel (20 x 7,5 cm; 40-63 μ m / poro: 60 Å) (ODA et al., 2019). Na tentativa de obter diterpenos com alto grau de pureza, o eluente das subfrações de SF 11 a 25 foram coletados em duas porções, originando duas subfrações cada (SF 11.1 a SF 25.1). A Tabela 5 indica o rendimento das 54 subfrações obtidas.

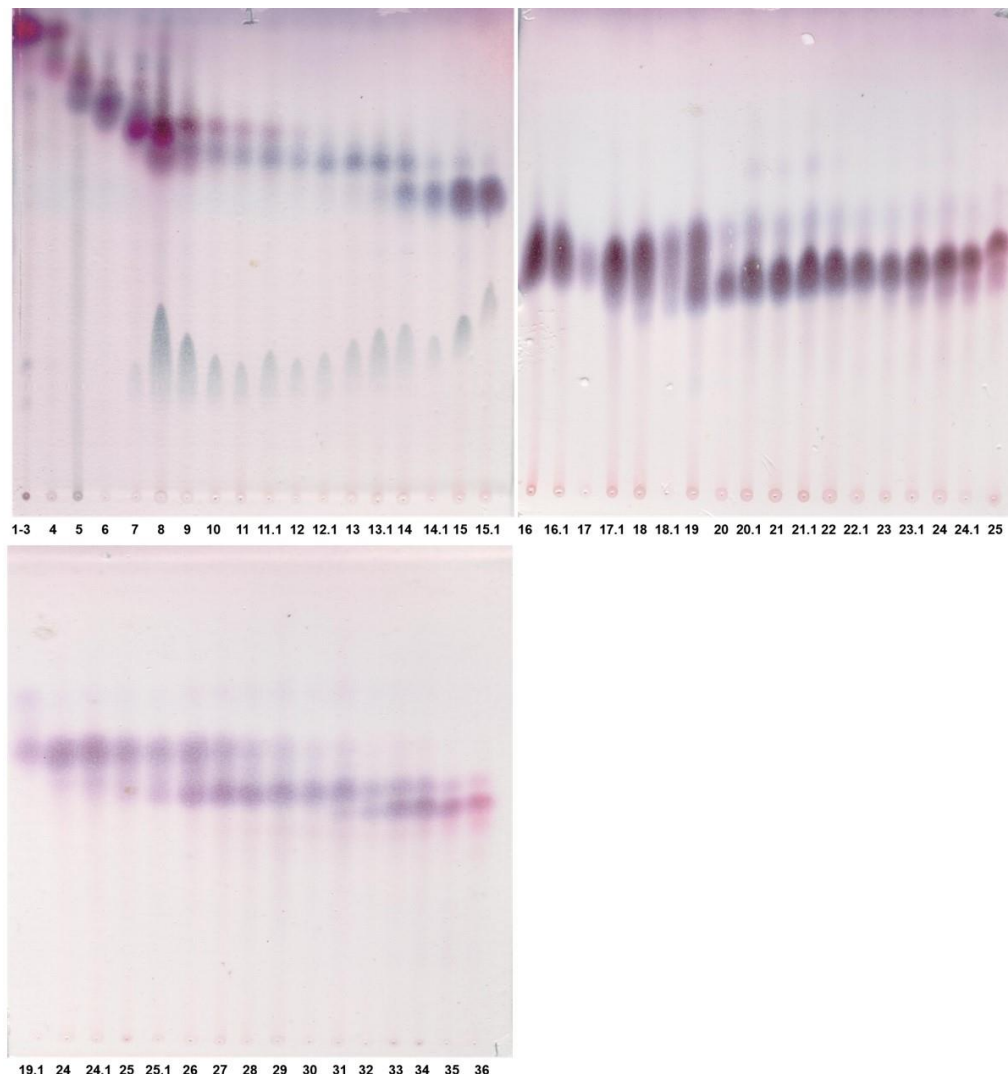
Tabela 5. Valores de massas das subfrações a partir do fracionamento da F 2 por CC em fase normal.

Frações	massa (mg)	% ¹	Frações	massa (mg)	%
1 – 3	37,7	0,94	24	37,0	0,92
4	33,3	0,83	24.1	34,6	0,86
5	20,3	0,50	25	97,2	2,43
6	38,4	0,96	25.1	243,2	6,08
7	73,7	1,84	26	19,8	0,49
8	93,2	2,33	27	7,6	0,19
9	84,9	2,12	28	3,1	0,07
10	31,7	0,79	29	8,8	0,22
11	9,5	0,23	30	3,6	0,09
11.1	61,8	1,54	31	16,7	0,41
12	45,5	1,13	32	13,9	0,34
12.1	11,1	0,27	33	1,7	0,04
13	12,9	0,32	34	17,1	0,42
13.1	14,3	0,35	35	13,5	0,33
14	22,6	0,56	36	12,8	0,32
14.1	42,7	1,06	37	10,7	0,26
15	99,3	2,48	38	1,0	0,02
15.1	98,7	2,46	39	1,1	0,02
16	108,0	2,70	40	11,3	0,28
16.1	54,3	1,35	41	18,1	0,45
17	115,7	2,89	42	2,0	0,05
17.1	25,7	0,64	43	66,6	1,66
18	232,4	5,81	44	17,9	0,44
18.1	141,9	3,54	45	69,5	1,73
19	117,6	2,94	46	48,1	1,20
19.1	73,5	1,83	47	71,1	1,77
20	4,4	0,11	48	246,5	6,16
20.1	78,9	1,97	49	81,9	2,04
21	276,3	6,90	50	70,1	1,75
21.1	57,3	1,43	51	1,0	0,02
22	15,2	0,38	52	1,6	0,04
22.1	1,0	0,02	53	0,9	0,02
23	99,0	2,47	54	0,8	0,02
23.1	33,3	0,83			
Total				3,51 g	87,6 %

¹porcentagem de massa em relação à massa de F 2 aplicada.

Análise por CCD foi realizada utilizando placas de alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®, 20 × 20 cm, 15-40 µm, 0,25 mm) das subfrações que provavelmente possuíam casearinas em sua composição química (SF 1-36) baseado em estudos anteriores de purificação dessas substâncias (CARVALHO, 2015; ODA, 2017) (Figura 10). Dentre essas, as que exibiram perfil cromatográfico semelhante, ou seja, bandas com R_f e cores idênticas foram agrupadas (Tabela 5).

Figura 10. Cromatoplaça (sílica gel; 0,25 mm) das subfrações SF 1-36 (5,0 mg/mL) obtidas por CC. Fase móvel: hexano: acetato de etila: isopropanol 60:37:03 (v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico (110° C por 10 min).

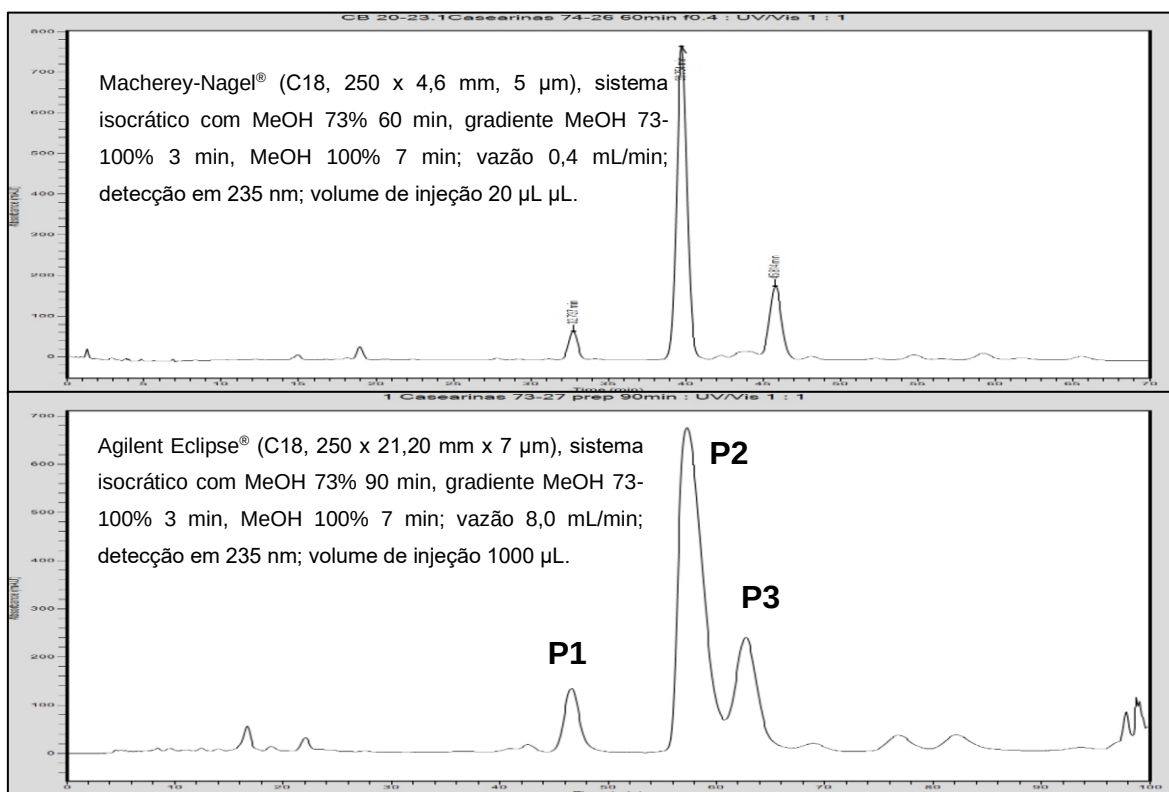


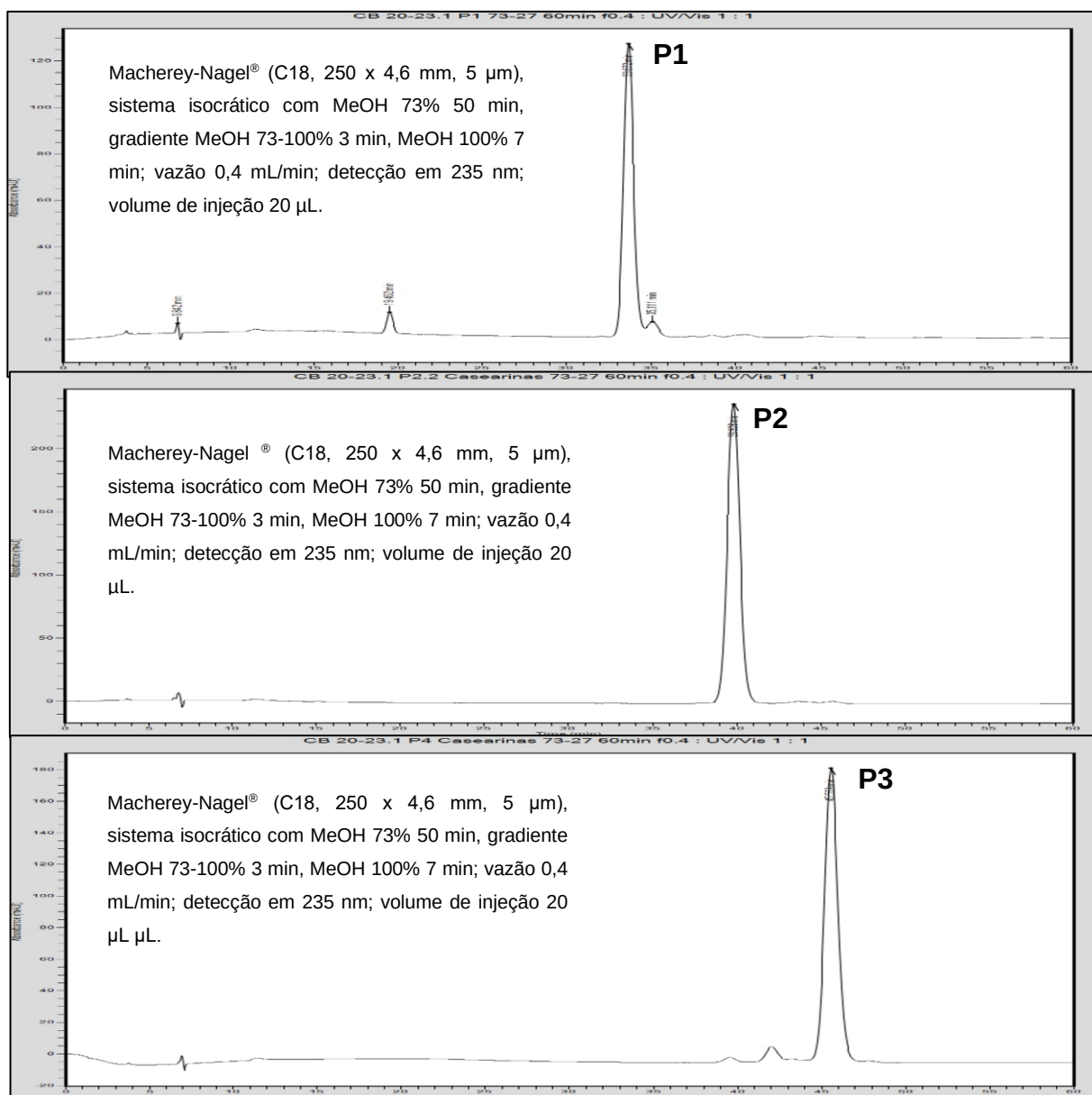
A maioria das amostras apresentou baixa complexidade de substâncias (2-3 bandas) ou substâncias semipurificadas (1 banda), o que indica que o método de fracionamento e purificação de CC em fase normal foi satisfatório. As amostras semelhantes agrupadas foram analisadas por LC-UV (item 4.3.2) para avaliação do perfil químico e escolha das subfrações que seriam submetidas à purificação de diterpenos, com foco na casg F e cas B, as quais já foram testadas isoladamente em outros estudos e apresentaram atividades anti-inflamatória, antiulcerogênica e antitumoral (SANTOS et al., 2010; PIERRI et al., 2017; SERTIÉ et al., 2018).

5.2.2 Cromatografia líquida semi-preparativa da SF 20-23.1

A subfração SF 20-23.1 (447,0 mg) apresentou perfil cromatográfico com picos no t_R correspondentes às casg F (16,8 min) e cas B (21,3 min) e, por isso, foi submetida a LCprep visando a obtenção desses diterpenos clerodânicos com alto grau de pureza e rendimento suficiente para os ensaios propostos. Além disso, através de análise por LC-MS os espectros dos picos majoritários da SF 20-23.1 foram coerentes com a casg F e cas B, apresentando pico de m/z 543 e m/z 599 $[M + Na]^+$, respectivamente. Os cromatogramas (analítico, preparativo e analítico pós-preparativo) da SF 20-23.1 estão apresentados na Figura 11. Foram coletados os 3 picos majoritários P1, P2 e P3, com t_R após a purificação de 33,7; 39,7 e 45,8 min, respectivamente.

Figura 11. Cromatogramas analíticos, preparativo e analítico pós-preparativo da subfração SF 20-23.1. t_R P1: 32,7 min; t_R P2: 39,7 min; t_R P3: 45,8 min.



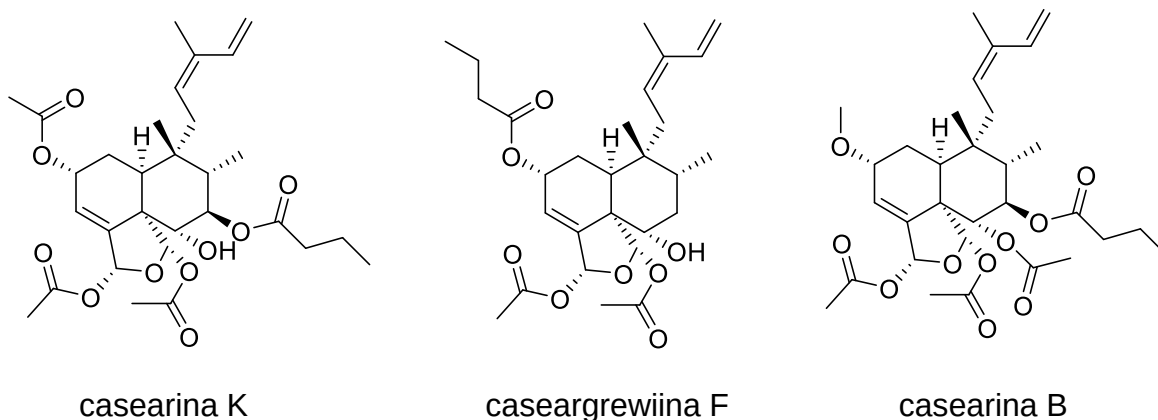


5.2.3 Identificação estrutural de diterpenos clerodânicos da SF 20-23.1

Após a purificação, os 3 diterpenos apresentaram pureza cromatográfica (λ 235 nm) satisfatória (> 90%) e suas identificações estruturais foram realizadas através de análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-QTOF-MS/MS) e Ressonância Magnética Nuclear (espectrômetro Bruker® 7,0 Tesla, pentadeuteropiridina) de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) unidimensional e bidimensional (HMBC) em conjunto com os dados da

literatura (MORITA et al., 1991). Foram identificadas a casearina K (P1), caseargrewiina F (P2) e casearina B (P3) (Figura 12).

Figura 12. Estruturas químicas da casearina K, caseargrewiina F e casearina B.



5.2.3.1 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P1

O P1 (t_R de 32,7 min, 25,0 mg, de pureza 91,1%; normalização de áreas λ 235 nm) coletado foi identificado como a casearina K (cas K, $C_{30}H_{42}O_{10}$, 562,2778 Da). O pico com t_R de 15,77 min do cromatograma obtido por UPLC-QTOF-MS/MS (Figura 13) apresentou espectro de massas (ESI^+ , MS^1 , Figura 14) com pico de m/z observada de 585,2679, a qual é correspondente ao íon aduto com sódio da cas K ($C_{30}H_{42}NaO_{10}^+$, m/z 585,2670) (erro de 1,5 ppm). Nesse espectro foi possível verificar também os íons adutos $[M + NH_4]^+$ e $[M + K]^+$ de m/z 580,3134 e 601,2424 respectivamente, sendo o íon aduto com amônio o pico base.

Figura 13. Cromatograma ESI⁺ (TIC) da casearina K (t_R de 15,77 min).

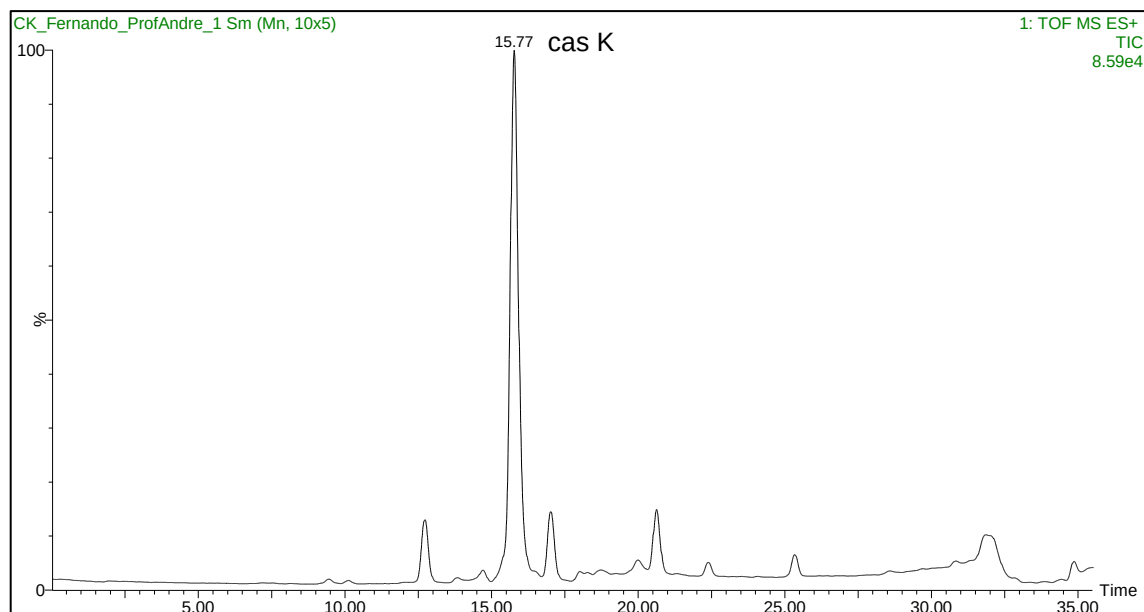
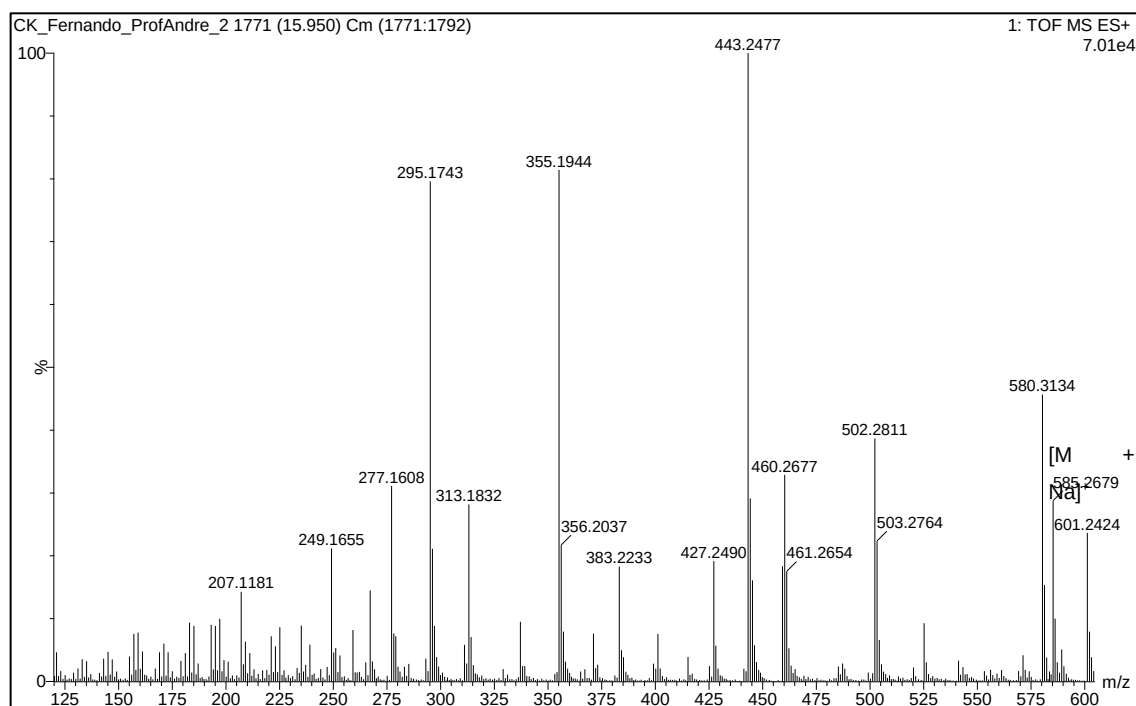


Figura 14. Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) da casearina K. m/z 585,2679 [M + Na]⁺.



No espectro MS² do íon precursor m/z 585,2679 (Apêndice 2) foi possível observar o íon de m/z 525,2527 [M + Na - CH₃COOH]⁺, o qual é gerado após a perda de um fragmento neutro ácido acético (60 Da), provavelmente oriundo do substituinte do C-18 (DANUELLO et al., 2020).

Os dados de RMN (Apêndices 3, 4, 5 e 6) foram muito semelhantes aos encontrados por Morita et al. (1991), primeiros a identificar essa substância nas folhas de *C. sylvestris*. Os autores utilizaram outro solvente (deuterocloroformio) em maiores frequências de análise (100 MHz ^{13}C e 400 MHz ^1H) e os seus resultados foram coerentes com os deslocamentos químicos (δ) obtidos para a cas K neste trabalho (Tabela 6). Apenas os diterpenos casg F e cas B foram utilizados para os ensaios posteriores de avaliação das propriedades farmacocinéticas e anti-inflamatórias, pois ambos já apresentaram atividades antiulcerogênica e anti-inflamatória em modelos *in vivo* (PIERRI et al., 2017; SERTIÉ et al., 2018).

Tabela 6. Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) obtidos para a casearina k, em pentadeuteropiridina.

C	$\delta^{13}\text{C}^*$	$\delta^{13}\text{C}$ cas K	$\delta^1\text{H}$ (J; Hz)*	$\delta^1\text{H}$ cas K (J; Hz)	HMBC
1 CH_2	26,8	27,7	no	2,15 <i>m</i>	
			no	2,32 <i>m</i>	
2 CH	65,9	67,1	5,45 <i>sl</i>	5,77 <i>tl</i> (4,0)	37,3; 122,3; 146,7; 170,8
3 CH	122,0	122,3	6,00 <i>dl</i> (4,0)	6,39 <i>dl</i> (4,0)	27,7; 54,8; 97,3
4 C	144,5	146,7	-	-	
5 C	53,6	54,8	-	-	
6 CH	74,9	74,6	3,66 <i>d</i> (10,8)	4,26 <i>d</i> (10,5)	54,8; 76,2; 99,2; 146,7
7 CH	75,4	76,2	4,97 <i>t</i> (10,8)	5,67 <i>t</i> (10,5)	11,8; 74,6; 173,7
8 CH	41,0	41,6	-	2,07 <i>m</i>	
9 C	39,2	40,1	-	-	
10 CH	36,1	37,3	no	2,83 <i>dl</i> (13,5)	
			-	2,0 <i>m</i>	
11 CH_2	30,1	31,0	2,51 <i>dd</i> (16,2; 8,7)	2,70 <i>dd</i> (15,9; 9,0)	
12 CH	125,5	127,4	5,23 <i>dl</i> (8,7)	5,60 <i>dl</i> (9,0)	
13 C	134,0	134,3	-	-	
14 CH	133,2	134,4	6,61 <i>dd</i> (17,5; 10,8)	6,67 <i>dd</i> (17,0; 10,9)	
			5,11 <i>d</i> (10,8)	5,12 <i>d</i> (10,9)	
15 CH_2	114,7	114,9	5,19 <i>d</i> (17,5)	5,23 <i>d</i> (17,0)	
16 CH_3	20,3	20,5	1,79 <i>sl</i>	1,77 <i>sl</i>	
17 CH_3	11,0	11,8	0,89 <i>d</i> (6,7)	1,02 <i>d</i> (6,4)	
18 CH	95,6	97,3	6,70 <i>t</i> (1,6)	7,42 <i>t</i> (1,5)	99,2; 170,9; 122,3; 170,9
19 CH	97,4	99,2	6,56 <i>sl</i>	7,22 <i>s</i>	146,7; 169,8
20 CH_3	25,3	25,9	0,81 <i>s</i>	0,94 <i>s</i>	
OAc	20,9	21,9	1,98 <i>s</i>	1,95 <i>s</i>	
OAc	168,8	169,8	-	-	
OAc	21,1	21,4	2,07 <i>s</i>	1,88 <i>s</i>	
OAc	170,0	170,8	-	-	
OAc	21,2	21,5	2,08	2,01 <i>s</i>	
OAc	171,5	170,9	-	-	
OBu	13,5	14,2	0,98 <i>t</i> (7,4)	0,89 <i>t</i> (7,3)	
OBu	18,3	19,2	no	1,68 <i>m</i>	
OBu	36,5	36,8	no	2,39 <i>m</i>	
OBu	174,0	173,7	-	-	

* Dados de RMN da casearina K obtidos a 400 MHz para ^1H e a 100 MHz para ^{13}C , em CDCl_3 (MORITA et al., 1991).

no: sinal não observado

5.2.3.2 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P2

O P2 (t_R de 39,7 min, 158,0 mg de pureza 98,6%; normalização de áreas λ 235 nm) coletado foi identificado como a caseargrewiina F (casg F, $C_{28}H_{40}O_8$, 504,2723 Da). O pico com t_R de 16,81 min do cromatograma obtido por UPLC-QTOF-MS/MS (Figura 15) apresentou espectro de massas (ESI^+ , MS^1 , Figura 16) com pico de m/z 527,2629, a qual é correspondente ao íon aduto com sódio da casg F ($C_{28}H_{40}NaO_8^+$, m/z 527,2615) (erro de 2,6 ppm). Nesse espectro foi possível verificar os sinais de m/z dos íons adutos $[M + K]^+$: 543, 2359 e $[M + NH_4]^+$: 522,3069, sendo o íon aduto com sódio o pico base.

Figura 15. Cromatograma ESI^+ (TIC) da caseargrewiina F (t_R de 16,81 min).

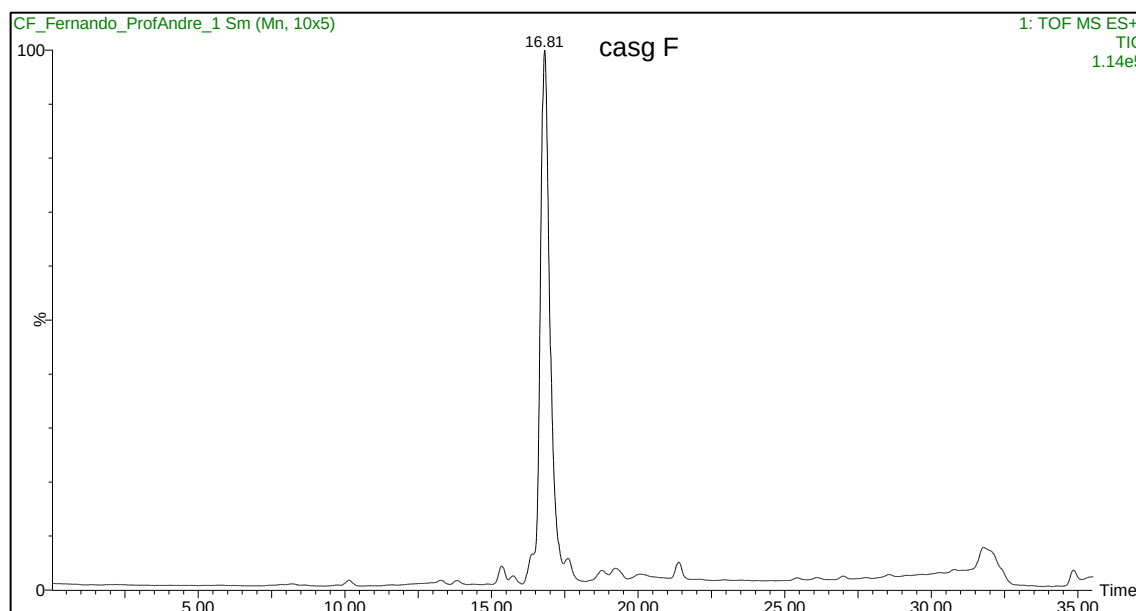
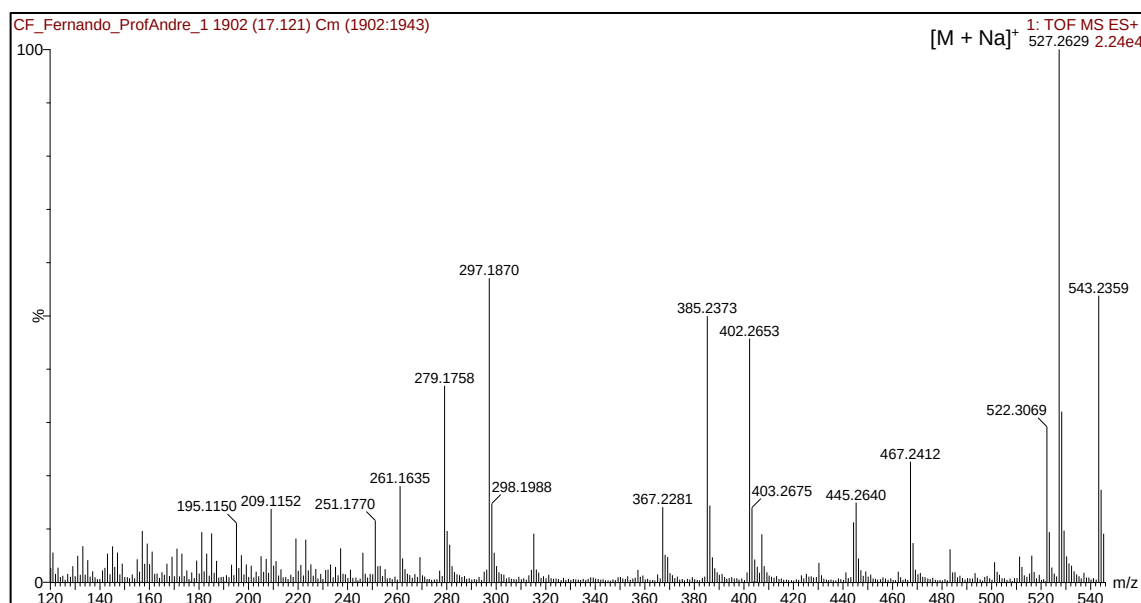


Figura 16. Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) da caseargrewiina F.



O espectro MS² do íon precursor m/z 527,2629 confirmou a perda de substituintes esterificados da casg F (Apêndice 7). Foi possível observar o pico de m/z 467,2434 $[M + Na - CH_3COOH]^+$, o qual é gerado após a perda de um fragmento neutro ácido acético (60 Da). Foi observado também o íon de m/z 407,2124 $[M + Na - 2 CH_3COOH]^+$, referente a perda de outro fragmento neutro de ácido acético (60 Da), uma vez que a casg F apresenta dois substituintes acetato no anel C (C-18 e C-19).

Os dados de RMN (Apêndices 8, 9, 10 e 11) foram muito semelhantes aos encontrados por Kanokmedhakul, Kanokmedhakul e Buayairaksa (2007), primeiros a identificar essa substância nos frutos de *Casearia grewiifolia* Vent. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos pelas análises de RMN da casg F.

Tabela 7. Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) obtidos para a caseargrewiina F, em pentadeuteropiridina.

C	$\delta^{13}\text{C}^*$	$\delta^{13}\text{C}$ casg F	$\delta^1\text{H}$ (J; Hz)*	$\delta^1\text{H}$ casg F	HMBC
1 CH_2	26,8	27,5	1,90 <i>m</i>	2,08 <i>m</i> 2,15 <i>m</i>	
2 CH	66,2	67,2	5,44 <i>sl</i>	5,75 <i>tl</i> (3,6)	
3 CH	121,7	121,5	5,98 <i>dl</i> (3,9)	6,35 <i>dl</i> (3,6)	
4 C	145,3	147,5	-	-	
5 C	53,5	54,6	-	-	
6 CH	72,8	72,7	3,78 <i>dd</i> (12,2; 3,9)	4,20 <i>dd</i> (12,3; 3,8)	37,9; 54,3; 99,0; 147,5
7 CH	37,2	37,9	1,60 <i>m</i> 1,66 <i>m</i>	1,95 <i>m</i>	16,0; 38,5; 54,6; 72,7;
8 CH	36,6	36,9	1,74 <i>m</i>	1,79 <i>m</i>	
9 C	37,7	38,5	-	-	
10 CH	36,7	37,4	2,35 <i>m</i>	2,75 <i>dd</i> (13,7; 3,5)	
11 CH_2	29,1	29,8	1,57 <i>m</i> 2,37 <i>m</i>	1,88 <i>m</i> 2,46 <i>dd</i> (16,5; 8,9)	
12 CH	126,6	128,3	5,27 <i>dl</i> (7,7)	5,64 <i>dl</i> (8,9)	
13 C	133,5	133,9	-	-	
14 CH	133,44	134,3	6,62 <i>dd</i> (17,0; 10,7)	6,81 <i>dd</i> (18,0; 10,2)	
15 CH_2	114,3	114,6	5,10 <i>d</i> (10,7) 5,18 <i>d</i> (17,0)	5,15 <i>d</i> (10,2) 5, 27 <i>d</i> (18,0)	
16 CH_3	20,4	20,6	1,80 <i>s</i>	1,84 <i>sl</i>	
17 CH_3	15,6	16,0	0,91 <i>d</i> (6,8)	0,93 <i>d</i> (6,6)	
18 CH	95,7	97,3	6,72 <i>s</i>	7,45 <i>t</i> (1,5)	
19 CH	97,3	99,0	6,50 <i>s</i>	7,19 <i>s</i>	54,6; 72,7; 97,3; 147,5; 170,1
20 CH_3	24,9	25,4	0,77 <i>s</i>	0,86 <i>s</i>	
OAc	21,3	21,4	2,00 <i>s</i>	2,03 <i>s</i>	
OAc	170,2	170,1	-	-	
OAc	21,2	21,9	2,09 <i>s</i>	2,18 <i>s</i>	
OAc	169,3	170,8	-	-	
OBu	13,6	13,9	0,99 <i>t</i> (7,3)	0,86 <i>t</i> (7,5)	
OBu	18,6	19,1	1,64 <i>m</i>	1,63 <i>m</i>	
OBu	36,5	36,6	2,36 <i>t</i> (7,0)	2,18 <i>m</i>	
OBu	173,1	173,3	-	-	

* Dados de RMN da caseargrewiina F obtidos a 400 MHz para ^1H e a 100 MHz para ^{13}C , em deuterochloroformio (KANOKMEDHAKUL; KANOKMEDHAKUL; BUAYAIRAKSA, 2007). no: sinal não observado

5.2.3.3 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P3

O P 3 (t_R de 45,8 min, 75,0 mg de pureza 95,7%; normalização de áreas (λ 235 nm) coletado foi identificado como a casearina B (cas B, $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{O}_{10}$, 576,2934 Da). O pico de t_R de 19,38 min do cromatograma obtido por UPLC-QTOF-MS/MS (Figura 17) apresentou espectro de massas (ESI^+ , MS^1 , (Figura 18) com pico de m/z observada de 599,2818, a qual é correspondente ao íon aduto com sódio da cas B ($\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{NaO}_{10}^+$, m/z 599,2827) (erro de 1,5 ppm). Nesse espectro foi possível verificar também os íons adutos $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ e $[\text{M} + \text{K}]^+$ de m/z 594,3241 e 615,2565, respectivamente, sendo o íon aduto com sódio o pico base.

Figura 17. Cromatograma ESI⁺ (TIC) da casearina B (t_R de 19,38 min).

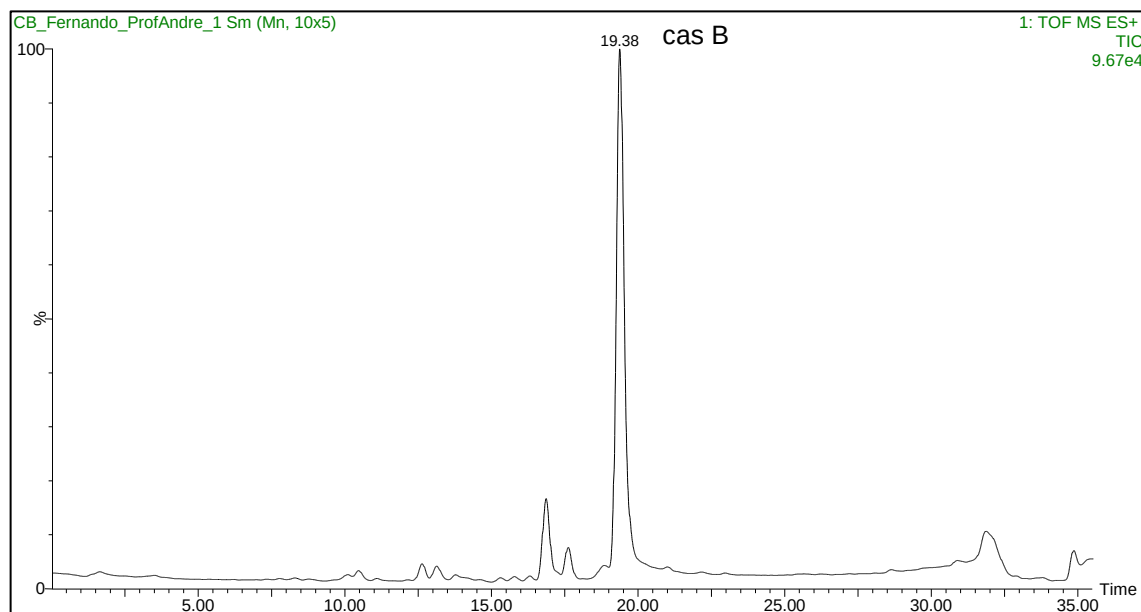
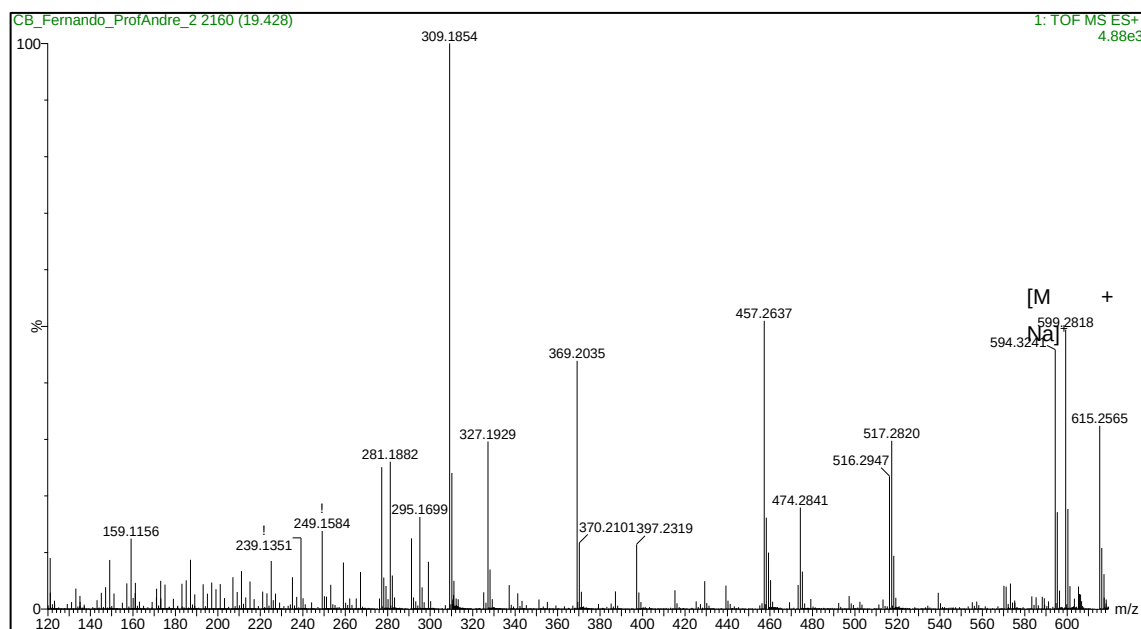


Figura 18. Espectro de massas LC-MS/MS (ESI⁺, MS¹) da casearina B. m/z 599,2818 [M + Na]⁺.



Além disso, no espectro MS² do íon precursor de m/z 599,2834 foram confirmadas as quebras de 2 substituintes esterificados da cas B (Apêndice 12), os quais foram referentes a perda de 2 fragmentos neutros de ácido acético, oriundos provavelmente da quebra dos substituintes esterificados em C-18 e C-19 da cas B:

m/z 539,2704 $[M + Na - CH_3COOH]^+$; m/z 479,2425 $[M + Na - 2 CH_3COOH]^+$, respectivamente (DANUELLO et al., 2020).

Os dados de RMN (Apêndices 13, 14, 15 e 16) foram muito semelhantes aos encontrados por Itokawa et al. (1990), primeiros a identificar essa substância das folhas de *C. sylvestris*. Assim como a casg F, a cas B também já foi isolada de folhas de *C. sylvestris* e apresentou atividade citotóxica em células tumorais, antiulcerogênica e anti-inflamatória (SANTOS et al., 2010; PIERRI et al., 2017; SERTIÉ et al., 2018). A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos por essas análises.

Tabela 8. Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) obtidos para a casearina B, em pentadeuteropiridina.

C	$\delta^{13}C^{**}$	$\delta^{13}C$ cas B	δ^1H (J; Hz)**	δ^1H cas B (J; Hz)	HMBC
1 CH_2	25,4	26,4	no	2,01 <i>m</i>	
2 CH	72,5	73,0	no	2,17 <i>m</i>	
3 CH	125,5	126,5	4,01 <i>s</i>	3,95 <i>sl</i>	37,6; 57,2; 126,5; 141,5
4 C	141,3	141,5	6,17 <i>dl</i> (3,9)	6,40 <i>sl</i>	26,4; 53,8; 96,0
5 C	52,9	53,8	-	-	
6 CH	74,0	74,9	no	5,67 <i>d</i> (10,4)	73,4; 98,3; 141,5; 170,5
7 CH	72,7	73,4	no	5,62 <i>t</i> (10,4)	10,5; 41,5; 74,9; 173,2
8 CH	41,0	41,5	no	2,05 <i>m</i>	
9 C	39,3	40,0	-	-	
10 CH	36,7	37,6	2,41 <i>dd</i> (17,6; 3,2)	2,76 <i>dl</i> (13,4)	
11 CH_2	30,2	30,9	1,67 <i>sl</i> (16,2)	1,93 <i>m</i>	
12 CH	125,8	127,0	2,59 <i>dd</i> (16,2; 7,9)	2,67 <i>dd</i> (16,0; 8,5)	
13 C	133,9	134,5	5,38 <i>dl</i> (7,9)	5,49 <i>dl</i> (8,5)	
14 CH	133,6	134,2	-	-	
15 CH_2	114,6	115,1	6,70 <i>dd</i> (17,2; 10,8)	6,68 <i>dd</i> (16,9; 11,0)	
16 CH_3	20,3	20,5	no	5,12 <i>d</i> (11,0)	
17 CH_3	11,0	10,5	no	5,24 <i>d</i> (16,9)	
18 CH	94,0	96,0	1,84 <i>sl</i>	1,74 <i>sl</i>	
19 CH	97,7	98,3	0,91 <i>d</i> (8,9)	0,98 <i>d</i> (6,4)	98,3; 126,5; 170,9
20 CH_3	25,4	25,9	6,35 <i>t</i> (1,5)	6,89 <i>t</i> (1,3)	53,8; 74,9; 96,0; 169,7
OMe	57,1	57,2	6,56 <i>sl</i>	7,18 <i>sl</i>	
OAc	21,0	21,7	0,92 <i>s</i>	0,96 <i>s</i>	73,0
OAc	169,1	169,7	3,45 <i>s</i>	3,36 <i>s</i>	
OAc	21,2	21,4	1,84 <i>s</i>	1,89 <i>s</i>	
OAc	170,1	170,5	-	-	
OAc	21,4	21,3	1,98 <i>s</i>	2,07 <i>s</i>	
OAc	170,1	170,9	-	-	
OBu	13,8	14,2	2,05 <i>s</i>	2,10 <i>s</i>	
OBu	18,4	19,1	-	-	
OBu	36,1	36,5	0,94 <i>t</i> (7,4)	0,90 <i>t</i> (7,3)	
OBu	172,5	173,2	no	1,66 <i>m</i>	
			-	2,38 <i>m</i>	

*Dados de RMN da casearina B obtidos a 400 MHz para ^1H e a 100 MHz para ^{13}C , em deuterochloroformio (MORITA et al., 1991).

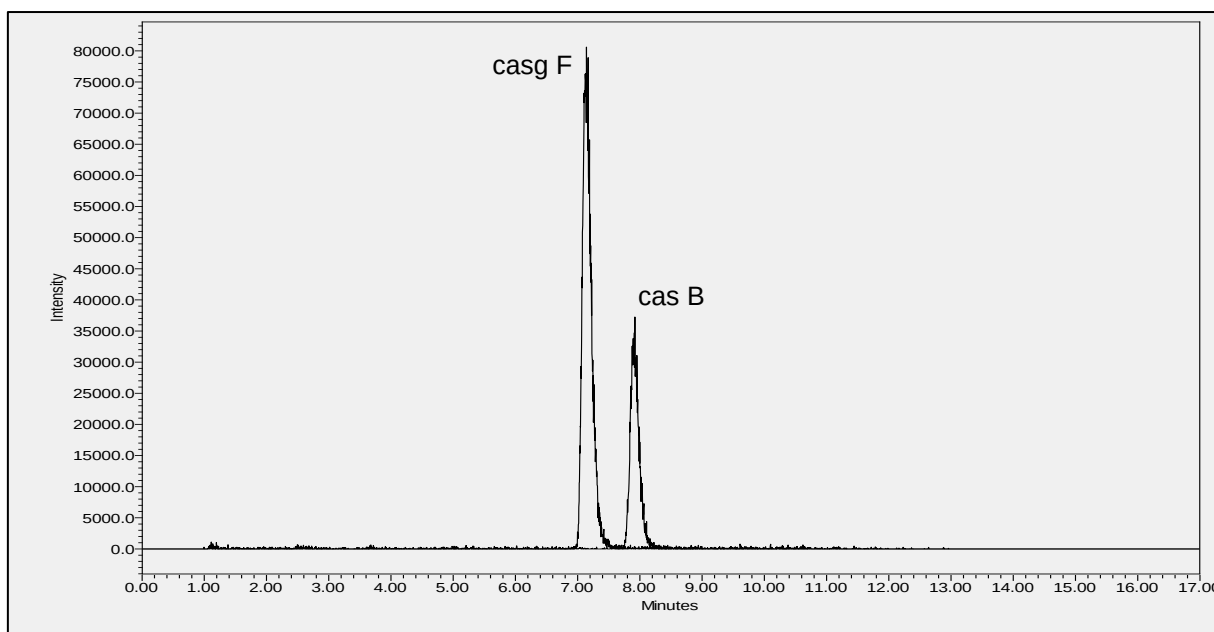
no: sinal não observado

5.3 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para a quantificação de diterpenos por LC-MS

5.3.1 Método analítico

O método cromatográfico foi desenvolvido em LC-MS (Waters® HPLC ACQUITY QDa) equipado com a coluna Macherey-Nagel® (C18, 250 × 4,6 mm, 5 µm). A condição cromatográfica utilizada foi otimizada e está descrita no item 4.4. As respostas para a validação dos métodos analíticos foram adquiridas a partir dos cromatogramas extraídos (SIM) da caseargrewiina F (t_R de 7,1 min) e casearina B (t_R de 8,0 min) (LC-MS), os quais partiram dos respectivos íons adutos com sódio de m/z 527 e 599 $[M + Na]^+$ (Figura 19). Para as quantificações, as análises das amostras foram feitas junto com as curvas analíticas construídas a partir de sete concentrações de 0,039 a 1,25 µg/mL.

Figura 19. Cromatograma ESI⁺ (SIM) da casg F (m/z 527) e casearina B (m/z 599) a 0,612 µg/mL (CQM) em acetonitrila. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.

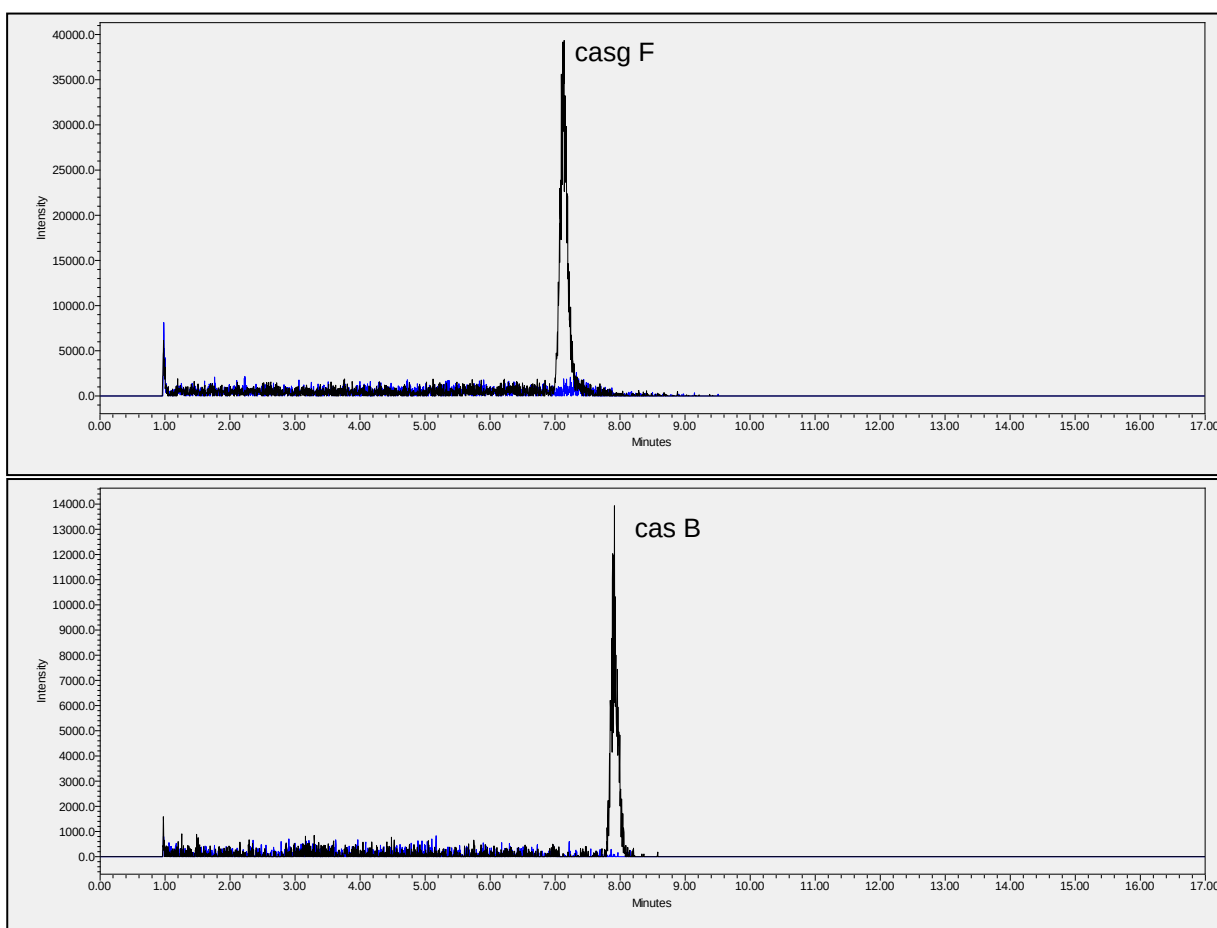


5.3.1.1 Matriz acetonitrila

O método analítico empregado utilizando acetonitrila como matriz demonstrou ser seletivo para ambos diterpenos, pois após a análise de amostras branco

(ausência de diterpenos) em comparação com amostras LIQ (0,039 µg/mL) não foram observados interferentes no tempo de retenção dos analitos. Além disso, não foram observados sinais dos diterpenos nos cromatogramas de amostras branco obtidos após 2 análises de amostras no LSQ (1,25 µg/mL), indicando que não houve efeito residual (Figura 20).

Figura 20. Cromatogramas ESI⁺ (SIM) da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) a 0,039 µg/mL (LIQ) em acetonitrila. Legenda: Linha azul: amostra branco e linha preta: casg F (t_R de 7,1 min) e cas B (t_R de 7,9 min). Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



Através do teste de homocedasticidade pelo índice de Cochran, os modelos aplicados nas análises em matriz acetonitrila foram considerados não homocedásticos ($C_{cal} > C_{tab}$). Por esse motivo, foi aplicada a ponderação de $1/y^2$, pois ela apresentou menores valores de Σ EPR e resíduos e maiores valores de

coeficiente de correlação (r) para ambos diterpenos. Essa ferramenta matemática adota maior peso aos dados com pouca variância e menor peso para os dados com elevada variância. Assim, há um ajuste na dispersão dos dados e uma aproximação mais adequada da variância entre as diferentes concentrações.

A correlação linear entre as concentrações nominais e as áreas dos sinais analíticos ponderados ($1/y^2$) gerou a equação $y = 516335x + 10627$ ($r = 0,9963$) para a casg F e $y = 260463x + 371$ ($r = 0,9980$) para a cas B. Após análise de variância (ANOVA) unilateral para um nível de confiança de 95% foi possível constatar que os modelos de regressão linear foram estatisticamente significativos dentro do intervalo de confiança ($F_{cal} > F_{tab}$, P valor $< 0,05$) e que ele descreve adequadamente os dados experimentais ($F_{cal} < F_{tab}$, P valor $> 0,05$), confirmando que não há falta de ajuste e que o modelo está adequado (Tabela 9) (BRASIL, 2017).

Tabela 9. Ensaios de confiança para os modelos lineares ponderados da casg F e cas B, com nível de significância $p = 0,05$.

Teste	Calculado		Tabelado	Valor p		Função	Conclusão
	casg F	cas B		casg F	cas B		
Cochran	0,73	0,88	0,56	-	-	Verificar homocedasticidade	Heterocedásticos
F ANOVA	4480	10269	4,35	$1,28 \times 10^{-18}$	$1,12 \times 10^{-18}$	Avaliação do coeficiente angular	Diferente de zero
F (falta de ajuste)	0,710	2,14	2,95	0,26	0,121	Avaliação da falta de ajuste	Não há falta de ajuste
Teste t	2,43	1,83	2,052			Avaliação do coeficiente linear	Diferente de zero

Os resultados de precisão e exatidão referentes aos controles de qualidade da curva analítica construída a partir da resposta de cada concentração da casg F e cas B estão apresentadas nas Tabelas 10 e 11. Os valores foram aceitáveis, pois ficaram entre o limite de $\pm 15\%$ em relação ao valor de concentração nominal (BRASIL, 2017).

Tabela 10. Exatidão e precisão do método analítico em acetonitrila da caseargrewiina F (n = 3).

	INTRA-CORRIDA				INTER-CORRIDA		
	Concentração nominal (µg/mL)	Concentração Calculada (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)	Concentração Calculada (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)
LIQ	0,039	0,038	4,1	-1,6	0,042	11,1	8,2
CQB	0,078	0,076	5,7	-1,4	0,076	0,7	-2,5
CQM	0,625	0,612	2,7	-2,0	0,619	0,7	-0,9
CQA	1,0	0,989	2,8	-1,1	0,961	1,17	-3,9

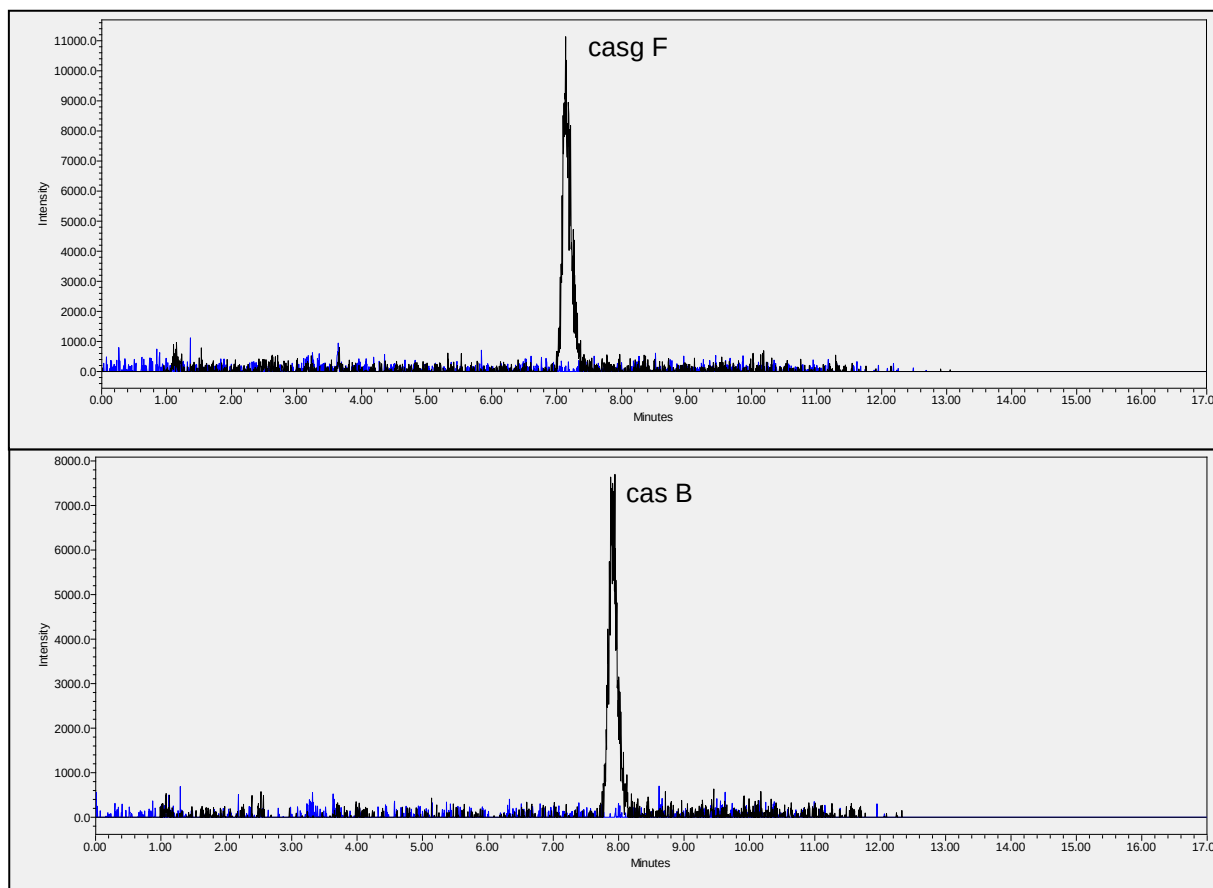
Tabela 11. Exatidão e precisão do método analítico em acetonitrila da casearina B (n = 3).

	INTRA-CORRIDA				INTER-CORRIDA		
	Concentração nominal (µg/mL)	Concentração Calculada (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)	Concentração Calculada (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)
LIQ	0,039	0,038	0,6	-2,9	0,032	5,92	-7,3
CQB	0,078	0,081	0,38	4,4	0,088	0,75	13,3
CQM	0,625	0,611	1,73	-2,1	0,697	0,18	11,5
CQA	1,0	0,955	4,42	-4,46	0,965	0,56	-3,5

5.3.1.2 Matriz tampão Hank's

Assim como os diterpenos diluídos em acetonitrila, as amostras em tampão Hank's não apresentaram picos interferentes significativos próximos ao t_R dos analitos e não foi observado efeito residual (Figura 21).

Figura 21. Cromatogramas ESI⁺ (SIM) da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) a 0,039 µg/mL (LIQ) em tampão Hank's. Legenda: Linha azul: Amostra branco e linha Preta: casg F (t_R 7,1 min) e cas B (t_R de 7,9 min). Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



Para ajuste da linearidade do método foi aplicada a ponderação $1/y^2$. Assim, após ANOVA unilateral para um nível de confiança de 95% foi possível constatar que os modelos de regressão linear determinados foram estatisticamente significativos dentro do intervalo de confiança e que eles descrevem adequadamente os dados experimentais. Os resultados de regressão linear, precisão e exatidão referentes aos controles de qualidade da curva analítica construída a partir da casg F e cas B em tampão Hank's estão apresentadas na Tabela 12. Os valores foram aceitáveis, pois ficaram entre o limite de $\pm 15\%$ em relação ao valor de concentração nominal (EMA, 2011; BRASIL, 2017).

Tabela 12. Parâmetros de validação do método analítico ponderado ($1/y^2$) para quantificação da caseargrewiina F e casearina B em tampão Hank's ($n = 3$, $p = 0,05$).

		Casg F				Cas B		
Curva de calibração	Equação	$y = 1119000x - 17511$				$y = 1345000x - 23877$		
	r	0,9992				0,9983		
	Cochran	0,42				0,84		
	F ANOVA ^a	12468				7041		
	Falta de ajuste ^b	2,7				1,7		
P valor		0,065				0,203		
		Conc. nominal (µg/mL)	Conc. calculada (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)	Conc. calculada (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)
LIQ		0,039	0,041	8,53	4,7	0,040	7,7	4,2
CQB		0,078	0,070	1,66	-11,5	0,068	1,6	12,1
CQM		0,625	0,66	2,1	5,6	0,671	1,5	7,4
CQA		1,00	1,07	2,7	6,7	1,09	0,9	9,25

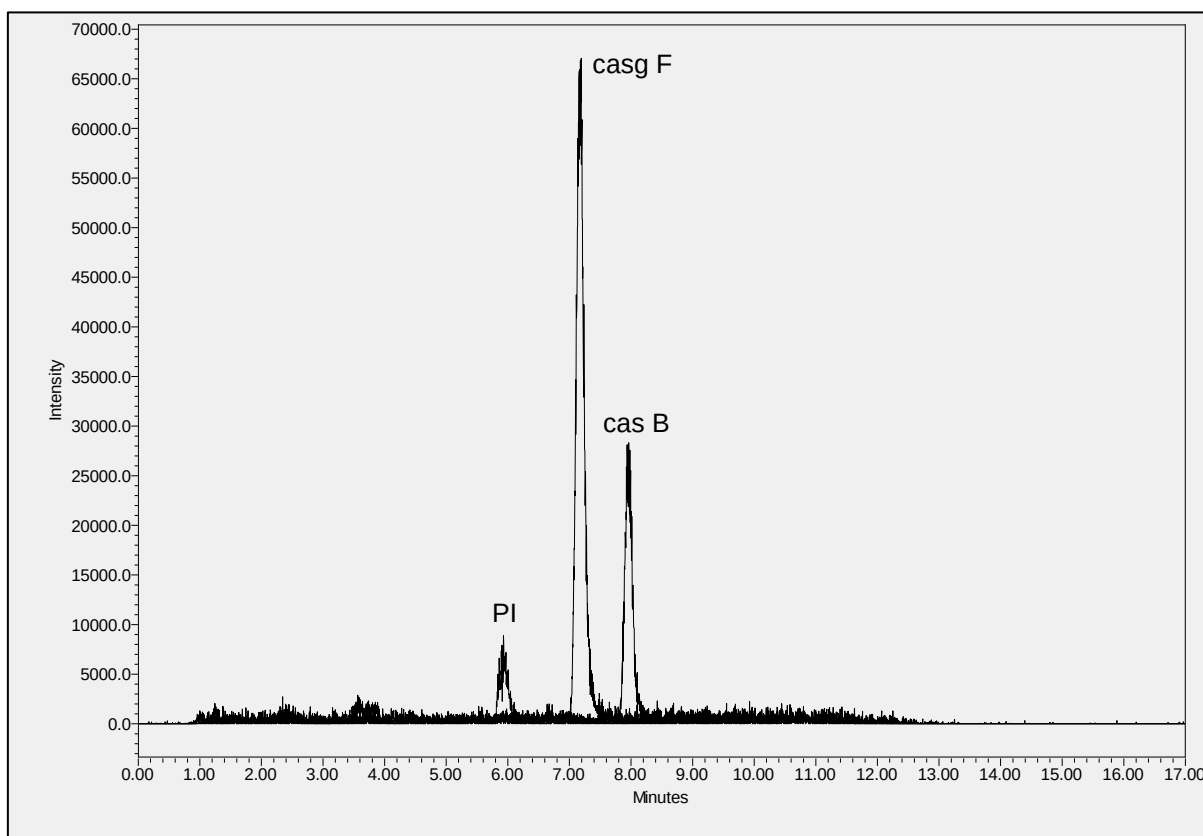
^a F tabelado: 4,38

^b F tabelado: 2,95

5.3.2 Método bioanalítico

As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas otimizadas e utilizadas na validação analítica (item 4.5.1). Também foi realizada a escolha do padrão interno (PI) baseado em suas propriedades físico-químicas e cromatográficas. Assim, foi escolhido o timol (monoterpeno), o qual possui considerável estabilidade e propriedades cromatográficas adequadas, cujo cromatograma extraído por LC-MS (t_R de 5,9 min) e utilizado para a quantificação foi obtido a partir do pico base do seu espectro de massas (ESI^+ , MS^1 , Apêndice 17) correspondente a molécula protonada de m/z 151 $[M + H]^+$. O processamento das amostras foi realizado através precipitação de proteínas com acetonitrila na proporção de 1:1 (v/v) (item 4.5.2). Os cromatogramas extraídos (SIM) da caseargrewiina F (t_R de 7,1 min) e casearina B (t_R de 8,0 min) foram obtidos a partir dos íons adutos com sódio de m/z 527 e 599 $[M + Na]^+$, respectivamente (Figura 22).

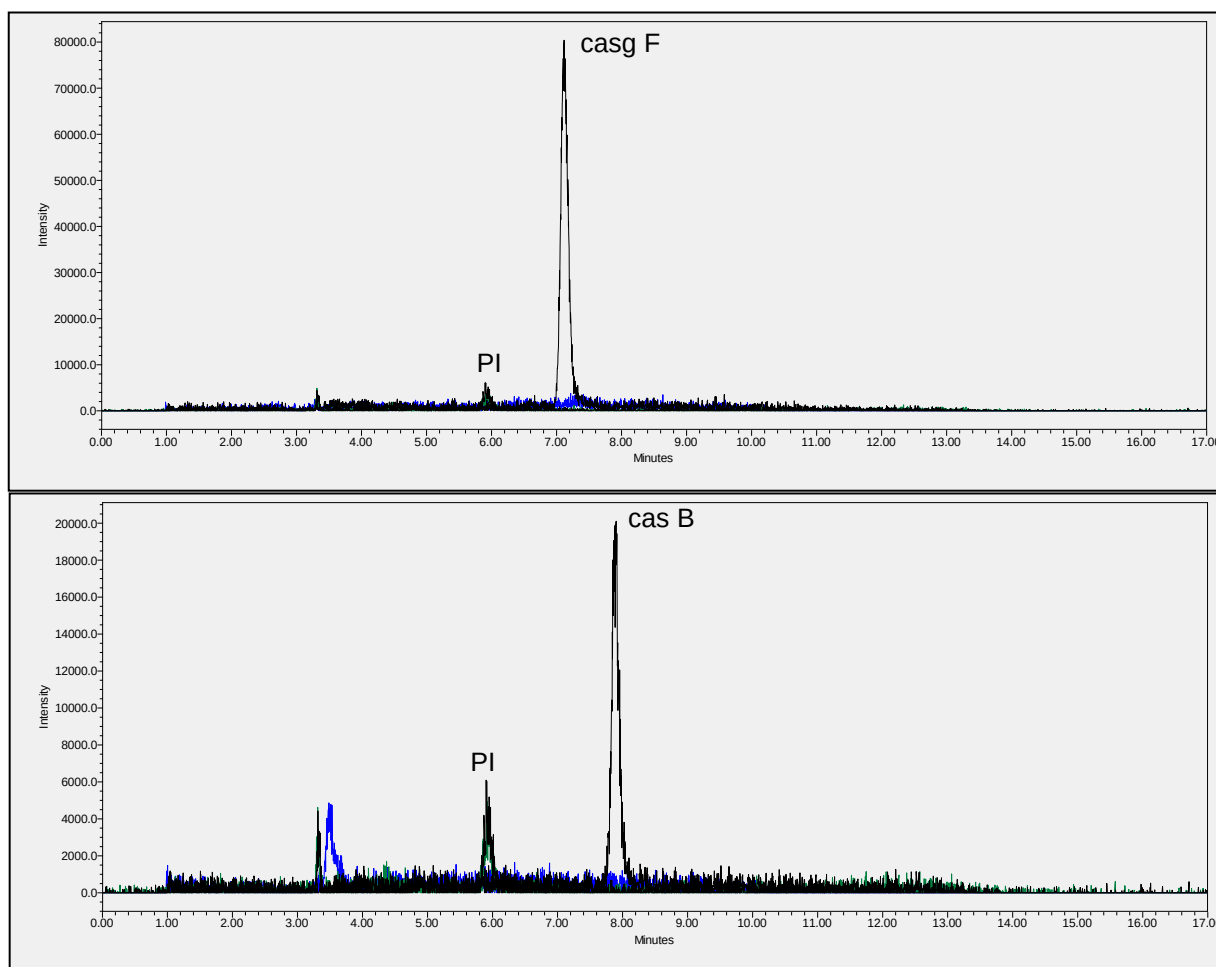
Figura 22. Cromatograma ESI⁺ (SIM) do padrão interno timol (50 µg/mL; t_R de 6,0 min), da caseargreina F (0,039 µg/mL; t_R de 7,1 min) e da casearina B (0,039 µg/mL; t_R de 7,9 min). Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



5.3.2.1 Matriz plasma humano

A avaliação da seletividade e efeito residual das amostras processadas em plasma humano foram satisfatórios, demonstrando que os cromatogramas extraídos não apresentaram picos interferentes significativos próximos ao t_R dos analitos. A Figura 23 representa os cromatogramas obtidos após o processamento das amostras em plasma humano.

Figura 23. Cromatogramas ESI⁺ (TIC) após extração em plasma humano da caseargrewiina F (casg F, t_R de 7,1 min) e casearina B (cas B, t_R de 7,9 min) a 0,039 µg/mL com padrão interno (PI, 50 µg/mL; t_R de 5,9 min). Legenda: Linha azul: amostra branco; Linha verde: amostra zero e Linha Preta: casg F, cas B e PI. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



Para ajuste da linearidade do método foi aplicada a ponderação $1/y^2$. Nos sete pontos da faixa de concentração de 0,039 a 1,25 µg/mL, o modelo de regressão linear foi estatisticamente significativo e adequado, com os parâmetros de precisão, exatidão, estabilidade e efeito matriz aceitáveis. Em relação à estabilidade pós-processamento (amostras mantidas 24h no auto injetor), as amostras do CQA e do CQB apresentaram EPR menor do que 15%, o que é considerado adequado. Os resultados referentes aos parâmetros de validação em plasma humano da casg F e cas B estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros de validação do método bioanalítico ponderado ($1/y^2$) para quantificação da caseargrewiina F e casearina B em plasma humano ($n = 5$, $p = 0,05$).

		Casg F				Cas B			
		y = 33,21x + 0,2835				y = 8,749 + 0,2479			
Equação									
r		0,9913				0,9910			
Curva	Cochran	0,40				0,84			
de calibração	F ANOVA ^a	5887,6				3500,6			
Falta de ajuste ^b		1,37				0,019			
p valor		0,265				0,897			
		Intra-corrida		Inter-corrida		Intra-corrida		Inter-corrida	
		Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão	Precisão	Exatidão
		(CV%)	(EPR)	(CV%)	(EPR)	(CV%)	(EPR)	(CV%)	(EPR)
LIQ		11,4	-12,8	11,6	12,5	14,2	-15,9	3,2	17,3
CQB		10,4	11,3	12,8	8,1	3,7	6,9	11,6	9,8
CQM		10,7	-9,1	11,5	10,1	10,0	-3,2	10,8	4,1
CQA		4,71	-10,9	7,8	0,7	5,7	-4,7	10,2	-3,6
Estabilidade	CQA	7,3	0,5	-	-	9,4	13,4	-	-
pós-	CQB	13,9	12,4	-	-	7,8	10,5	-	-
processamento									
Efeito matriz	CQA	6,7	-	-	-	6,6	-	-	-
(FMN)	CQB	9,8	-	-	-	12,5	-	-	-

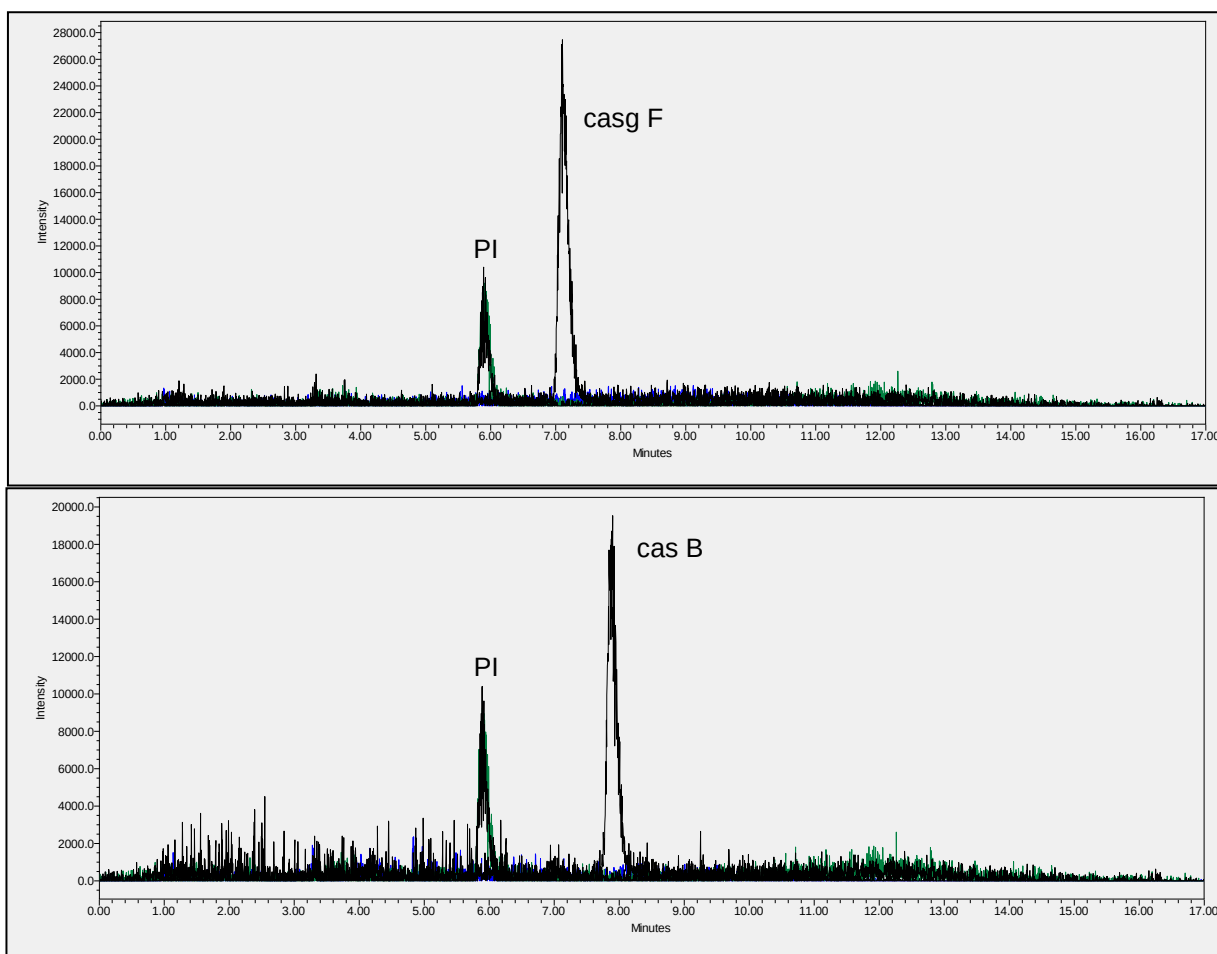
^a F tabelado: 4,38

^b F tabelado: 2,95

5.3.2.2 Matriz microssoma hepático humano

A avaliação da seletividade e efeito residual das amostras processadas em microssoma humano foram satisfatórios, demonstrando que os cromatogramas extraídos não apresentaram picos interferentes próximos ao t_R dos analitos. A Figura 24 representa os cromatogramas obtidos após o processamento das amostras em plasma humano.

Figura 24. Cromatogramas ESI⁺ (TIC) após extração em meio microssomal hepático humano da caseargrewiina F (casg F, t_R de 7,1 min) e casearina B (cas B, t_R de 7,9 min) a 0,039 µg/mL com padrão interno (PI, 50 µg/mL; t_R de 5,9 min). Legenda: Linha azul: amostra branco; Linha verde: amostra zero e Linha Preta: casg F, cas B e PI. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



Para ajuste da linearidade do método foi aplicada a ponderação $1/y^2$. Os resultados referentes aos parâmetros de validação da casg F e cas B em microssoma humano estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Parâmetros de validação do método bioanalítico ponderado ($1/y^2$) para quantificação da caseargrewiina F e casearina B em microssoma humano ($n = 5$, $p = 0,05$).

		Casg F		Cas B	
Curva de calibração	Equação	$y = 6,76x + 0,0334$		$y = 4,236x + 0,0801$	
	r	0,9921		0,9923	
	Cochran	0,61		0,60	
	F ANOVA	1360,9		1418,1	
	Falta de ajuste ^a	0,910		0,59	
	p valor ^b	0,49		0,71	
		Intra-corrida		Inter-corrida	
		Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)	Precisão (CV%)	Exatidão (EPR)
LIQ		9,1	13,5	3,8	-12,5
CQB		4,6	7,5	7,9	9,3
CQM		5,9	7,2	5,9	-9,9
CQA		7,7	0,7	7,7	-2,6
Estabilidade pós-processamento	CQA	7,4	0,5	-	-
	CQB	3,7	-10,9	-	-

^a F tabelado: 4,38

^b F tabelado: 2,95

5.4 Determinação de propriedades físico-químicas e biológicas da caseargrewiina F e casearina B

5.4.1 Determinação do coeficiente de partição octanol / água (log P)

5.4.1.1 Determinação *in silico*

Inicialmente, o log P e clog P de cada substância foram obtidos através do programa ChemDraw® Ultra 14, como apresentado na tabela 15.

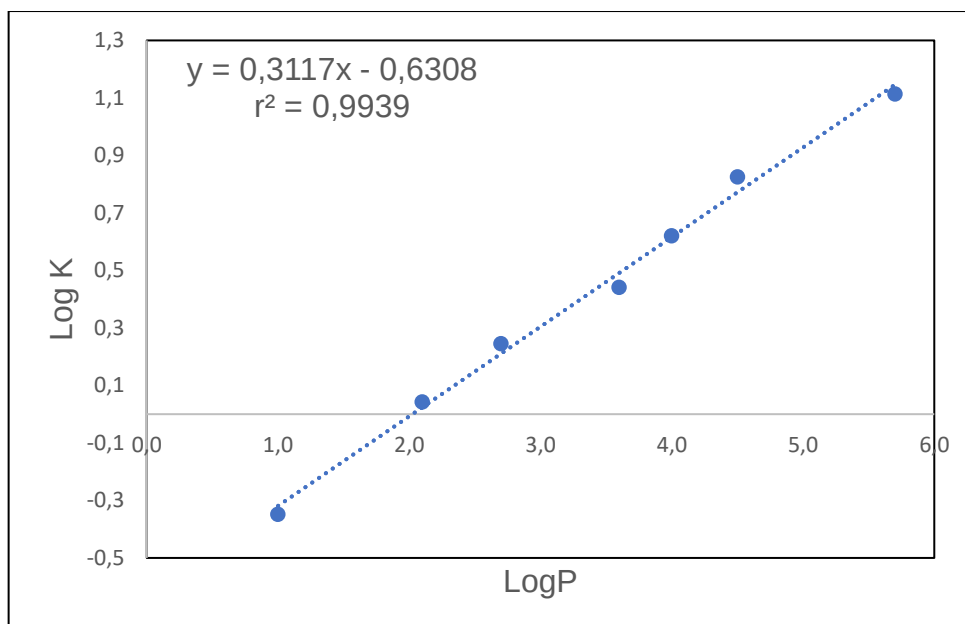
Tabela 15. Valores de log P obtidos para cada substância.

	ChemDraw®		Método Cromatográfico
	log P	clog P	log P
casg F	4,1	4,4	3,8
casg F dialdeído	2,9	4,7	3,6
cas B	3,9	4,7	4,0
cas B dialdeído	2,7	4,6	3,9

5.4.1.2 Determinação por método cromatográfico

Foram utilizadas 7 substâncias de referência compreendendo uma faixa ampla de log P: acetanilida (1,0), benzeno (2,1), tolueno (2,7), naftaleno (3,6), bifenila (4,0), fenantreno (4,5) e trifenilamina (5,7). Após análise em LC-UV, foi construída a curva analítica log P $\times$ log k (k: fator de retenção) que forneceu a equação $y = 0,3117x - 0,6308$, $r^2 = 0,9939$ (Figura 25). Através da regressão linear foi calculado o valor de log P de cada analito (OECD, 2004).

Figura 25. Curva analítica log P $\times$ log K das substâncias de referência.



Os resultados de log P obtidos pelo método cromatográfico (Tabela 15) foram mais próximos à determinação do log P do que em relação ao cLog P estimados pelo método de predição no software ChemDraw®. Como esperado, os diterpenos e seus dialdeídos se diferiram numa estreita faixa de valor de log P (3,6-4,0) já que são muito similares estruturalmente, sendo que os dialdeídos apresentaram valores de log P cerca de 0,2 unidade menor do que os respectivos diterpenos. Tais resultados confirmam a adequação de escolha do método cromatográfico para determinação do log P de diterpenos e seus dialdeídos, uma vez que a precisão desse método é aceitável para uma distribuição de log P de 0 a 6 (TAKÁCS-NOVÁK, 2012).

Esses valores indicam que essas substâncias possuem moderada lipofilicidade ($2,0 < \log P < 4,0$), e provavelmente exibem boa permeabilidade celular. Entretanto, deve-se levar em consideração a baixa solubilidade dos diterpenos em meios aquosos, o que pode prejudicar sua absorção no trato gastrointestinal. Substâncias com esses valores de $\log P$ geralmente possuem propriedades físico-químicas e ADME ideais para a administração oral. Além disso, o metabolismo hepático pode ser mais expressivo nesta faixa devido a maior afinidade às enzimas do fígado. Estudos sobre a permeabilidade em células Caco-2 da casearina X mostraram que ela foi capaz de permear a monocamada de células por transporte ativo, sem efluxo, mas com significativa retenção dentro das células. Assim, os resultados de $\log P$ em conjunto com os da permeabilidade aparente *in vitro* podem ser utilizados para estimar o grau de absorção das substâncias no trato gastrointestinal (SMITH; WATERBEEMD; WALKER, 2012; TAKÁCS-NOVÁK, 2012; MOREIRA DA SILVA et al., 2014).

5.4.2 Ensaio de estabilidade química da casg F e cas B em soluções aquosas de pHs 1,2; 7,4 e 9,0

O ensaio de estabilidade em soluções aquosas com diferentes valores de pH fisiológicos pode ser útil para investigar o comportamento dos diterpenos no trato gastrointestinal e nos fluídos corporais após administração oral, a qual é a mais comumente utilizada para derivados da *C. sylvestris* (FERREIRA et al., 2011). A vulnerabilidade química das substâncias depende da sua estrutura, e geralmente está envolvida com reações de hidrólise e oxidação no sistema biológico. O pH também influencia no equilíbrio molecular e iônico das moléculas, o que afeta diretamente a sua absorção e distribuição. Assim, a análise da estabilidade química ajuda a selecionar as substâncias mais promissoras e buscar estratégias para aumentar a biodisponibilidade oral (CHEN et al., 2006; KERNS; DI, 2007; DI; KERNS, 2009).

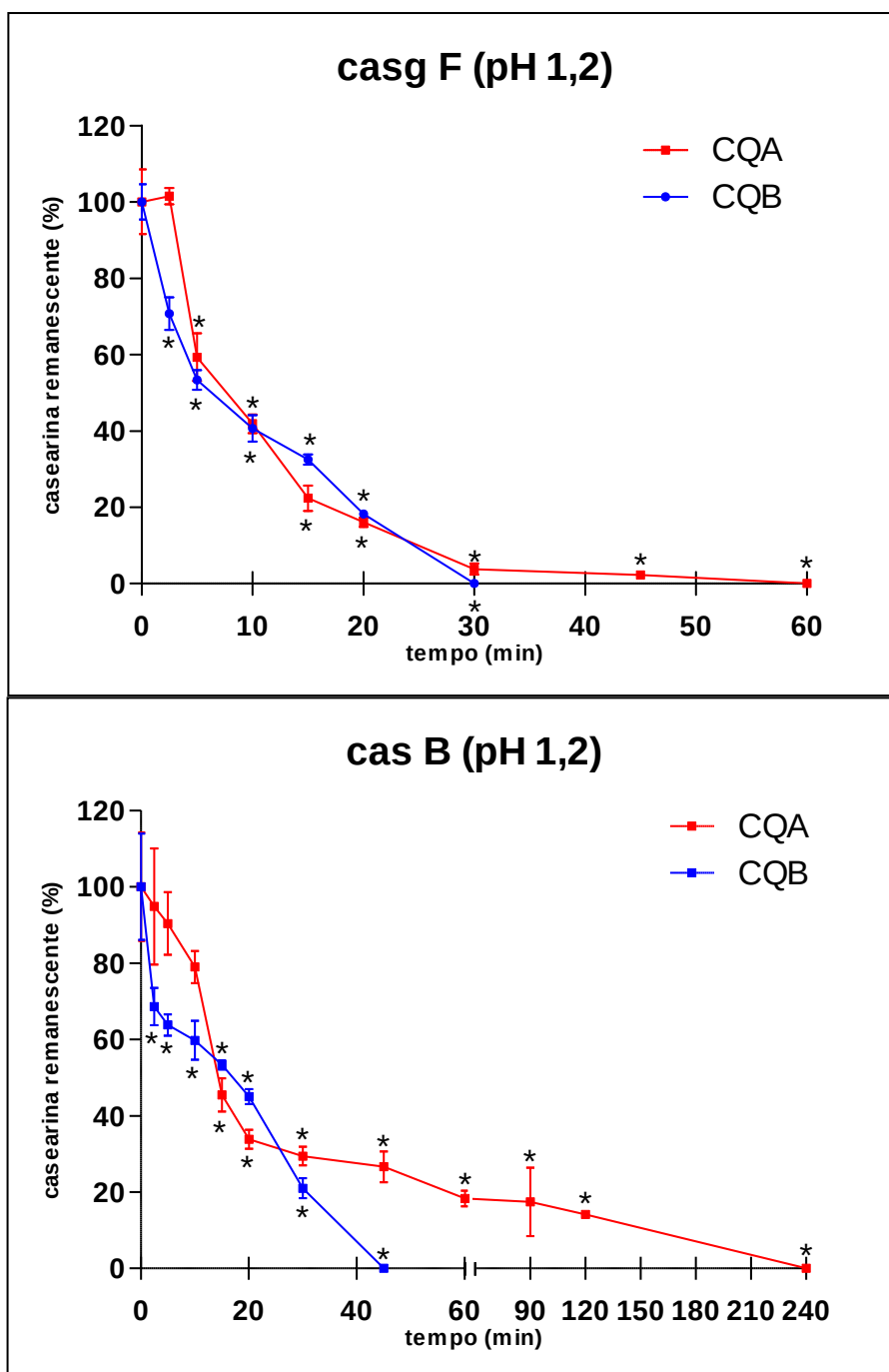
O estudo de estabilidade da casg F e cas B em soluções aquosas com diferentes valores de pH foram realizados de acordo com o método previamente validado (item 4.5.1) nas concentrações CQB (0,078 µg/mL) e CQA (1,0 µg/mL). O cálculo da porcentagem remanescente foi realizado através da comparação da

concentração de cada substância nos diferentes tempos analisados em relação ao tempo inicial.

5.4.2.1 Estabilidade em pH 1,2 (FGS)

Tanto a casg F quanto a cas B foram rapidamente degradadas ao serem submetidas ao meio de FGS, sendo que o decaimento de ambos diterpenos foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em apenas 2,5 min de incubação na menor concentração testada (CQB). As concentrações remanescentes da casg F e da cas B no CQA foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) do tempo inicial a partir de 5,0 e 15,0 min, respectivamente. Além disso, a casg F foi totalmente consumida em 60 min e a cas B em 240 min mesmo no CQA, uma vez que as concentrações de diterpenos remanescentes estavam abaixo do LIQ (0,039 $\mu\text{g/mL}$) do método analítico validado (Figura 26).

Figura 26. Estabilidade da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) no meio de fluído gástrico simulado (pH 1,2) (n = 3).



*estatisticamente significativo comparado ao tempo inicial (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os resultados indicam que casg F foi mais suscetível à degradação ácida do que a cas B, e ambas provavelmente sofrem intensa degradação ao passarem pelo estômago. A degradação provavelmente está relacionada com as reações de

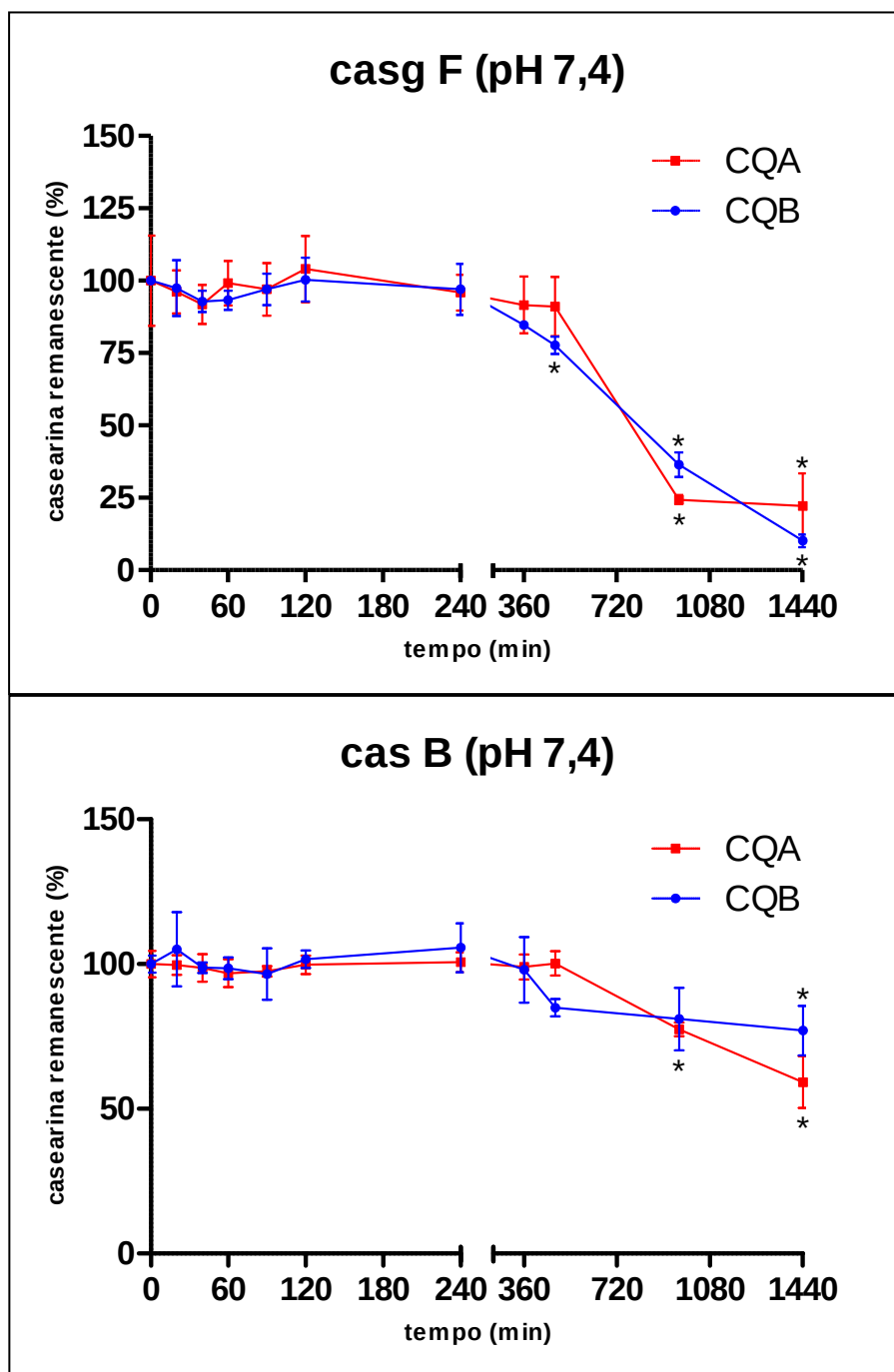
hidrólise ácida, as quais ocorrem comumente em fármacos, visto que as casearinas possuem muitos grupos ésteres. Tendo em vista o uso tradicional da *C. sylvestris* e seus derivados vegetais contendo casearinas, provavelmente não serão as moléculas inalteradas que serão absorvidas e terão atividade terapêutica, e sim os seus produtos de degradação ácida (ODA et al., 2019). É importante ressaltar que o pH também influencia no equilíbrio molecular e iônico das moléculas, e afeta diretamente a absorção e distribuição. Considerando a estrutura molecular dos diterpenos e seus derivados (grupamentos hidroxilas), a forma molecular é favorecida em meios ácidos. Desse modo, o pH estomacal favorece a absorção dessas moléculas no estômago (KERNES; DI, 2007).

A análise da estabilidade química de fármacos é indicada para selecionar as substâncias mais promissoras ou propor estratégias farmacotécnicas para evitar a interferência da degradação ou aumentar a absorção visando maior biodisponibilidade (CHEN et al., 2006; KERNES; DI, 2007; DI; KERNES, 2009). Tais estratégias nem sempre são aplicáveis aos produtos naturais. Apesar do extrato etanólico de *C. sylvestris* e os diterpenos casg F e cas B terem demonstrado atividade anti-inflamatória via oral em modelos animais, o mecanismo de ação ainda não é elucidado e os mesmos não apresentaram atividade em ensaios *in vitro* de inibição de óxido nítrico em macrófagos nem em ensaios imunoenzimáticos de COX-I e II. Assim, podem ser os seus produtos de degradação formados durante a passagem pelo trato gastrointestinal que chegam nos sítios de ação e desempenham atividade. Desse modo, não seria interessante a utilização de formulações gastrorresistentes (ODA et al., 2019).

5.4.2.1 Estabilidade em pH 7,4 (Hank's)

No CQB, as concentrações remanescentes da casg F e cas B apenas foram estatisticamente diferentes da concentração inicial ($p < 0,05$) após ficarem 480 e 1440 min incubadas nesse tampão. Em relação ao CQA, esse tempo foi de 960 min para ambos diterpenos (Figura 27).

Figura 27. Estabilidade da caseargreina F (casg F) e casearina B (cas B) no tampão Hank's (pH 7,4) (n = 3).



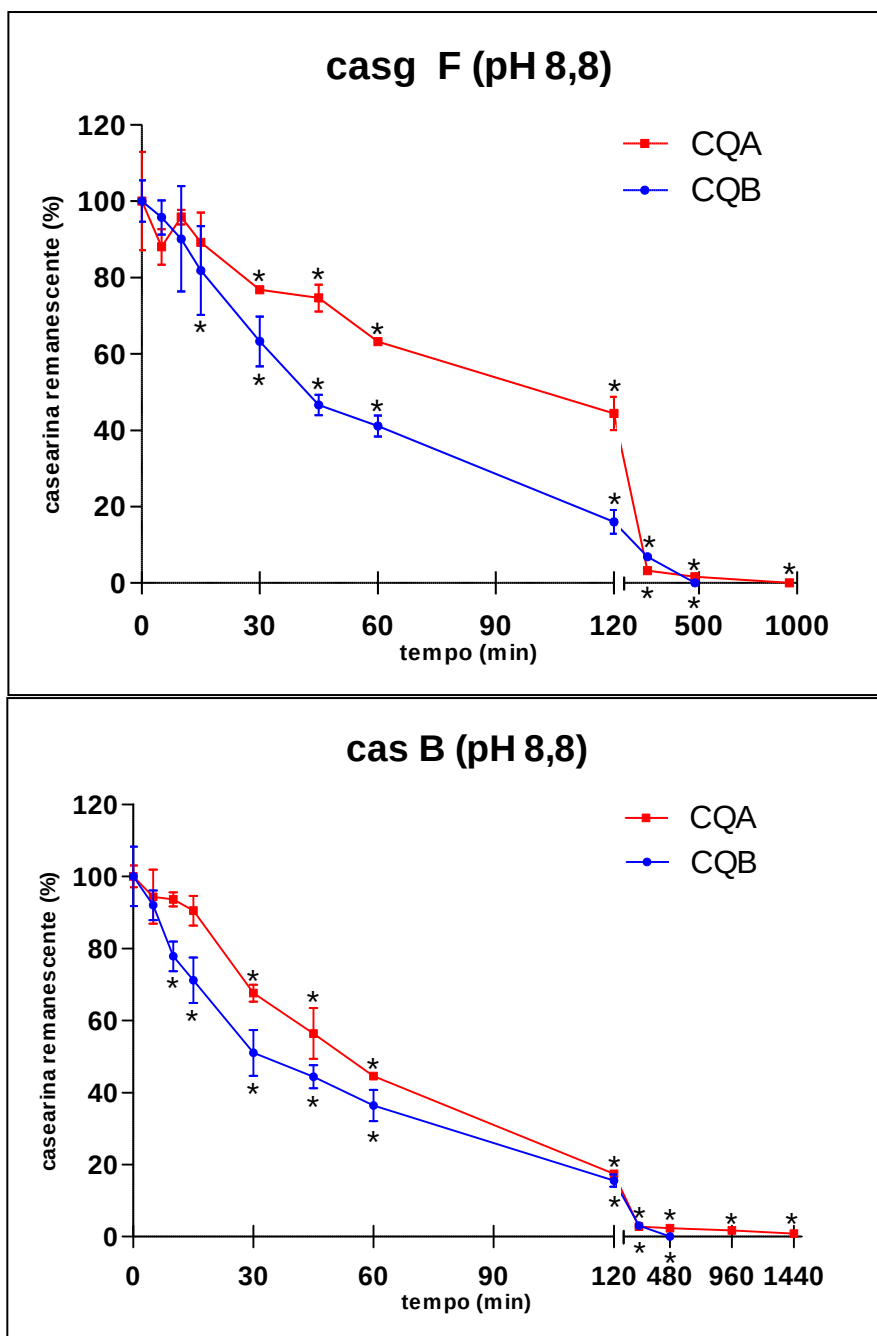
*estatisticamente significativo comparado ao tempo inicial (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

A concentração de casg F remanescente após 24 h foi de aproximadamente 30% em ambas concentrações testadas. Por outro lado, a cas B foi mais estável, permanecendo cerca de 60% inalterada mesmo após as 24 h de incubação do CQA e CQB. Esses resultados indicam que a concentração de diterpenos nos fluidos corporais, como o sangue, serão pouco influenciadas pela degradação química.

5.4.2.2 Estabilidade em pH 8,8 (TRIS)

Os resultados do estudo de estabilidade química dos diterpenos em solução de pH 8,8 estão representados nas Figura 28.

Figura 28. Estabilidade da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) no tampão TRIS (pH 8,8) (n = 3).



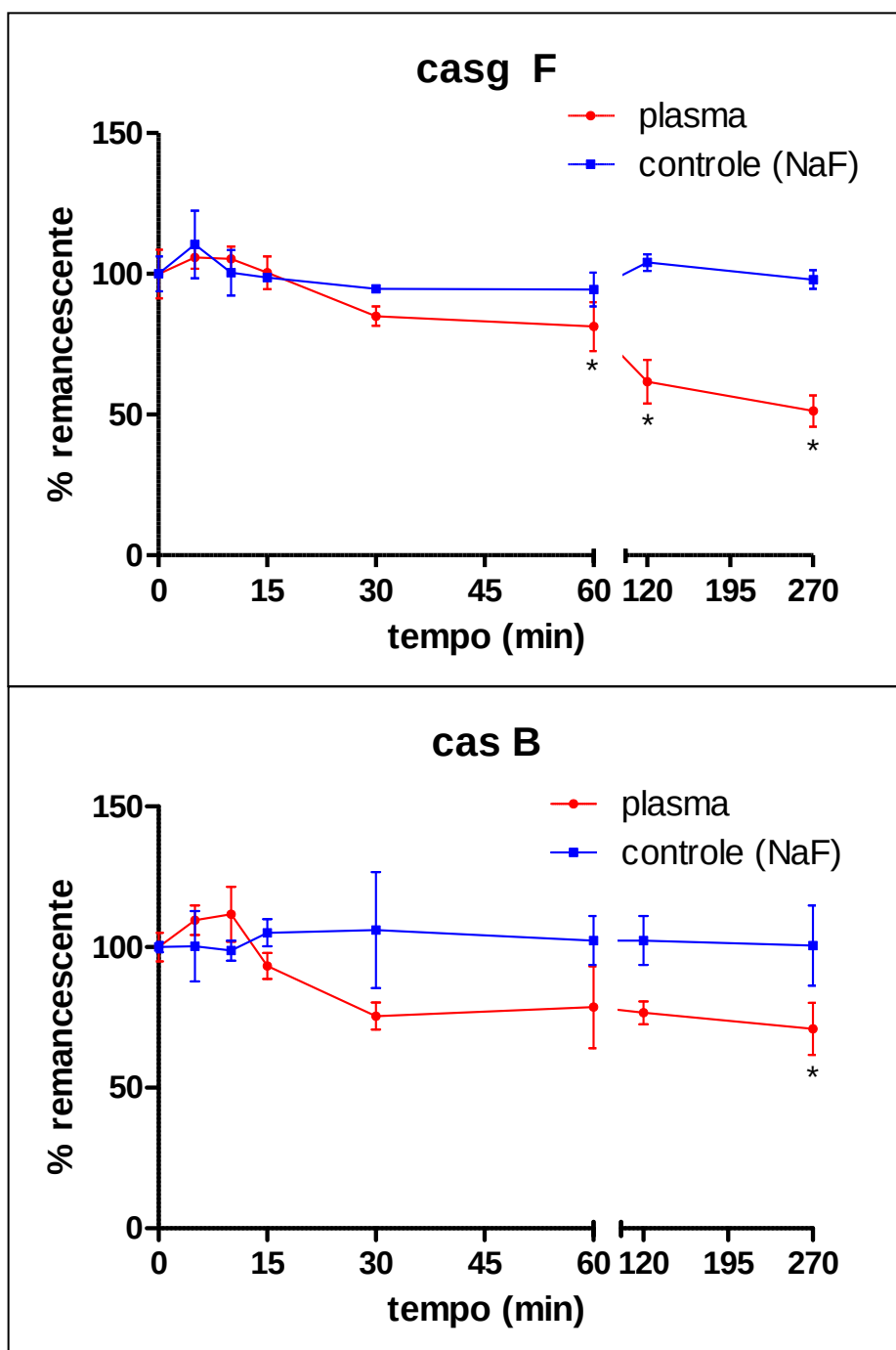
*estatisticamente significativo comparado ao tempo inicial (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

Ambos diterpenos sofreram degradação em tampão TRIS, porém com menor intensidade do que no pH ácido, uma vez que neste caso as concentrações remanescentes de casg F e cas B foram menores ($p < 0,05$) em menor intervalo de tempo. No CQB, as concentrações remanescentes da casg F e cas B foram estatisticamente diferentes da concentração inicial ($p < 0,05$) após 15 e 10 min de incubação no tampão TRIS, respectivamente. Em relação ao CQA, a diferença estatisticamente significativa da concentração de ambos diterpenos em relação ao tempo inicial só foi observada após 30 min de incubação. Além disso, a casg F e cas B foram praticamente totalmente consumidas em 240 min nas duas concentrações testadas, uma vez que as concentrações remanescentes estavam abaixo do LIQ ($0,039 \mu\text{g/mL}$) do método analítico validado. Esses resultados indicam que os diterpenos podem sofrer degradação química ao passarem pelo intestino, provavelmente devido à hidrólise básica dos ésteres presentes em sua estrutura.

5.4.3 Ensaio de estabilidade *ex vivo* da casg F e cas B em plasma humano

A estabilidade *ex vivo* (plasma humano) da casg F e cas B foi avaliada durante o período equivalente ao ensaio de ligação a proteínas plasmáticas (4,5 h). O controle da estabilidade foi avaliado através da pré-incubação (10 min) do plasma com o inibidor enzimático NaF (200 mM, controle negativo). A concentração utilizada foi de $1,0 \mu\text{g/mL}$, o equivalente a $1,98 \mu\text{M}$ para casg F e $1,73 \mu\text{M}$ para cas B (DI et al., 2005). Os resultados do estudo de estabilidade *ex vivo* dos diterpenos estão representados nas Figura 29.

Figura 29. Estabilidade da caseargrewiina F (casg F; 1,0 µg/mL) e casearina B (cas B; 1,0 µg/mL) em plasma humano (n = 3).



*estatisticamente significativo comparado ao tempo inicial (ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

As concentrações remanescentes de ambos diterpenos apenas diminuíram significativamente em relação à concentração inicial ($p < 0,05$) após 60 e 270 min de

incubação. Mesmo após 270 min, a porcentagem de diterpeno remanescente foi de aproximadamente 50% de casg F e 75% de cas B.

O decaimento das concentrações de diterpenos pode ser atribuído à ação de esterases plasmáticas, pois quando o plasma foi previamente tratado com o inibidor de esterases NaF (200 mM), não foi observado decaimento estatisticamente significativo durante todo o período de incubação ($p < 0,05$) (controle NaF). Os resultados são coerentes com os dados de estabilidade em tampão Hank's (pH 7,4), já que é equivalente ao pH fisiológico sanguíneo, onde a casg F e cas B foram estáveis ($p < 0,05$) até 960 min incubadas nesse tampão (KOITKA et al., 2010).

As esterases mais comuns encontradas no plasma humano são as carboxilesterases, as quais podem se ligar especificadamente em uma grande variedade de substratos e hidrolisar vários ésteres. Desse modo, elas podem ser as responsáveis pela metabolização dos diterpenos e podem influenciar nas suas concentrações ao serem distribuídos pelo organismo através do plasma. Essa hipótese está de acordo com estudos anteriores de metabolização da casearina X, uma vez que ela foi substrato para as carboxilesterases de microssomas hepáticos de ratos e humanos e de células Caco-2 (KOITKA et al., 2010; NISHIMUTA; HOUSTON; GALENTIN, 2014; MOREIRA DA SILVA, 2018).

Em comparação com as enzimas microssomais, a atividade das enzimas plasmáticas é mais robusta. Isso porque a manutenção da atividade das enzimas plasmáticas não é alterada e nem se inibem facilmente dependendo da concentração do substrato. Além disso, resultados mostraram que concentrações de solvente orgânico até 2,5% não causam diminuição da eficácia da atividade enzimática, sendo que em esterases microssomais esse limite é de até 0,1% de solvente orgânico. Esses fatos, em conjunto com o controle NaF, justificam que as concentrações de diterpenos e solventes foram adequadas no ensaio realizado (DI et al., 2005; ZHANG et al., 2014).

5.4.4 Determinação da fração de diterpeno livre em plasma (f_{up}) e em meio microssomal humano (f_{um})

A fração livre de casg F e cas B em plasma e em meio microssomal humanos foi investigada pelo método de ultracentrifugação (Tabela 16). A taxa média de

ligação da casg F foi de 74,1 e 77,1% em plasma e microsossomas, respectivamente, enquanto a cas B apresentou valores próximos, com taxa de ligação de 86,7 e 87,1%, respectivamente. Esses dados foram próximos aos da casearina X com taxa de ligação de 87,1 em plasma e 87,3% em microsossomas humanos. Os valores são considerados altos, e provavelmente estão relacionadas com a lipofilicidade dos diterpenos demonstrada pelos valores de log P próximos a 4,0 (OBACH et al., 1997; PARFITT, 1999; MOREIRA DA SILVA et al., 2018).

Tabela 16. Taxa de ligação a proteínas de plasma e de microsossomas humanos das caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) nas concentrações de 1 e 10 µg/mL pelo método de ultracentrifugação (n = 2). Média (desvio padrão).

Concentração (µg/mL)	% de ligação a proteínas (DP)			
	casg F		cas B	
	plasma	microsossoma	plasma	microsossoma
1	75,3 (3,2)	77,0 (1,9)	86,1 (2,8)	87,4 (2,4)
10	73,0 (8,2)	77,2 (2,2)	87,2 (3,9)	86,8 (1,6)
Média	74,1	77,1	86,7	87,1

DP: Desvio padrão

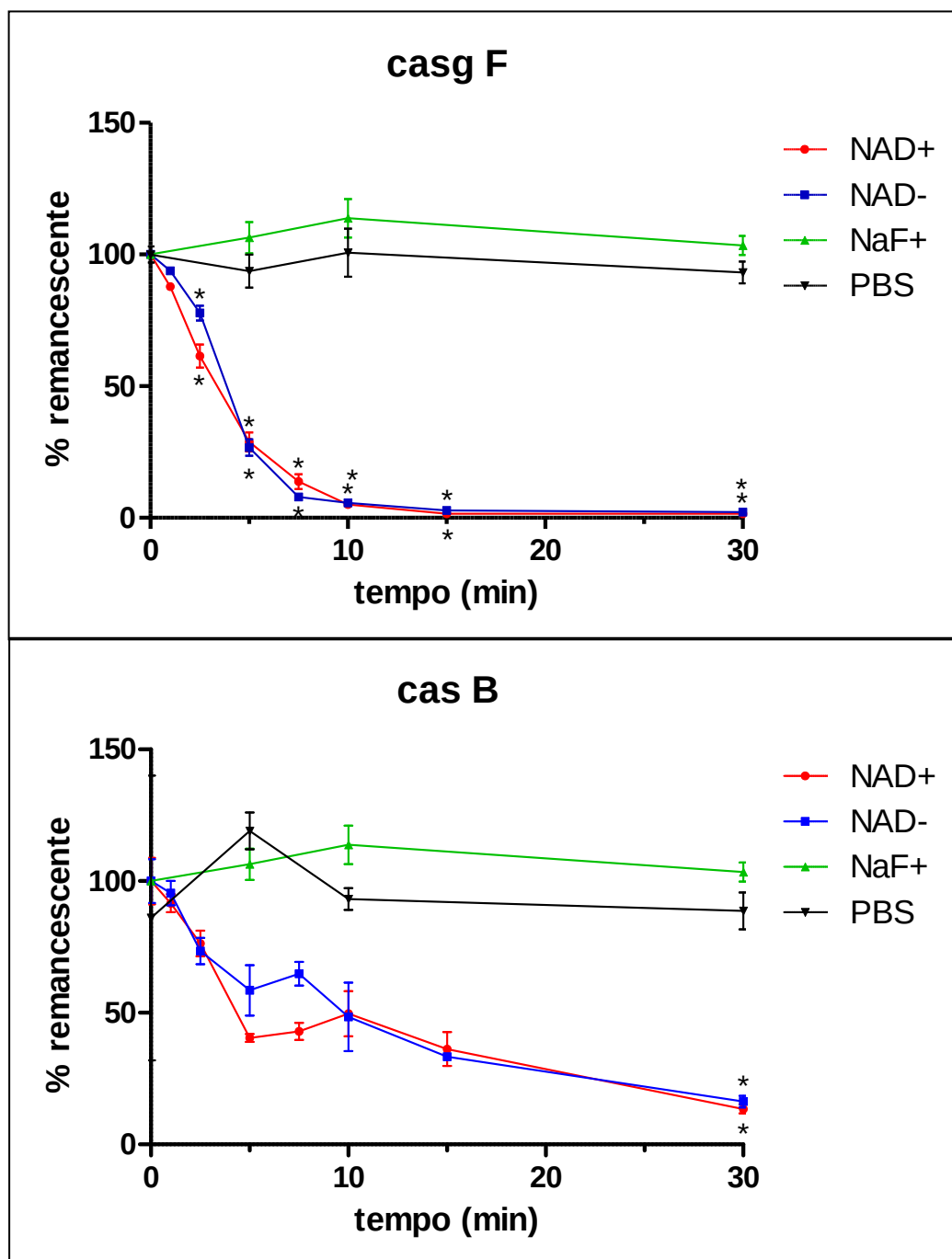
A f_{up} e f_{um} da casg F foi de 0,26 e 0,23 em plasma e microsossomas, respectivamente, enquanto que a f_{up} e a f_{um} da cas B foi de 0,13 nos dois meios. A fração de diterpeno não ligada a proteínas em ambos meios permaneceu relativamente inalterada nas concentrações testadas (1,0 e 10 µg/mL), indicando que não ocorreram saturações na ligação nessa faixa de concentração. (OBACH et al., 1997; PARFITT, 1999; MOREIRA DA SILVA et al., 2018).

Conhecer a taxa de ligação dos fármacos (ou marcadores químicos ativos de fitoterápicos) a proteínas biológicas é importante pois está envolvida com o processo de distribuição e ação da substância no organismo. Apenas a fração não ligada no plasma ou nos tecidos é capaz de cruzar membranas biológicas, interagir com enzimas, receptores ou alvos da toxicidade (OBACH et al., 1999).

5.4.5 Ensaio de estabilidade metabólica dos diterpenos em microsossomas hepáticos de humanos

Foi observado o decaimento do diclofenaco (controle positivo), como esperado, demonstrando a funcionalidade das enzimas e SRN. A concentração de 1,0 µg/mL (1,98 µM para casg F e 1,73 µM para cas B) foi estabelecida segundo estudos anteriores envolvendo a casearina X onde não ocorreu a inibição das enzimas na concentração de 0,2 mg/mL (MOREIRA DA SILVA et al., 2018). Os resultados estão expressos nos gráficos de decaimento da casg F e cas B (Figura 30).

Figura 30. Estabilidade da caseargrewiina F (casg F; 1,0 µg/mL) e casearina B (cas B; 1,0 µg/mL) em meio microsomal hepático humano (0,2 mg/mL) (n = 3).



*estatisticamente significativo comparado ao tempo inicial (ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste de Tukey, $p < 0,05$).

Pode-se constatar que a casg F foi metabolizada mais rapidamente do que a cas B. Um progressivo decaimento linear da casg F foi observado em apenas 10 min de metabolização, enquanto que para a cas B esse decaimento linear ocorreu em um maior intervalo de tempo, 15 min, restando cerca de 5 e 30% de casearina

remanescente, respectivamente. As concentrações remanescentes da casg F e cas B diminuíram significativamente em relação às concentrações iniciais ($p < 0,05$) após 2,5 e 30 min de incubação, respectivamente, em microssomas com e sem o SRN. O decaimento das concentrações de ambos diterpenos não foi constatado ($p < 0,05$) mesmo após os 30 min de incubação em tampão PBS (controle negativo). Isso indica que a casg F e a cas B são substratos para as enzimas microssomais humanas e que as condições estabelecidas nos ensaios foram adequadas. Além disso, foi escolhido o tempo de 5 min de reação para aplicação nos ensaios de cinética enzimática, já que nesse tempo o decaimento dos substratos foi linear, indicando que o sistema enzimático está em estado estacionário (saturação das enzimas).

A equação da regressão linear do gráfico de decaimento (NAD-) do logaritmo da quantidade de substrato remanescente e o tempo de incubação da casg F e cas B foram $y = -0,1107x + 2,0585$ e $y = -0,0491x + 2,0075$, respectivamente. Assim, a k_{el} da casg F foi determinada como 0,1107 e a k_{el} da cas B como 0,0491. Portanto, através da divisão do $\ln 2$ pela k_{el} foi calculada a meia vida da casg F (6,3 min) e cas B (14,1 min).

A similaridade do perfil de decaimento das curvas de cada diterpeno entre as metabolizações com e sem os cofatores de SRN indicam que o metabolismo da casg F e cas B não é mediado por enzimas do CYP 450 (CYP), apesar desse sistema englobar uma série de enzimas responsáveis pela metabolização de grande parte de fármacos. Isso porque o NADPH é vital para a atividade dessas enzimas, sendo responsável pela transferência de elétrons que ocorrem nas reações de oxidação. Desse modo, o metabolismo dos diterpenos provavelmente não está sujeito às variações da capacidade metabólica das enzimas do CYP, a qual pode variar entre os indivíduos por causa genética, de gênero e idade, ou devido à interação com substâncias exógenas. (MAZUR et al. 2009; EMOTO et al., 2010; BAUERMEISTER et al. 2016; ZVEREVA et al. 2016).

A partir de estudos anteriores que apontaram que a casearina X é substrato de esterases microssomais hepáticas, a casg F e cas B também foram submetidas à metabolização após incubação prévia com o inibidor de esterases NaF (200 mM). O perfil de decaimento dos diterpenos foram respectivamente semelhantes aos do tampão PBS, onde a concentração remanescente de ambos diterpenos não diminuiu

significativamente ($p < 0,05$) mesmo após os 30 min de incubação. Tais resultados nortearam os ensaios desse trabalho que envolviam o uso de microssoma e plasma humano em relação à utilização de NaF para evitar a degradação quando necessário e a não utilização de cofatores de regeneração de NADPH em microssoma, evitando gastos dispensáveis.

5.5 Estudo de degradação do EetCs e diterpenos em fluido gástrico simulado

Para análise dos produtos de degradação ácida (PDA) oriundos da casg F (PDA-F) e cas B (PDA-B), estas foram incubadas em FGS por 60 min, equivalente ao tempo médio que os alimentos permanecem no estômago humano. O controle da degradação dos diterpenos e extrato em tampão PBS (pH 7,4) nas mesmas condições do ensaio com FGS foi utilizada para a seleção dos picos oriundos da degradação ácida.

5.5.1 Análises dos PDA por LC-DAD/UV

A condição cromatográfica utilizada na análise por LC-DAD/UV foi a mesma do extrato e frações da *C. sylvestris* (item 4.3.2), já que essa condição foi previamente otimizada e apresenta eficiência na separação dos PDA, os quais possuem pequenas mudanças estruturais em relação aos diterpenos (ODA et al., 2019).

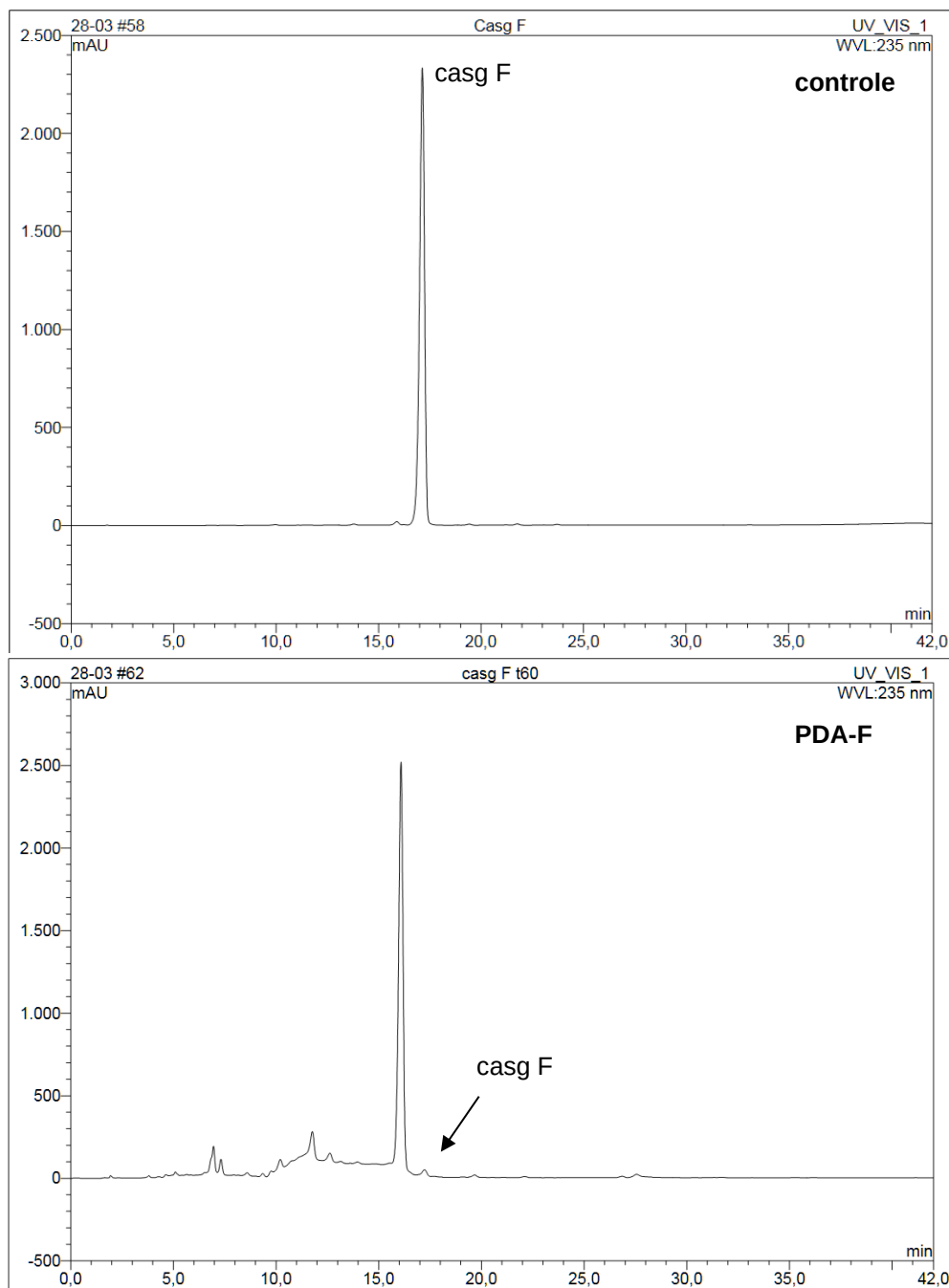
A comparação dos t_R e espectros de absorção na região do UV com padrões purificados foi utilizada para confirmar a presença da cas B e casg F nos PDA. A ordem de eluição dos produtos foi considerada para as propostas estruturais, visto que a estrutura química das substâncias interfere nas diferentes interações em fase reversa. Em geral, as substâncias menos polares tendem a interagir mais com a FE da coluna e apresentam maior t_R do que as mais polares (SNYDER et al., 2010).

- Caseargrewiina F

Os picos com t_R de 6,8; 7,2; 10,1; 11,3 e 16,0 min (majoritário) no cromatograma dos PDA-F obtido por LC-DAD/UV (Figura 31) apresentaram espectro de absorção na região do UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 233 e 234 nm. Tal fato indica que o dieno conjugado C-12 e 14 ($\lambda_{\text{máx}}$ 232-235 nm) presente na estrutura da casg F foi

preservado nos produtos formados após a incubação em FGS (CARVALHO et al., 2009).

Figura 31. Cromatogramas do controle da caseargrewiina F (casg F, t_R de 16,9 min, PBS 0,1 M) e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-F) em FGS por 60 min. Amostras: 500 µg/mL. Análise em LC-DAD/UV, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% em 42 min; vazão de 0,8 mL/min; 235 nm.



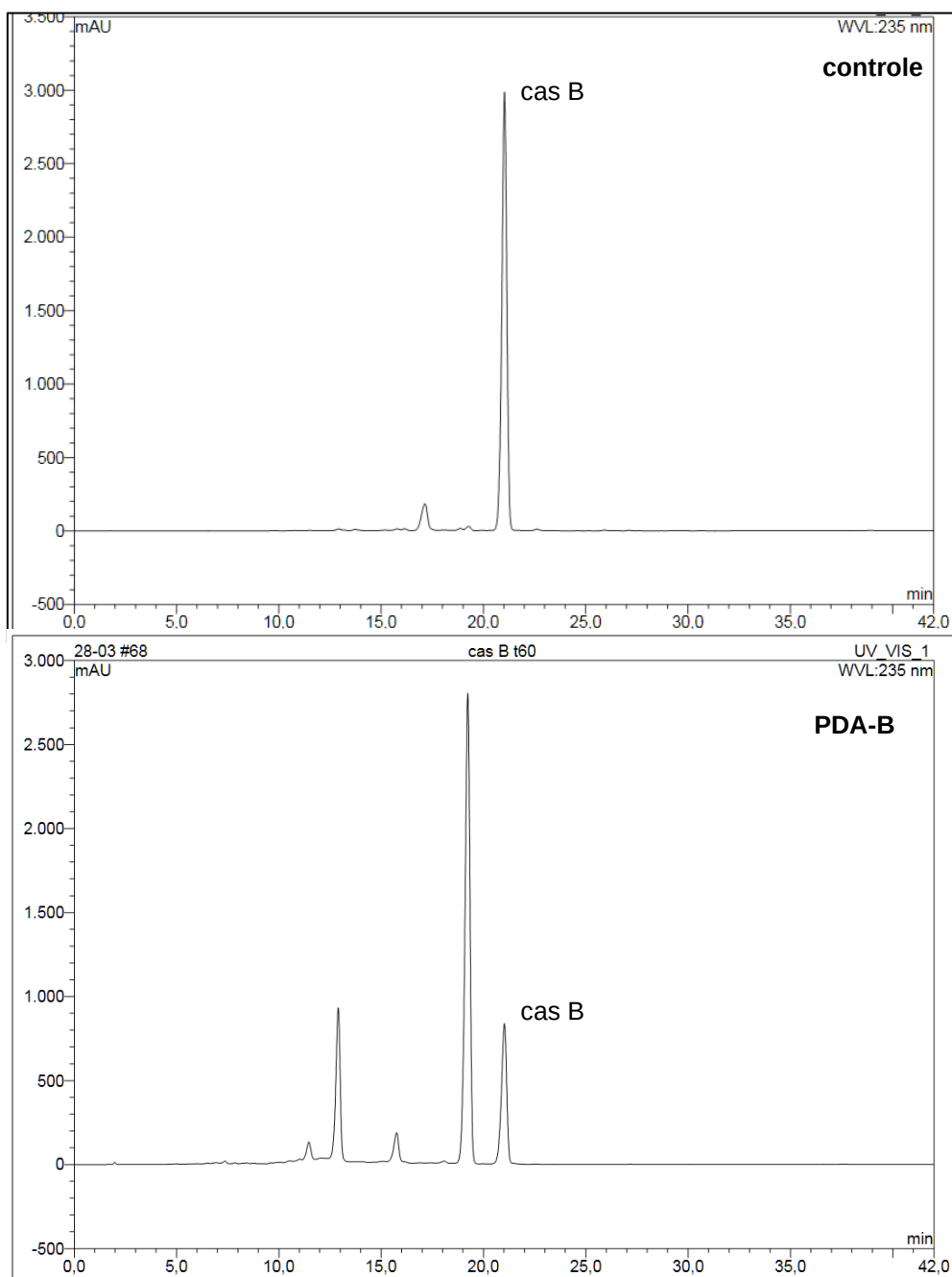
A casg F foi quantificada nos PDA-F por LC-DAD/UV. Para isso, foi utilizada a curva analítica da casg F, cuja equação foi: $y = 1,2508x + 0,0769$, $r^2 = 0,9996$. A

concentração de casg F foi obtida através da regressão linear do valor da área relativa ao seu pico (t_R de 16,9 min), e o seu teor foi de 0,35% (m/m). Em relação à normalização das áreas dos picos do cromatograma dos PDA-F, o valor referente ao pico da casg F variou de 98,6% no controle para 1,4% (m/m) nos PDA. Essa variação na concentração de casg F remanescente foi coerente com o ensaio de estabilidade da casg F em solução de pH 1,2 (FGS) (item 5.4.2.1).

- Casearina B

Da mesma maneira do que o observado para os PDA-F, não ocorreu alteração no dieno conjugado C-12 e 14 ($\lambda_{\text{máx}}$ 232-235 nm) dos PDA-B após degradação em FGS, uma vez que os espectros na região do UV dos picos com t_R de 11,4; 12,9; 15,7; 19,2 (majoritário) do cromatograma obtido por LC-DAD/UV (Figura 32) apresentaram $\lambda_{\text{máx}}$ de 234 nm.

Figura 32. Cromatogramas do controle da casearina B (cas B, t_R de 20,9 min, PBS 0,1 M) e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-B) em FGS por 60 min (500 $\mu\text{g/mL}$). Amostras: 500 $\mu\text{g/mL}$. Análise em LC-DAD/UV, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm), gradiente linear de MeCN 55-100% em 42 min; vazão de 0,8 mL/min; 235 nm.



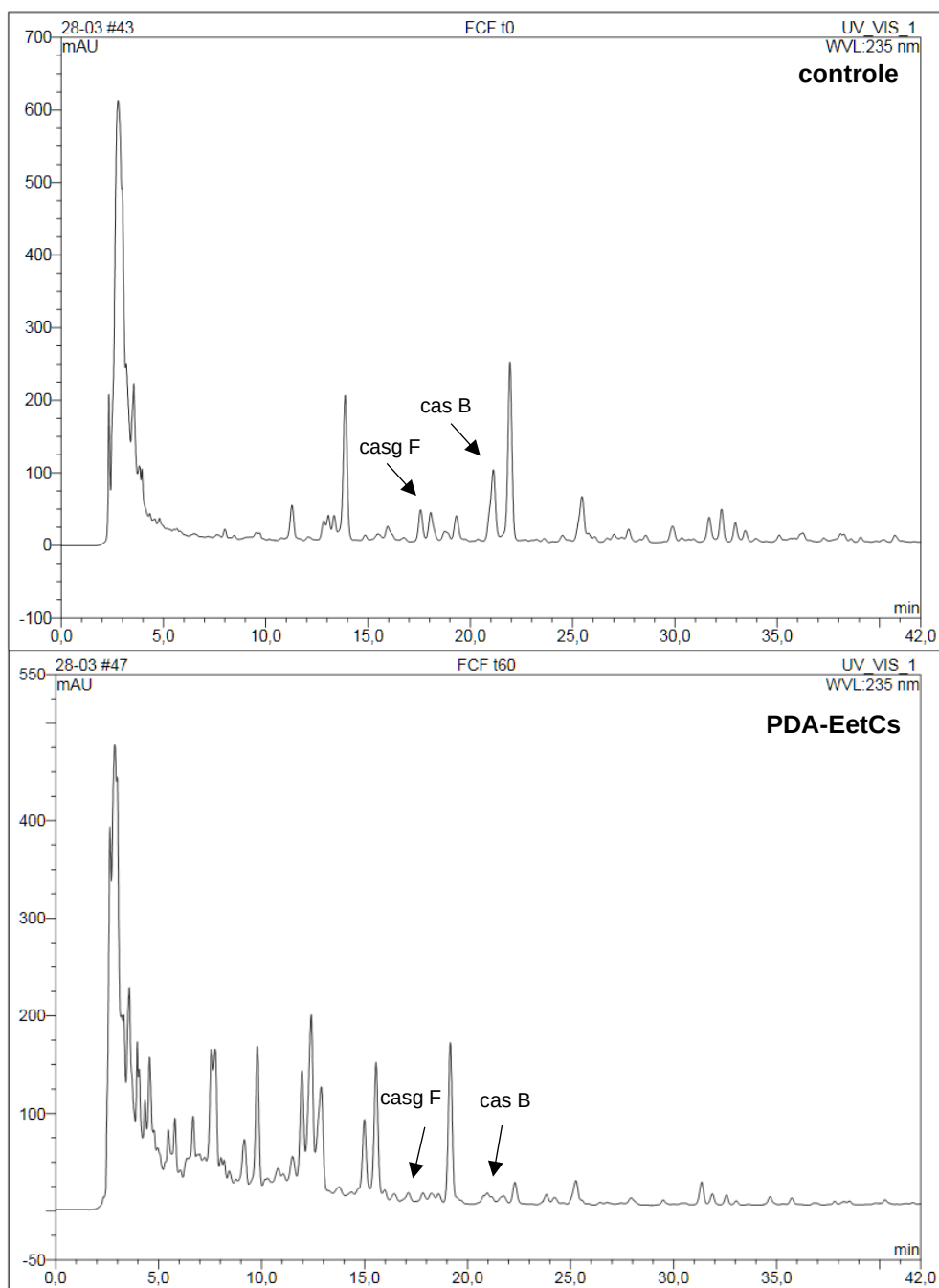
A quantificação de cas B nos PDA-B por LC-DAD/UV foi realizada utilizando a regressão linear da curva analítica da cas B: $y = 1,1032x + 0,02654$ $r^2 = 0,9998$. O teor de cas B remanescente nos PDA-B foi de 11,4% (m/m). Em relação à

normalização das áreas dos picos no cromatograma dos PDA-B, o valor referente ao pico da cas B decaiu de 95,7 % no controle para 17,5% após 60 min. O teor de cas B remanescente foi superior ao calculado para a casg F, sendo que esta apresenta maior instabilidade em meio FGS. Esses fatos foram coerentes com os resultados do ensaio de estabilidade da cas B em solução de pH 1,2 (FGS) (item 5.4.2.1).

- Extrato etanólico

O extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* também foi submetido à degradação ácida em FGS. Através da análise por LC-UV (item 4.3.2) pode-se observar que após 60 min de reação ocorreu a diminuição da intensidade de substâncias com t_R de 15 a 25 min e espectro de absorção UV típico das casearinas ($\lambda_{m\acute{a}x}$: 232-235 nm) (CARVALHO et al., 2009; CLAUDINO et al., 2013). Por sua vez, alguns picos com menor t_R tiveram a intensidade aumentada e vários novos surgiram com esse mesmo espectro característico (Figura 33). Esse fato provavelmente está relacionado com a degradação ácida das casearinas presentes no extrato (hidrólise), com consequente formação de seus produtos mais polares, os quais têm menor t_R em C18 (ODA et al., 2019).

Figura 33. Cromatogramas (LC-DAD/UV) do controle do extrato e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-EetCs) em FGS por 60 min (3,0 mg/mL). Amostras: 3,0 mg/mL. Análise em LC-DAD/UV, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), gradiente linear de MeCN 55-100% em 42 min; vazão de 0,8 mL/min; 235 nm.



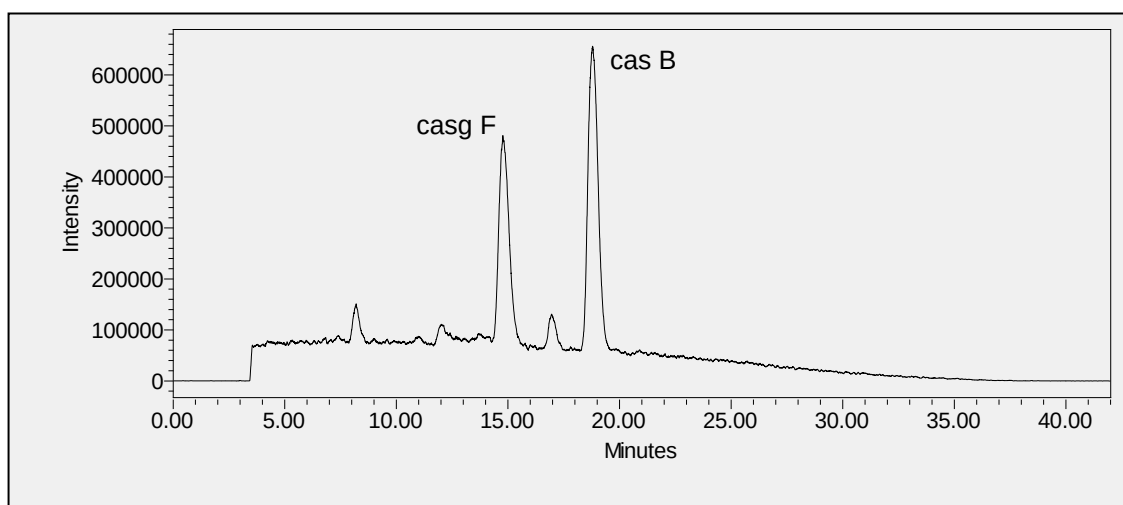
Os picos relativos à casg F e cas B foram identificados no controle de degradação do extrato e, após os 60 min de reação as intensidades desses picos no cromatograma diminuiriam muito. Isso mostra que o padrão de degradação ácida

destes diterpenos é similar quando estão no extrato ou purificados. Desse modo, a matriz complexa com várias substâncias não interfere na ação estomacal de hidrólise dos diterpenos.

5.5.2 Análises dos PDA por LC-MS

Inicialmente, utilizando-se o equipamento Waters® ACQUITY QDA, as condições de análise dos diterpenos e seus produtos de degradação foram otimizadas, utilizando gradiente de fase móvel água: MeCN por tratar-se de uma mistura complexa de substâncias com ampla faixa de fatores de retenção (k). Como aditivo foi utilizado 0,1 % de ácido fórmico nos solventes para melhor ionização das substâncias analisadas (Figura 34).

Figura 34. Cromatograma (TIC) ESI⁺ da caseargrewiina F (casg F, t_R de 15,0 min) e casearina B (cas B, t_R de 18,9 min) a 10,0 µg/mL em acetonitrila. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min.



Tanto para a casg F (504 Da) e cas B (576 Da) remanescentes quanto para os seus produtos de degradação foram observados íons apenas no modo positivo, com moléculas protonadas $[M + H]^+$ ou coordenadas com íon amônio $[M + NH_4]^+$ ou metais alcalinos $[M + K]^+$ e $[M + Na]^+$. Houve predomínio de formação de íons adutos com sódio e potássio provavelmente porque a estrutura química oxigenada das casearinas favorecem a formação de adutos com esses cátions em ESI⁺, como já

visto em estudos anteriores (SANTOS et al., 2010; BUENO, 2015; ODA et al., 2019; DANUELLO et al., 2020).

Os diterpenos e seus produtos sofreram fragmentações mesmo em MS¹, de modo que em alguns espectros o pico do íon precursor não era o pico base (fragmentação na fonte de ionização). Sabe-se que os substituintes R₁₋₅ podem ser perdidos pela fragmentação dos diterpenos, como já apontado anteriormente para casearinas (ODA et al., 2019; DANUELLO et al., 2020). Assim, foi observada a perda de fragmentos neutros de 42, 60 e 88 Da, atribuídos ao ceteno, ácido acético e ácido butanoico, respectivamente. A identificação dos produtos de degradação ácida (PDA) foi realizada a partir da análise dos espectros de massas dos picos majoritários nos cromatogramas obtidos por LC-MS.

- **Caseargrewiina F**

O cromatograma dos PDA-F obtido por LC-MS apresentou perfil semelhante ao cromatograma obtido por LC-UV. Foi observada a degradação quase que total da casg F (t_R de 16,8 min) com espectro de massas (Apêndice 18) com pico de *m/z* 527 Da [M + Na]⁺, com concomitante formação de um produto majoritário com t_R de 15,5 min (Figura 35). Esse produto apresentou espectro de massas com pico base de *m/z* 425 Da (Apêndice 19) cujo valor é relativo ao dialdeído da casg F como íon aduto de sódio [M + Na]⁺ (Figura 36). A formação dessa substância ocorre após o rompimento do anel diacetálico presente nos diterpenos clerodânicos. Geralmente, o mecanismo de reação ocorre com a protonação do oxigênio acetálico (catalise ácida específica). Entretanto, a formação do dialdeído pode ser favorecida através da hidrólise dos substituintes esterificados do anel diacetálico (C-18 e C-19) com a formação de intermediário di-hemiacetal cíclico, já que em solução aquosa ácida o equilíbrio é muito favorecido nesse sentido (ODA et al., 2019). Os produtos com t_R de 8,1 e 11,3 min geraram espectros com pico base de *m/z* 443 (Apêndice 20), cujo valor corresponde ao íon [M + Na]⁺ da molécula de casg F após a hidrólise ácida dos 2 substituintes acetato C-18 e C-19 (casg F deacetilada) ou da molécula de dialdeído da casg F com uma hidratação no C-18 ou C-19 (casg F dialdeído hidratada). Entretanto, essas informações foram confirmadas posteriormente por UPLC-QTOF-MS/MS.

Figura 35. Cromatogramas (TIC) ESI⁺ do controle da caseargreina F (casg F, t_R de 16,8 min, PBS 0,1 M) e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-F) em FGS por 60 min. Identificação: dialdeído da caseargreina F (casg F dialdeído, t_R de 15,5 min). Amostras: 500 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min.

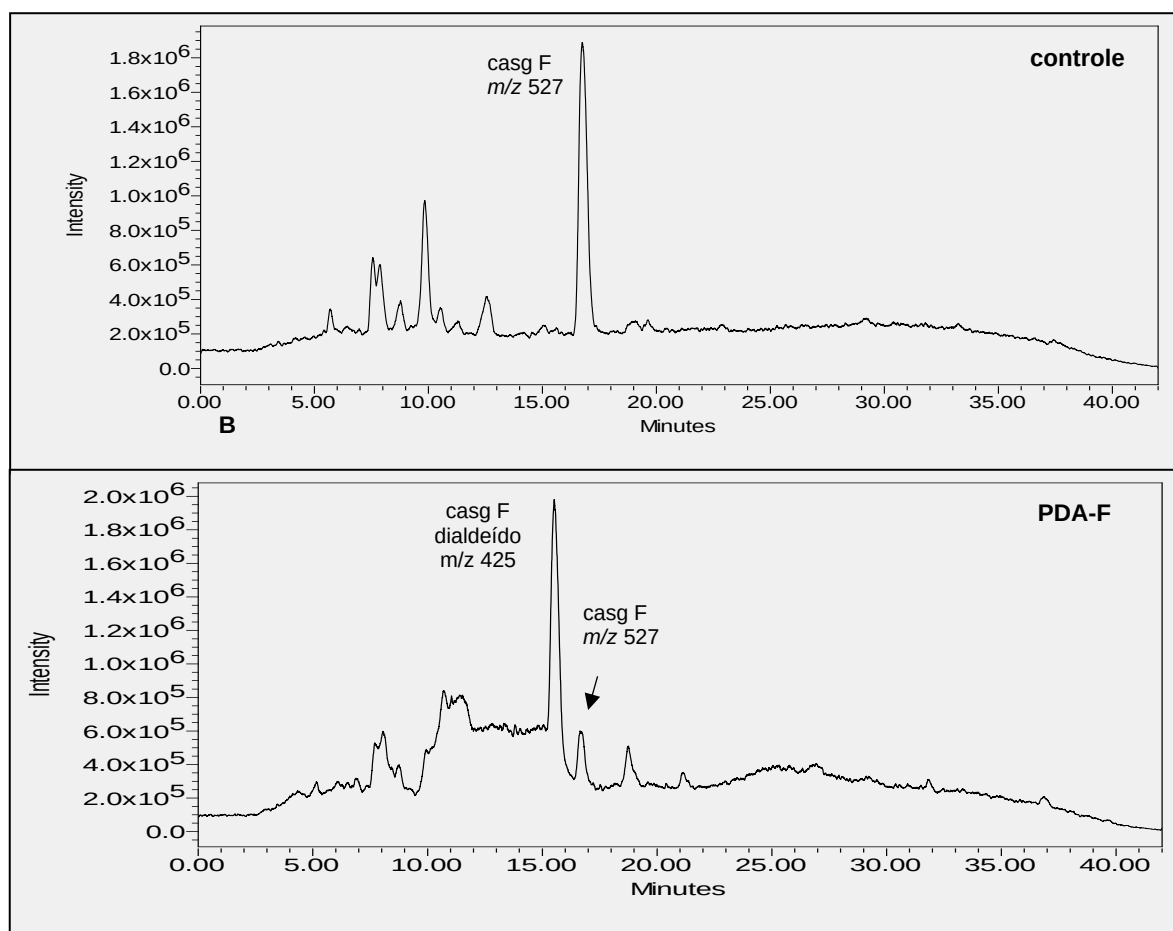
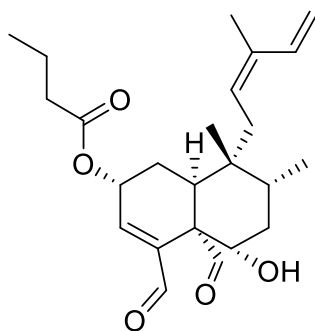


Figura 36. Estrutura química do dialdeído da caseargreina F (402 Da).



- Casearina B

A análise dos espectros de massas dos picos majoritários do cromatograma obtido por LC-MS dos PDA-B também permitiu a identificação dos produtos de degradação (Figura 37). O cromatograma dos PDA-B obtidos por LC-MS tiveram perfil semelhante em relação aos cromatogramas obtidos por LC-DAD/UV. Foi observada a degradação da cas B (t_R de 20,9 min) com espectro (Apêndice 21) contendo pico base de m/z 599 Da $[M + Na]^+$, e concomitante formação de um produto majoritário com t_R de 19,2 min. Este apresentou espectro de massas (Apêndice 22) com pico de m/z 497 cuja relação massa carga é relativa ao dialdeído da cas B (Figura 38) como íon aduto de sódio $[M + Na]^+$.

Figura 37. Cromatogramas (TIC) ESI⁺ do controle da casearina B (cas B, t_R de 21,0 min, PBS 0,1 M) e dos seus produtos obtidos após degradação ácida (PDA-B) em FGS por 60 min. Identificação: dialdeído da casearina B (cas B dialdeído, t_R de 19,2 min). Amostras: (500 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de MeCN 55-100% (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 42 min; vazão de 0,8 mL/min.

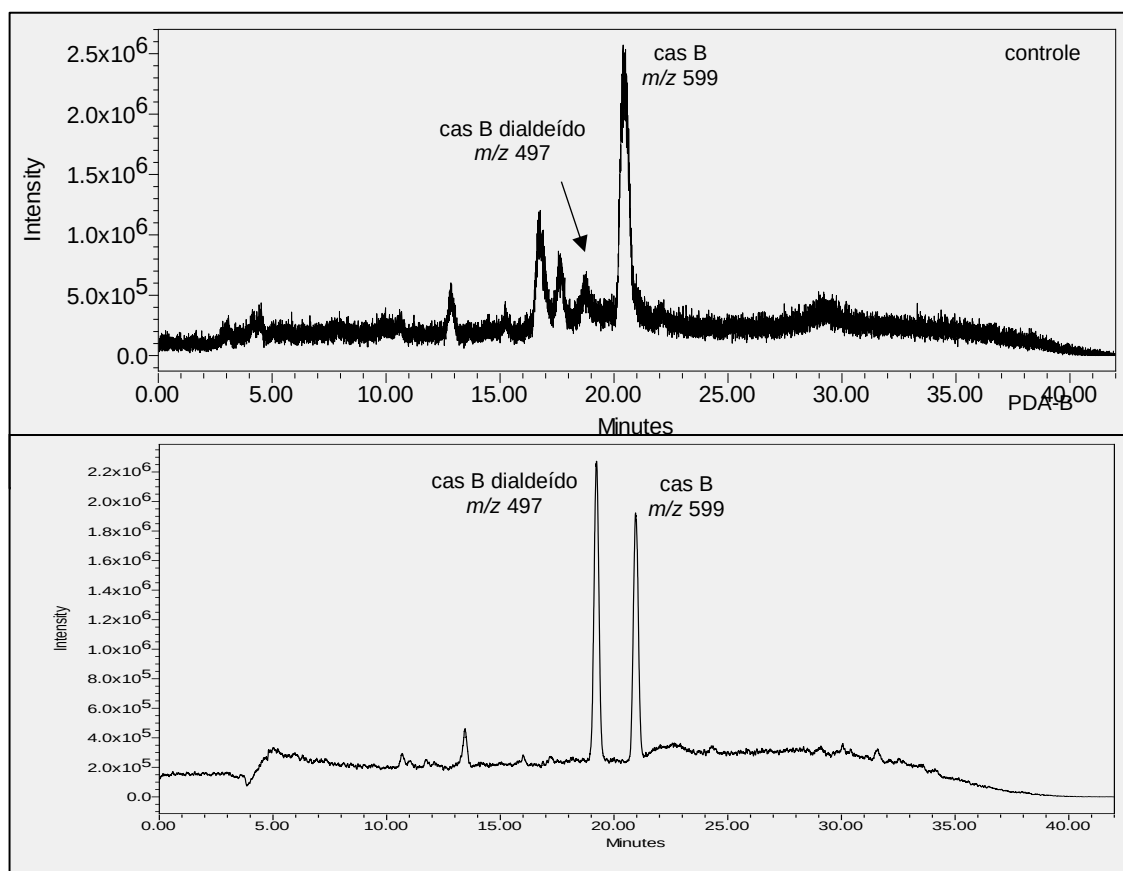
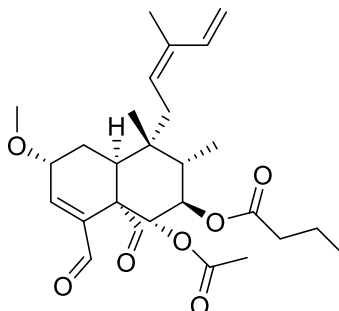


Figura 38. Estrutura química do dialdeído da casearina B (474 Da).



O pico com t_R de 13,5 min gerou espectro (Apêndice 23) com pico base de m/z 515, cujo valor corresponde ao íon $[M + Na]^+$ da molécula de cas B após a hidrólise ácida dos 2 substituintes acetato C-18 e C-19 (cas B deacetilada) ou da molécula de dialdeído da cas B com uma hidratação no C-18 ou C-19 (cas B dialdeído hidratada). Assim, essas informações foram confirmadas posteriormente por UPLC-QTOF-MS/MS.

5.5.3 Análises dos PDA por UPLC-QTOF-MS/MS e RMN

Para confirmação da estrutura química dos produtos de degradação formados de cada diterpeno, foi utilizada espectrometria de massas de alta resolução *tandem*. Através das análises dos espectros de massas (ESI^+ , MS^1) relativos aos picos do cromatograma (TIC) obtido por UPLC-QTOF-MS/MS, da comparação entre a m/z observada e a calculada para cada substância e do estudo de fragmentação dos íons base (ESI^+ , MS^2) foi possível propor a fórmula molecular e a estrutura química das substâncias geradas.

- Caseargrewiina F

A partir da análise por UPLC-QTOF-MS/MS dos PDA-F (Figura 39) foi possível confirmar o produto majoritário (t_R de 15,89 min) com espectro (ESI^+ , MS^1) com pico base de m/z 425,2318 $[M + Na]^+$ (Figura 40), que se refere ao íon aduto com sódio do dialdeído da caseargrewiina F de m/z calculada como 425,2298 ($C_{24}H_{34}NaO_5^+$, erro de 3,9 ppm). O espectro MS^2 do íon precursor de m/z 425,2307 (Apêndice 24) confirmou a perda do substituinte esterificado da casg F dialdeído. Assim, foi possível observar o íon de m/z 337,1700 $[M + Na - C_3H_7COOH]^+$, o qual é

gerado após a perda de um fragmento neutro de ácido butanoico, uma vez que o dialdeído da casg F apresenta um substituinte butanoato no C-2.

Figura 39. Cromatogramas (TIC) ESI⁺ do controle da caseargrewiina F (casg F, t_R de 17,09 min, PBS 0,1 M) e dos produtos obtidos após degradação ácida (PDA-F) em FGS por 60 min (100 µg/mL). Identificação: dialdeído da caseargrewiina F (casg F dialdeído, t_R de 15,89 min). Amostras: 100 µg/mL. Análise em LC-MS/MS, coluna C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 µm), gradiente linear de 30-90% MeCN (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente por 5 min, vazão 0,25 mL/min.

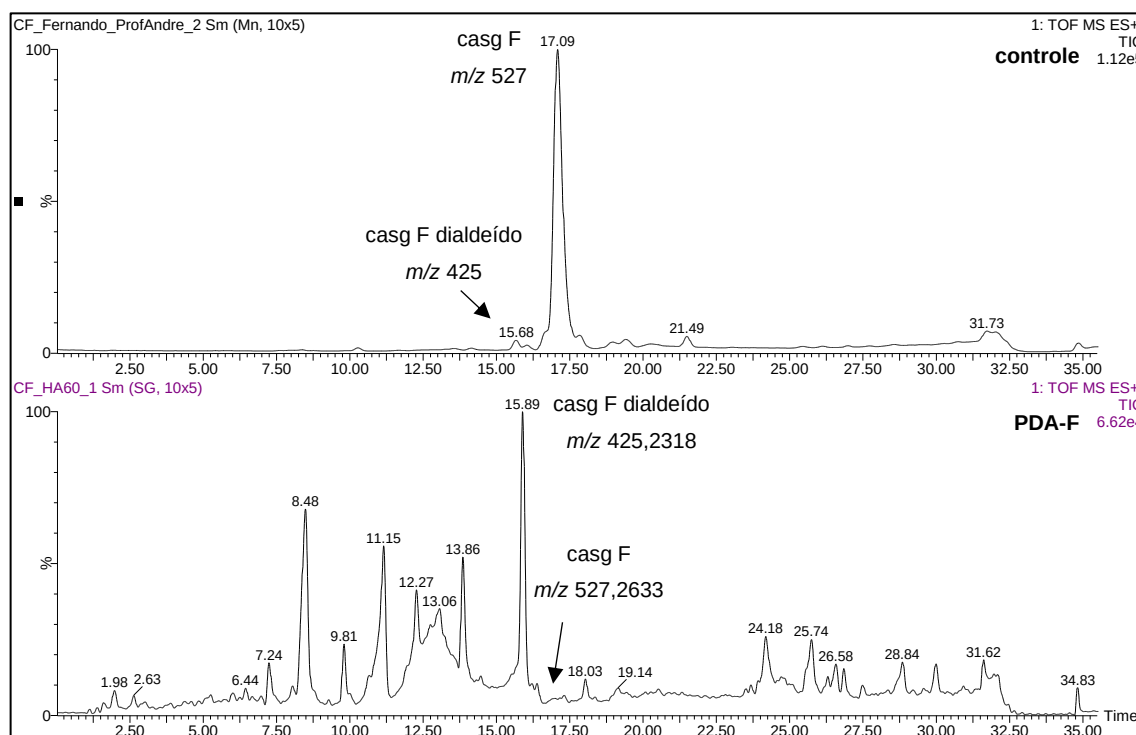
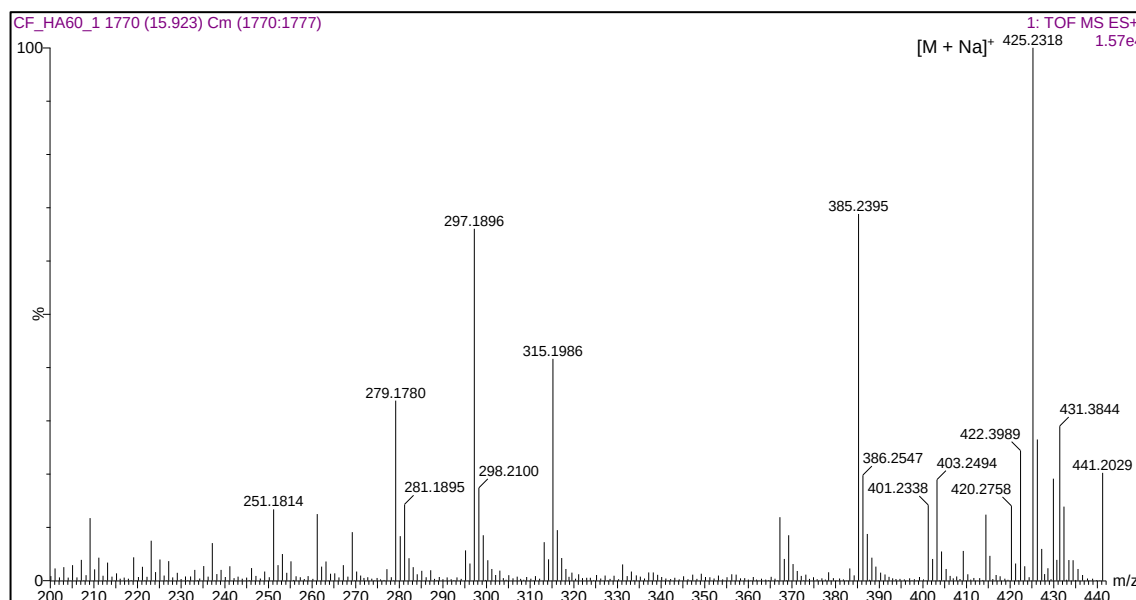


Figura 40. Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do dialdeído da caseargrewiina F (t_R de 15,89 min) nos PDA-F.



No cromatograma dos PDA-F também foi identificada a casg F remanescente com baixa intensidade (t_R de 17,30 min), cujo espectro apresentou pico base de m/z 527,2631 $[M + Na]^+$ (erro de 3,0 ppm, Apêndice 25). Além disso, os 6 picos de menor intensidade identificados no cromatograma dos PDA-F com t_R de 7,26; 8,47; 9,79; 11,13; 12,28 e 13,06 min apresentaram espectro de massas (ESI^+ , MS^1) muito semelhantes (Apêndice 26), com pico base de m/z 443,2398 a 443,2430. Esses valores correspondem ao íon $[M + Na]^+$ da molécula de casg F após a hidrólise ácida dos 2 substituintes acetato C-18 e C-19 (casg F deacetilada) ou da molécula de dialdeído da casg F com uma hidratação no C-18 ou C-19 (casg F dialdeído hidratada) (Figura 41). Eles possuem m/z calculada de 443,2404 ($C_{24}H_{36}NaO_6^+$) (erro de 1,1 a 5,8 ppm), cuja alta correlação com as m/z observadas reforçam a identificação de pelo menos 3 dessas 6 moléculas dos PDA-F. De acordo com Oda e colaboradores (2019) os diterpenos deacetilados possuem menor t_R do que os seus respectivos dialdeídos hidratados. Entretanto, visto que são isóbaros e possuem espectros de massas análogos, não foi possível apontar os t_R de cada isômero (Tabela 17).

Figura 41. Estrutura química das moléculas ($C_{24}H_{36}O_6$, 420 Da) de casg F após a hidrólise ácida (casg F deacetilada) e da molécula referente ao dialdeído da casg F com uma hidratação no C-18 ou C-19 (casg F dialdeído hidratada).

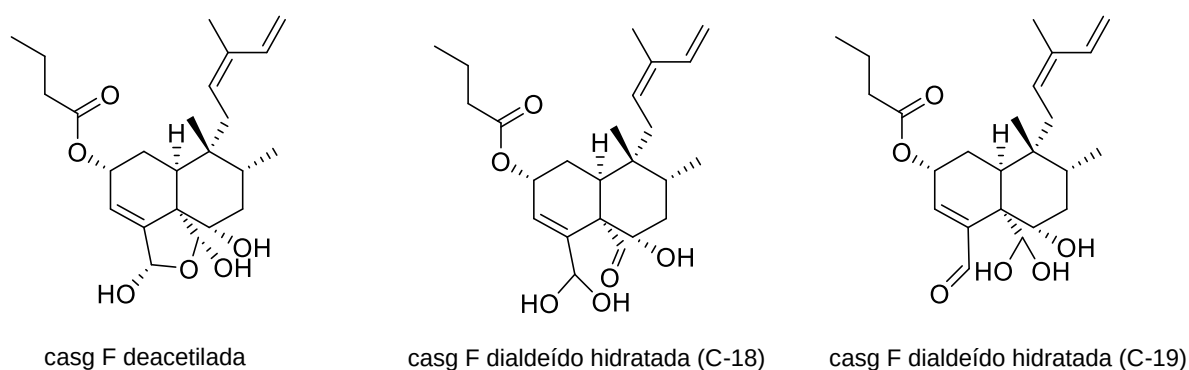


Tabela 17. Dados obtidos por espectrometria de massas (ESI⁺) dos produtos de degradação ácida da caseargrewiina F. Análise em LC-MS/MS, coluna C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 μ m), gradiente linear de 30-90% MeCN (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente por 5 min, vazão 0,25 mL/min.

Substância	t _R (min)	Fórmula empírica (Da)	Massa observada [M + Na] ⁺	Massa calculada [M + Na] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS (% do íon formado)
casg F	17,09	C ₂₈ H ₄₀ O ₈ (504)	527,2631	527,2615	3,0	467 (45); 407 (25)
dialdeído da casg F deacetilada ou hidratado	7,26; 8,47; 9,79; 11,13; 12,28 e 13,06	C ₂₄ H ₃₆ O ₆ (420)	443,2398 a 443,2430	443,2404	1,1 a 5,8	-
dialdeído da casg F	19,58	C ₂₄ H ₃₄ O ₅ (402)	425,2318	425,2298	3,9	337 (15)

A alta correlação (< 5 ppm) entre a *m/z* calculada e a *m/z* observada experimentalmente e as fragmentações nas análises por UPLC-QTOF-MS/MS permitiram a dedução da fórmula molecular do dialdeído da casg F. Porém, são necessárias análises complementares por RMN para confirmação estrutural de uma molécula. Assim, os PDA-F foram concentrados por EFS (MeCN 98%, C18, 2,0 x 2,0 cm) e analisados por RMN de ¹H e ¹³C (DEPT 135) cujos espectros (Apêndices 27 e 28) evidenciaram a formação do produto majoritário sendo o dialdeído da casg F. De modo coerente com o que ocorreu no ensaio de estabilidade química em solução com pH 1,2 (FGS, item 5.4.2.1), foi possível observar que praticamente toda casg F converteu-se em seu dialdeído após os 60 min em FGS, já que sinais não atribuídos à casg F dialdeído apresentaram baixa intensidade. Esse tipo de conversão de casearina já foi relatada na literatura quando foram submetidas em meio FGS, mantidos em deuteroclorofórmio e também através da metabolização em microssomas hepáticos de ratos e de humanos (WILLIAMS et al., 2007; SANTOS et al., 2010; MOREIRA DA SILVA et al., 2018; ODA et al., 2019).

O espectro de RMN ¹H do dialdeído da casg F foi similar ao da casg F, ambos apresentaram valores de sinais correspondentes muito próximos. A exceção evidente foi a substituição dos sinais relativos aos hidrogênios da casg F H-18, atribuído como δ 7,45 *t* (1,5 Hz) e H-19, atribuído como 7,19 *s*, pelos sinais δ 9,99 *d*

(1,2 Hz) e 9,44 s, respectivamente, os quais são típicos de hidrogênios aldeídicos. Diferenças similares foram observadas no espectro de ^{13}C do dialdeído da casg F, onde os sinais dos carbonos diacetálicos do anel C em δ 97,3 (C-18) e 99,0 (C-19) foram substituídos por sinais associados aos grupos aldeídicos com valor de δ 195,5 e 202,8, respectivamente. Além disso, nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do dialdeído da casg F os sinais referentes aos dois substituintes acetato do anel C da casg F foram suprimidos δ 2,03 s e 2,18 m; δ 170,1 e 170,8 (Tabela 18).

Tabela 18. Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) obtidos para a caseargrewiina F e seu dialdeído, em deuteroclorofórmio.

C	$\delta^{13}\text{C}$ casg F*	$\delta^{13}\text{C}$ casg F dialdeído	$\delta^1\text{H}$ casg F (J; Hz)*	$\delta^1\text{H}$ casg F dialdeído (J; Hz)
1 CH_2	27,5	25,8	2,08 m 2,15 m	2,24 m 2,28 m
2 CH	67,2	64,9	5,75 <i>tl</i> (3,9)	5,53 <i>td</i> (4,8; 1,2)
3 CH	121,5	147,8	6,35 <i>dl</i> (3,4)	7,04 <i>dd</i> (4,8; 1,2)
4 C	147,5	146,9	-	-
5 C	54,6	59,4	-	-
6 CH	72,7	72,4	4,20 <i>dd</i> (12,3; 3,8)	3,87 <i>dd</i> (12,0; 5,6)
7 CH_2	37,9	37,1	1,95 m 1,66 m	1,67 m 1,68 m
8 CH	36,9	40,0	1,79 m	1,97 m
9 C	38,5	38,8	-	-
10 CH	37,4	35,6	2,75 <i>dd</i> (13,7; 3,5)	2,36 m
11 CH_2	29,8	30,2	1,88 m 2,46 <i>dd</i> (16,5; 9,5)	1,88 m 2,23 m
12 CH	128,3	124,5	5,64 <i>dl</i> (8,1)	5,49 m
13 C	133,9	135,2	-	-
14 CH	134,3	133,6	6,81 <i>dd</i> (18,0; 10,2)	6,66 <i>dd</i> (17,2; 10,8)
15 CH_2	114,6	114,7	5,15 <i>d</i> (10,2) 5, 27 <i>d</i> (18,0)	5,13 <i>d</i> (10,8) 5, 22 <i>d</i> (17,2)
16 CH_3	20,6	20,5	1,84 <i>sl</i>	1,83 <i>d</i> (1,1)
17 CH_3	16,0	15,6	0,93 <i>d</i> (6,6)	0,95 <i>d</i> (6,5)
18 CH	97,3	195,5	7,45 <i>t</i> (1,5)	9,99 <i>d</i> (1,2)
19 CH	99,0	202,8	7,19 s	9,44 s
20 CH	25,4	26,0	0,86 s	0,91 s
OAc	21,4	-	2,03 s	-
OAc	170,1	-	-	-
OAc	21,9	-	2,18 s	-
OAc	170,8	-	-	-
OBu	13,9	13,8	0,86 <i>t</i> (7,5)	0,98 <i>t</i> (7,4)
OBu	19,1	18,7	1,63 m	1,74 m
OBu	36,6	36,4	2,18 m	2,36 <i>t</i> (7,4)
OBu	173,3	173,0	-	-

* Dados de RMN do padrão de casg F (P2) obtidos em pentadeuteropiridina a 600 MHz para ^1H e a 150 MHz para ^{13}C .

- Casearina B

A partir das análises dos PDA-B por UPLC-QTOF-MS/MS (Figura 42) foi constatado que o dialdeído da cas B era o produto majoritário do cromatograma (t_R de 18,17 min). O pico base referente ao seu espectro (ESI^+ , MS^1 , Figura 43) de m/z

497,2535 $[M + Na]^+$ corresponde ao íon aduto com sódio do dialdeído da casearina B de m/z calculada de 497,2510 ($C_{27}H_{38}NaO_7^+$, erro de 4,8 ppm). O espectro MS^2 do íon precursor de m/z 497,2472 (Apêndice 29) confirmou a perda do substituinte esterificado da cas B dialdeído, pois foi observado o íon de m/z 437,2503 $[M + Na - C_2H_5COOH]^+$ e o íon de m/z 409,2042 $[M + Na - C_3H_7COOH]^+$, os quais são gerados após a perda de um fragmento neutro de ácido acético e de ácido butanoico, uma vez que o dialdeído da cas B apresenta substituintes acetato e butanoato no C-6 e C-7, respectivamente.

Figura 42. Cromatograma (TIC) ESI^+ do controle da casearina B (t_R de 19,51 min) e dos produtos obtidos após degradação ácida (PDA-B) em FGS por 60 min. Identificação: dialdeído da casearina B (cas B dialdeído, t_R de 18,17 min). Amostras: 100 $\mu g/mL$. Análise em LC-MS/MS, coluna C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 μm), gradiente linear de 30-90% MeCN (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente por 5 min, vazão 0,25 mL/min.

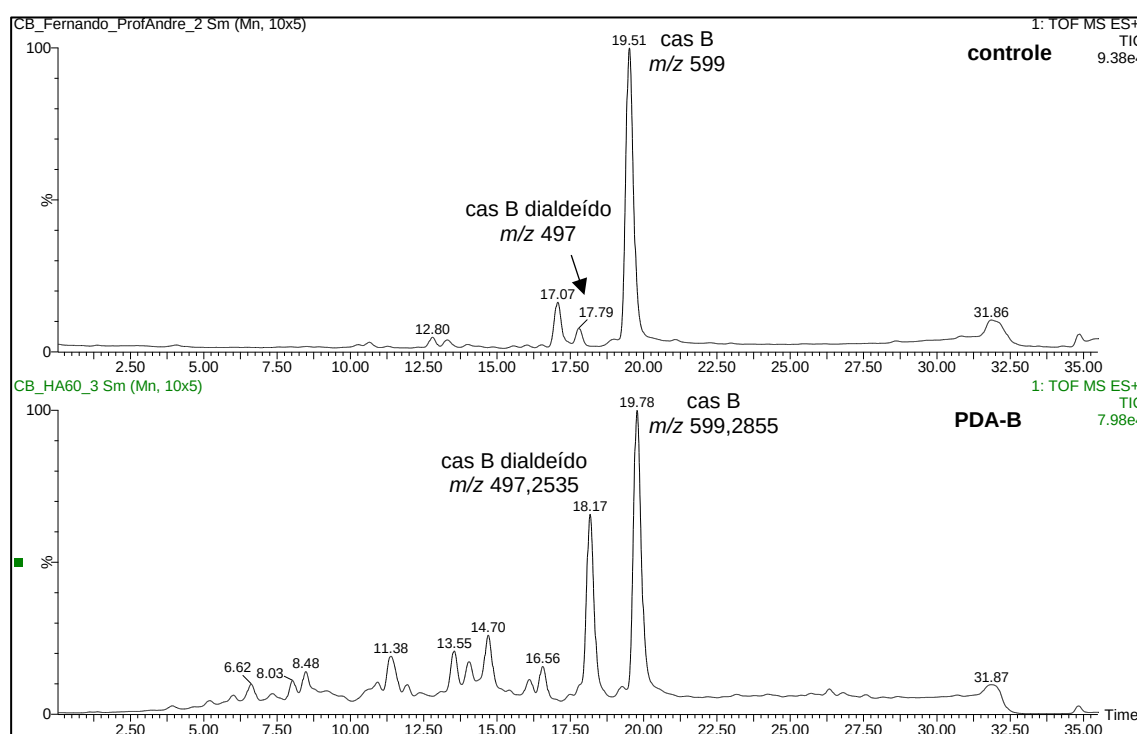
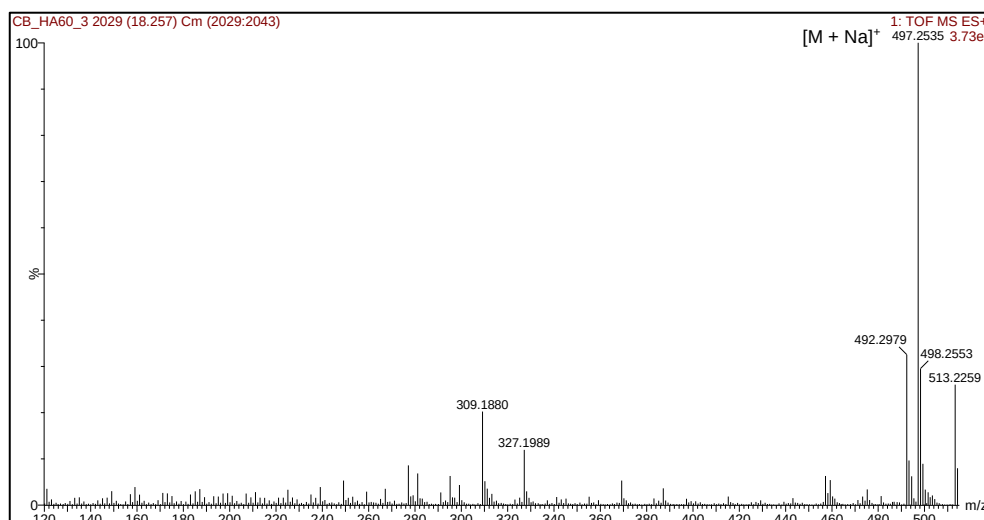


Figura 43. Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do dialdeído da casearina B (t_R de 18,17 min) nos PDA-B.



No cromatograma dos PDA-B também foi possível identificar a cas B remanescente (t_R de 19,51 min) com espectro de pico base de m/z 599,2844 [M + Na]⁺ (erro de 2,8 ppm, Apêndice 30). Além disso, os picos de menor intensidade identificados no cromatograma dos PDA-B com t_R de 14,70 e 16,56 min apresentaram espectro de massas (ESI⁺, MS¹) (Apêndice 31) com pico base de m/z 515,2639 e 515,2630, respectivamente, os quais são correspondentes ao íon com sódio da molécula de cas B após a hidrólise ácida dos 2 substituintes acetato (C-18 e C-19) ou da molécula referente ao dialdeído da cas B com uma hidratação no C-18 ou C-19 (isóbaras, Figura 44). Eles possuem m/z calculada de 515,2615 (C₂₇H₄₀NaO₈⁺) (erro de 4,6 e 2,9 ppm), cuja alta correlação com as m/z observadas reforçam a identificação dessas moléculas nos PDA-B, uma vez que pode ocorrer coeluição dos isômeros (Tabela 19). Esse tipo de hidrólise dos substituintes esterificados foi verificado para a casg F e também em estudos anteriores com as casearinas J e O após serem submetidas em FGS por 60 min. Porém, não foi possível apontar os t_R de cada molécula já que elas são isóbaras e possuem espectros de massas muito semelhantes (ODA et al., 2019).

Figura 44. Estrutura química das moléculas ($C_{24}H_{36}O_6$, 420 Da) da casg F após a hidrólise ácida dos 2 substituintes acetato (casg F deacetilada) e da molécula referente ao dialdeído da casg F com uma hidratação no C-18 ou C-19 (casg dialdeído hidratada).

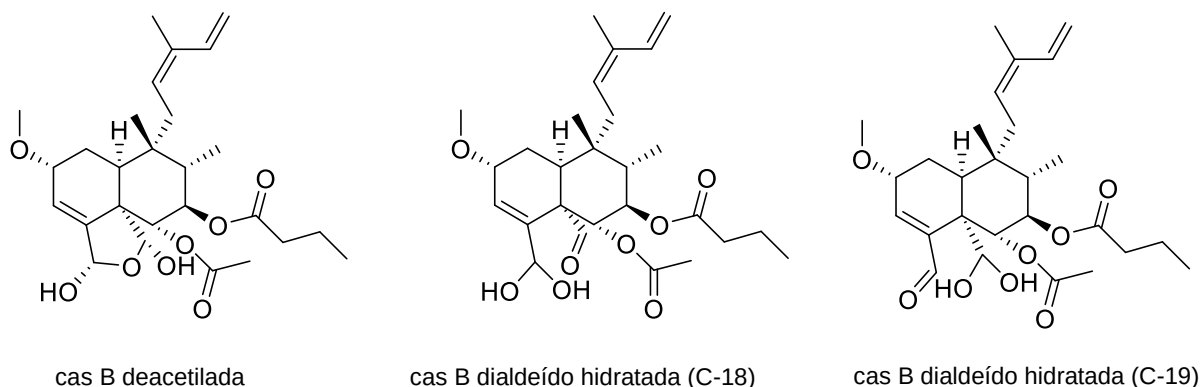


Tabela 19. Dados obtidos por espectrometria de massas (ESI⁺) dos produtos de degradação ácida da casearina B. Análise em LC-MS/MS, coluna C18 (150 x 2,1 mm; 1,7 μ m), gradiente linear de 30-90% MeCN (ác. fórmico 0,1%, v/v) em 30 min, mantendo isocraticamente por 5 min, vazão 0,25 mL/min.

Substância	t _R (min)	Fórmula empírica (Da)	Massa observada [M + Na] ⁺	Massa calculada [M + Na] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS (% do íon formado)
cas B	19,78	C ₃₁ H ₄₄ O ₁₀ (576)	599,2855	599,2827	4,6	539 (20); 479 (15)
dialdeído da cas B deacetilada ou hidratado	14,7; 16,56	C ₂₇ H ₄₀ O ₈ (492)	515,2639 515,2630	515,2615	4,6 2,9	-
dialdeído da cas B	18,17	C ₂₇ H ₃₈ O ₇ (474)	497,2535	497,2510	4,8	437 (10); 409 (5)

Do mesmo modo que os PDA-F, os PDA-B foram concentrados por EFS e analisados por RMN de ¹H e ¹³C (DEPT 135) e tais resultados confirmaram a estrutura do dialdeído da cas B, sendo esse o seu produto majoritário (Apêndice 32 e 33). Foi possível atribuir os sinais referentes ao dialdeído da cas B, os quais apresentaram maior intensidade nos espectros. Assim, foram atribuídos os valores de δ 10,42 s e 9,21 s para H-18 e H-19 e δ 192,8 e 199,3 para os carbonos aldeídicos C-18 e C-19. Conforme observado para PDA-F, o produto majoritário dos

PDA-B foi o seu dialdeído. Todavia, grande quantidade da cas B ainda permaneceu remanescente após a incubação de 60 min em FGS. Portanto, seus sinais também puderam ser vistos nos espectros dos PDA-B, porém com menor intensidade do que o seu respectivo dialdeído (tabela 20).

Tabela 20. Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) obtidos para a casearina B e seu dialdeído, em deuterochloroformio.

C	$\delta^{13}\text{C}$ cas B*	$\delta^{13}\text{C}$ cas B dialdeído	$\delta^1\text{H}$ cas B (J; Hz)*	$\delta^1\text{H}$ cas B dialdeído (J; Hz)
1 CH ₂	26,4	24,9	2,01 <i>m</i> 2,17 <i>m</i>	2,18 <i>m</i> 2,21 <i>m</i>
2 CH	73,0	72,6	3,95 <i>sl</i>	3,95 <i>td</i> (4,0; 1,5)
3 CH	126,5	125,6	6,40 <i>sl</i>	7,04 <i>dl</i> (4,0)
4 C	141,5	150,3	-	-
5 C	53,8	52,9	-	-
6 CH	74,9	74,2	5,67 <i>d</i> (10,4)	5,44 <i>d</i> (10,4)
7 CH	73,4	74,0	5,62 <i>t</i> (10,4)	5,43 <i>t</i> (10,4)
8 CH	41,5	41,1	2,05 <i>m</i>	1,79 <i>m</i>
9 C	40,0	39,3	-	-
10 CH	37,6	40,2	2,76 <i>dl</i> (13,4)	2,39 <i>dd</i> (13,8; 3,2)
11 CH ₂	30,9	30,2	1,93 <i>m</i> 2,67 <i>dd</i> (16,0; 8,5)	1,61 <i>m</i> 2,22 <i>m</i>
12 CH	127,0	125,9	5,49 <i>dl</i> (8,5)	5,29 <i>dl</i> (7,0)
13 C	134,5	134,0	-	-
14 CH	134,2	133,4	6,68 <i>dd</i> (16,9; 11,0)	6,63 <i>dd</i> (17,0; 10,9)
15 CH ₂	115,1	114,8	5,12 <i>d</i> (11,0) 5,24 <i>d</i> (16,9)	5,12 <i>d</i> (10,9) 5,16 <i>d</i> (17,0)
16 CH ₃	20,5	20,4	1,74 <i>sl</i>	1,79 <i>sl</i>
17 CH ₃	11,5	11,1	0,98 <i>d</i> (6,4)	0,95 <i>d</i> (6,3)
18 CH	96,0	192,8	6,89 <i>t</i> (1,3)	9,21 <i>s</i>
19 CH	98,3	199,3	7,18 <i>sl</i>	10,42 <i>s</i>
20 CH ₃	26,4	25,6	0,96 <i>s</i>	0,92 <i>s</i>
OMe	57,2	57,3	3,36 <i>s</i>	3,44 <i>s</i>
OAc	21,7	-	1,89 <i>s</i>	-
OAc	169,7	-	-	-
OAc	21,4	-	2,07 <i>s</i>	-
OAc	170,5	-	-	-
OAc	21,3	21,1	2,10 <i>s</i>	1,93 <i>s</i>
OAc	170,9	170,4	-	-
OBu	14,2	13,9	0,90 <i>t</i> (7,3)	0,93 <i>t</i> (7,1)
OBu	19,1	18,5	1,66 <i>m</i>	1,68 <i>m</i>
OBu	36,5	36,2	2,38 <i>m</i>	2,24 <i>t</i> (7,4)
OBu	173,2	172,7	-	-

* Dados de RMN do padrão de cas B (P3) obtidos em pentadeuteropiridina a 600 MHz para ^1H e a 150 MHz para ^{13}C .

A partir dos resultados desse trabalho e em conjunto com os dados de estudos anteriores de degradação em FGS das casearinas J e O, pode ser constatado que apesar dos produtos de degradação oriundos de diferentes diterpenos serem diferentes entre si, o perfil de degradação ácida aparentemente segue um padrão de formação dos seus respectivos dialdeídos, uma vez que estes são os produtos majoritários. Esse fato provavelmente está relacionado com a facilidade de formação do dialdeído através do mecanismo de abertura do anel diacetálico (anel C) dos

diterpenos clerodânicos do tipo das casearinas. O mecanismo dessa reação ocorre por catálise ácida específica iniciada com a protonação do oxigênio cíclico, podendo anteriormente ocorrer a hidrólise dos substituintes esterificados do anel diacetálico (C-18 e C-19) com a formação de intermediário di-hemiacetal cíclico (ODA et al., 2019).

5.6 Estudo de metabolização *in vitro* dos diterpenos em microssomas hepáticos de humanos

A casg F e a cas B foram submetidas à metabolização por microssomas hepáticos e os produtos obtidos foram analisados por técnicas cromatográficas e espectrométricas. O controle negativo PBS dessa metabolização revelou que os produtos obtidos PME eram oriundos da catálise enzimática, uma vez que sem a adição das enzimas microssomais os diterpenos mantiveram-se íntegros após os 30 min de incubação. Além disso, os outros controles indicaram que os ensaios envolvendo enzimas microssomais foram conduzidos adequadamente.

5.6.1 Análises dos PME por LC-MS

Tanto para a casg F (504 Da) e cas B (576 Da) remanescentes quanto para os seus produtos de metabolização foram observados íons apenas no modo positivo, com moléculas protonadas $[M + H]^+$ ou ionizadas íon amônio $[M + NH_4]^+$ ou metais alcalinos $[M + K]^+$ e $[M + Na]^+$. Houve predomínio de formação de adutos com sódio e potássio (SANTOS et al., 2010; BUENO, 2015; ODA et al., 2019; DANUELLO et al., 2020).

Os diterpenos e seus metabólitos sofreram fragmentações mesmo em MS¹ (fragmentação na fonte de ionização), provavelmente devido à quebra dos substituintes R₁₋₅, como já visto anteriormente nos PDA e em outros estudos (ODA et al., 2019; DANUELLO et al., 2020). Do mesmo modo, foi observada a perda de fragmentos neutros de 42, 60 e 88 Da, atribuídos às perdas de ceteno, ácido acético e *n*-butanoico, respectivamente.

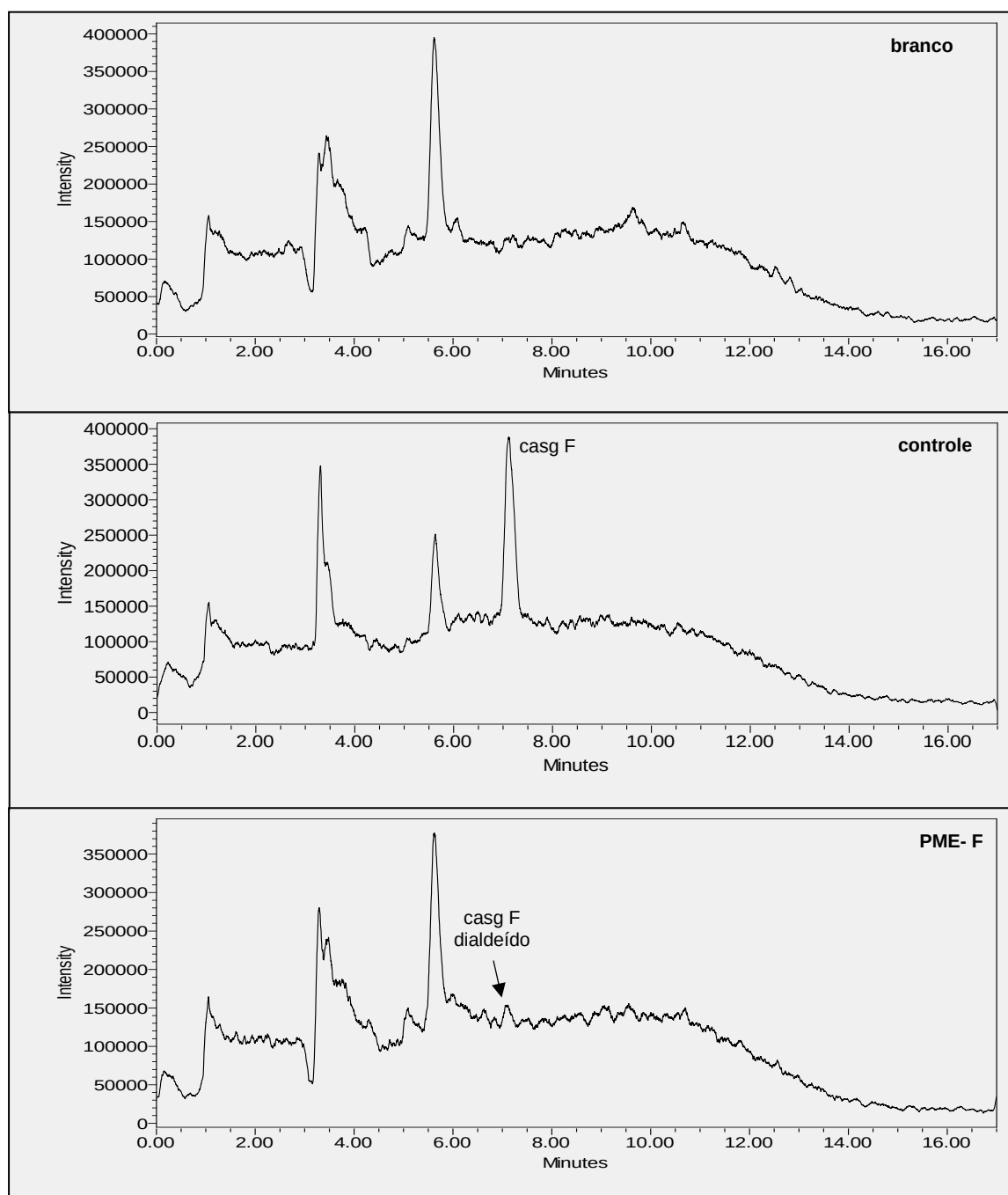
A identificação dos produtos de metabolização enzimática (PME) foi realizada a partir da análise dos espectros de massas dos picos majoritários nos

cromatogramas obtidos por LC-MS. Para eleição dos picos resultantes da metabolização hepática dos diterpenos foi levado em consideração seu controle negativo em meio microssomal com pré-incubação de NaF (200 mM) e a amostra branco (sem diterpenos).

- Caseargrewiina F

No cromatograma dos PME-F obtido por LC-MS foi observada a degradação quase total da casg F (t_R de 7,1 min), com espectro de pico base de m/z 543 Da $[M + K]^+$ (Apêndice 34), e concomitante formação de um produto majoritário com t_R de 7,0 min (Figura 45). Esse pico apresentou espectro de massas com pico base de m/z 441 Da cujo valor é relativo ao dialdeído da casg F como íon aduto de potássio $[M + K]^+$ (Apêndice 35). Esses dados foram coerentes com os ensaios de estabilidade metabólica (item 5.4.5).

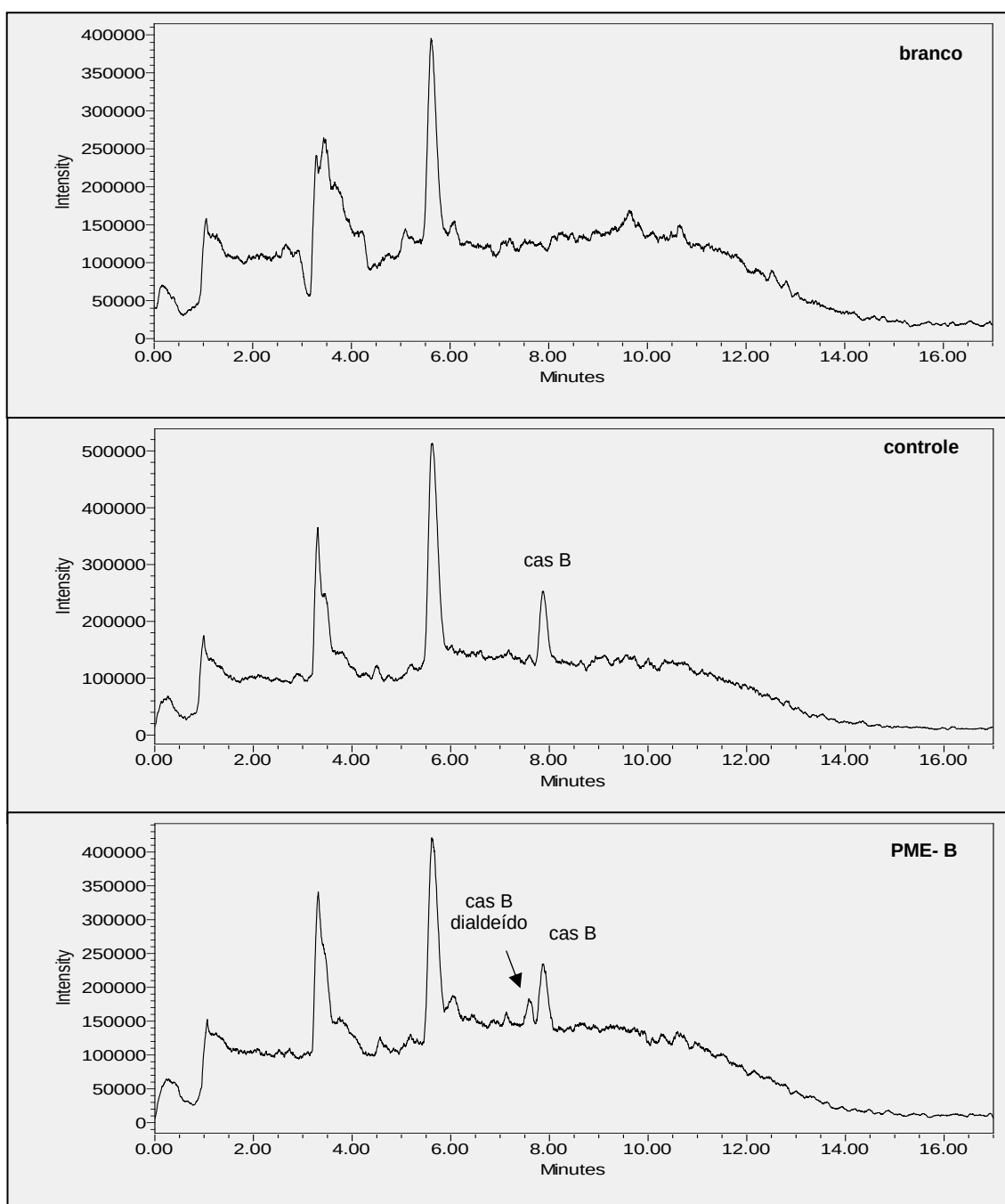
Figura 45. Cromatogramas (TIC) ESI⁺ do controle da caseargreina F (casg F, t_R de 7,1 min) e dos produtos obtidos após metabolização por microsossoma hepático humano (PME-F) por 30 min. Identificação: dialdeído da casg F (casg F dialdeído, t_R de 7,0 min), demais picos correspondem a componentes da matriz microsossomal. Amostras: 10,0 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



- Casearina B

A análise dos espectros de massas dos picos majoritários do cromatograma obtido por LC-MS dos PME-B também permitiu a identificação dos metabólitos (Figura 46). No cromatograma dos PME-B foi observada a degradação da cas B (t_R de 7,9 min) com espectro de pico base de m/z 615 $[M + K]^+$ (Apêndice 36), e concomitante formação de um produto com t_R de 7,6 min. Esse pico apresentou espectro de massas com pico base de m/z 513 (Apêndice 37) cuja relação massa carga é relativa ao dialdeído da cas B como íon aduto de potássio $[M + K]^+$.

Figura 46. Cromatograma (TIC) ESI⁺ do controle da casearina B (cas B, t_R de 7,9 min) e dos produtos obtidos após metabolização por microsossoma hepático humano (PME-B) por 30 min. Identificação: dialdeído da cas B (cas B dialdeído, t_R de 7,7 min), demais picos correspondem a componentes da matriz microsossomal. Amostras: 10,0 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



Os dados para a identificação das estruturas químicas propostas dos PME foram comparados com os resultados das análises por LC-MS dos PDA nas

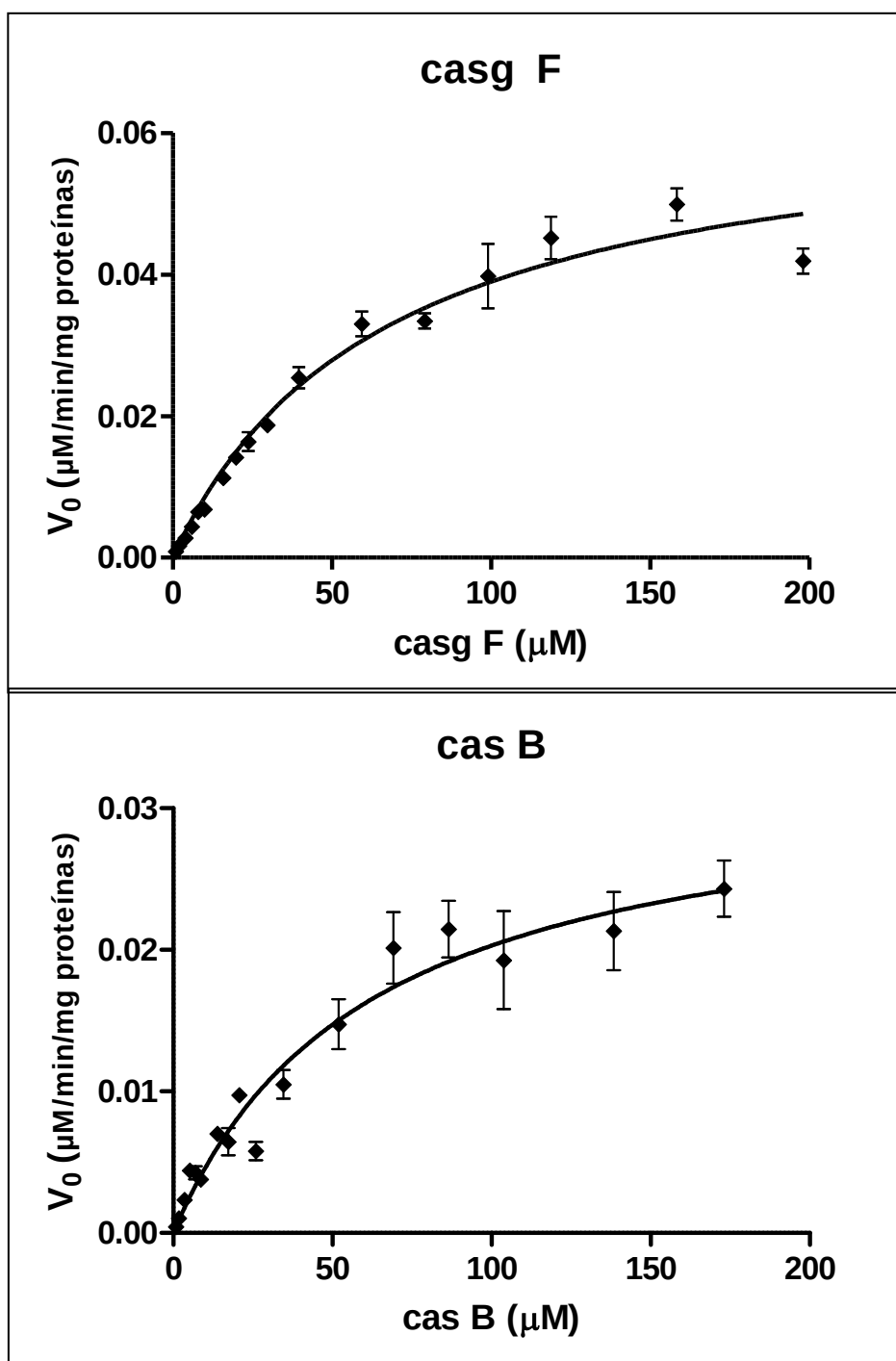
mesmas condições cromatográficas (Apêndices 38 e 39). Desta forma, a similaridade entre os t_R relativos aos dialdeídos da casg F (t_R de 7,0 min) e cas B (t_R de 7,7 min) e entre os seus espectros de massas (m/z 425 e 497 $[M + Na]^+$, respectivamente) (Apêndices 40 e 41) confirmam que os dialdeídos da casg F e cas B foram formados através da metabolização enzimática por microsomas hepáticos humanos.

5.6.2 Cinética enzimática dos diterpenos

As condições para a determinação da cinética enzimática da casg F e cas B foram pré-definidas e padronizadas para estabelecer o estado estacionário, garantindo que a velocidade inicial da reação (V_0) se mantivesse sem que fatores pudessem alterar a depleção dos diterpenos devido à inibição pelo produto ou à instabilidade da enzima, o que possibilita uma descrição mais precisa dos parâmetros cinéticos enzimáticos (HOUSTON; KENWORTHY, 2000; SUBRAMANIAN; TRACY, 2012; SEIBERT; TRACY, 2014).

A concentração de proteínas foi definida de acordo com Moreira da Silva et al. (2018), o qual utilizou a concentração de 0,2 mg/mL de proteínas microsomais hepáticas humanas para a casearina X, correspondente a metade da faixa linear de concentração testada (0-0,4 mg/mL). Considerando que o intervalo linear de depleção da casg F foi de até 10 min e da cas B de até 15 min com 0,2 mg/mL de proteínas microsomais, a velocidade inicial da reação foi avaliada de 0 a 5 min. Nessas condições fica garantido que as enzimas microsomais estão em estado estacionário, no qual elas encontram-se saturadas durante todo o tempo de incubação, sendo que a taxa de formação e consumo do intermediário reativo são idênticas (SEIBERT; TRACY, 2014). Os gráficos da velocidade inicial (V_0) × concentração de substrato da casg F e cas B estão indicados na Figura 47.

Figura 47. Gráfico da cinética enzimática ($V_0 \times S$) da caseargrewiin F (casg F) e casearina B (cas B) em meio microssomal hepático humano ($n = 3$).

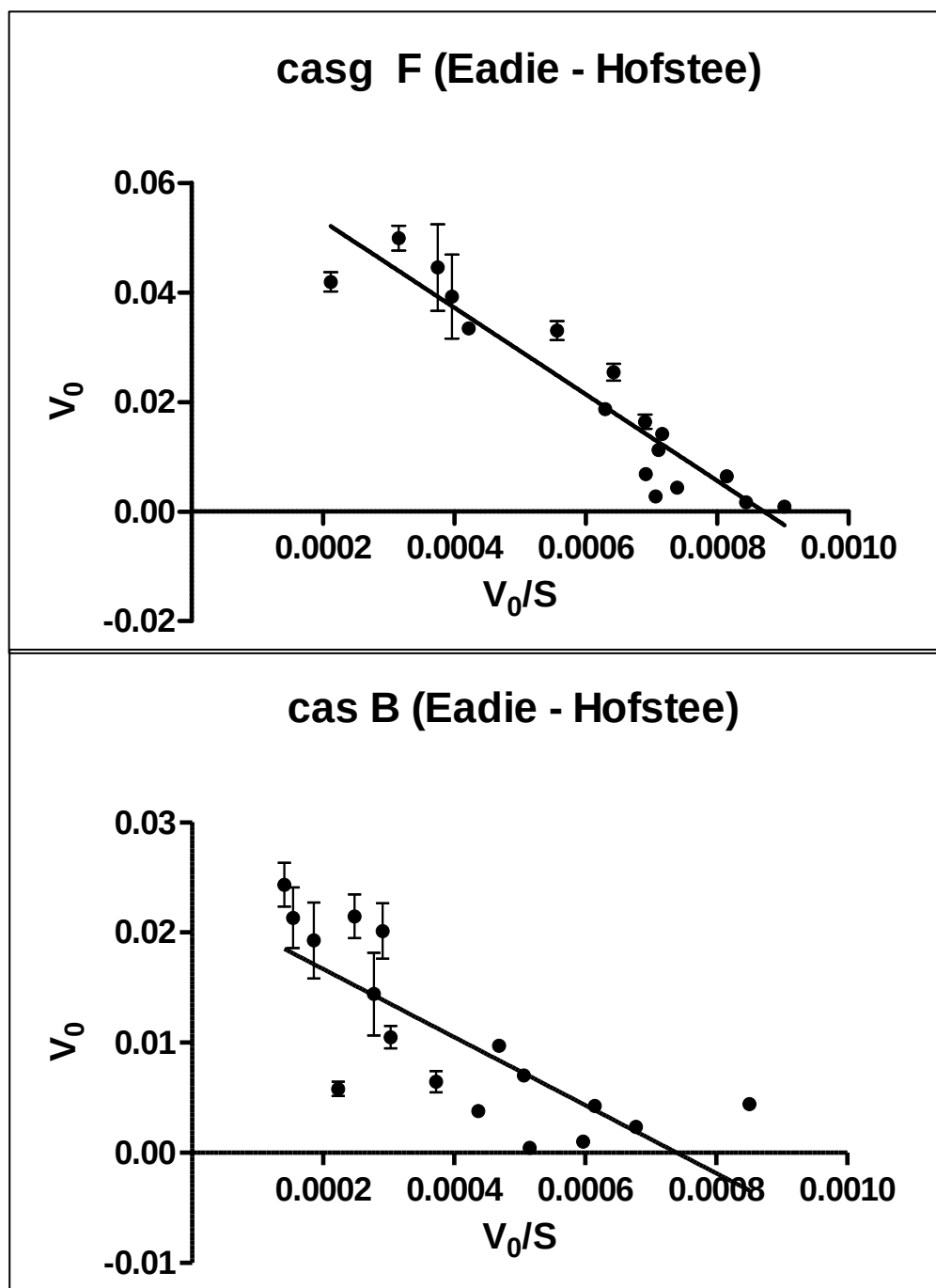


O modelo clássico de Michaelis-Menten é bem descrito na literatura e geralmente pode ser usado para descrever a cinética *in vitro* através da equação hiperbólica clássica de $V_0 \times S$. Esse modelo assume que as enzimas possuem apenas um sítio de ligação que opera de forma independente. No entanto, algumas

enzimas possuem mais de um sítio de ligação para substratos, sendo que a ligação de um substrato em um sítio pode aumentar ou diminuir a afinidade do posterior. Isso gera um comportamento cinético *in vitro* incomum, cuja curva obtida que descreve esse modelo tem forma sigmoide. Em alguns casos é difícil distinguir o perfil da curva e identificar a cinética enzimática envolvida, o que pode levar predições *in vivo* errôneas, com valores de $V_{\max}$ ou CI sub ou superestimados (HOUSTON; KENWORTHY, 2000).

Assim, para ajudar a diagnosticar o tipo de cinética que o modelo utilizado obedece, pode ser utilizado o gráfico dos dados em gráfico tipo Eadie-Hofstee ($V_0 \times V_0/S$). Quando o comportamento cinético do sistema é típico de Michaelis-Menten, as curvas hiperbólicas se transformam em função linear, do contrário elas assumem formato sigmoide (autoativação) ou convexo (inibição de substrato). Desse modo, os dados do estudo de cinética em microssomas hepáticos de humanos da casg F e cas B também foram plotados em gráficos de Eadie-Hofstee (Figura 48) (HOUSTON; KENWORTHY, 2000; MOREIRA et al., 2013).

Figura 48. Gráfico de Eadie-Hofstee ($V_0 \times V_0/S$) da caseargrewiin F (casg F) e casearina B (cas B) em microssomas hepáticos humano ($n = 3$).



O comportamento cinético da casg F e cas B foi descrito como uma relação hiperbólica entre a velocidade inicial (V_0) e a concentração de substrato e como uma reta na relação $V_0 \times V_0/S$, confirmando que o metabolismo de ambas em microssomas hepáticos humanos segue a cinética de Michaelis-Menten. Assim, os

parâmetros cinéticos ($V_{\max}$ e K_M) foram estimados a partir do ajuste não linear das curvas de ambos diterpenos, em triplicata, pelo software Prism GraphPad® 5. O Cl_{int} foi determinado pelo cálculo da razão entre $V_{\max}$ e K_M (Tabela 21).

Tabela 21. Parâmetros cinéticos de metabolismo *in vitro* da casg F e cas B em microsossoma hepático humano. Média (desvio padrão), n = 3.

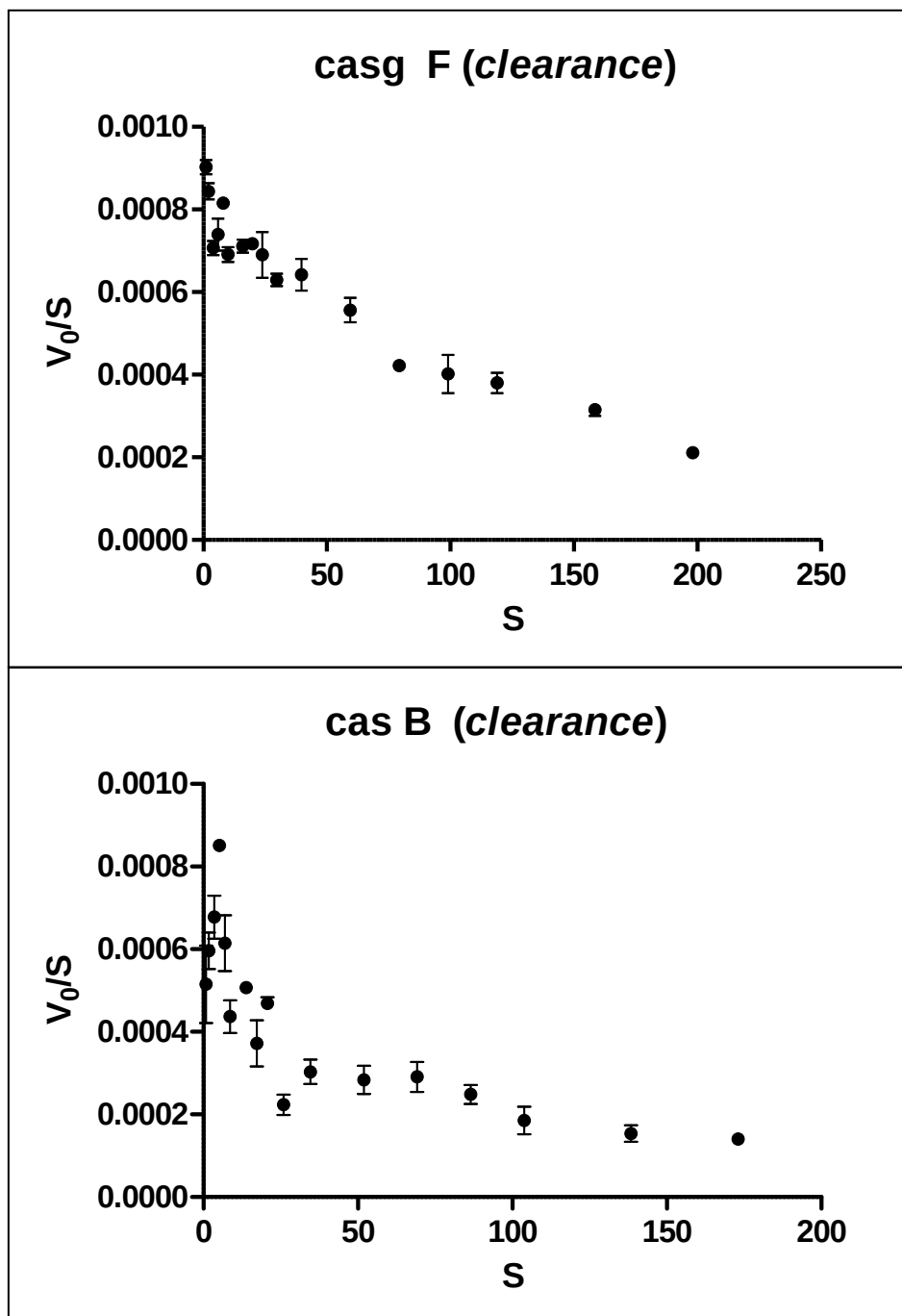
Diterpeno clerodânico	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas)	K_M (μM)	Cl_{int} ($\text{mL}/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas)
casg F	0,0648 (0,014)	66,4 (6,5)	0,977 (0,05)
cas B	0,0327 (0,006)	61,4 (5,1)	0,534 (0,08)

A partir dos resultados de cinética enzimática pode-se observar que o parâmetro $V_{\max}$ da casg F é 2 vezes maior do que a $V_{\max}$ da cas B. Entretanto, o K_M da casg F foi próximo ao da cas B, indicando que a afinidade das enzimas microsossomais humanas por ambos diterpenos é similar. O Cl_{int} representa a taxa de metabolismo de um fármaco, desconsiderando as influências relacionadas ao fluxo sanguíneo e fração livre. Assim, o Cl_{int} da casg F foi aproximadamente o dobro da cas B. Esse parâmetro permite escalonar os dados cinéticos *in vitro* para prever a depuração *in vivo* de substâncias (Cl'_{int}) (HOUSTON, 1994; SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

O valor de $V_{\max}$ da cas B foi próximo ao da casearina X no estudo de metabolismo *in vitro* em microsossomas hepáticos humanos desenvolvido por Moreira da Silva e colaboradores (2018), os quais observaram valores de $V_{\max}$: 0,0374 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas, K_M : 47,0 μM e Cl_{int} : 0,80 $\text{mL}/\text{min}/\text{mg}$ de proteínas. Por sua vez, o Cl_{int} calculado da casg F foi próximo ao da casearina X, sendo aproximadamente o dobro da cas B. Já o K_M da casearina X foi inferior ao de ambos diterpenos desse estudo, indicando que estes possuem menor afinidade aparente às enzimas microsossomais hepáticas humanas.

Os gráficos de decaimento de $V_0/S \times S$ foram plotados para ambos diterpenos (Figura 49) e corroboraram com o comportamento típico de Michaelis-Menten, com a observação de um decaimento linear (HOUSTON; KENWORTHY, 2000).

Figura 49. Gráfico de *clearance* ($V_0/S \times S$) da caseargrewiin F (casg F) e casearina B (cas B) em microsossoma hepático humano (n = 3).



5.6.3 Extrapolação *in vitro-in vivo* (IVIVE)

A IVIVE dos dados de metabolismo hepático foi conduzida pelo modelo *well-stirred*. Essa extrapolação permite que os dados de Cl_{int} em microsossomas hepáticos

caracterizados *in vitro* possam ser usados para prever o metabolismo hepático *in vivo*. Dentre os modelos mais utilizados, o *well-stirred* destaca-se por sua simplicidade, o qual considera que o fígado é um compartimento único e isolado, com taxa de perfusão sanguínea e distribuição das enzimas metabólicas homogêneas, e também assume que o fármaco se distribui rapidamente, sendo que sua concentração no tecido está em equilíbrio com a concentração no sangue (OBACH et al., 2011; SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

Para a predição foram incorporados os dados de fração livre da casg F e cas B em plasma e em meio microssomal. As estimativas de *clearance* requerem o uso de fração livre no plasma e no meio de incubação, uma vez que apenas a fração do fármaco não ligada encontra-se disponível para ser biotransformada. Assim, há maior precisão para extrapolação *in vivo*. Geralmente fármacos lipofílicos apresentam valores altos de ligação a proteínas, permanecendo apenas uma pequena fração livre para ação. Os dados de fluxo sanguíneo hepático (FSH) e resultados do cálculo de Cl_H da casg F e cas B em humanos obtidos a partir do modelo descrito estão descritas na Tabela 22. (OBACH et al., 1997; SUBRAMANIAN; TRACY, 2012).

Tabela 22. Parâmetros da extrapolação *in vitro-in vivo* da casg F e cas B pelo modelo farmacocinético *well-stirred*, incorporando dados de ligações a proteínas plasmáticas e microssomais correspondente.

Diterpeno clerodânico	Cl_H (mL/min/kg)	FSH (mL/min/kg)	$Cl_H:FSH$ (%)	Fu_p (%)	Fu_m (%)
casg F	19,6	20	98,0	26,0	22,8
cas B	19,2	20	96,0	12,9	12,7

Cl_H : *clearance* hepático

FSH: fluxo sanguíneo hepático

Fu_p : fração de casearina livre no plasma

Fu_m : fração de casearina livre no meio microssomal

Os valores de Cl_H da casg F e cas B foram altos e correspondem a 98,0 e 96,0% do FSH. Esses valores estimados indicam que ambos diterpenos são quase totalmente depurados ao passarem pelo fígado, uma vez que são muito susceptíveis à hidrólise enzimática. Os achados desse trabalho são coerentes com os resultados de outra casearina (casearina X). Apesar das enzimas microssomais apresentarem diferentes parâmetros *in vitro* (Cl_{int}) de cinética entre a casg F e cas B, os parâmetros *in vivo* (Cl_H) de ambas foram muito próximos. Isso ocorreu devido à

incorporação da taxa de diterpeno livre das ligações inespecíficas a proteínas plasmáticas e microssomais, o que demonstra a importância dessas informações na predição do Cl_H *in vivo* (MOREIRA DA SILVA et al., 2018).

Esses dados de metabolismo em conjunto com o estudo de estabilidade em FGS e tampão TRIS corroboram com a hipótese de que a biodisponibilidade da casg F e cas B via oral provavelmente é muito baixa, devido à degradação ácida, básica e à eliminação hepática pré-sistêmica. Assim, seus produtos de degradação ou metabólitos é que provavelmente chegam aos sítios ativos e desempenham a ação farmacológica. Dessa forma, corroborando com as agências regulatórias que sugerem a investigação dos metabólitos formados no organismo, o estudo dos produtos formados em ensaios *in vitro* que simulam as condições *in vivo* são de grande relevância (MOREIRA DA SILVA et al., 2018; ODA et al., 2019).

5.7 Estudo de modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) para predição do perfil farmacocinético da caseargrewiina F e casearina B em humanos

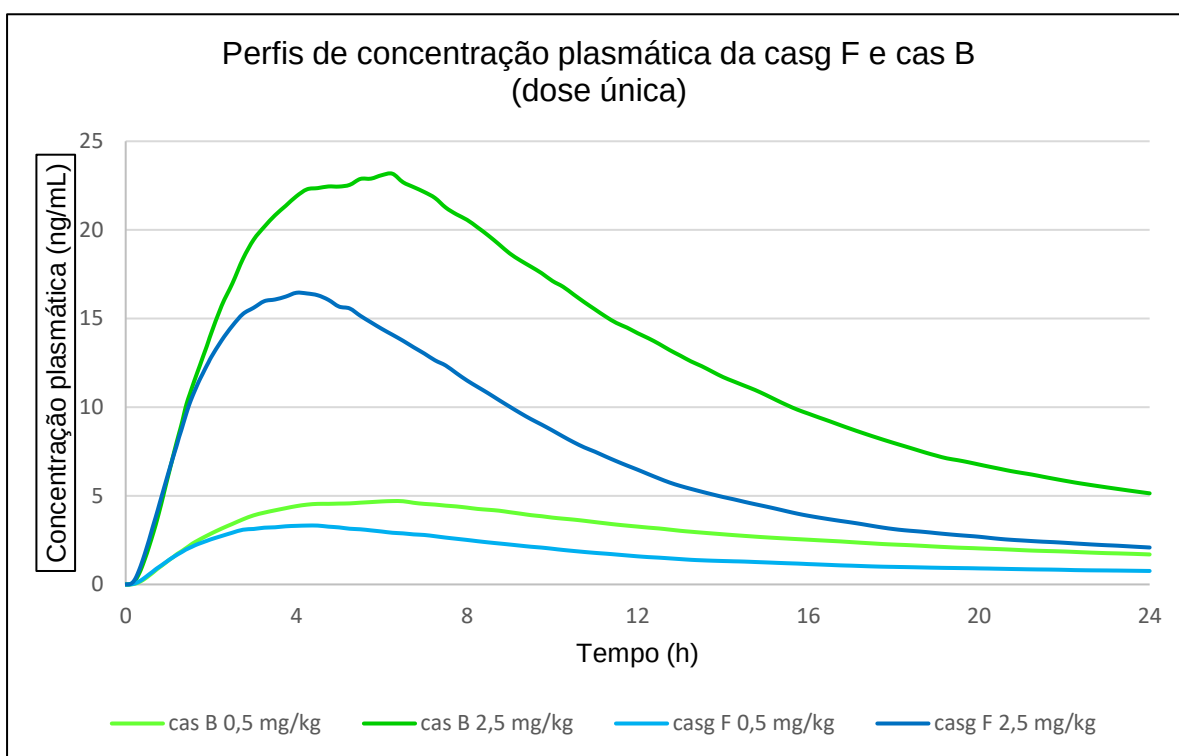
Os modelos PBPK desenvolvidos forneceram dados para a predição da farmacocinética da caseargrewiina F (504,61 g/mol) e casearina B (576,67 g/mol) em humanos. Os dados cinéticos *in vitro* utilizados nos modelos e que foram obtidos neste estudo para a casg F e cas B foram, respectivamente: log P: 3,8 e 4,0; $f_{u\text{plasma}}$: 0,26 e 0,13 e $f_{u\text{mic}}$: 0,23 e 0,13. A solubilidade de ambas casearinas em pH fisiológico (7,4) foi baseada em estudos anteriores com casearinas (20 µg/mL). O pKa dos diterpenos foram preditos pelo software Chemdraw® sendo o pKa da casg F foi de 13,4 e da cas B foi de 13,6. Os demais parâmetros de ADME foram preditos pelo próprio software. A representação gráfica do perfil cinético foi representada através da mediana dos valores simulados, uma vez que a distribuição farmacocinética de uma população é não-paramétrica, sendo melhor representada pela mediana.

- Caseargrewiina F

Na simulação através da via oral de administração em doses únicas, a concentração plasmática máxima (C_{max}) da casg F foi de 3,3 ng/mL (dose 0,5 mg/kg)

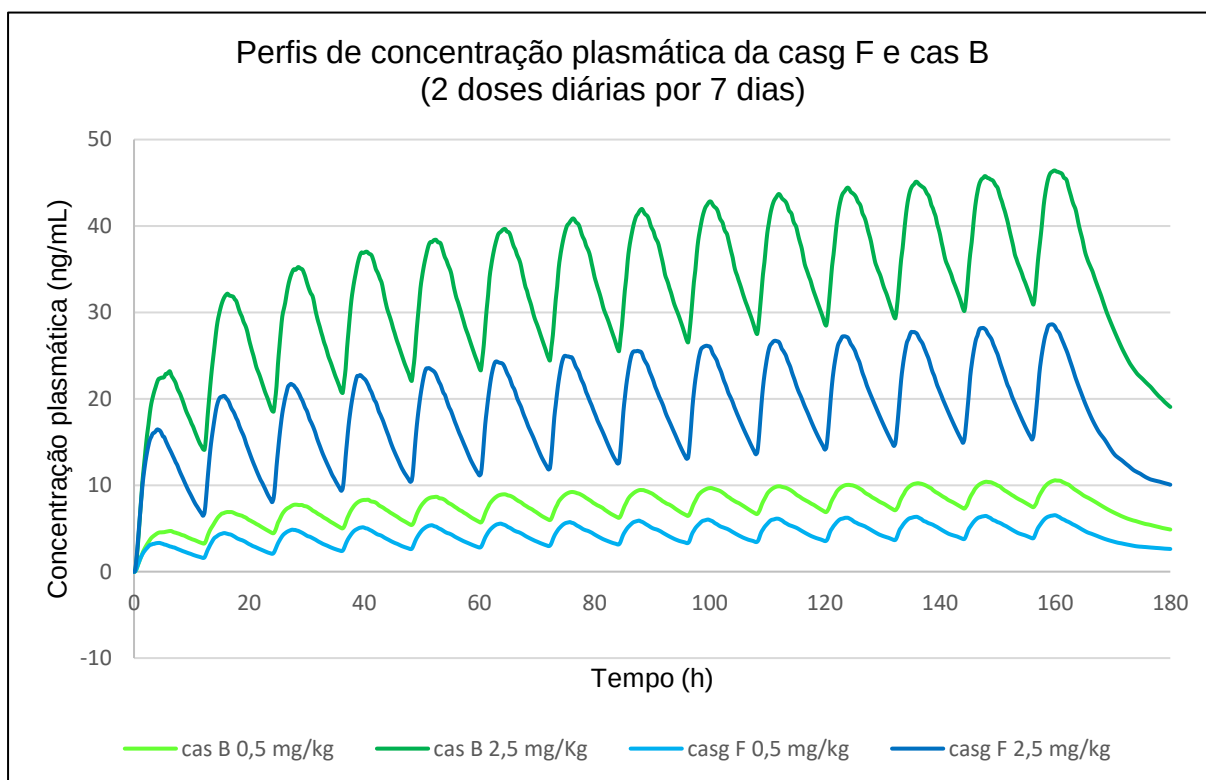
e 16,5 ng/mL (dose 2,5 mg/kg). A meia vida de eliminação foi de 17,3 e 11,4h nas doses baixa e alta, respectivamente. A concentração plasmática máxima (C_{max}) da cas B foi de 4,7 ng/mL (dose 0,5 mg/kg) e 23,17 ng/mL (dose 2,5 mg/kg) em doses únicas. A meia vida de eliminação foi de 12,8 e 11,3h nas doses baixa e alta, respectivamente (Figura 50).

Figura 50. Perfis de concentração plasmática da caseargrewiina F e casearina B simulados através do modelo PBPK em humanos em doses únicas (via oral). Linha azul clara: dose de casg F de 0,5 mg/kg. Linha azul escura: dose de casg F de 2,5 mg/kg. Linha verde clara: dose de cas B de 0,5 mg/kg. Linha verde escura: dose de cas B de 2,5 mg/kg. Software: PK-Sim®.



Já em 2 doses diárias durante 7 dias, a C_{max} da casg F foi de 6,5 ng/mL (dose 0,5 mg/kg) e 28,2 ng/mL (dose 2,5 mg/kg). Em 2 doses diárias durante 7 dias, a C_{max} da cas B foi de 10,6 ng/mL (dose 0,5 mg/kg) e 46,4 ng/mL (dose 2,5 mg/kg) (Figura 51). Em ambos protocolos de administração foi atingido o estado de equilíbrio das concentrações plasmáticas.

Figura 51. Perfis de concentração plasmática da caseargrewiina F e casearina B simulados através do modelo PBPK em humanos em 2 doses diárias durante 7 dias (via oral). Linha azul clara: dose de casg F de 0,5 mg/kg. Linha azul escura: dose de casg F de 2,5 mg/kg). Linha verde clara: dose de cas B de 0,5 mg/kg. Linha verde escura: dose de cas B de 2,5 mg/kg. Software: PK-Sim®.



Apesar de as propriedades físico-químicas da casg F e cas b serem similares, pode ser constatado através dos modelos construídos que elas possuem diferentes perfis cinéticos. Os valores simulados de C_{max} da cas B foram superiores aos da casg F em ambos protocolos de administração e doses. Isso corrobora com o fato de que a casg F é mais suscetível à ação das esterases do que a cas B, como observado nos ensaios de metabolização *in vitro* por microsomas hepáticos humanos deste trabalho. Apesar da meia vida de eliminação ser similar para ambos diterpenos, os resultados indicam que a cas B estará disponível em concentrações maiores no plasma dos indivíduos para exercer ação terapêutica e/ou tóxica do que a casg F. Essas informações são importantes e apontam que os diferentes diterpenos clerodânicos encontrados nas folhas da *C. sylvestris*, apesar de serem estruturalmente similares, provavelmente apresentam diferente disposição cinética em humanos (CHARMAN et al., 2020).

Vale lembrar que esses dados são limitados pois os modelos PBPK não foram validados por nenhum ensaio *in vivo*, uma vez que não foram realizados estudos cinéticos de diterpenos envolvendo animais ou humanos. Essas simulações foram construídas a partir de dados de metabolismo e de ligação a proteínas plasmáticas e microssomais advindos de ensaios *in vitro*, sem considerar a degradação ácida (administração oral em capsulas gastrorresistentes). Desse modo, é interessante que se investigue a farmacocinética em modelos animais ou em humanos para validação dos modelos PBPK.

5.8 Investigação da ação anti-inflamatória *in vitro* dos diterpenos clerodânicos caseargrewiina F e casearina B sobre a inibição da das ciclo-oxigenases 1 e 2 de ovinos (COX-1 e COX-2) e fosfolipase A2 (sPLA₂)

As concentrações testadas foram baseadas em estudos anteriores envolvendo o uso de diterpenos no ensaio de avaliação da atividade anti-inflamatória de edema de pata em ratos (CASTRO, 2016; PIERRI et al., 2017). Considerando que o volume de distribuição teórico de ratos de 200,0 g é de 100 mL, e supondo biodisponibilidade de 100% via oral, na menor dose testada (0,5 mg/kg), a concentração plasmática seria de 5 µg/mL. Assim, foram testadas 3 concentrações 2, 10 e 20 vezes superiores do que a concentração plasmática suposta. O objetivo de se utilizar essas concentrações foi investigar, em um amplo espectro, se as amostras apresentam efeito inibitório significativo sobre as enzimas avaliadas, sem determinar o IC₅₀ (Castro et al., 2014). Os diterpenos e os PDA, em todas as concentrações testadas (10, 50 e 100 µg/mL), exerceram baixa inibição (< 50%) das enzimas COX-1, COX-2 e sPLA₂, as quais estão envolvidas com o processo inflamatório (Tabela 23).

Tabela 23. Efeito da caseargrewiina F e casearina B e seus produtos de degradação ácida (PDA) sobre a atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e fosfolipase A₂ (sPLA₂) (n = 3).

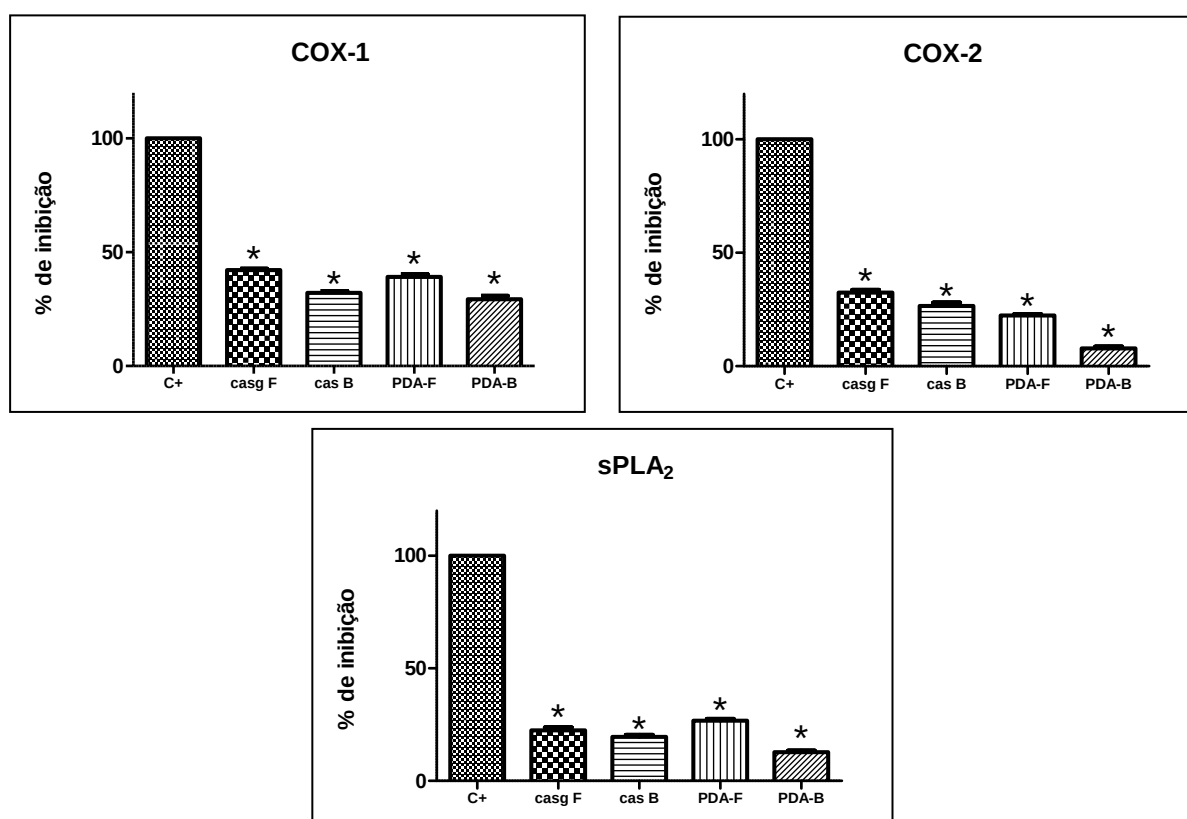
Amostras	Concentração (µg/mL)	% Inibição enzimática (DV)		
		COX-1	COX-2	sPLA ₂
casg F	10	8,3 (0,5)	9,3 (0,5)	7,34 (0,9)
	50	20,5 (0,7)	18,24 (0,5)	11,62 (1,1)
	100	42,1 (0,6)	32,48 (1,2)	22,47 (1,2)
casearina B	10	6,95 (0,6)	5,84 (0,7)	4,38 (0,8)
	50	17,64 (0,7)	11,88 (1,2)	10,58 (0,7)
	100	32,18 (0,7)	26,55 (1,5)	19,54 (0,9)
PDA-F	10	9,32 (0,6)	4,97 (0,8)	4,23 (0,6)
	50	18,84 (0,6)	10,59 (0,9)	12,33 (0,7)
	100	39,18 (1,2)	22,34 (0,6)	26,78 (0,8)
PDA-B	10	5,12 (0,7)	3,97 (0,6)	3,55 (0,5)
	50	13,49 (0,7)	7,89 (0,7)	7,48 (0,5)
	100	29,37 (1,4)	19,23 (1,6)	12,77 (0,7)
Diclofenaco (controle positivo)	10	99,4 (0,0)	98,7 (0,3)	-
	50	100,0 (0,0)	100,0 (0,0)	-
	100	100,0 (0,0)	100,0 (0,0)	-
Tioeteramida-PC (controle positivo)	-	-	-	99,8 (0,1)
	-	-	-	100,0 (0,0)
	-	-	-	100,0 (0,0)

DV: desvio padrão

Apesar de a ação das amostras testadas serem muito próximas, a casg e seus produtos de degradação apresentaram uma ação superior na inibição das enzimas COX-1 e sPLA₂, ainda que discreta. Em relação à COX-2, a casg F apresentou uma porcentagem de inibição maior do que as outras amostras. No geral, as amostras inibiram mais as enzimas COX-1, COX-2 e sPLA₂, nessa ordem.

Levando-se em conta a maior concentração testada (100 µg/mL), houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores de inibição entre todas as amostras entre si e em relação ao controle positivo, que foi próximo de 100%. A única exceção é da inibição da enzima COX-1 pela cas B e PDA-B, nos quais a diferença dos valores não foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 52).

Figura 52. Efeito da caseargrewiina F e casearina B e seus produtos de degradação ácida (PDA) sobre a atividade das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e fosfolipase A₂ (sPLA₂). Concentração: 100 µg/mL.



% de inibição está expressa em relação ao controle negativo. * $p < 0,05$ comparado com o controle positivo (ANOVA, teste de Bonferroni). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de todas as amostras entre si e em relação ao controle positivo, exceto na enzima COX-1 entre a cas B e PDA-B.

A baixa inibição da COX-1 pelos diterpenos e seus produtos (<50%) vai de acordo com a atividade gastroprotetora dessas substâncias. Entretanto, assim como as casearinas J e O, também ocorreu baixa inibição da COX-2. A baixa inibição da enzima sPLA₂ é coerente com os resultados de estudos anteriores nos quais a casg F e casearina J não inibiram o edema de pata induzido por sPLA₂ do veneno de *Bothrops jararacussu* (bothropstoxina II) (CASTRO, 2016). Por outro lado, o fato de estudos demonstrarem a ação inibitória de extratos hidroalcóolicos e aquosos da *C. sylvestris* sobre atividade biológica de sPLA₂ isoladas de venenos e COX-2 indicam

que são outras substâncias presentes na planta responsáveis por essa ação, como flavonoides que apresentam propriedades anti-inflamatórias (RASLAN et al., 2002; OSHIMA-FRANCO et al., 2005; CAVALCANTE et al., 2007; BORGES et al., 2010; CHIRUMBOLO et al., 2010). Também foi observado que o extrato etanólico inibiu COX-I e II e que a planta possui rutina e outros derivados glicosilados da quercetina em sua composição (BUENO et al., 2016).

Ainda há a necessidade de mais investigações, considerando que os diterpenos clerodânicos apresentaram atividade anti-inflamatória em animais e que ensaios *in vitro* em macrófagos demonstraram que a casearina J e O inibiram em mais de 50% a produção de PGE₂. Essa inibição pode ocorrer através da supressão de um ou mais vias de sinalização celular em receptores de membrana que levam à expressão da COX-2 ou através da inibição de outras enzimas da cascata do ácido araquidônico como a sPLA₂ e a PGE₂ sintase (CASTRO, 2014). Entretanto, a sPLA₂ não foi inibida pelos diterpenos ou seus produtos de degradação, o que exclui a possibilidade de a inibição da PGE₂ ocorrer pela ação na sPLA₂.

Além disso, os resultados de inibição enzimática dos produtos de degradação ácida, cuja substância majoritária são os dialdeídos e que poderiam ser as substâncias biodisponíveis após a ingestão oral de diterpenos, foram muito próximos aos respectivos diterpenos em todas os ensaios realizados, assim como em estudos anteriores de inibição de NO. Isso diminui a possibilidade de que esses produtos de degradação ou metabolização possuem atividade sobre essas enzimas, e indicam que a via de ação anti-inflamatória dos diterpenos não está envolvida diretamente com as enzimas COX-1 e COX-2 e sPLA₂, sendo que as modificações estruturais que os diterpenos possivelmente sofrem ao serem ingeridos por via oral não alteram a atividade anti-inflamatória dos diterpenos sobre essas enzimas (ODA et al., 2019).

6. CONCLUSÃO

Foram isolados 2 diterpenos (caseargrewiina F e casearina B) com alto grau de pureza (> 95%) para realização dos ensaios. Os métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação de caseargrewiina F e casearina B nas matrizes dos ensaios de estabilidade e ADME realizados neste trabalho mostraram-se

compatíveis para as aplicações em termos de especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade.

Ambos diterpenos e seus dialdeídos apresentaram valores de log P de 3,6 a 4,0 pelo método cromatográfico, que sugerem boa permeabilidade celular. A casg F e a cas B sofreram degradação em meio de fluído gástrico simulado (pH 1,2) com mais intensidade do que em tampão TRIS (pH 8,8). Já em tampão Hank's (pH 7,4), ambas foram estáveis até 480 e 960 min de incubação, respectivamente. A casg F e a cas B sofreram decaimento quando incubadas em plasma humano por 60 e 270 min, respectivamente. Os resultados sugerem que os diterpenos investigados são substrato de esterases plasmáticas, uma vez que na presença de inibidor de esterases NaF (200 mM) ambas foram estáveis até o tempo de 270 min de incubação.

Nos ensaios de metabolismo *in vitro* usando microsomas hepáticos humanos, foi observado o decaimento de casg F e cas B na presença ou ausência do SRN. Na presença do inibidor de esterases NaF (200 mM) não foi constatado decaimento, sugerindo que a casg F e a cas B são substratos para as esterases hepáticas, as quais não são dependentes dos cofatores do SRN. Desse modo, o metabolismo dos diterpenos provavelmente não está sujeito às variações da capacidade metabólica das enzimas do CYP. A casg F e cas B apresentaram ligação a proteínas plasmáticas e microsomais superiores a 70,0%, o que pode ser explicado por suas características lipofílicas.

O produto de degradação ácida (constituindo mais de 50% do total de produtos, normalização LC-DAD) e metabolização hepática majoritário da casg F e da cas B foi o seu respectivo dialdeído. Os diterpenos apresentaram perfil cinético de Michaelis-Menten em microsomas hepáticos de humanos, com valores de V_{max} e Cl_{int} para a casg F 2 vezes maior do que cas B. O parâmetro K_M da casg F foi próximo ao da cas B, indicando que a afinidade das enzimas microsomais humanas por ambos diterpenos é similar. Pode-se sugerir que a casg F e B são extensamente eliminadas após sua passagem pelo fígado, uma vez que o *clearance* hepático de ambas correspondeu a quase todo fluxo sanguíneo hepático (98,0 e 96,0 %, respectivamente).

Os resultados demonstraram que a casg F é mais suscetível à degradação química e metabolização microsomal do que a cas B, mas ambas possuem

susceptibilidade similar à depuração hepática em humanos. Assim, pode-se inferir que a biodisponibilidade oral *in vivo* dos dois diterpenos é muito reduzida em razão da extensa degradação gastrointestinal e da elevada fração metabolizada na passagem pelo fígado e que as ações farmacológicas decorrentes do uso via oral devem ser atribuídas aos produtos de degradação ou metabólitos destes diterpenos, como o seu dialdeído.

Os valores simulados de $C_{\max}$ através de PBPK da cas B foram superiores aos da casg F em ambos protocolos de administração e doses. Essas informações são importantes e apontam que os diferentes diterpenos clerodânicos encontrados nas folhas da *C. sylvestris*, apesar de serem estruturalmente similares, provavelmente apresentam diferente disposição cinética em humanos.

A via de ação anti-inflamatória dos diterpenos provavelmente não está envolvida diretamente com a inibição das enzimas COX-1, COX-2 e sPLA₂, sendo que as modificações estruturais que os diterpenos possivelmente sofrem ao serem ingeridos por via oral não alteram a atividade anti-inflamatória dos diterpenos sobre essas enzimas.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSSON, B.; LENNERNAS, H. Application of the biopharmaceutic classification system now and in the future. In: WATERBEEMD, H.; LENNERNAS, H.; ARTURSSON, P. **Drug bioavailability, estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability**. 1 ed. Wiley, 2005. p. 523–558.

ABSY, M.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *Casearia sylvestris* Swartz. **Boletim de Zoologia e Biologia Marinha**, v. 30, p. 641-676, 1973.

ALMEIDA, A. E. et al. Mutagenic activity of glycoalkaloids from *Solanum palinacanthum* (Solanaceae) found in the Brazilian cerrado. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 122-126, 2010.

AMENI, A. Z.; LATORRE, O. A.; TORRES, L. M. B.; GÓRNIK, S. L. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: A contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 9-13, 2015.

AMOA, S. K. S. et al. Rosmarinic acid – pharmaceutical and clinical aspects. **Planta Medica**, v. 82, n. 5, p. 388-406, 2016.

ANULIKA, N. P.; IGNATIUS, E. O.; RAYMOND, E. S.; OSASERE, O.; ABIOLA, A. H. The chemistry of natural product: plant secondary metabolites. **International journal of technology enhancements and emerging engineering research**, v. 4, p. 1-8, 2016.

BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; PANNIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p.185-197, 1990.

BAI, L. et al. Plasma pharmacokinetics and brain distribution kinetics of lapachol in rats using LC-MS and microdialysis techniques. **RSC Advances**, v. 7, p. 53355–53361, 2017.

BEZERRA, D. P. et al. Sensitive method for determination of pipartine, an alkaloid amide from *Piper* species, in rat plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 460-465, 2012.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends in immunology**, v. 36, p. 161-178, 2015.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 127B, p. 21-30, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 27, de 27 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, maio, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, maio, 2014.

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

BUENO, P. C. P.; PEREIRA, F.M.V.; TORRES, R.B.; CAVALHEIRO, A. J. Development of a comprehensive method for analysing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra-high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 1649-1656, 2015.

BUENO, P. C. P. et al. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety lingua (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 68, p. 23-26, 2016.

BUTTERWECK, V. et al. Pharmacokinetic herb-drug interactions: are preventive screenings necessary and appropriate? **Planta Medica**. v. 70, n. 9, p. 784-791, 2004.

CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de botânica geral e médica**. Rio de Janeiro: Tipographia Nacional, 1877. v. 3, 2600 p.

CARVALHO, E.S.; SANTOS, A.G.; CAVALHEIRO, A.J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, p. 277-284, 2009.

CARVALHO, F. A.; UCHINA, H. S.; BORGES, F. A.; OYAFUSO, M. H.; HERCULANO, R. D.; GREMIÃO, M. P. D.; SANTOS, A. G. Natural membranes of *Hevea brasiliensis* latex as delivery system for *Casearia sylvestris* leaf components. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 102-110, 2018.

CARVALHO, F. A. **Estudo de variabilidade do óleo essencial de folhas de *Casearia sylvestris* Swartz**. 2019. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

CASTRO, R. C. **Caracterização por espectrometria de massas e investigação das atividades anti-inflamatória e gastroprotetora do extrato etanólico e diterpenos clerodânicos de folhas de *Casearia sylvestris* Swartz**. 2016. 150f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara, 2016.

CAVALCANTE, W. L. G.; CAMPOS, T. O.; PAI-SILVA, M. D.; PEREIRA, P. S.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GALLACCI, M. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 490- 497, 2007.

CAYMAN CHEMICAL. **COX (ovine) inhibitor screening assay kit (Item No. 560101)**. Disponível em: < <https://www.caymanchem.com/pdfs/560101.pdf>>. Acesso em: 09 ago 2017a.

CAYMAN CHEMICAL. **sPLA₂ (type V) inhibitor screening assay kit (Item No. 10004883)**. Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/pdfs/10004883.pdf>>. Acesso em: 09 ago 2017b.

CHARMAN, S. A. et al. An in vitro toolbox to accelerate anti-malarial drug discovery and development. **Malaria Journal**. V. 19, n. 1, p. 2-27, 2020.

CHEN, J. Y. et al. Anti-inflammatory effects and pharmacokinetics study of geniposide on rats with adjuvant arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 24, p. 102-109, 2015.

CHEN, X. Q., et al. Discovery pharmaceuticals—challenges and opportunities. **The AAPS journal**, v. 8, n. 2, p. E402-E408, 2006.

CHEN, Q. et al. Development of a liquid chromatography–mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: Application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2877-2884, 2011.

CHIRUMBOLO, S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. **Inflammation and Allergy Drug Targets**. v. 9, p. 263–285, 2010.

CHOI, E. J. Pharmacokinetic profile of kaurenoic acid after oral administration of *Araliae continentalis* Radix extract powder to humans. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, 2018.

CLAUDINO, J. C.; SACRAMENTO, L. V. S.; KOCH, I.; SANTOS, H. A.; CAVALHEIRO, A. J.; TININIS, A. G.; SANTOS, A. G. Evaluation of morpho-anatomical and chemical differences between varieties of the medicinal plant *Casearia sylvestris* Swartz. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1252-65, 2013.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Pesquisa Clínica. p. 64, São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.crfsp.org.br/component/phocadownload/category/cartilhas-das-comissoes-assessoras-comites.html?download=200:cartilha-pesquisa-clinica>. Acesso em: 10/06/2020.

DANUELLO, A. et al. Fragmentation study of clerodane diterpenes from *Casearia* species by tandem mass spectrometry (quadrupole time-of-flight and ion trap). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Special issue research article, v. 34 Suppl 3, e8781. 2020. <https://doi.org/10.1002/rcm.8781>.

DE FORD, C. B.; HEIDERSDORF, F.; HAUN, R.; MURILLO, T.; FRIEDRICH, C.; BORNER, I.; MERFORT. The clerodane diterpene casearin J induces apoptosis of T-ALL cells through SERCA inhibition, oxidative stress, and interference with Notch1 signaling, **Cell Death Disease**, v. 7, p. 2070, 2016.

DEMARQUE, D. P. Pharmacokinetic disposition of erythraline in rats after intravenous administration. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 6, p. 773-777, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.07.002>.

DENNIS E. A. et al. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130- 6185, 2011.

DEWICK, P. M. **Medical Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3rd. ed. West Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons, 2009. 520 p.

DI, L., et al. Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. **International journal of pharmaceutics**, v. 297, n. 1-2, p. 110-119, 2005.

DI, L.; KERNS, E. H. Stability challenges in drug discovery. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, n. 11, p. 1875-1886, 2009.

DI, L.; KERNS, E. H. **Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization**. San Diego, CA: Academic press, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801076-1.09992-5>.

EMOTO, C. et al. Methodologies for investigation drug metabolism at the early drug discovery stage: prediction of hepatic drug *clearance* and P450 contribution. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 11, n. 8, p. 678–685, 2010.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). ICH guideline M3 (R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. 2009. Disponível em: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002720.pdf. Acesso em: 15/maio/2018.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). Guideline on bioanalytical method validation. 2011. Disponível em https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. Acesso em: 21/maio/2018.

FELIPE, K. B.; KVIECINSKI, M. R.; SILVA, F. O.; BÜCKER, N. F.; FARIAS, M. S.; CASTRO, L. S. E. P. W.; GRINEVICIUS, V. M. A. S.; MOTTA, N. S.; CORREIA, J. F. G.; ROSSI, M. H.; PEDROSA, R. C. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p.1492-1499, 2014.

FERREIRA, P. M. P. et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 83, n. 4, p. 1373- 1384, 2011.

FERREIRA, P. M. P. et al. Morphological and biochemical alterations activated by antitumor clerodane diterpenes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 222, p. 112-125, 2014.

FERREIRA, P. M. P. et al. Preclinical anticancer effectiveness of a fraction from *Casearia sylvestris* and its component Casearin X: *in vivo* and *ex vivo* methods and microscopy examinations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 270-279, 2016.

FOFARIA, N. M. et al. Nanoemulsion formulations for anti-cancer agente piplartine - characterization, toxicological, pharmacokinetics and efficacy studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 498, p. 12-22, 2015.

FOSTER, B. C.; ABRAMOVICI, H.; HARRIS, C. S. Cannabis and cannabinoids: kinetics and interactions. **The American Journal of Medicine**, v. 132, n. 11, p. 1266-1270, 2019.

GASPARETTO, J. C. A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans. **Plos One**, v. 10, n. 3, e0118922, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0118922.

GREENHOUGH et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 3, p. 377-386, 2009.

GROSSER, T.; SMYTH, E. M.; FITZGERALD, G. A. Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. *In*: BRUNTON, L.; CHABNER, B.; KNOLLMAN, B. **Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics**. 12th. ed. New York: McGraw-Hill, 2011. cap. 34.

GUARANTINI, T. et al. *In vitro* metabolism studies of erythraline, the major spiroalkaloid from *Erythrina verna*. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 61, 2014. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-61>.

HE, S. M. et al. Disposition Pathways and Pharmacokinetics of Herbal Medicines in Humans. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4072-4113, 2010.

HEYMANNNS, A. C. et al. Macroscopic, biochemical and hystological evaluation of topical anti-inflammatory activity of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, e113139, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113139>.

HOU, Y. C. et al. Metabolism and pharmacokinetics of genipin and geniposide in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2764–2769, 2008.

HOUSTON, J. B. Utility of *in vitro* drug metabolism data in predicting *in vivo* metabolic clearance. **Biochemical pharmacology**, Oxford, v. 47, n. 9, p. 1469–1479, 1994.

HOUSTON, J. B; KENWORTHY, K. E. *In vitro-in vivo* scaling of cyp kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. **Drug metabolism and disposition**, v. 28, n. 3, p. 246-254, 2000.

HOWARD, M. L. et al. Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, p. 170-187, 2010.

HUBATSCH I. et al. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. **Nature Publishing Group**, v. 2, n. 9, 2111-19, 2007.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; IITAKA, Y.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. New Antitumor Principles, Casearins A-F, for *Casearia Sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 3384-3388, 1990.

JIA, L.; LIU, X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *in vitro* experiments. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 8, n. 8, p. 822–829, 2007.

JIANG, R. et al. Identification of cytochrome P450 enzymes responsible for metabolism of cannabidiol by human liver microsomes. **Life Sciences**, v. 89, p. 165-170, 2011.

JONES, H. M. et al. Application of PBPK modelling in drug discovery and development at Pfizer. **Xenobiotica**, v. 42, n. 1, p. 94-106, 2012.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; BUAYAIRAKSA, M. Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiaifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 7, p. 1122-1126, 2007.

KERNS, A. H.; DI, L. Chemical Stability. In: TAYLOR, J. B.; TRIGGLE, D. J. **Comprehensive medicinal chemistry II**. New York, NY: Elsevier, 2007. cap 5.20, p.489-507.

KLEIN, R. M.; SLEUMER, H. O. **Flora ilustrada catarinense: flacourtiáceas**. 1984. p. 78-87.

KOITKA, M. et al.. Improving the *ex vivo* stability of drug ester compounds in rat and dog serum: Inhibition of the specific esterases and implications on their identity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, p. 664–678, 2010.

KWONG, E. Advancing Drug Discovery: A Pharmaceuticals Perspective. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 865-71, 2015.

LANE, T. E., WU-HSIEH B. A., HOWARD, D. H. Gamma interferón cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1468–1473, 1993.

LEXCHIN, J. Pharmaceutical company spending on research and development and promotion in Canada, 2013-2016: a cohort analysis. **Journal of Pharmaceutical Policy and Practice**, v. 11, n. 5, p. 1-6, 2018.

LIAO, Q. et al. LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation Luying extract. **Journal of Pharmaceutical Society of Japan**, v. 125, n. 6, p 509-515, 2005.

LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 49, n. 4, p. 403–449, 1997.

LOHMANN, W. KARST, U. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. **Analytical and Bionalytical Chemistry**. v. 391, n 1, p. 79-96, 2008.

LUCAS, C. J.; GALETTIS, P.; SCHNEIDER, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, p. 2477-2488, 2018.

MADGULA, V. L. M. et al. Characterization of *in vitro* pharmacokinetic properties of hoodigogenin a from *hoodia gordonii*. **Planta Medica**, v. 76, p. 62-69, 2010.

MARQUES, L. M. M. et al. *In vitro* metabolism of the alkaloid pipartine by rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 95, p. 113-120, 2014.

MARQUES, L. M. M. et al. Pharmacokinetic properties, *in vitro* metabolism and plasma protein binding of govaniadine an alkaloid isolated from *Corydalis govaniana* Wall. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 464-472, 2016.

MARQUES, L. M. M. et al. Microsomal metabolism of erythraline: an anxiolytic spiroalkaloid. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, p. 529-532, 2015.

MARQUETE, R. Reserva ecológica do IBGE (Brasília-DF): Flacourtiaceae. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 5-16, 2001.

MARQUETE, R.; VAZ, A. M. S. F. O gênero *Casearia* no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, p. 705-738, 2007.

MAURO, M. et al. Acid diterpenes from copaiba oleoresin (*Copaifera langsdorffii*): chemical and plasma stability and intestinal permeability using caco-2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 235, p. 183-189, 2019.

MATOS, D. M. et al. Pharmacokinetic profile and oral bioavailability of kaurenoic acid from *Copaifera* spp. in rats. **Fitoterapia**, v. 128, p. 142-147, 2018.

MERRICK, J. et al. Identification of psychoactive degradants of cannabidiol in simulated gastric and physiological fluid. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 1, n. 1, p. 101-112, 2016.

MESSIANO, G. B. et al. *In vitro* metabolism study of the promising anticancer agent the lignan (–)-grandisin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 240-244, 2013.

MILLAR, S. et al. A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1365, 2018.

MOREIRA DA SILVA, R. **Caracterização *in vitro* do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X**. 2016. 120 f. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

MOREIRA DA SILVA, R. et al. Evaluation of the Intestinal Absorption Mechanism of Casearin X in Caco-2 Cells with Modified Carboxylesterase Activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 1084-1090, 2016.

MOREIRA DA SILVA, R. et al. Characterization of Casearin X Metabolism by Rat and Human Liver Microsomes. **Planta Medica**, v. 85, n. 4, p. 282-291, 2018.

MOREIRA, F. L. et al. A non-michaelian behavior of the *in vitro* metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyrins by employing rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.84, p. 14-19, 2013.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E. P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693-697, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NIEHUES, M. et al. Biomimetic *in vitro* oxidation of lapachol: A model to predict and analyse the *in vivo* phase I metabolism of bioactive compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 804-812, 2012.

NISHIMUTA, H.; HOUSTON, J. B.; GALENTIN, A. Hepatic, intestinal, renal, and plasma hydrolysis of prodrugs in human, cynomolgus monkey, dog, and rat: implications for *in vitro-in vivo* extrapolation of clearance of prodrugs. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 42, n. 9, p. 1514–1521, 2014.

NOGUCHI-SHINOHARA, M. et al. Pharmacokinetics, safety and tolerability of *Melissa officinalis* extract which contained rosmarinic acid in healthy individuals: a randomized controlled trial. **Plos One**, v. 10, n. 5, e0126422, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126422>.

NUNES, S. et al. Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid - cytoprotective properties and pharmacokinetic profile. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 57, n. 9, p. 1799-1806, 2017.

OBACH, R. S., et al. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and *in vitro* metabolism data. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, p. 46–58, 1997.

OBACH, R. S. Prediction of human *clearance* of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic *clearance* data: an examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 27, n. 11, p. 1350-1359, 1999.

OBACH, R. S. Predicting *clearance* in humans from *in vitro* data. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 334-339, 2011.

ODA, F. B. **Derivados de diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* Swartz obtidos por ensaios *in vitro*: caracterização estrutural e avaliação da atividade anti-inflamatória**. 2017. 190 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

ODA, F. B. et al. Acidic and hepatic derivatives of bioactive clerodane diterpenes casearins J and O. **Fitoterapia**, v. 137, 104197, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104197>.

OECD. Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD. p. 1–11, Publishing, 2004.

OSHIMA-FRANCO, Y.; ALVES, C. M. V.; ANDRÉO FILHO, N.; GERENUTTI, M.; CINTRA, A. C. O.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; SILVA, M. G. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from

Bothrops jararacussu snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga). **Journal of Venoms Animal Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 465-478, 2005.

PIERRI, E. G. et al. Anti-inflammatory action of ethanolic extract and clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 4, p. 495-501, 2017.

PRIETO, A. M. et al. Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodane diterpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 153- 159, 2013.

RAMOS, C. S.; VANIN, S. A.; KATO, M. J. Metabolism of (-)-grandisin from *Piper solmsianum* in Coleoptera and Lepidoptera species. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2157-2161, 2008.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D. S.; BORGES, M. H.; DE LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bolletín Chimie et Farmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

RODRIGUES, I. V. **Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo***. 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências), USP, Ribeirão Preto.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos do extrato das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico**. 2008. 335 f. Tese (Doutorado em Química), UNESP, Araraquara.

SANTOS, A. G. et al. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Caseria sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

SARTORI, L. R. **Avaliação do metabolismo *in vitro* da budleína A**. 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências), USP, Ribeirão Preto.

SASSIOTO, M. C. P. et al. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 6, p. 637-641, 2004.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Fundamentals of enzyme kinetics. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. **Enzyme Kinetic in Drug Discovery**. 1 ed. Springer Protocols. 2014.

SERTIÉ, J.A.A., WOISKY, R. G., CAVALHEIRO, A. J., BOLZANI, V. S., SANTOS, A. G., TININIS, A. G., 2018. Processo de Obtenção de Extratos e de Frações ativas de *Casearia sylvestris* e seus usos. PI 0306167-1. Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brazil.

SHAN, M. et al. A review on the phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of geniposide, a natural product. **Molecules**, v. 22, n. 10, p 1689, 2017.

SHANMUGAM, M. K. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 11, p. 1579-1587, 2013.

SLEUMER, H. O. **Flacourtiaceae: flora neotropica**. Monograph number 22. New York: The New York Botanic Garden 1980. p. 4, 281, 392-393, 400-401.

SMITH, D. A.; WATERBEEMD, H. V. D.; WALKER, D. K. **Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design**. Weinheim; New York: Wiley-VCH, p. 19, 2012.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd. Ed. New York: John Wiley & Sons, 2010. p. 912.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa, Brazil: Instituto Plantarum, 2005.

SPÓSITO, L.; ODA, F. B.; VIEIRA, J. H. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-helicobacter pylori activity of *Casearia sylvestris* leaf derivatives, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 1–12, 2019.

SRIKANT, C. H. et al. Correlation of in-vitro and in-vivo plasma protein binding using ultracentrifugation and UPLC-tandem mass spectrometry. **Analyst**, v. 138, n. 20, p. 6106-16, 2013.

STEHMANN, R. S.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In. SIMÕES et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** 7. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Artmed. 2017. p. 1.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética básica e aplicada.** ed. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUBRAMANIAN, M.; TRACY, T. S. Methods for Determination of Enzyme Kinetics and Metabolic Rates. In: LYUBIMOV, A. V. **Encyclopedia of drug metabolism and interactions.** Hoboken: Wiley, 2012, p. 1-27.

TAKÁCS-NOVÁK, K. Physicochemical profiling in drug research and development. In: **Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development**, IAPC Publishing, Zagreb, 2012. Chapter 1, p. 1-59.

TESTA, B.; KRAMER, S. D. The biochemistry of drug metabolism – a introduction: part 1. Principles and overview. **Chemistry & Biodiversity**. v. 3, n. 10, p. 1053-1101, 2006.

THERMOFISHER. **Rat (Sprague Dawley) Microsomes (RTMCPL)**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/RTMCPL>>. Acessado em: 07/10/2017a.

THERMOFISHER. **Human Microsomes, 50 Donors (HMMCPL)**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/HMMCPL>>. Acessado em: 07/10/2017b.

TORRES, R. B.; YAMAMOTO, K. Taxonomia das espécies de *Casearia* Jacq. (Flacourtiaceae) do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 9, p. 239-258, 1986.

UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY (USP). ed. 34. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.

VAN BREEMEN, R. B.; LI, Y. Caco-2 Cell Permeability Assays to Measure Drug Absorption. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.1, n.2, p. 175-185, 2005.

VIEIRA, M. S. *In vitro* basal cytotoxicity assay applied to estimate acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, p. 505-510, 2011.

WANG, J. et al. Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats by LCMS/MS: absolute bioavailability and dose proportionality. **RSC Advances**, v. 5, n. 15, 2017. <https://doi.org/10.1039/C6RA28237G>.

WATERBEEMD H. V.; GIFFORD E. Admet in silico modelling: towards prediction paradise?. **Nature Reviews Drug Discovery**. Michigan, Estados Unidos, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.

WILLIAMS R. B. et al. Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 206–209, 2007.

XIA, L.; GUO, Q; TU, P.; CHAI, X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 99-135, 2015.

XIN, G. Z. Strategies for Integral Metabolism Profile of Multiple Compounds in Herbal Medicines: Pharmacokinetics, Metabolites Characterization and Metabolic Interactions. **Current Drug Metabolism**, v. 12, p. 809-817, 2011.

XU, C. et al. Pharmacokinetics of oral and intravenous cannabidiol and its antidepressant-like effects in chronic mild stress mouse model. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 70, 2019.

YUTAKA, K. et al. Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4740-46, 2005.

ZHANG et al. *In Vitro* Evaluation of the Inhibitory Potential of Pharmaceutical Excipients on human carboxylesterase 1A and 2. **Plos one**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1–8, 2014.

ZHANG, C. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the triterpenoid ursolic acid in regulating the antioxidant, anti-inflammatory, and epigenetic gene responses in rat leukocytes. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, 3709-3717, 2017.

ZHENG, X. et al. Quantitative determination and pharmacokinetic study of solamargine in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p; 1157-1162, 2011.

ZHAO, P.; ZHANG, L.; GRILLO, J. A.; LIU, Q.; BULLOCK, J. M.; MOON, Y. J.; SONG, P.; BRAR, S. S.; MADABUSHI, R.; WU, T. C.; BOOTH, B. P.; RAHMAN, N. A.; REYNOLDS, K. S.; GIL BERGLUND, E.; LESKO, L. J.; HUANG, S. M. Application

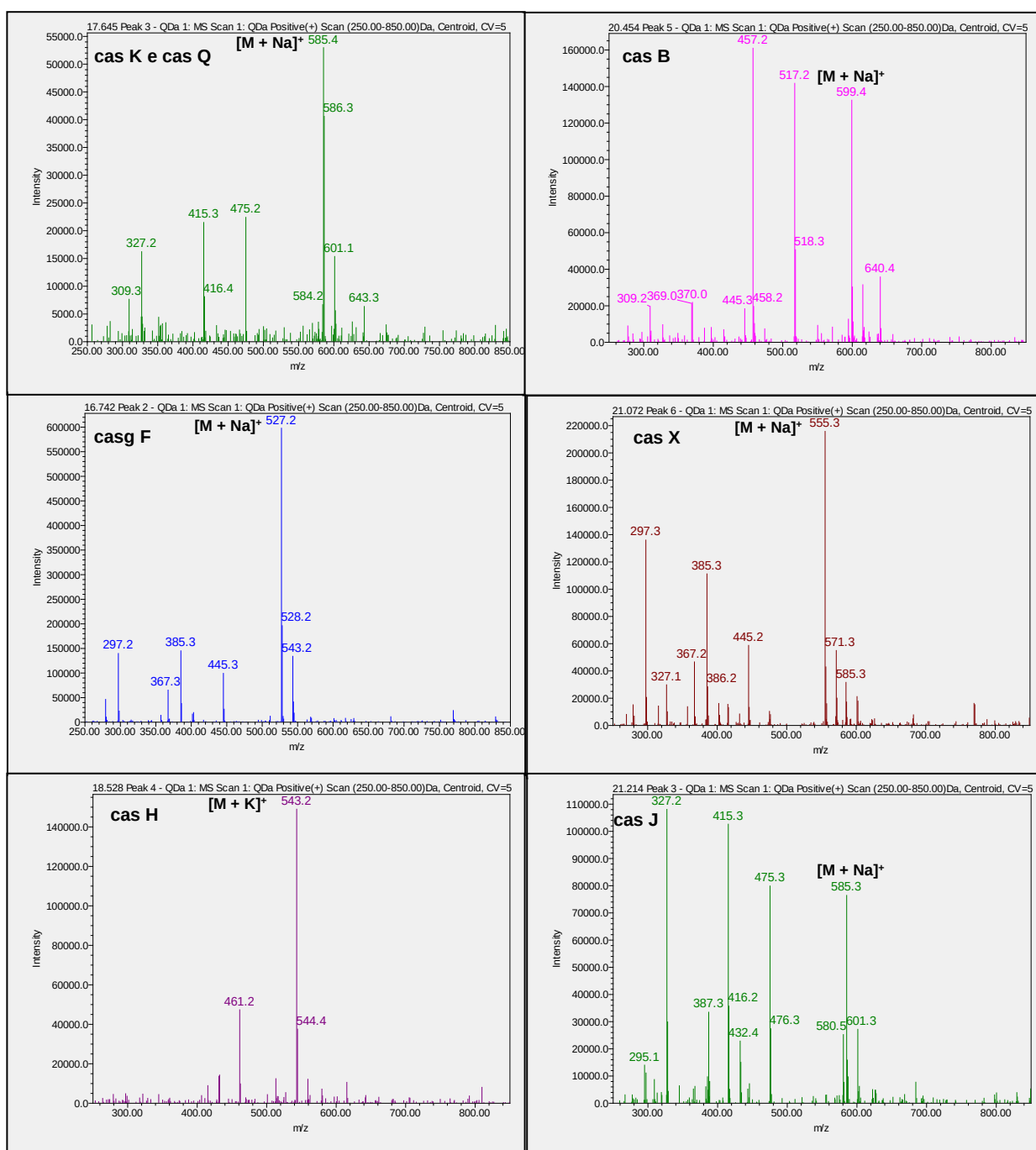
of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation during regulatory review. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, United States, v. 89, n. 2, p. 259-267, 2011.

ZHUANG, X.; LU, CHUANG. PBPK modeling and simulation in drug research and development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 5, p. 430-440, 2016.

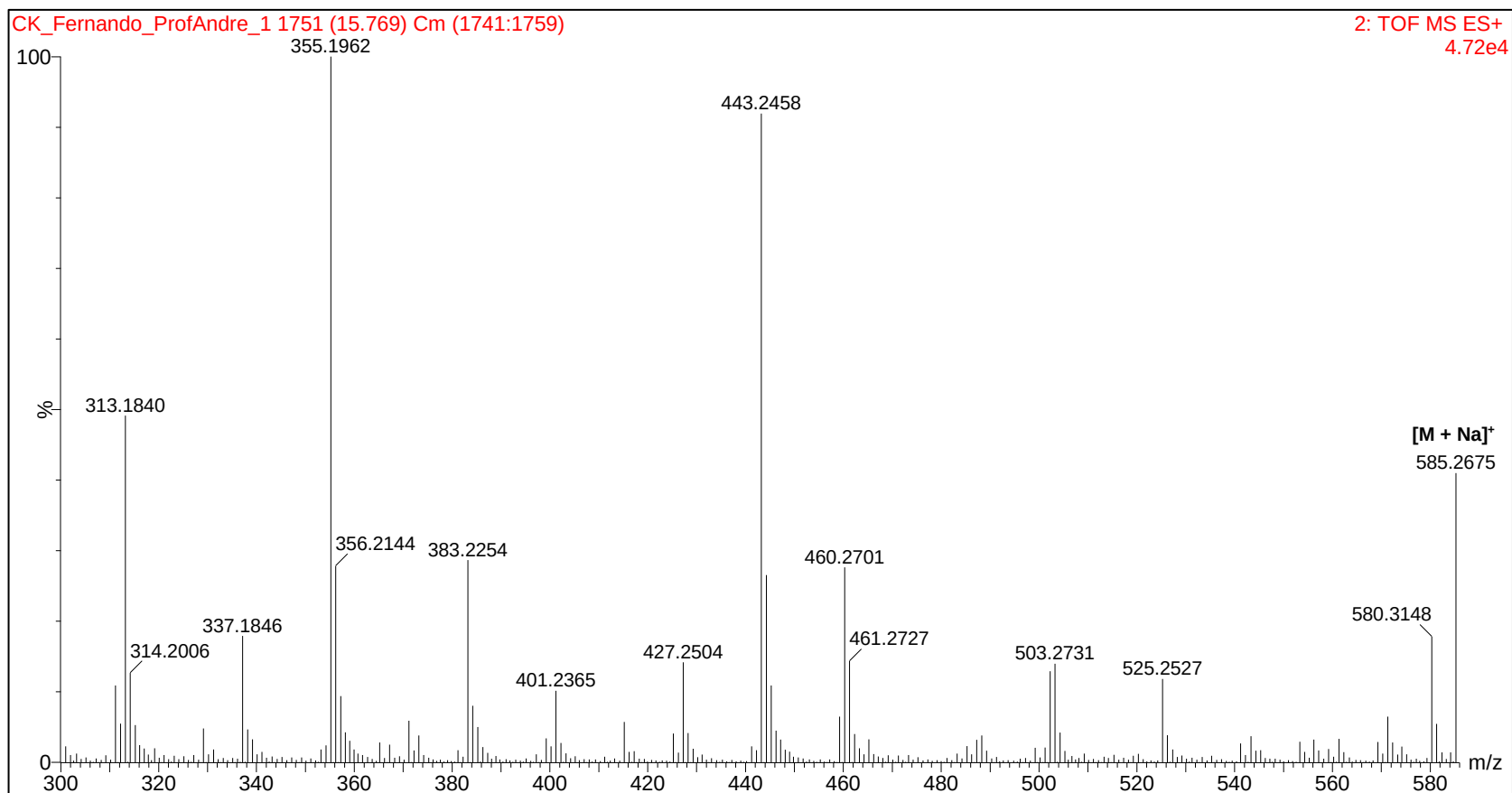
ZVEREVA, I.; EKATERINA, S.; GRIGORY, K. e GIGORY R. 2016. Comparison of various *in vitro* model systems of the metabolism of synthetic doping peptides: proteolytic enzymes, human blood serum, liver and kidney microsomes and liver S9 fraction. **Journal of Proteomics**, 149, n. 21, p. 85-97, 2016.

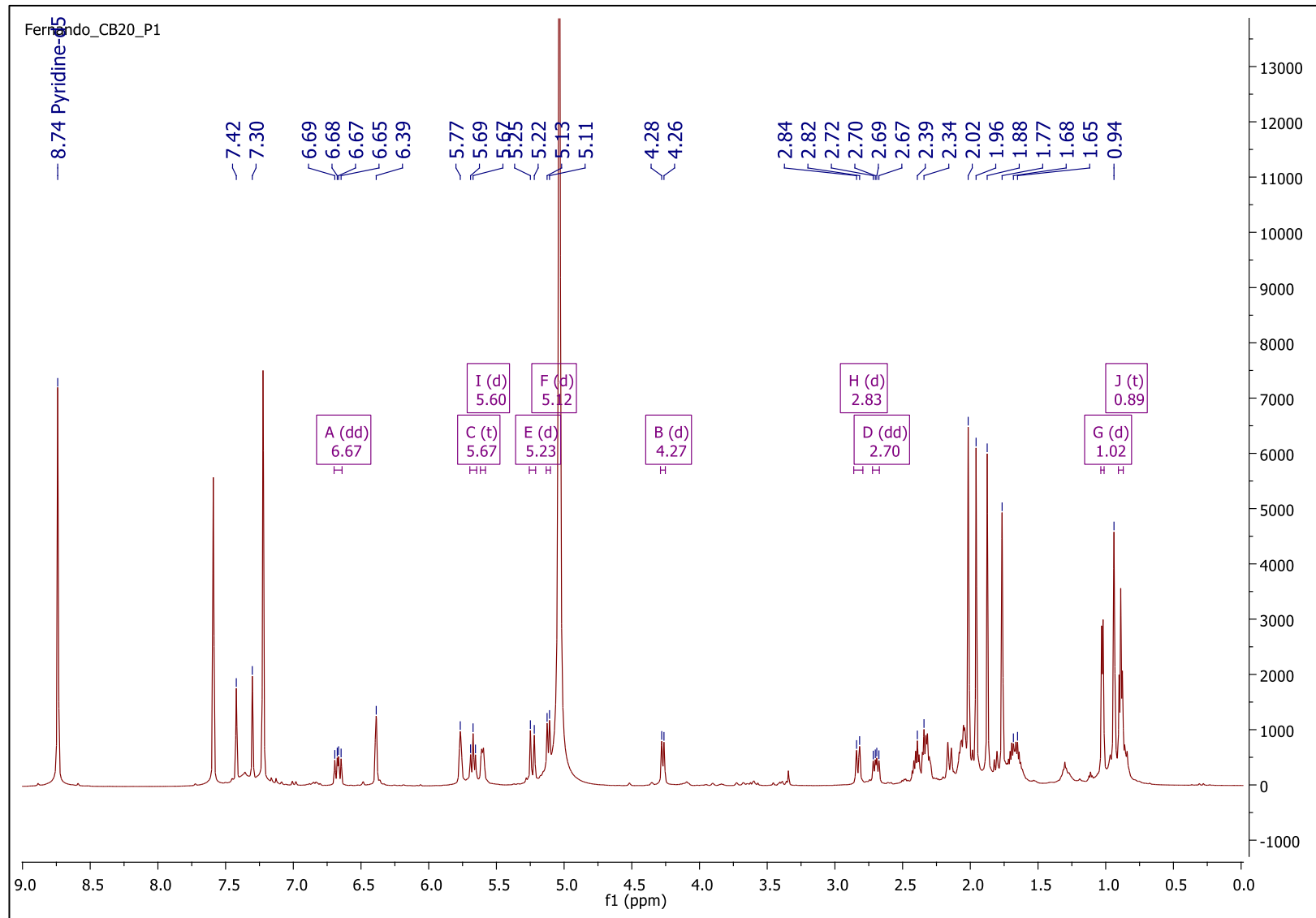
8. APÊNDICES

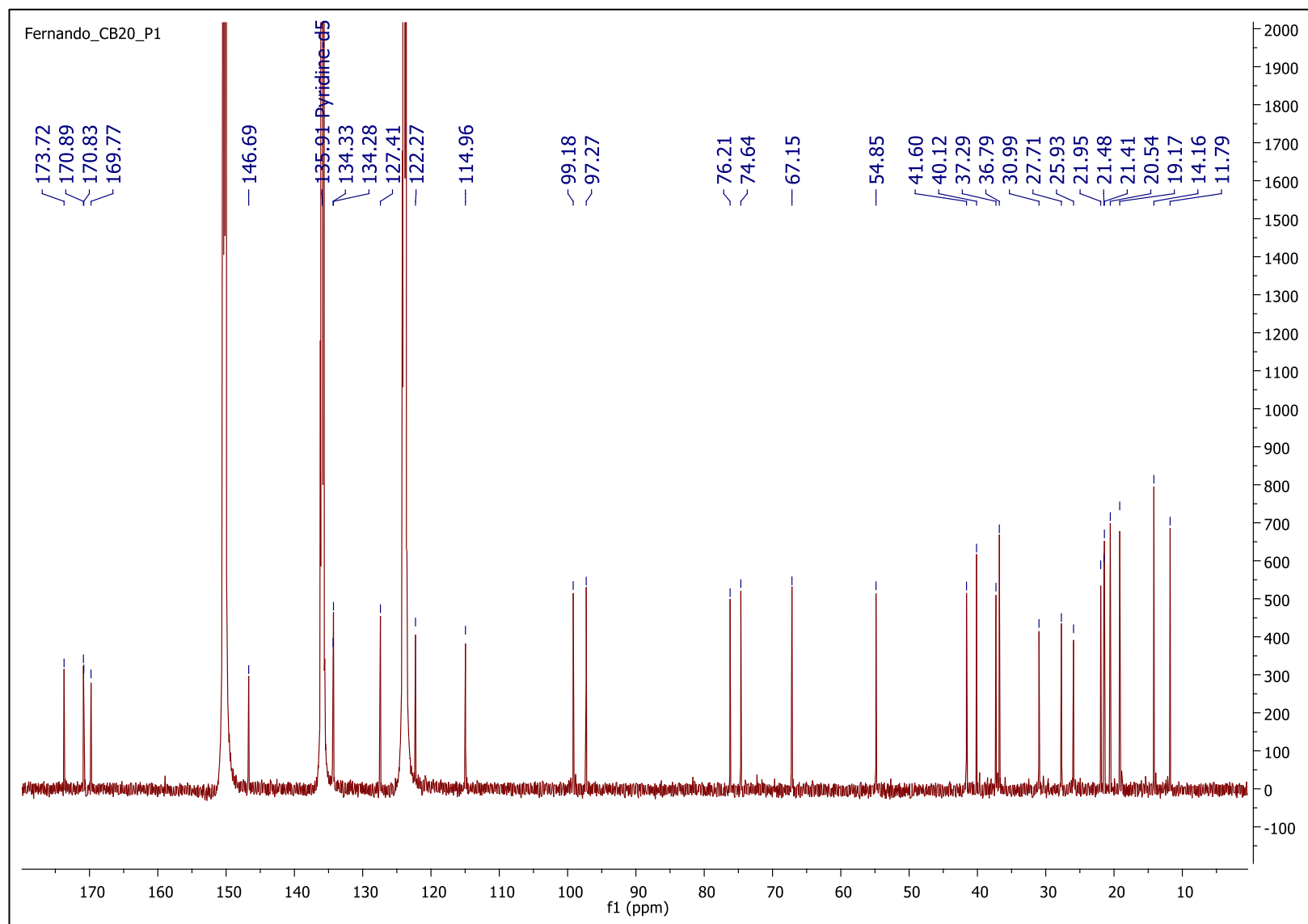
APÊNDICE 1 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) dos picos majoritários da F2. No t_R de 15,6 casearina K com pico base de 585 [M + Na]⁺; no t_R de 16,7 min a caseargrewiina F com pico base de 527 [M + Na]⁺; no t_R de 17,6 min a casearina Q com pico base de 585 [M + Na]⁺; no t_R de 18,5 min a casearina H com pico base de 543 [M + Na]⁺; no t_R de 20,4 min a casearina B com pico de 599 [M + Na]⁺; no t_R de 21,1 min a casearina X com pico base de 555 [M + Na]⁺; no t_R de 21,3 min a casearina J com pico de 601 [M + K]⁺.

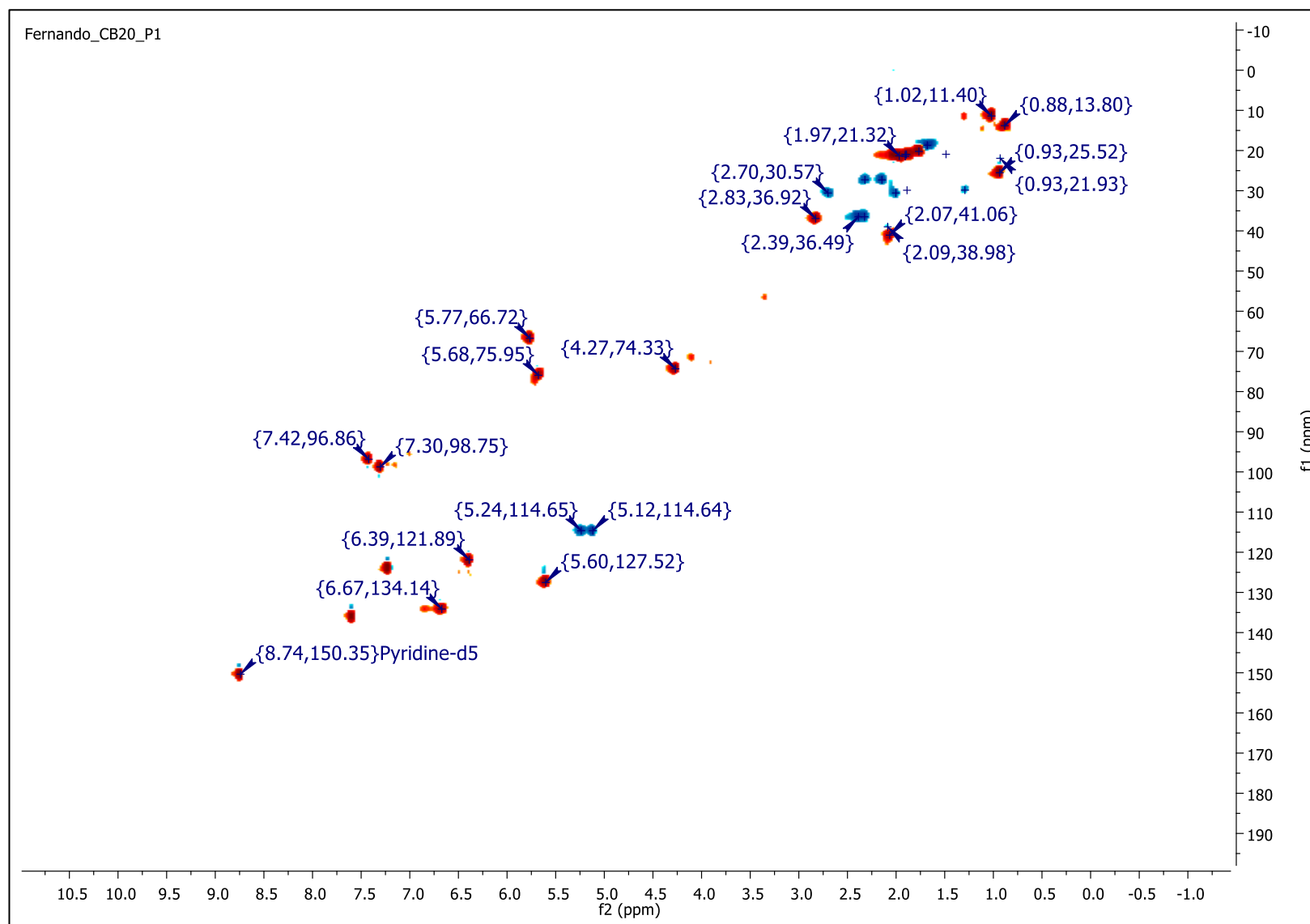


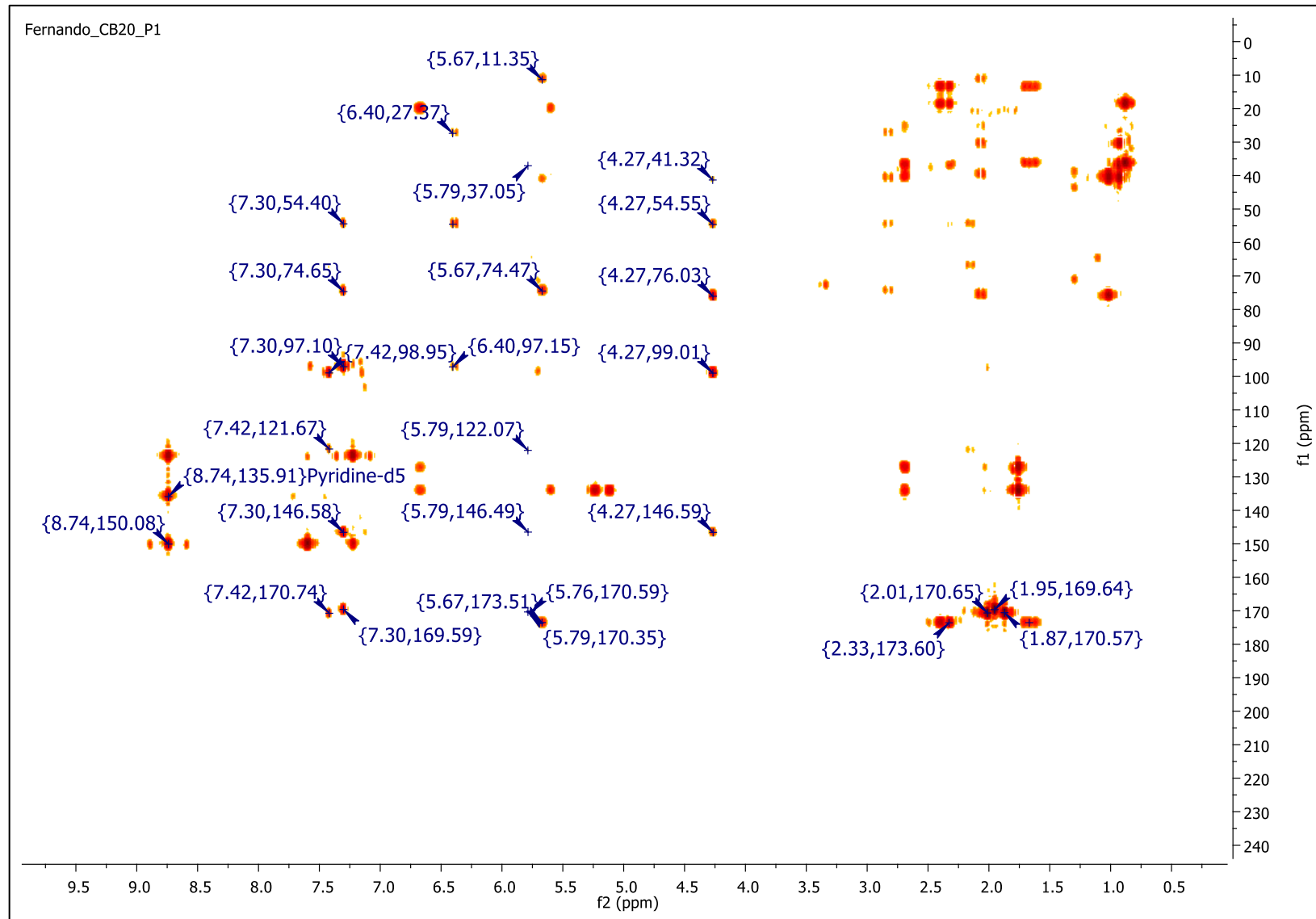
APÊNDICE 2 – Espectro de massas ESI⁺ (MS²) do íon m/z 585,2675 [M + Na]⁺ relativo à casearina K.

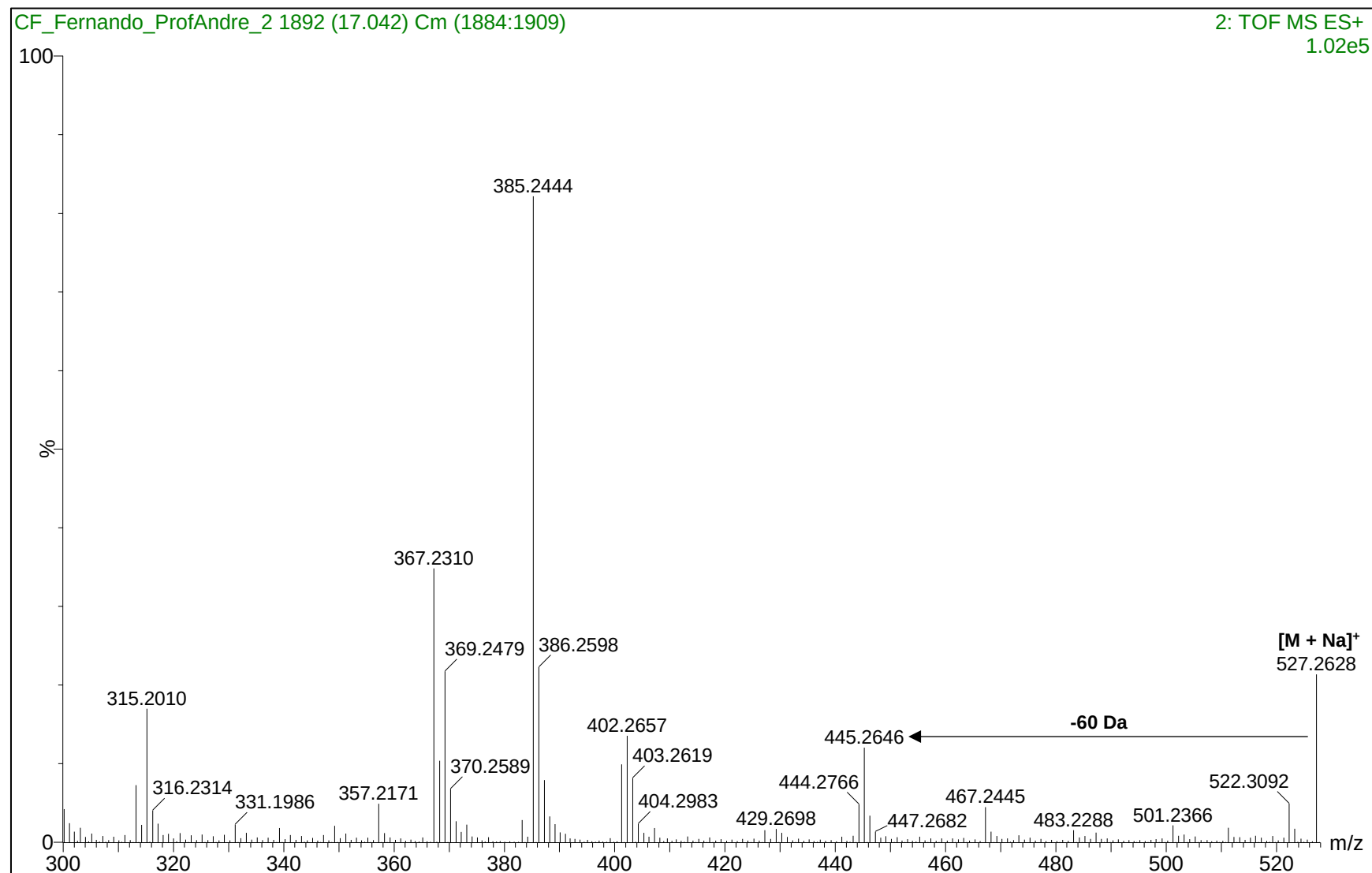


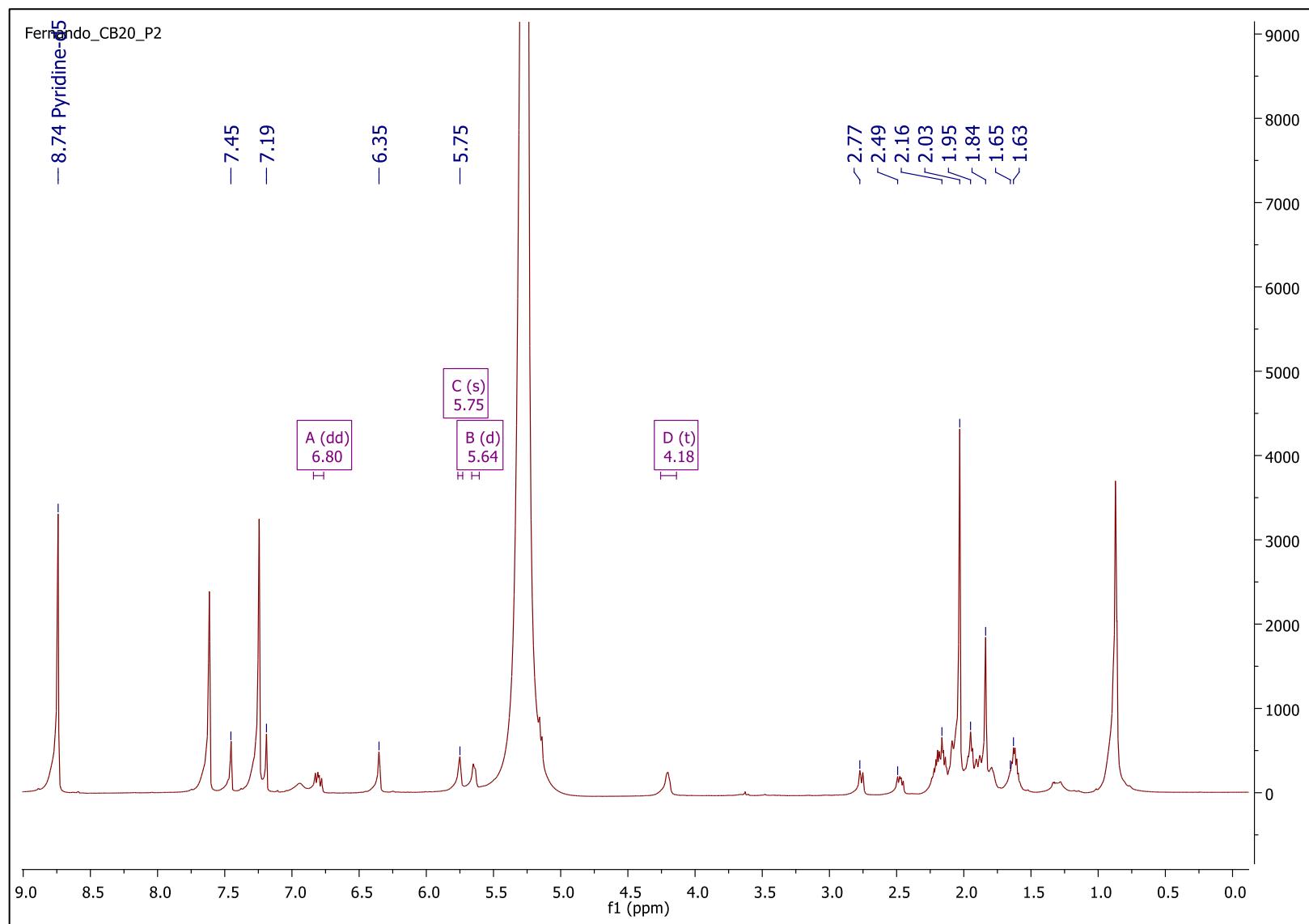
APÊNDICE 3 – Espectro de RMN de ^1H da casearina K (P1) obtido a 600 MHz (pentadeuteropiridina).

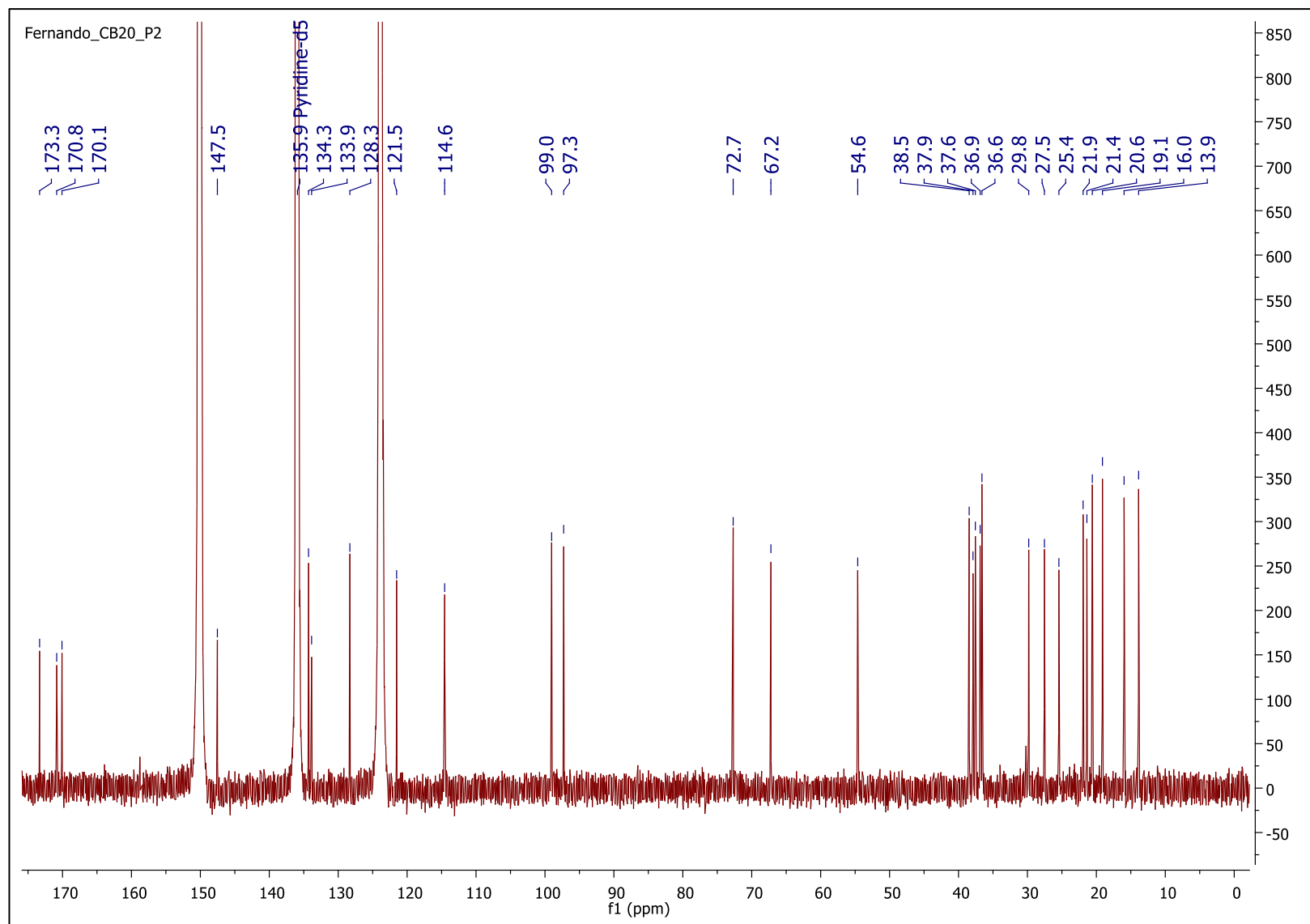
APÊNDICE 4 – Espectro de RMN de ^{13}C da casearina K (P1) obtido a 150 MHz (pentadeuteropiridina).

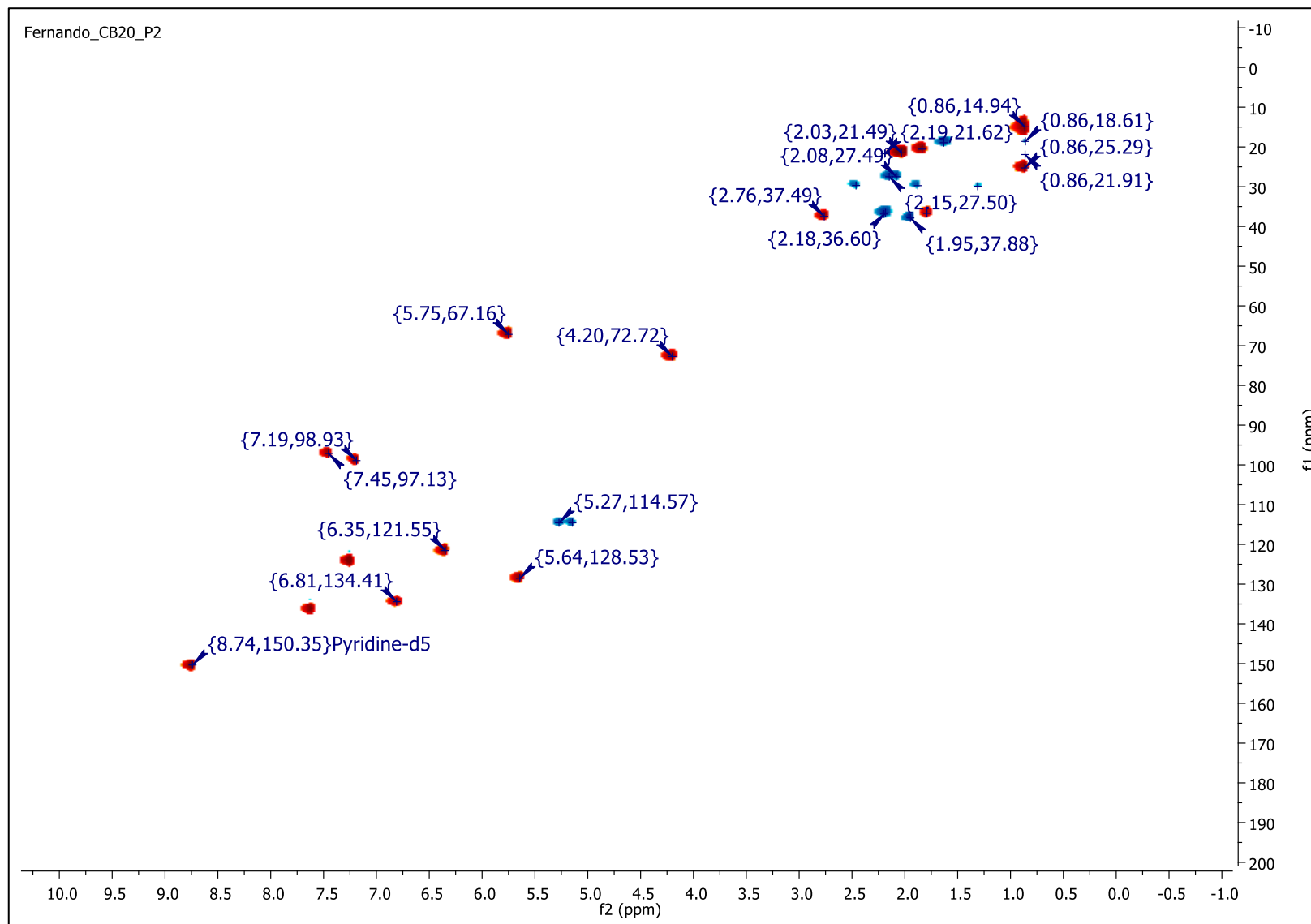
APÊNDICE 5 – Mapa de contornos HSQC da casearina K (P1) (pentadeuteropiridina, 7,0 T).

APÊNDICE 6 – Mapa de contornos HMBC da casearina K (P1) (pentadeuteropiridina, 7,0 T).

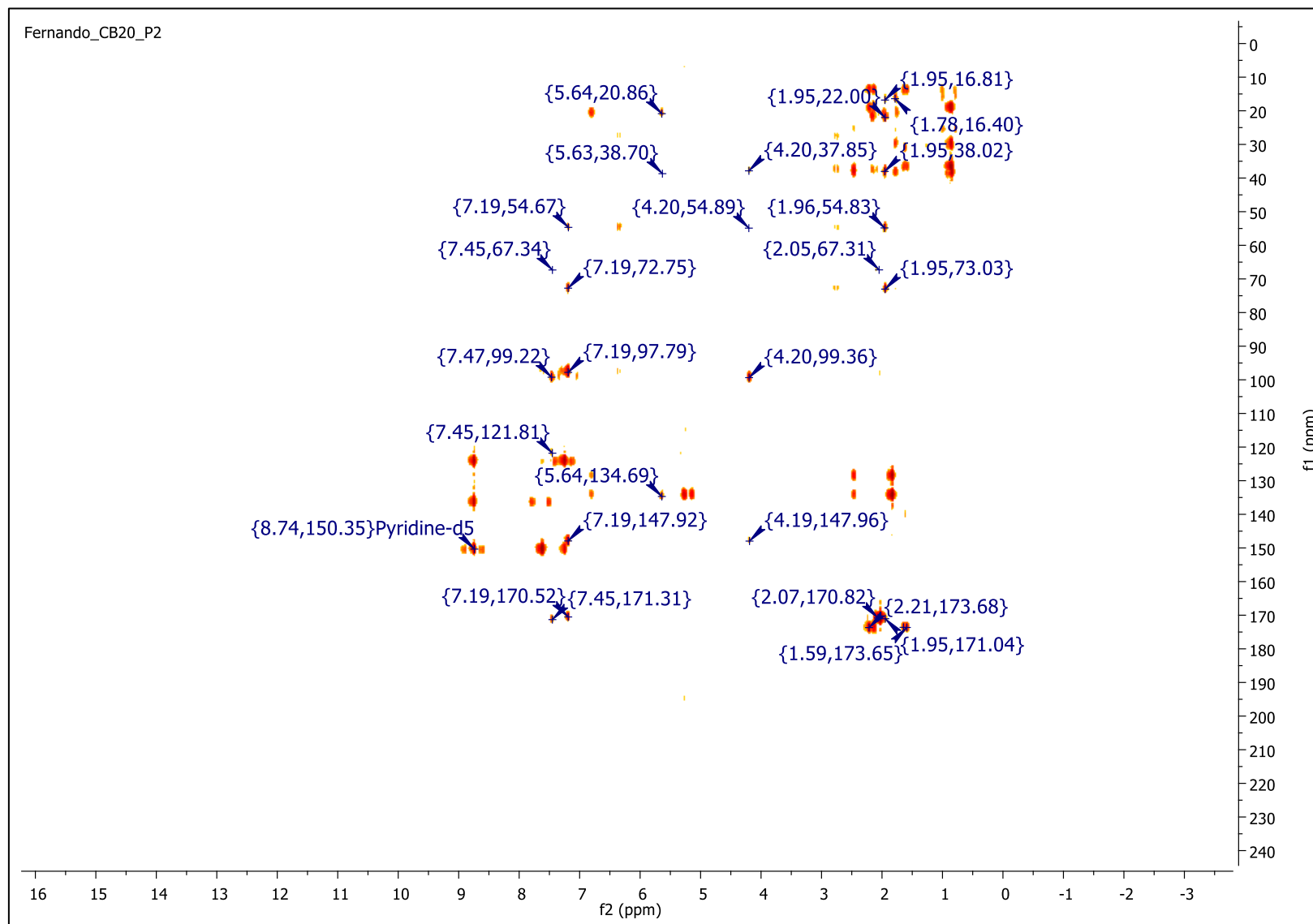
APÊNDICE 7 – Espectro de massas ESI⁺ (MS²) do íon de m/z 527,2628 [M + Na]⁺ relativo à caseargrewiina F.

APÊNDICE 8 – Espectro de RMN de ^1H da caseargreina F (P2) obtido a 600 MHz (pentadeuteropiridina).

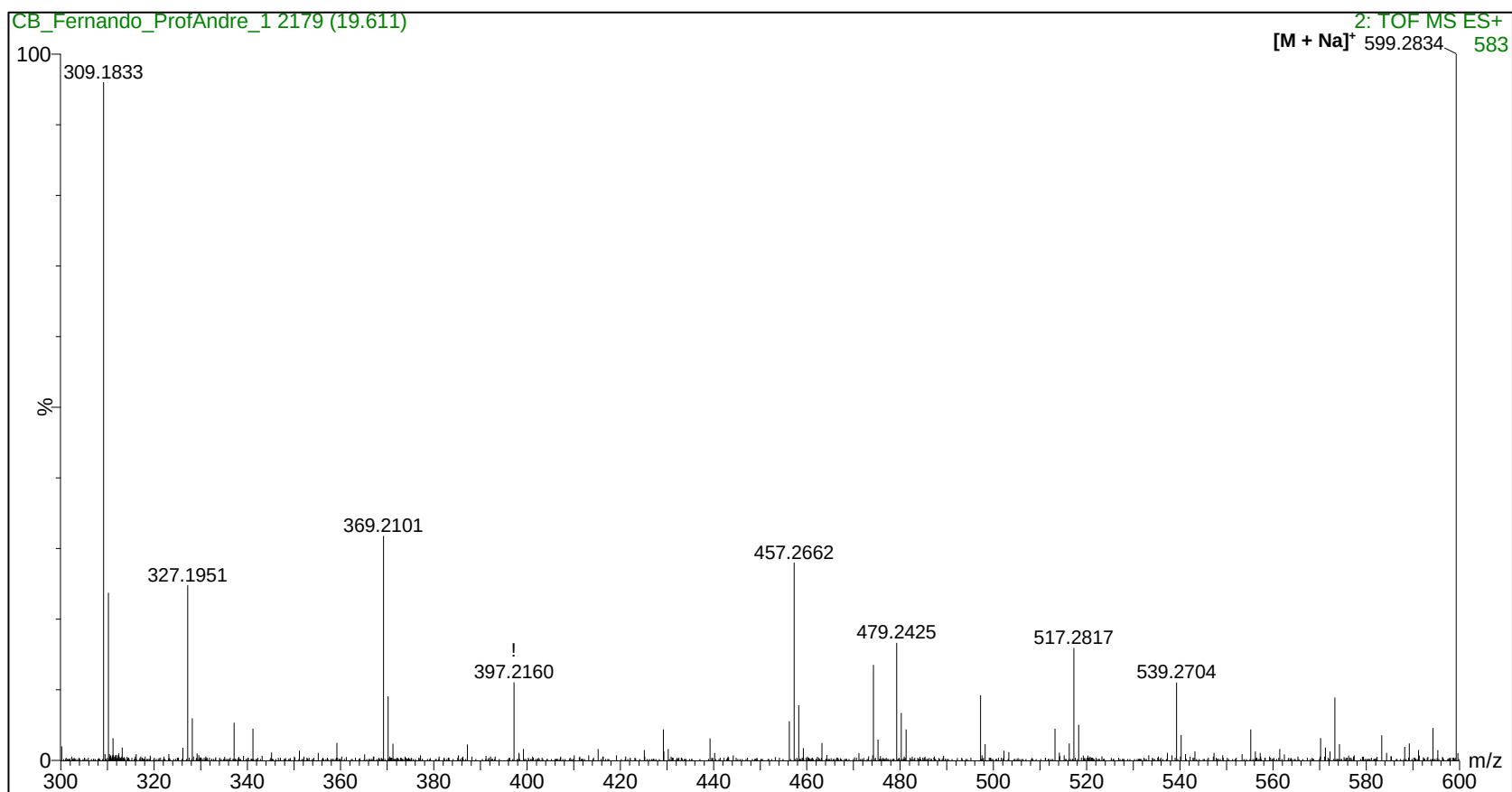
APÊNDICE 9 – Espectro de RMN de ^{13}C da caseargrewiina F (P2) obtido a 150 MHz (pentadeuteropiridina).

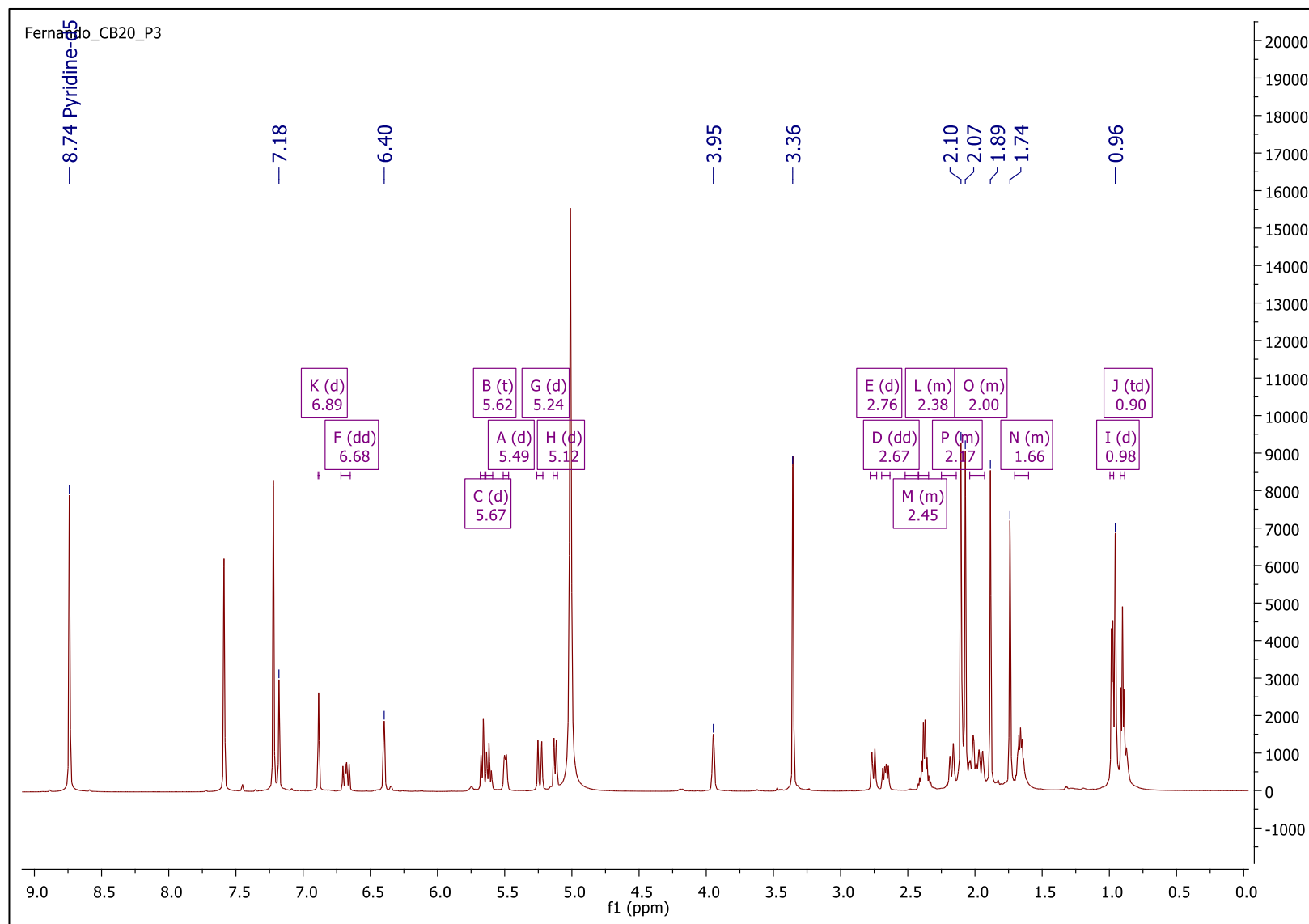
APÊNDICE 10 – Mapa de contornos HSQC da caseargrewiina F (P2) (pentadeuteropiridina, 7,0 T).

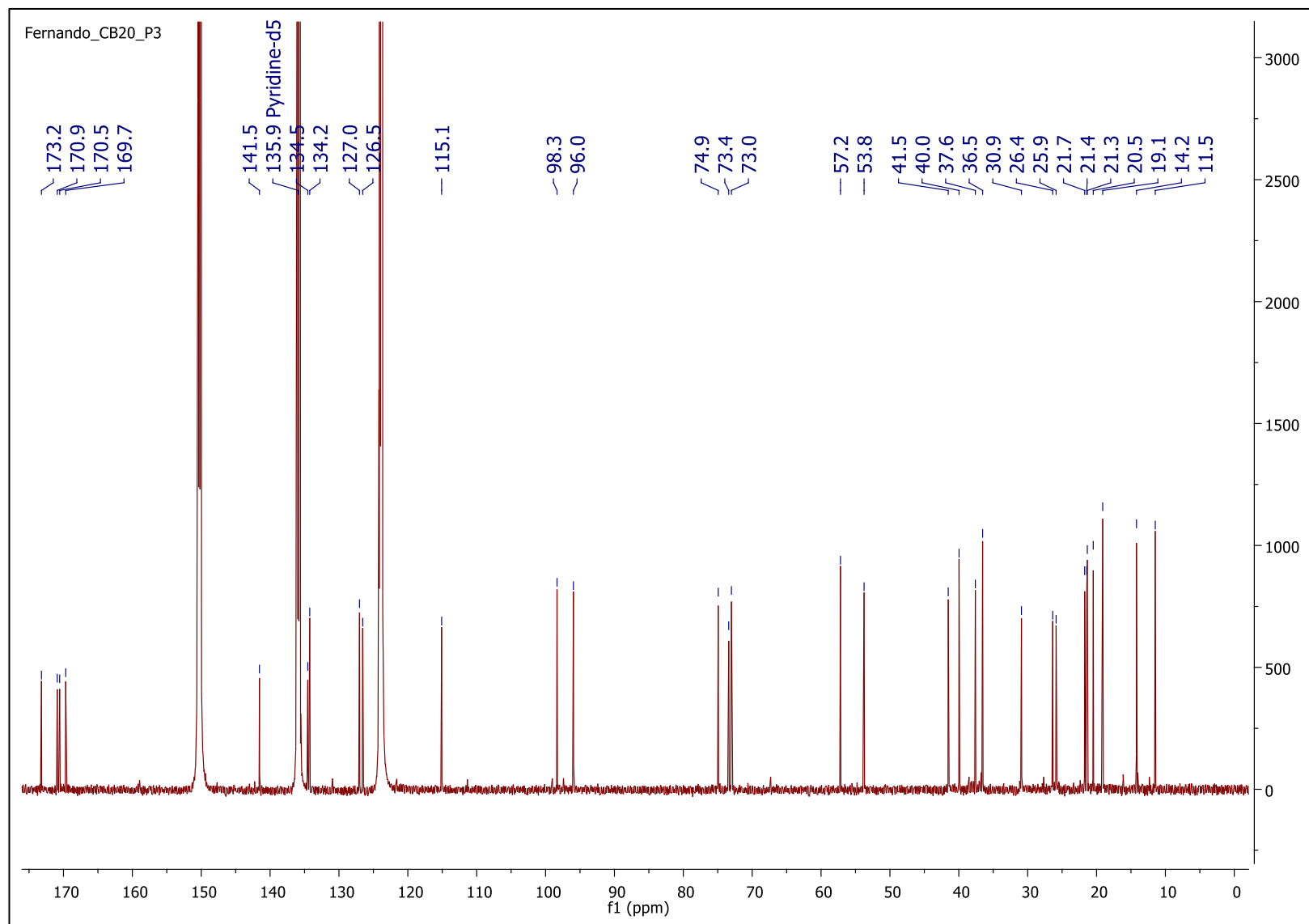
APÊNDICE 11 – Mapa de contornos HMBC da caseargreina F (P2) (pentadeuteropiridina, 7,0 T).

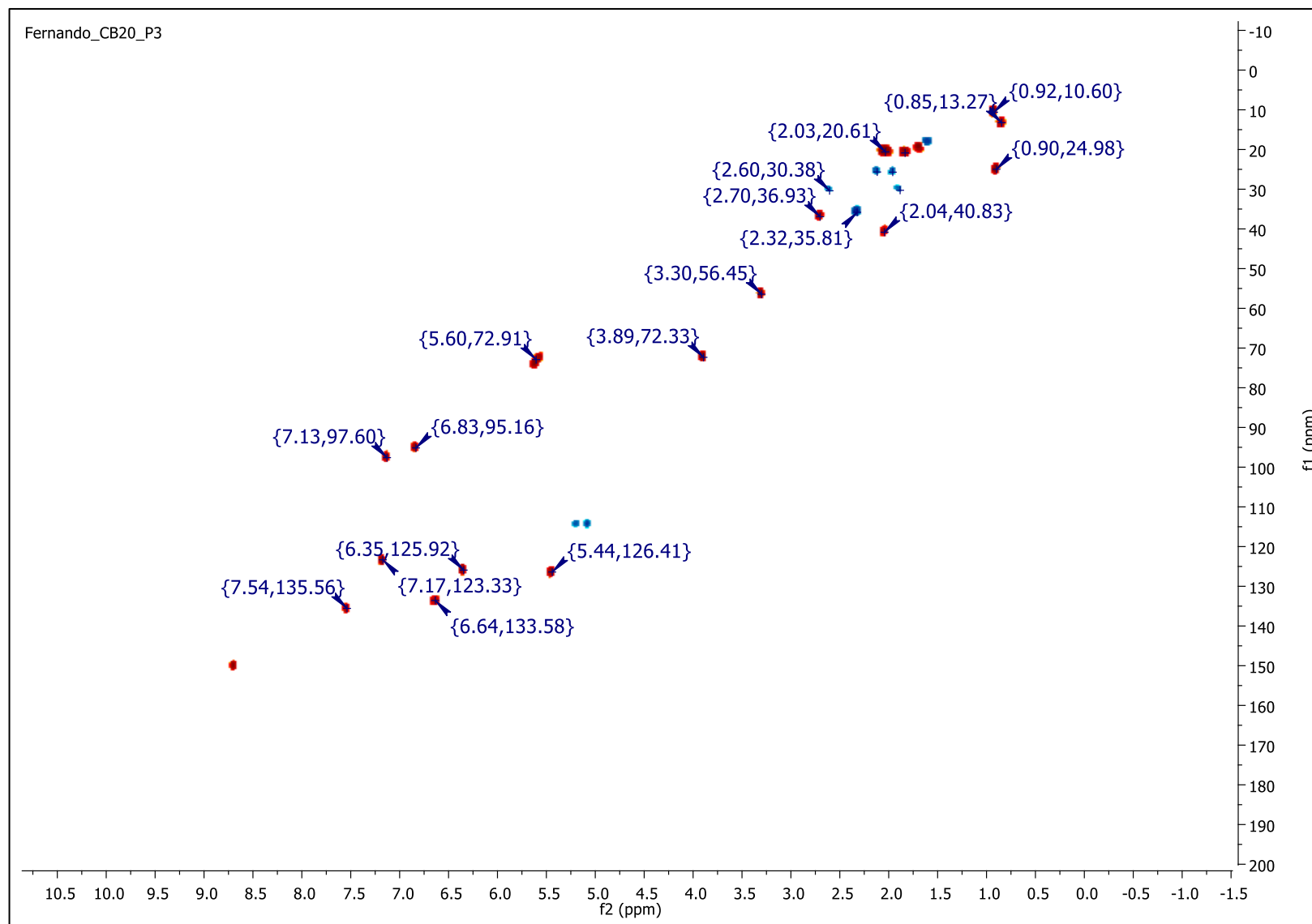


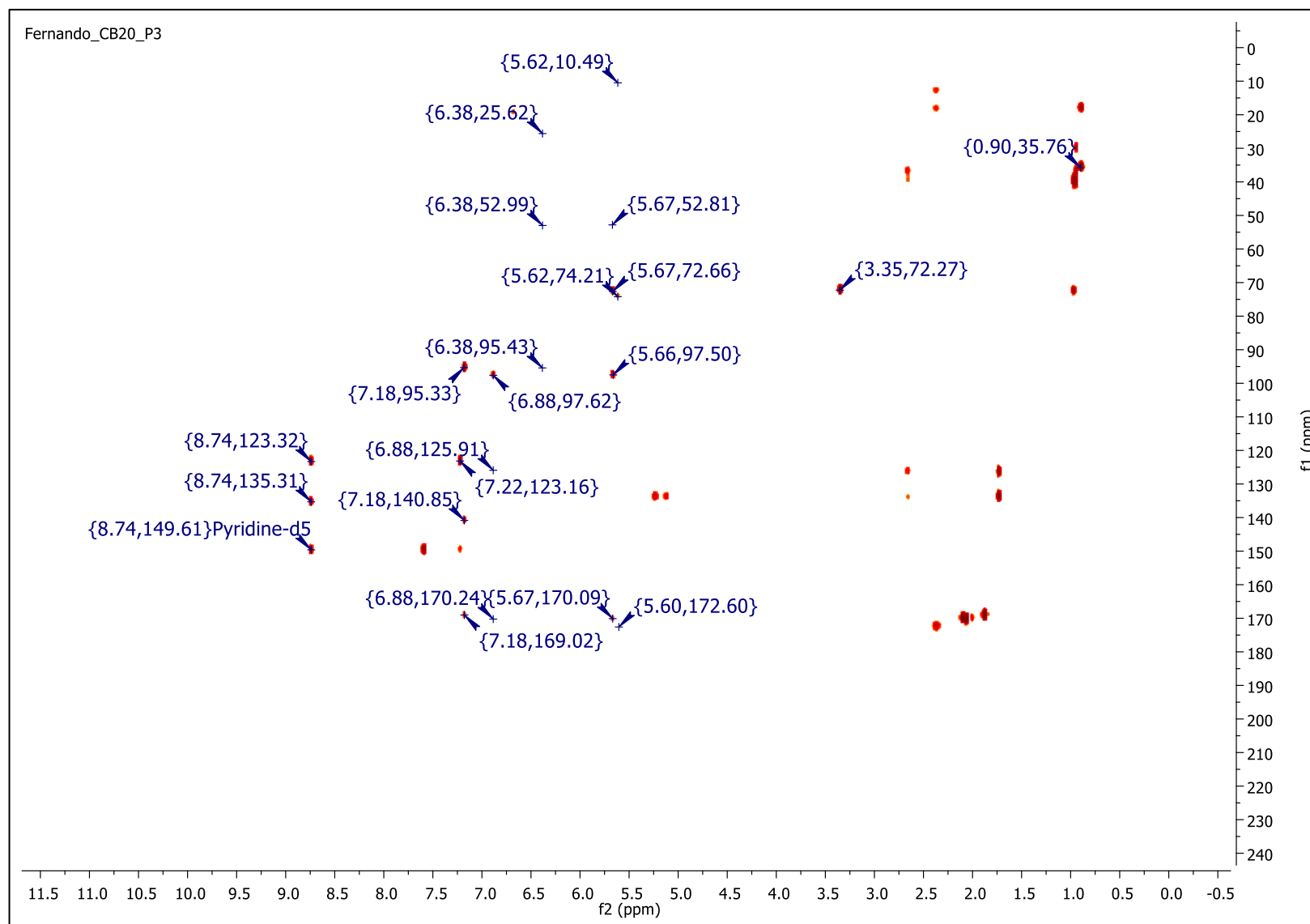
APÊNDICE 12 – Espectro de massas ESI⁺ (MS²) do íon de m/z 599,2834 [M + Na]⁺ relativo à casearina B.



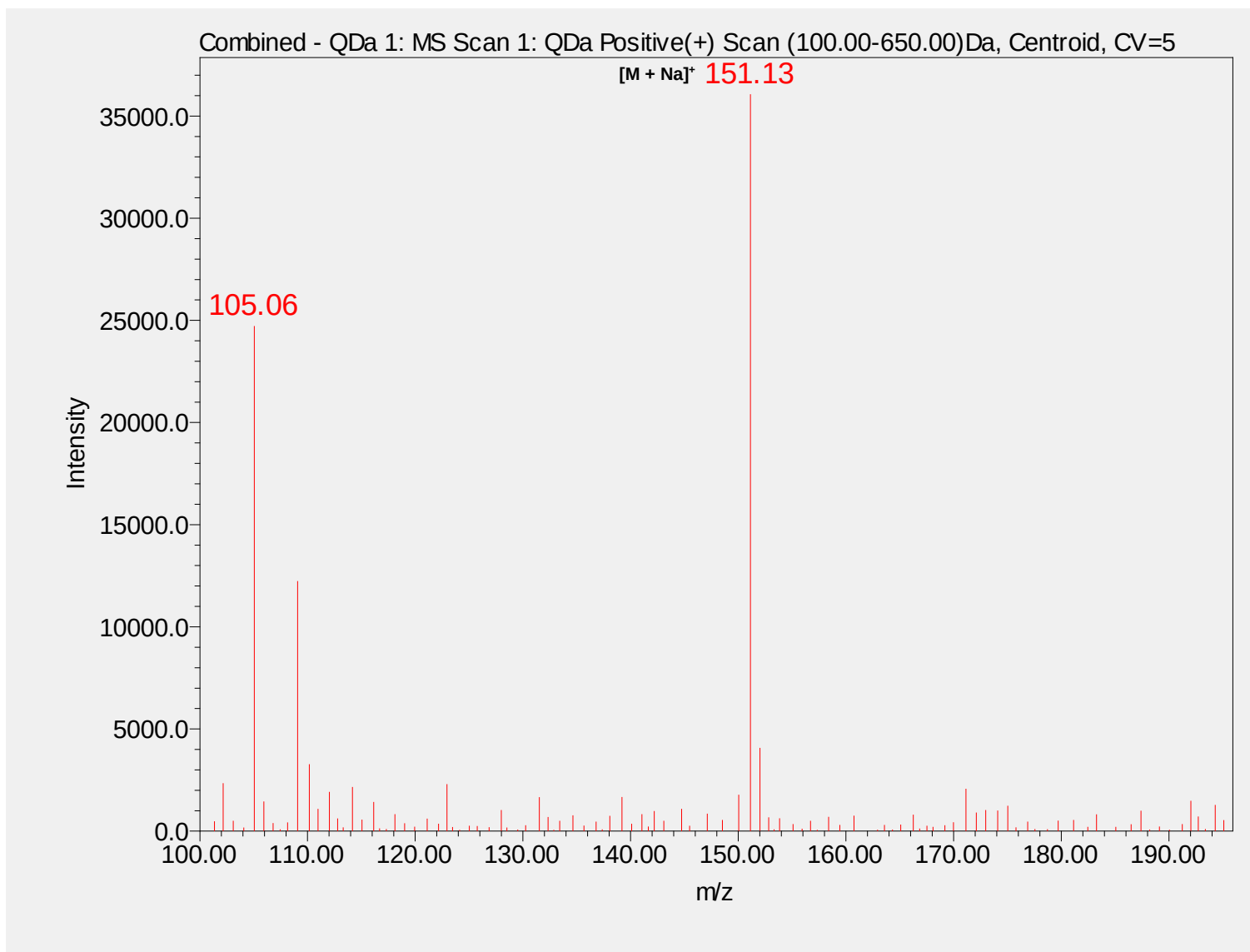
APÊNDICE 13 – Espectro de RMN de ^1H da casearina B (P3) obtido a 600 MHz (pentadeuteropiridina).

APÊNDICE 14 – Espectro de RMN de ^{13}C da casearina B (P3) obtido a 150 MHz (pentadeuteropiridina).

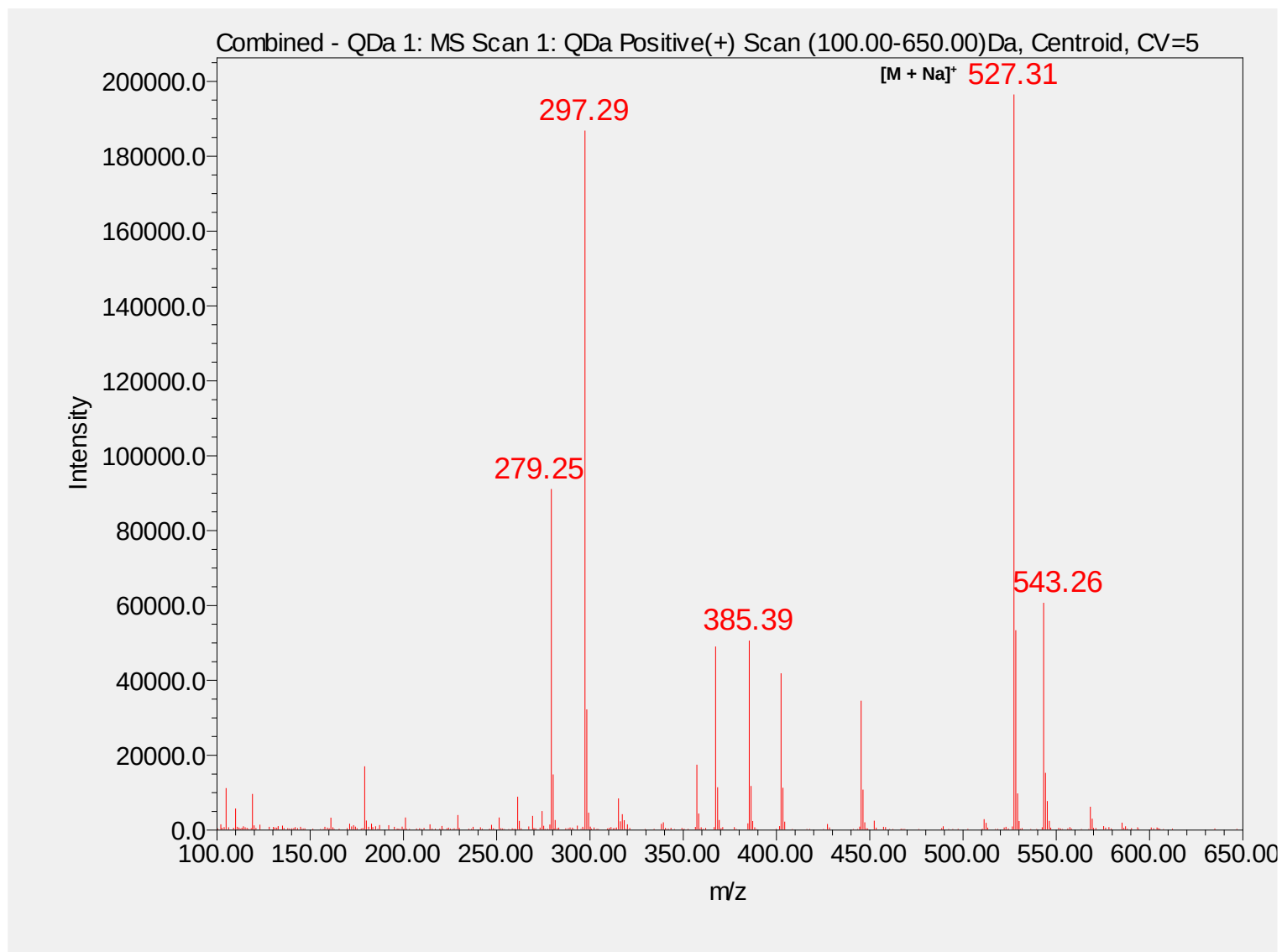
APÊNDICE 15 – Mapa de contornos HSQC da casearina B (P3) (pentadeuteropiridina, 7,0 T).

APÊNDICE 16 – Mapa de contornos HMBC da casearina B (P3) (pentadeuteropiridina, 7,0 T).

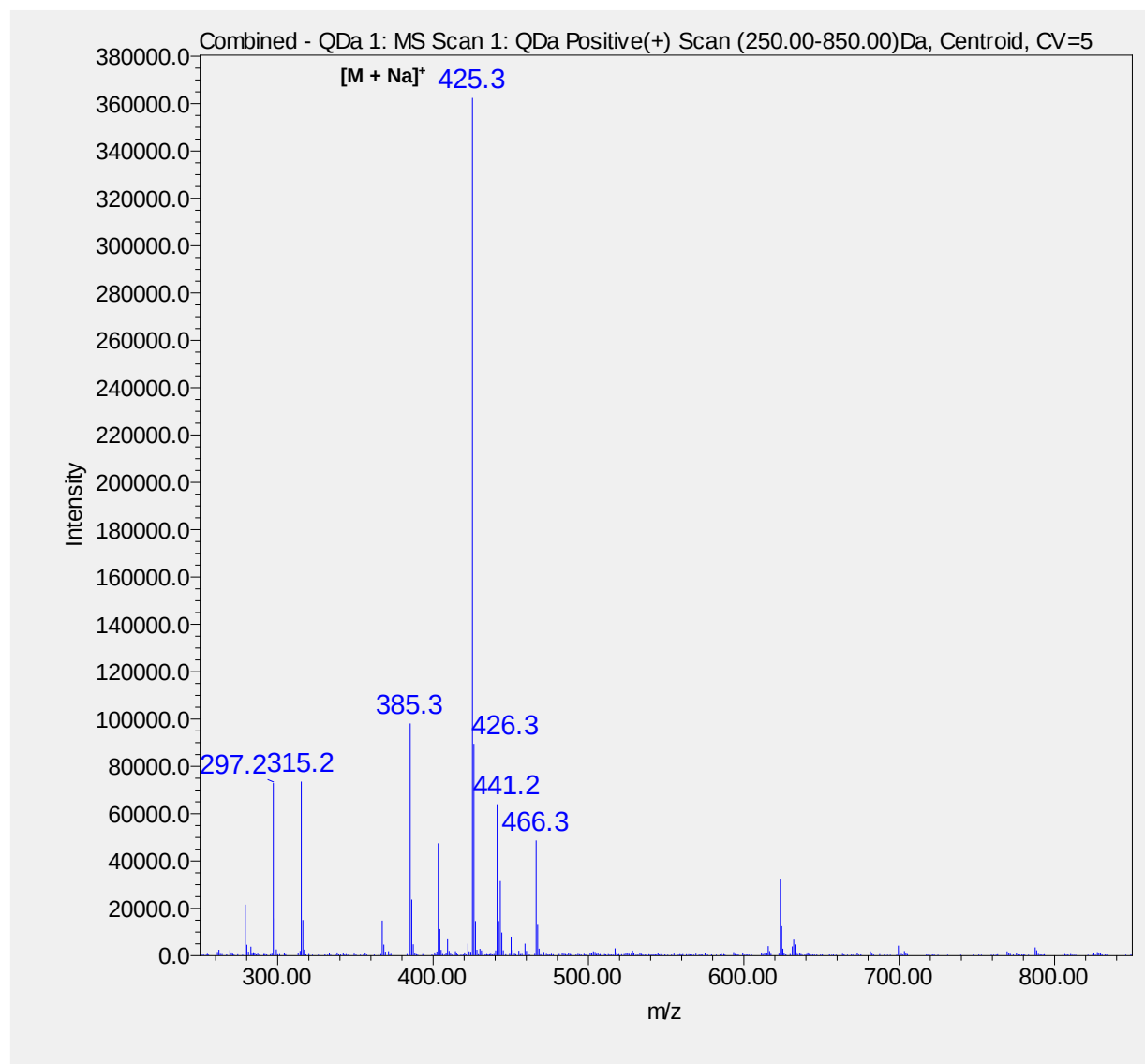
APÊNDICE 17 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do padrão interno timol (t_R 5,9 min) obtido por LC-MS.



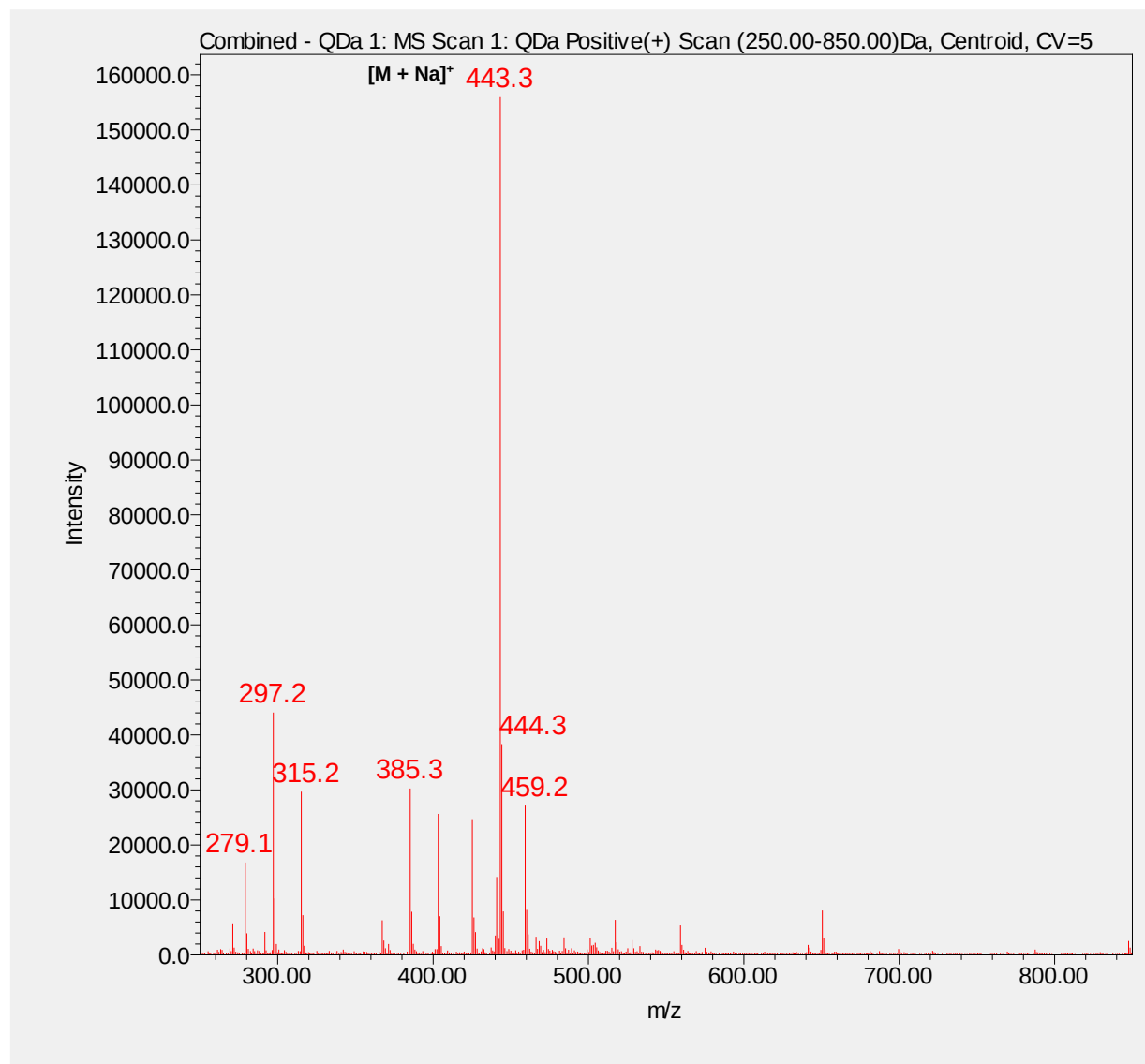
APÊNDICE 18 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) da caseargrewiina F (t_R 16,8 min) do cromatograma dos PDA-F obtido por LC-MS.



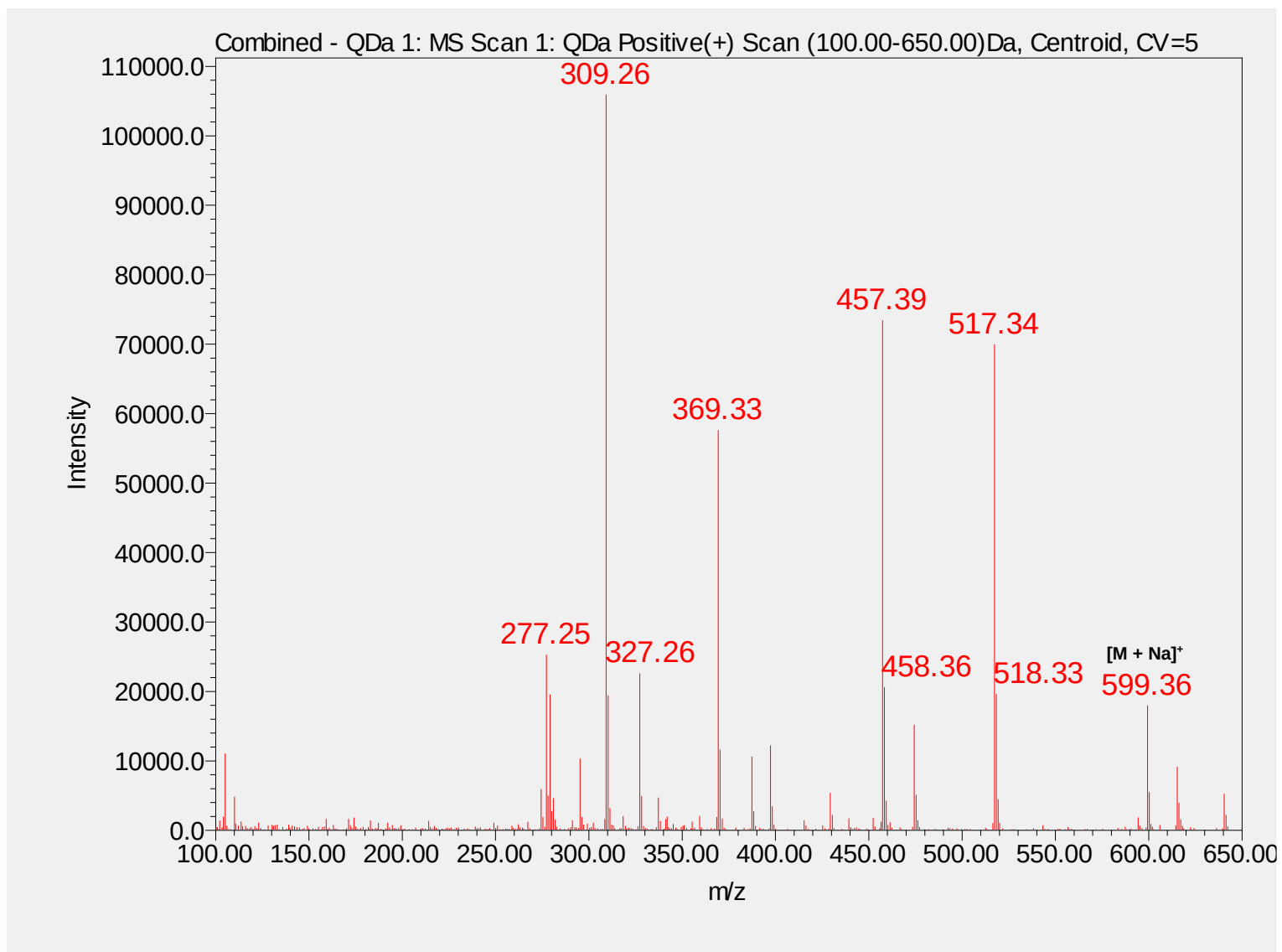
APÊNDICE 19 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do dialdeído da caseargrewiina F (t_R 15,5 min) do cromatograma dos PDA-F obtido por LC-MS.



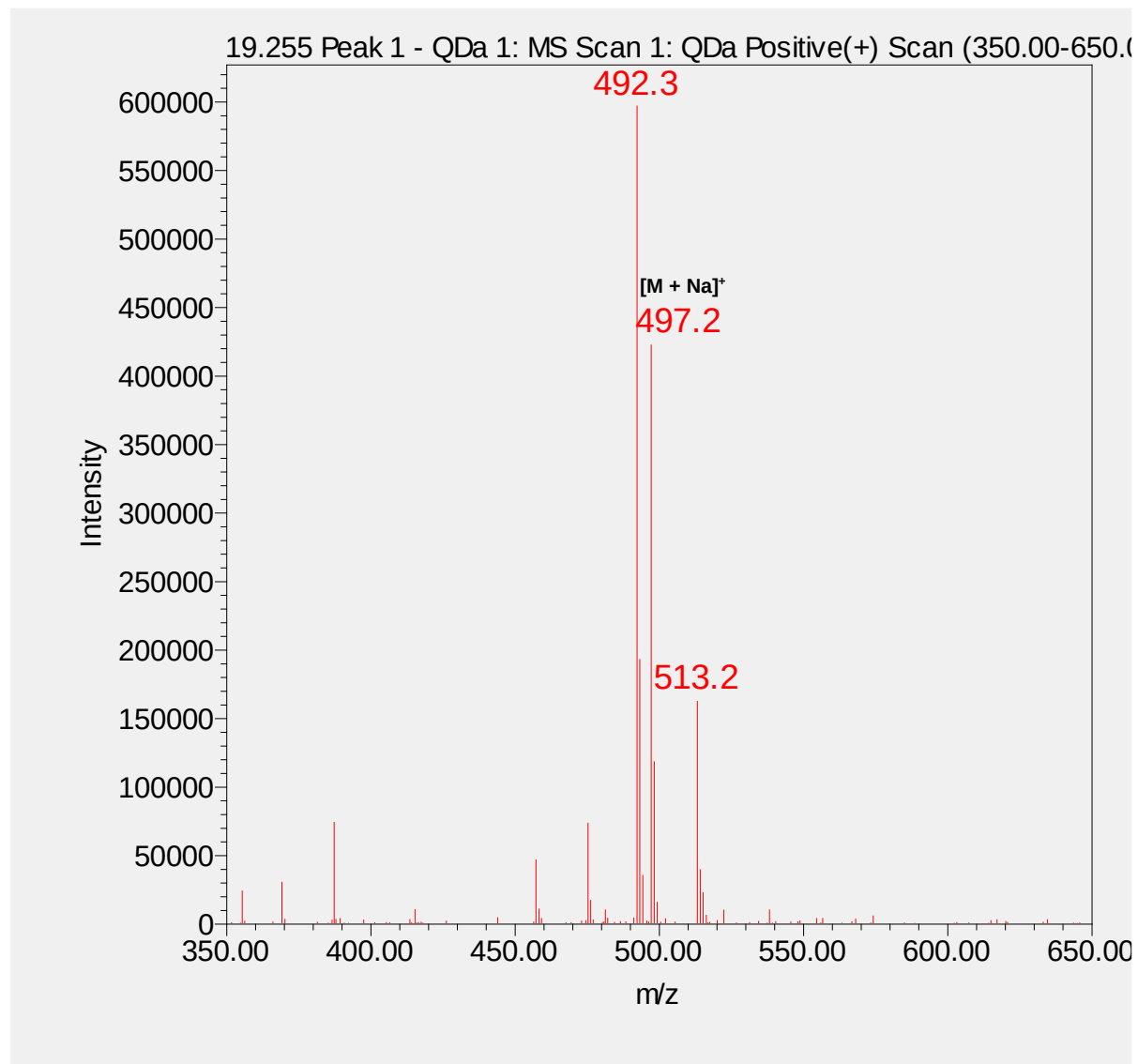
APÊNDICE 20 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) dos picos de t_R 8,1 e 11,3 min do cromatograma dos PDA-F obtido por LC-MS.



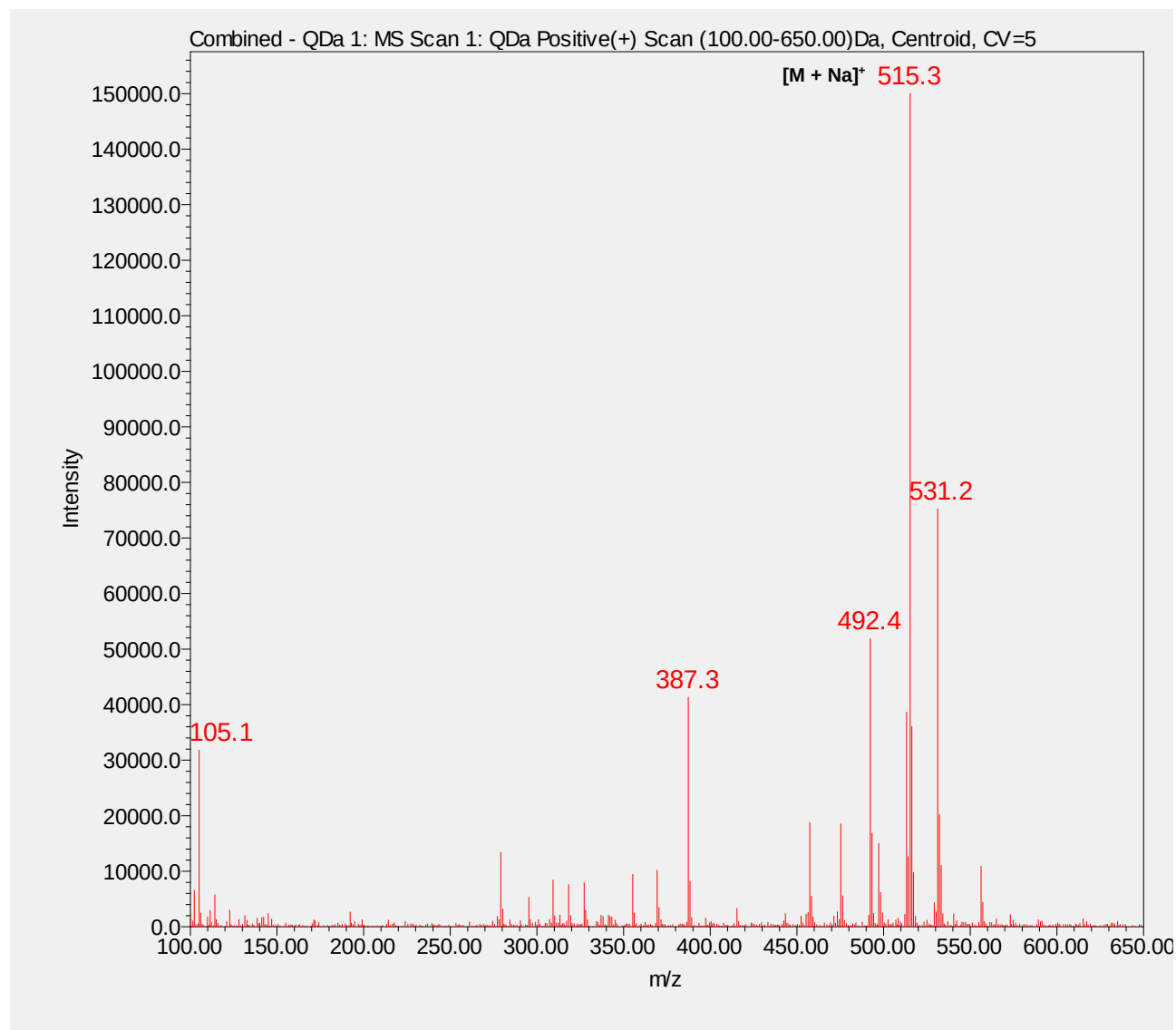
APÊNDICE 21 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) da casearina B (t_R 20,9 min) do cromatograma dos PDA-B obtido por LC-MS.



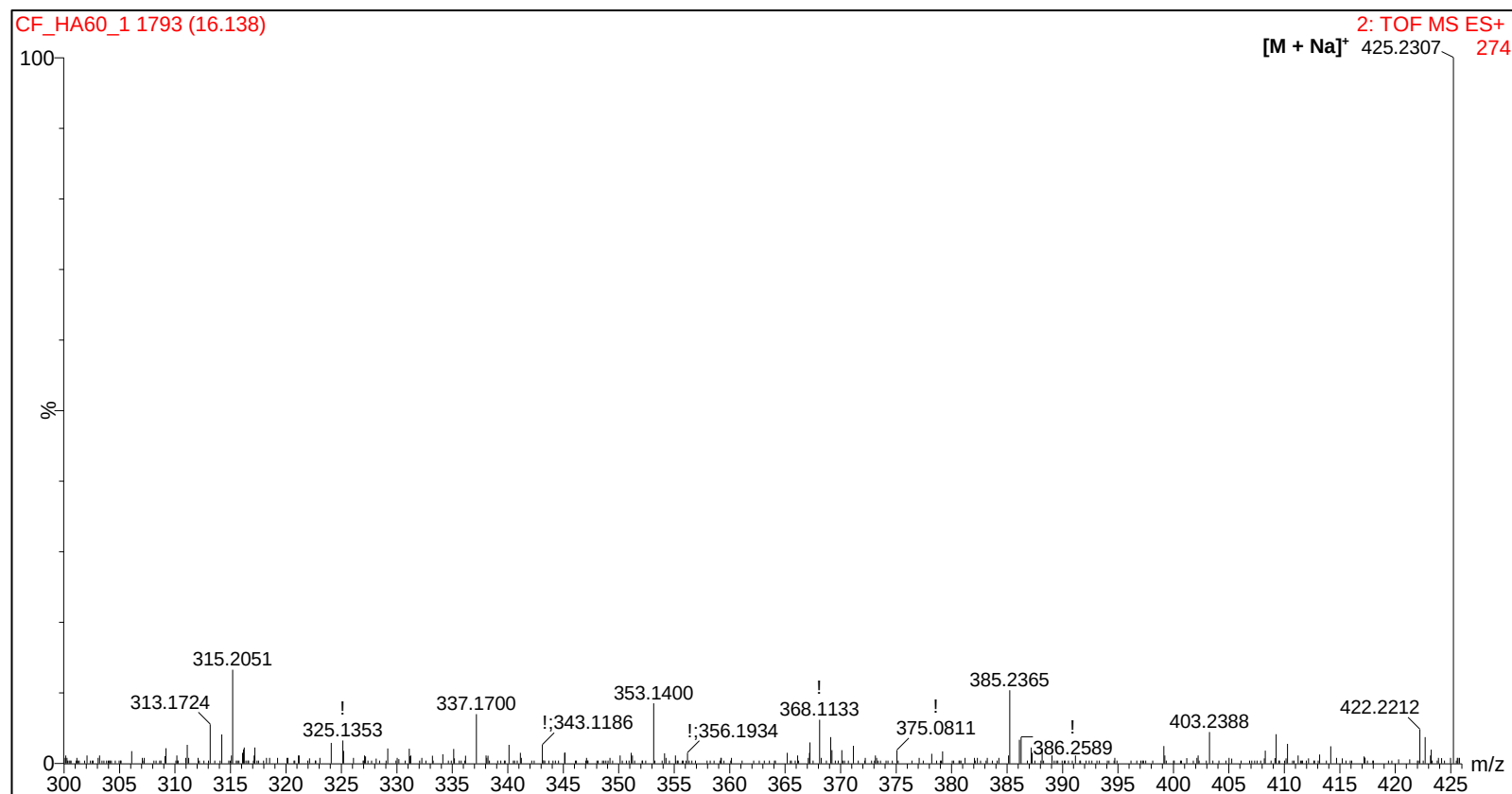
APÊNDICE 22 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do dialdeído da casearina B (t_R 19,2 min) do cromatograma dos PDA-B obtido por LC-MS.



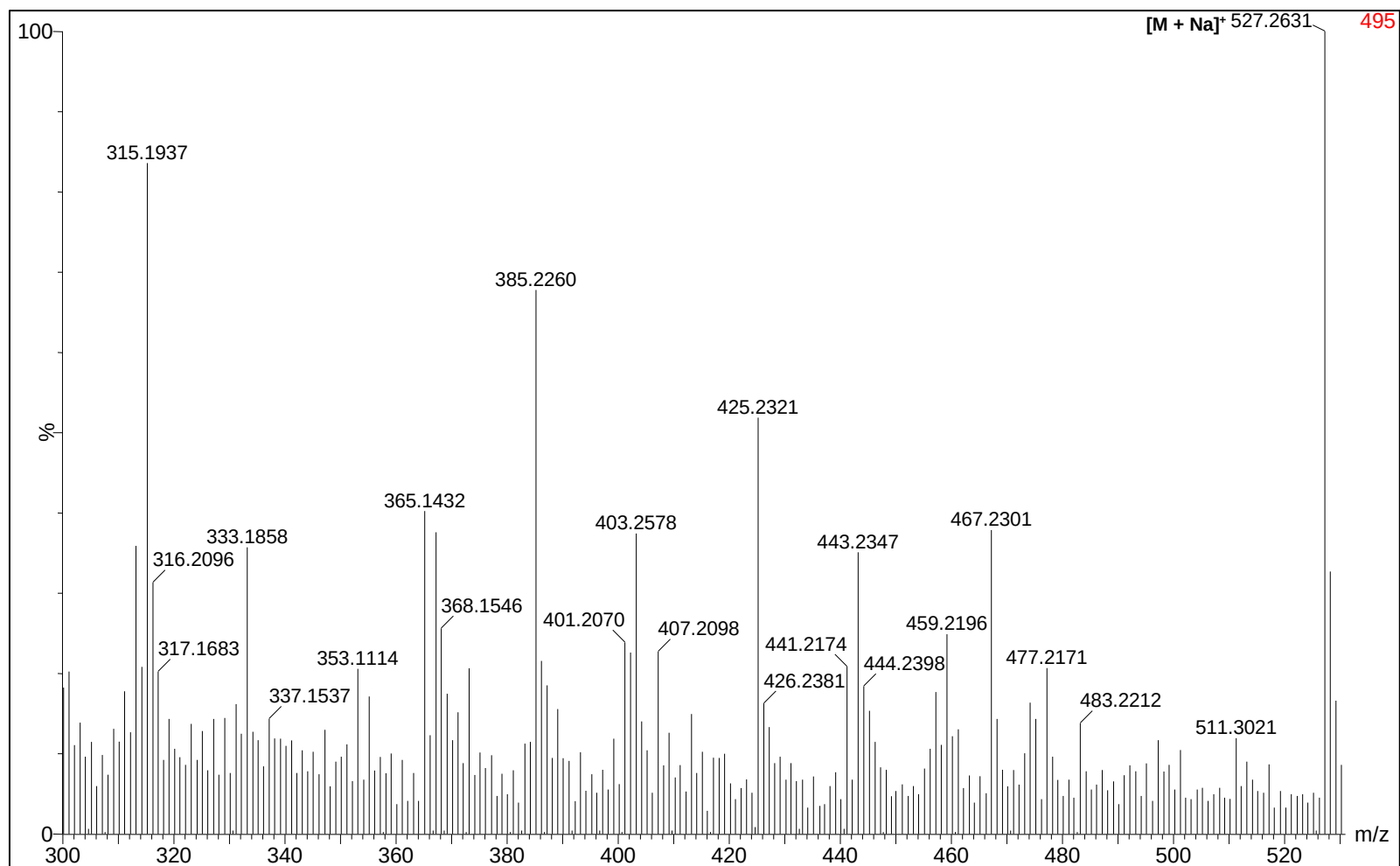
APÊNDICE 23 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do pico de t_R 13,5 min do cromatograma dos PDA-B obtido por LC-MS.



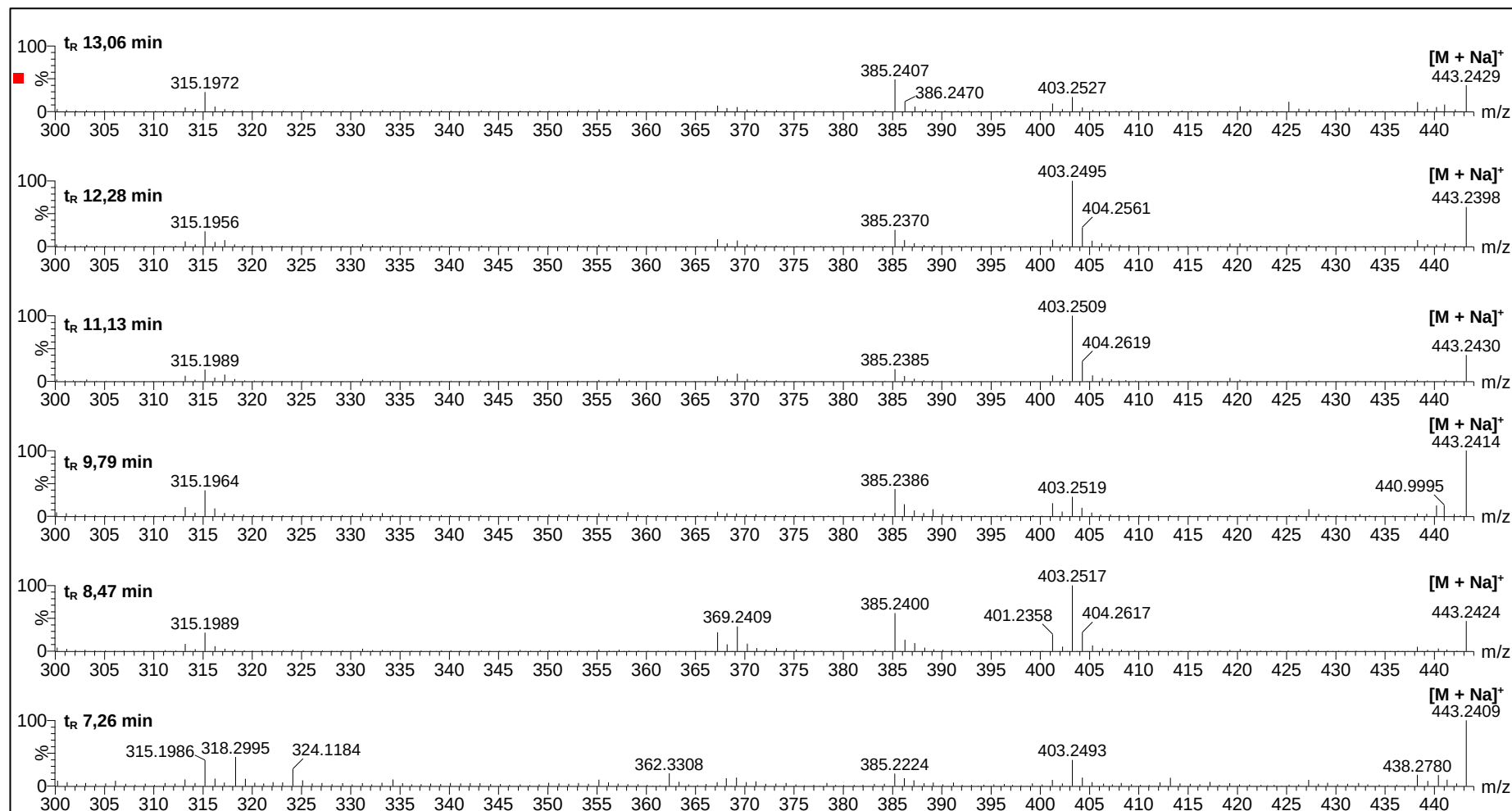
APÊNDICE 24 – Espectro de massas ESI⁺ (MS²) do íon de m/z 425,2307 [M + Na]⁺ relativo ao dialdeído da caseargreina F do cromatograma dos PDA-F obtido por UPLC-QTOF-MS/MS.

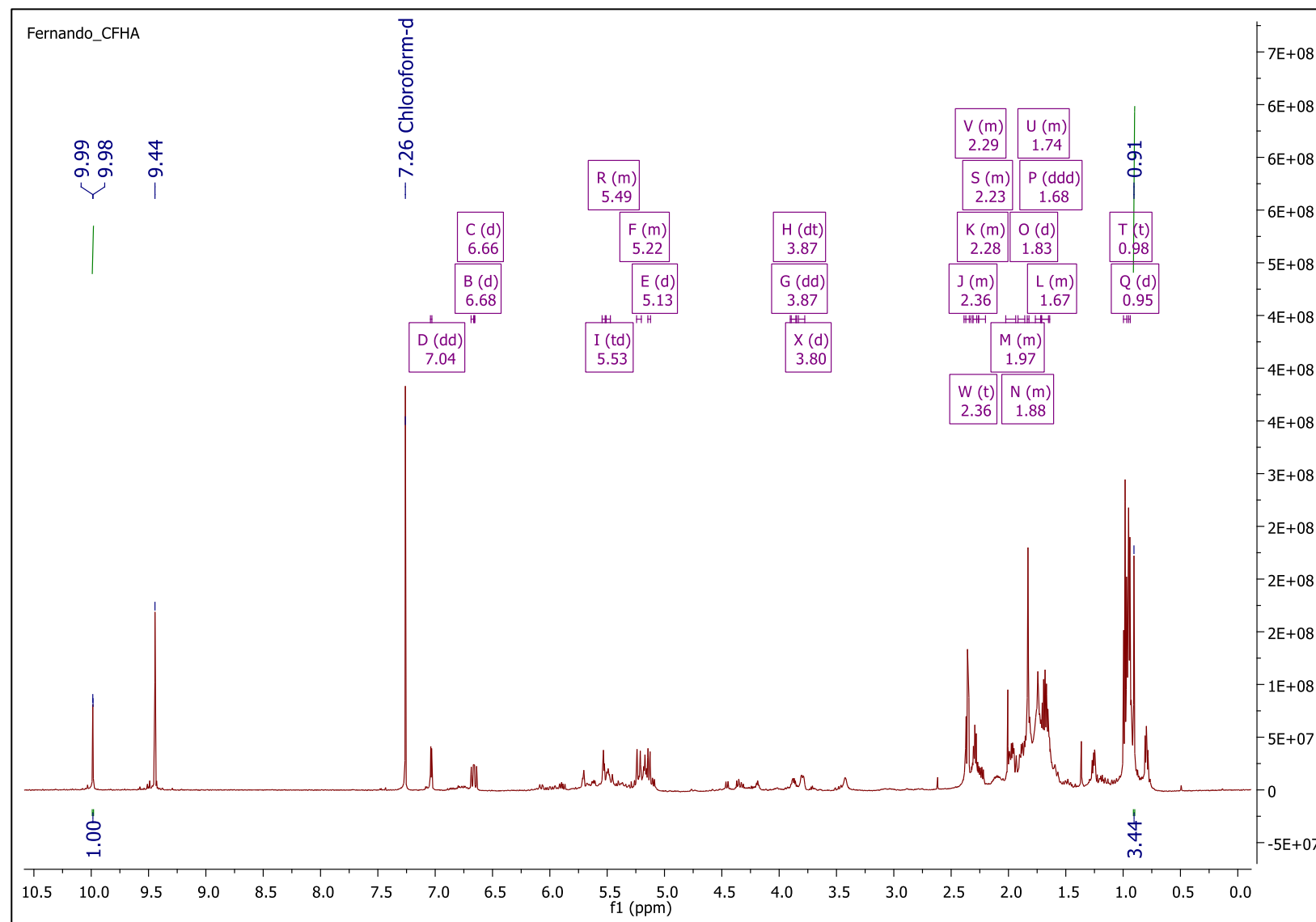


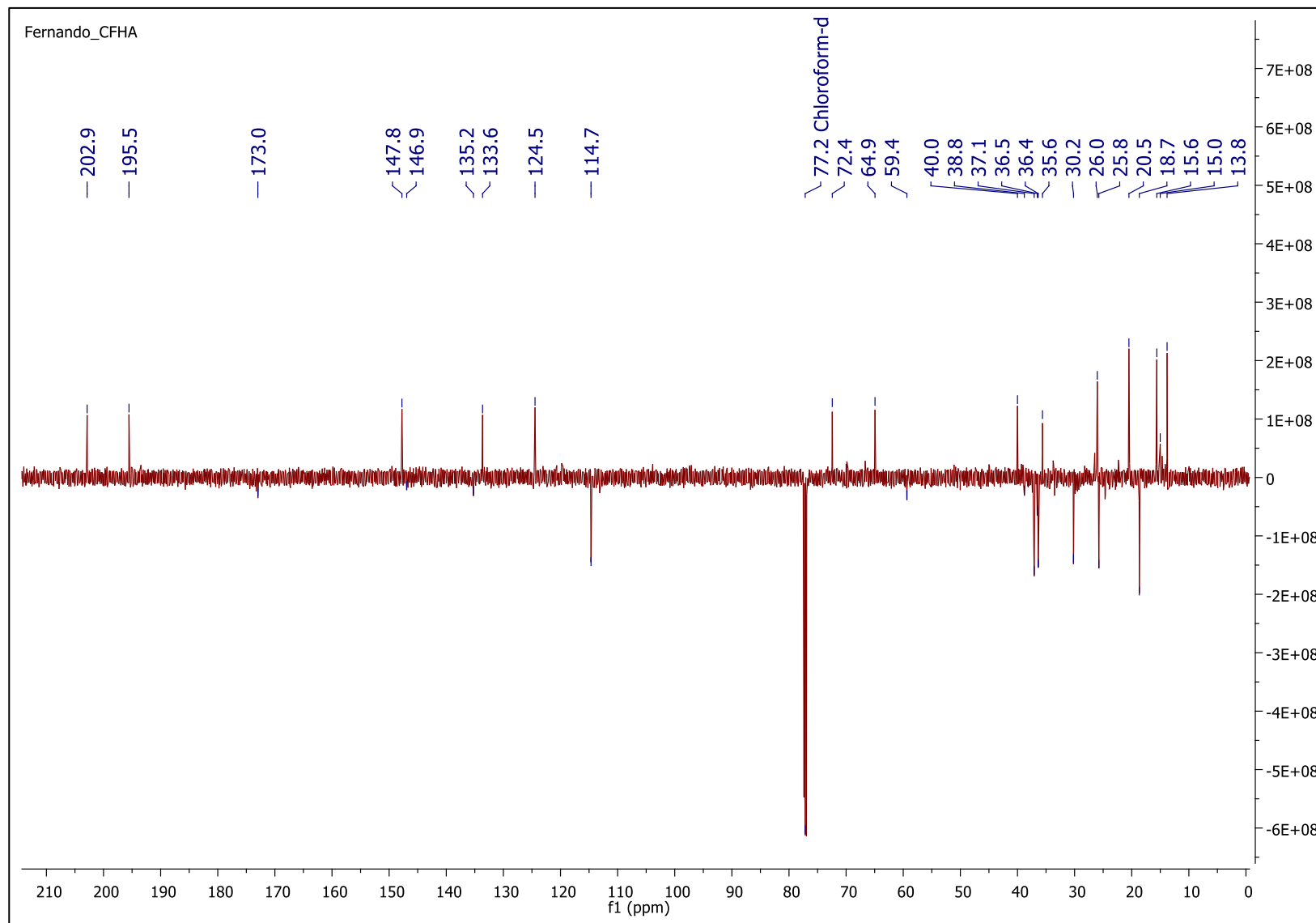
APÊNDICE 25 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do íon de m/z 527,2631 [M + Na]⁺ relativo à caseargrewiina F (t_R 17,09 min) do cromatograma dos PDA-F obtido por UPLC-QTOF-MS/MS.



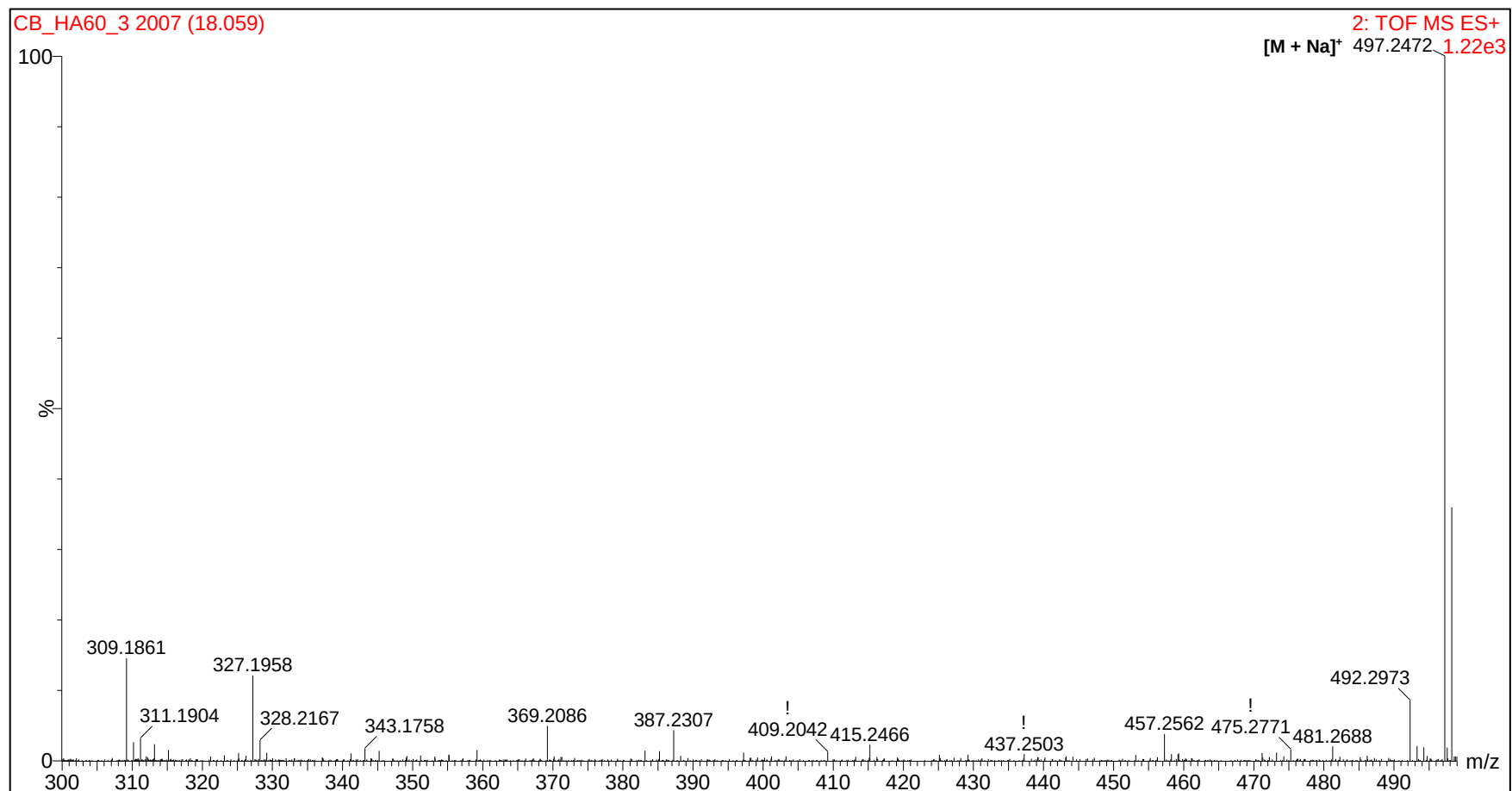
APÊNDICE 26 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) dos picos de t_R 7,26; 8,47; 9,79; 11,13; 12,28 e 13,06 min do cromatograma dos PDA-F obtido por UPLC-QTOF-MS/MS.



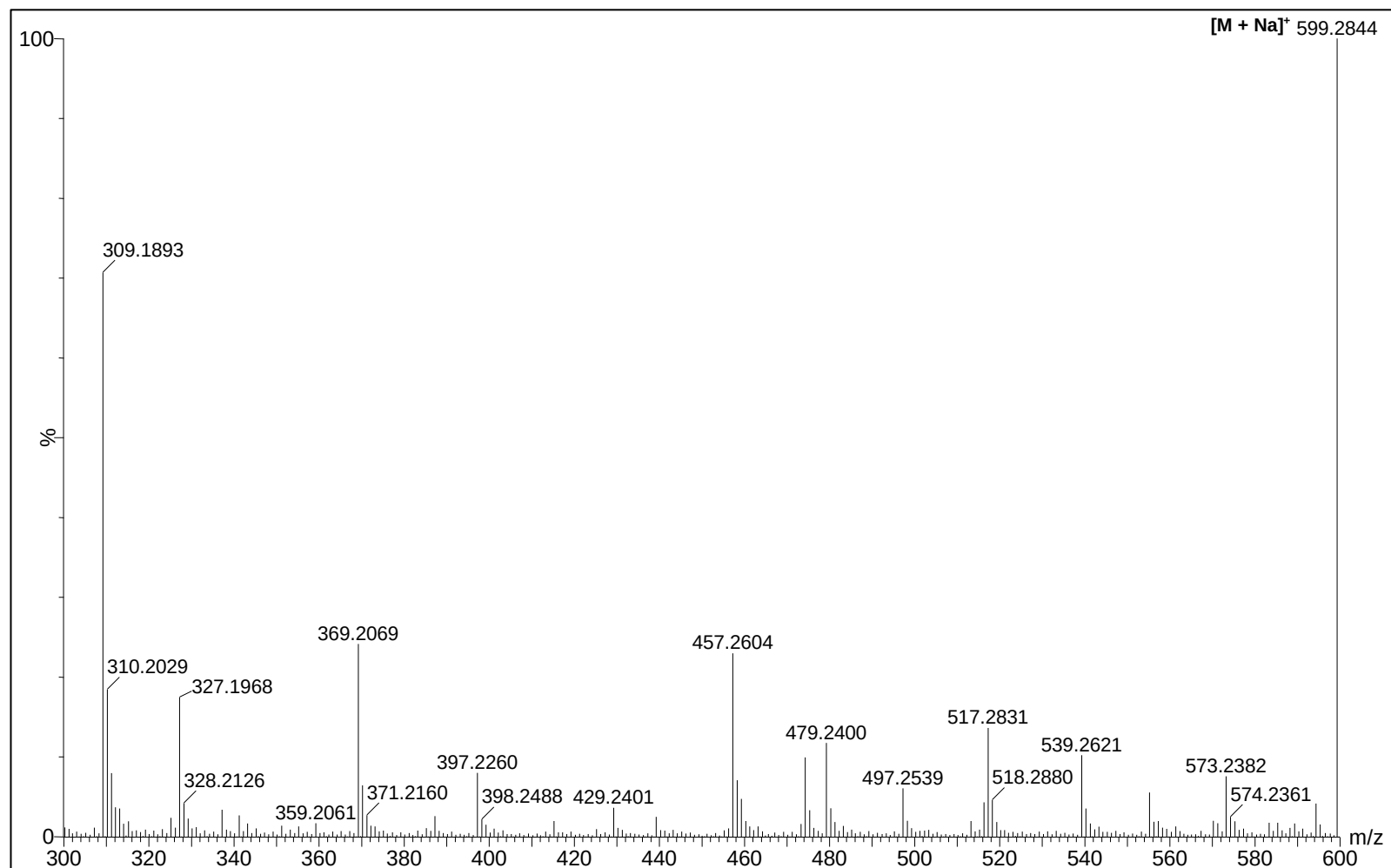
APÊNDICE 27 – Espectro de RMN de ^1H dos PDA-F obtido a 600 MHz (deuterocloroformio).

APÊNDICE 28 – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) dos PDA-F obtido a 150 MHz (deuterocloroformio).

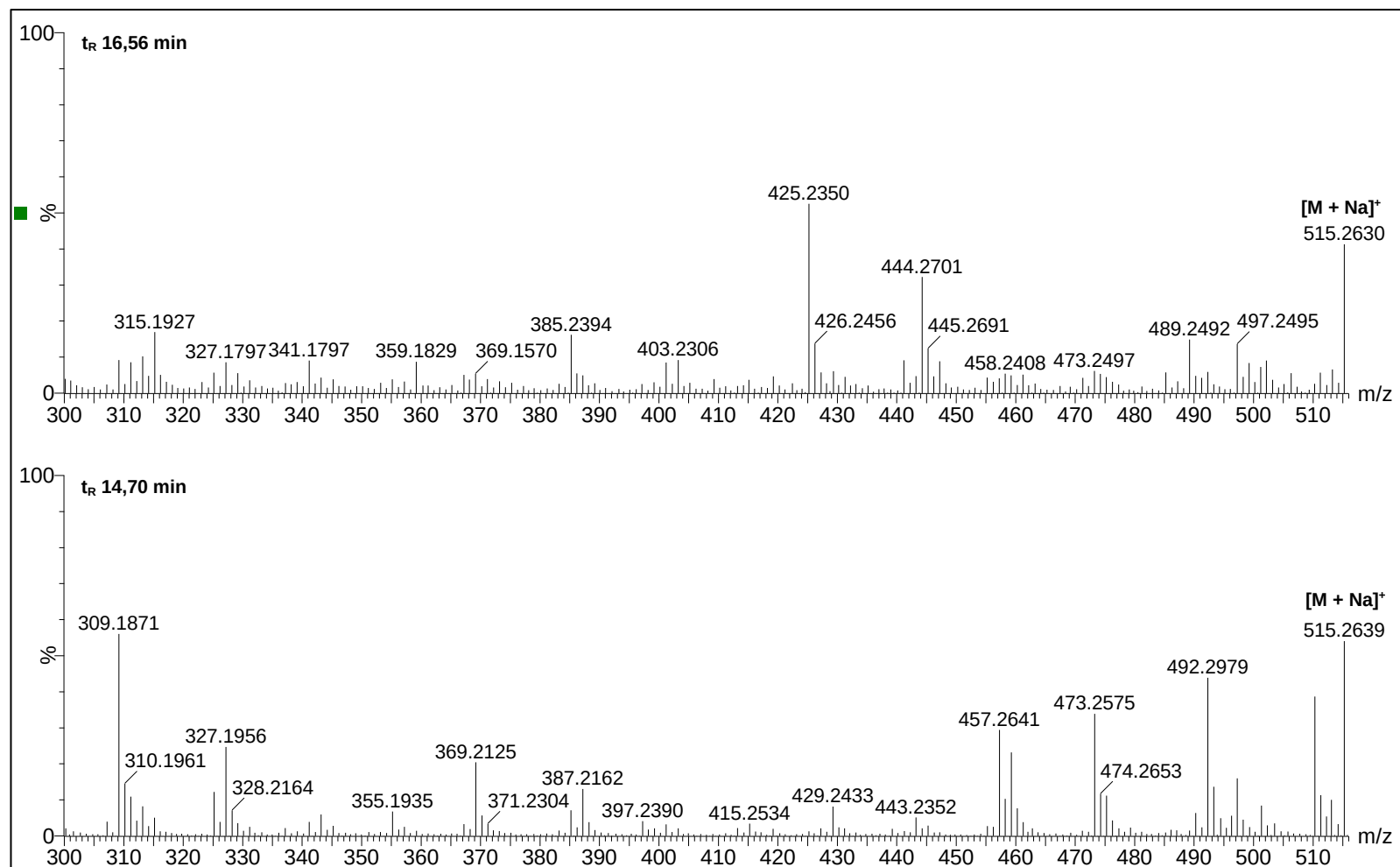
APÊNDICE 29 – Espectro de massas ESI⁺ (MS²) do íon de m/z 497,2472 [M + Na]⁺ relativo ao dialdeído da casearina B do cromatograma dos PDA-B obtido por UPLC-QTOF-MS/MS.

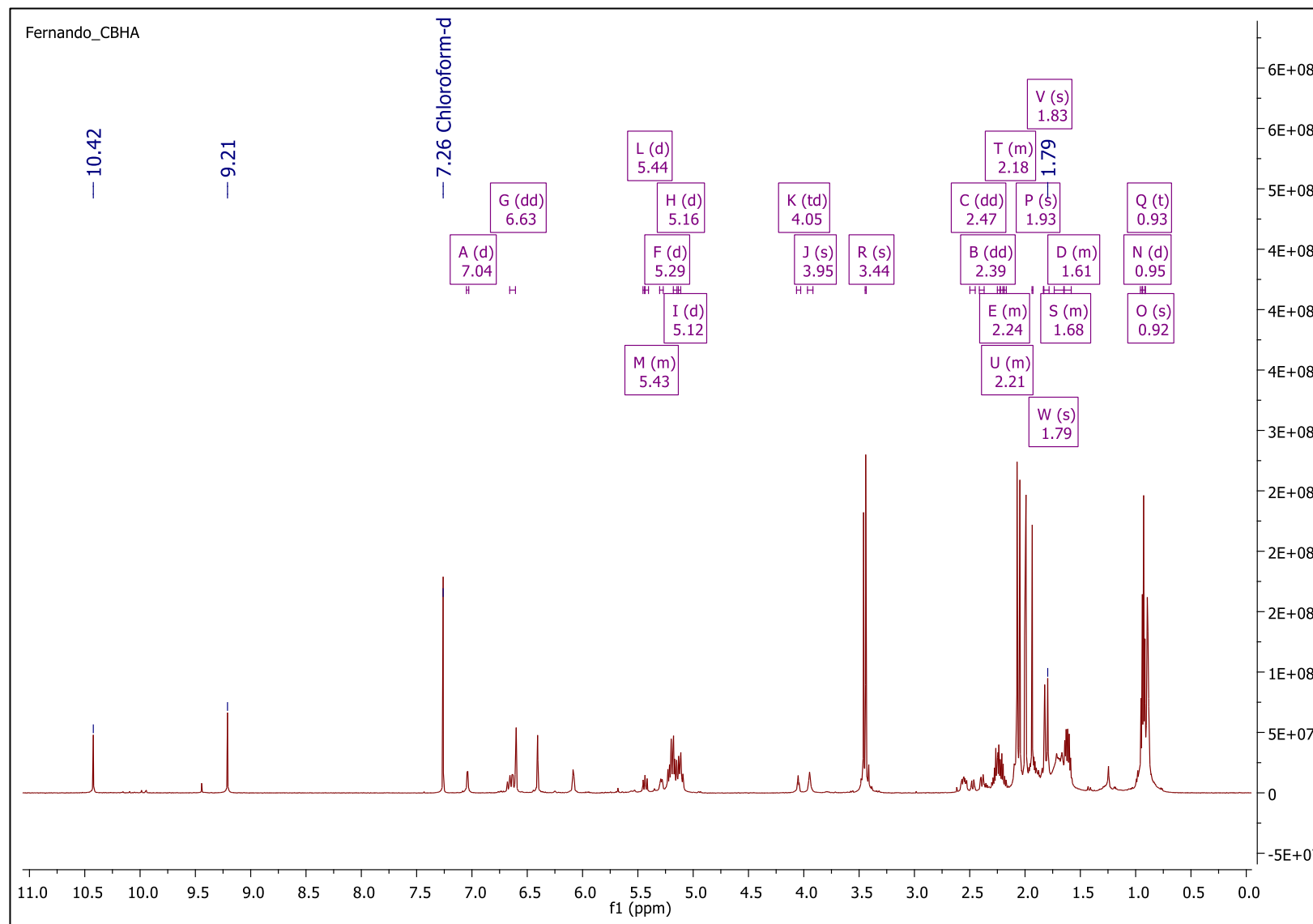


APÊNDICE 30 – Espectro de massas ESI⁺ (MS²) do íon de m/z 599,2844 [M + Na]⁺ relativo à casearina B (t_R 19,78 min) do cromatograma dos PDA-B obtido por UPLC-QTOF-MS/MS.

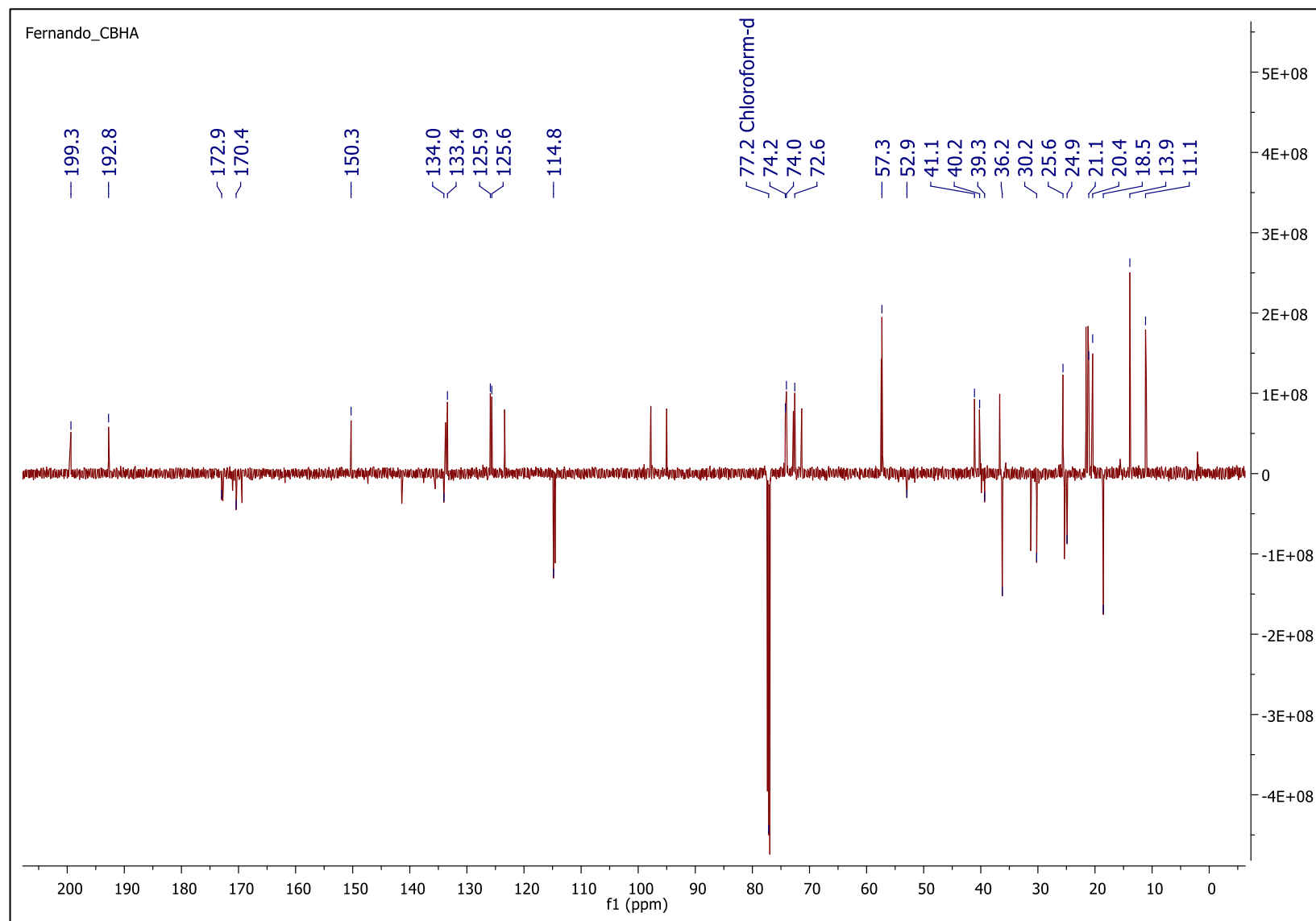


APÊNDICE 31 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) dos picos de t_R 14,69 e 16,56 min do cromatograma dos PDA-B obtido por UPLC-QTOF-MS/MS.

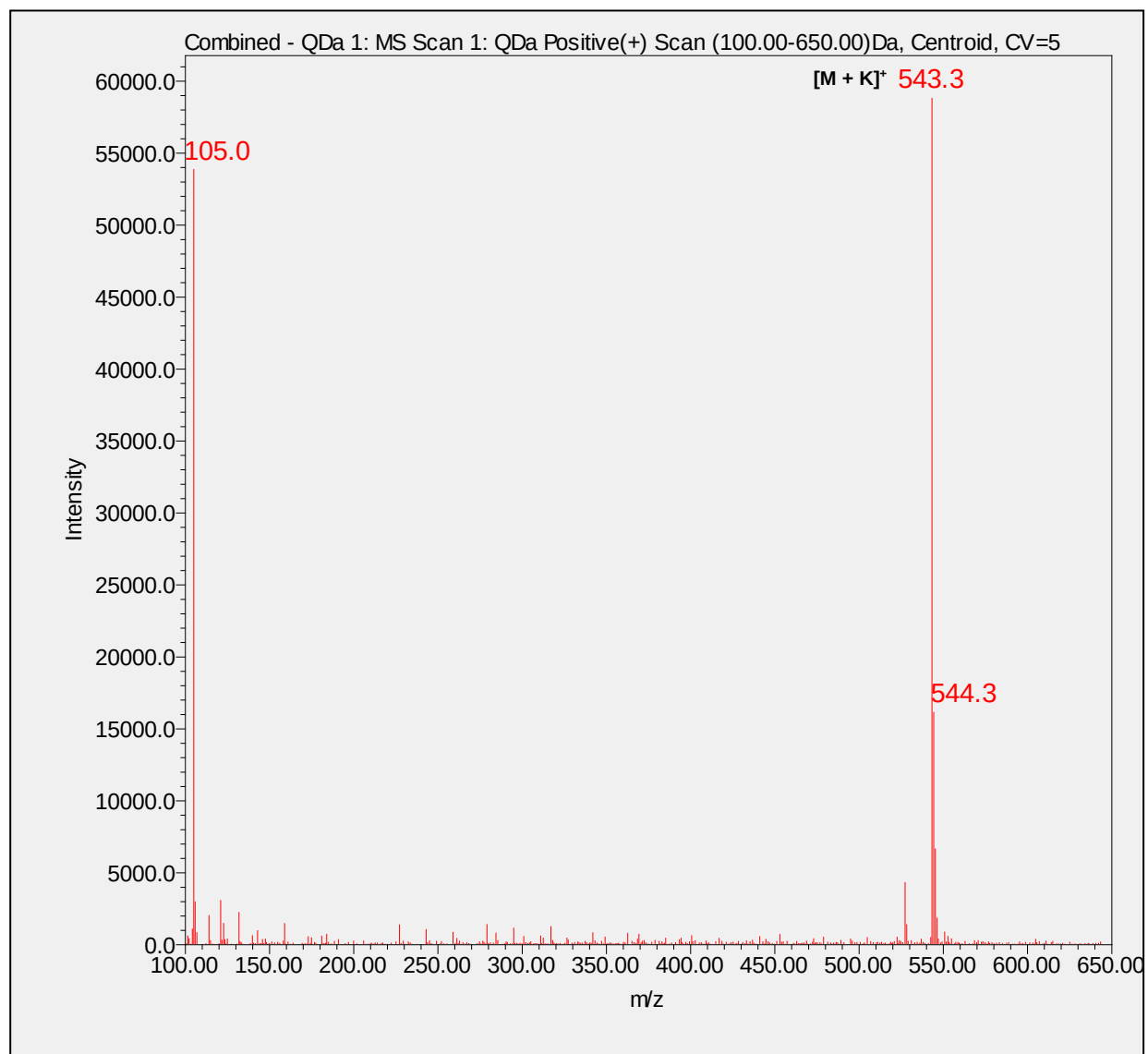


APÊNDICE 32 – Espectro de RMN de ^1H dos PDA-B obtido a 600 MHz (deuterocloroformio).

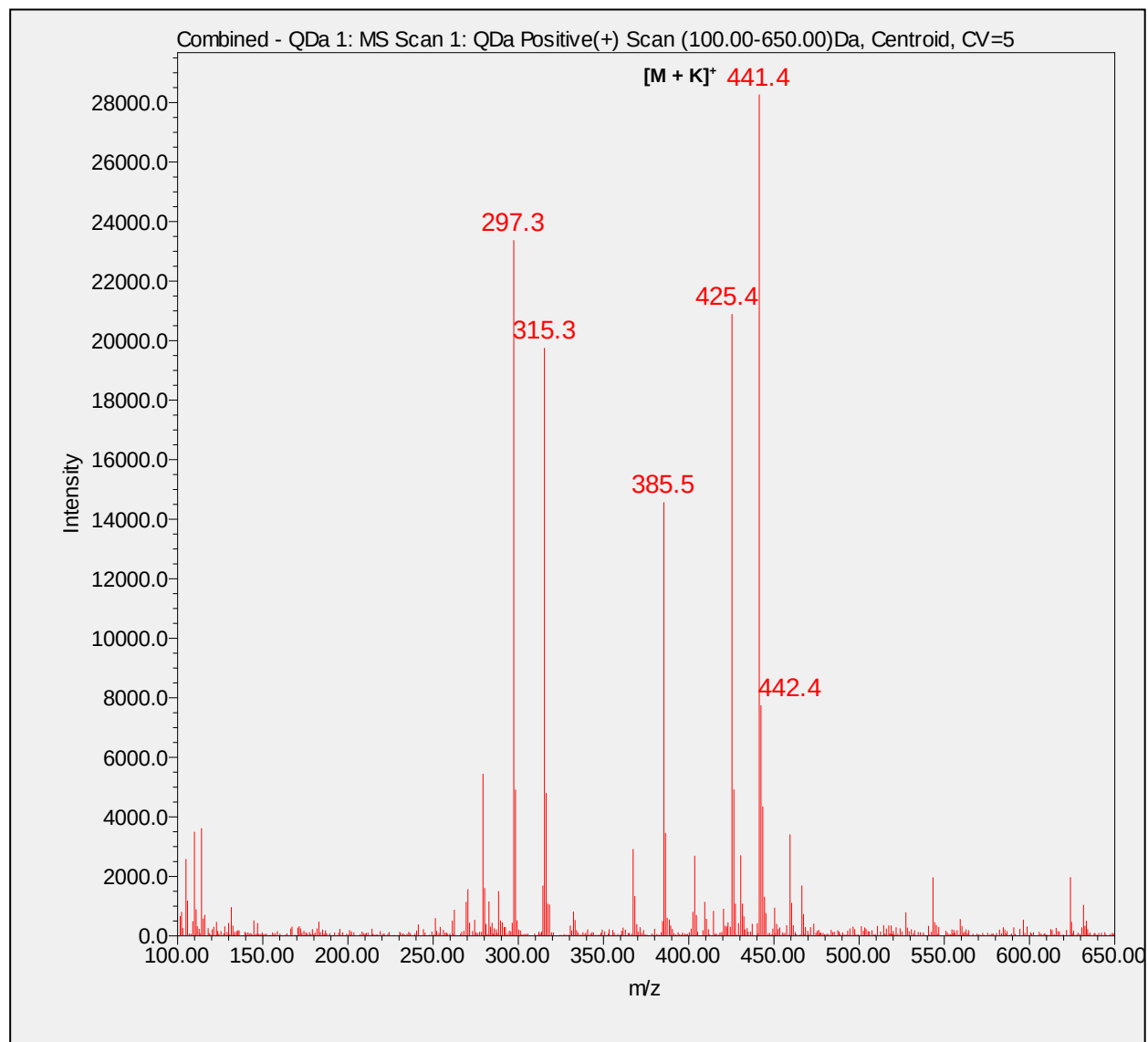
APÊNDICE 33 – Espectro de RMN de ^{13}C (DEPT 135) dos PDA-B obtido a 150 MHz (deuterocloroformio).



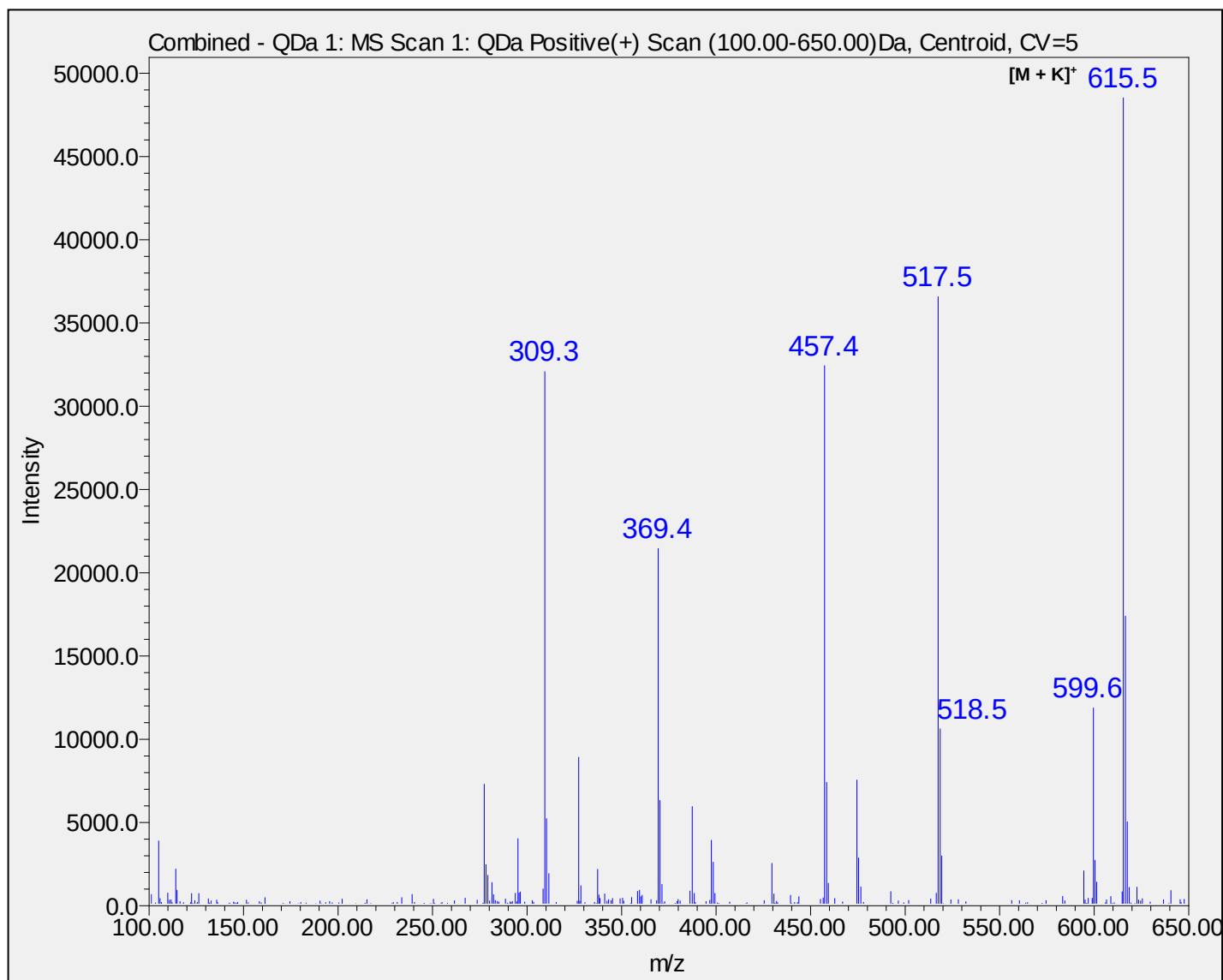
APÊNDICE 34 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) caseargrewiina F (t_R 7,1) min do cromatograma dos PME-F obtido por LC-MS.



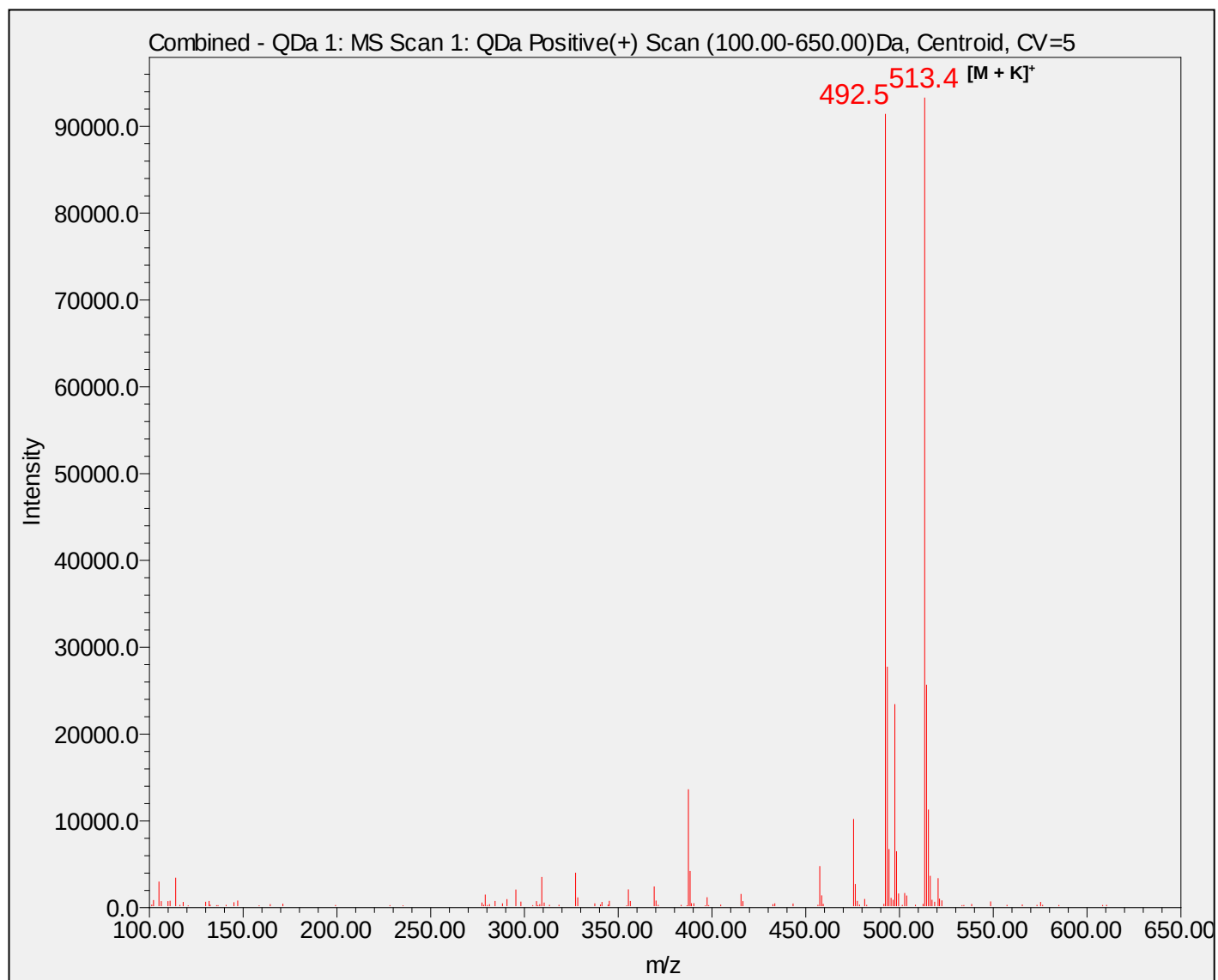
APÊNDICE 35 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do pico de t_R 7,0 min do cromatograma dos PME-F obtido por LC-MS.



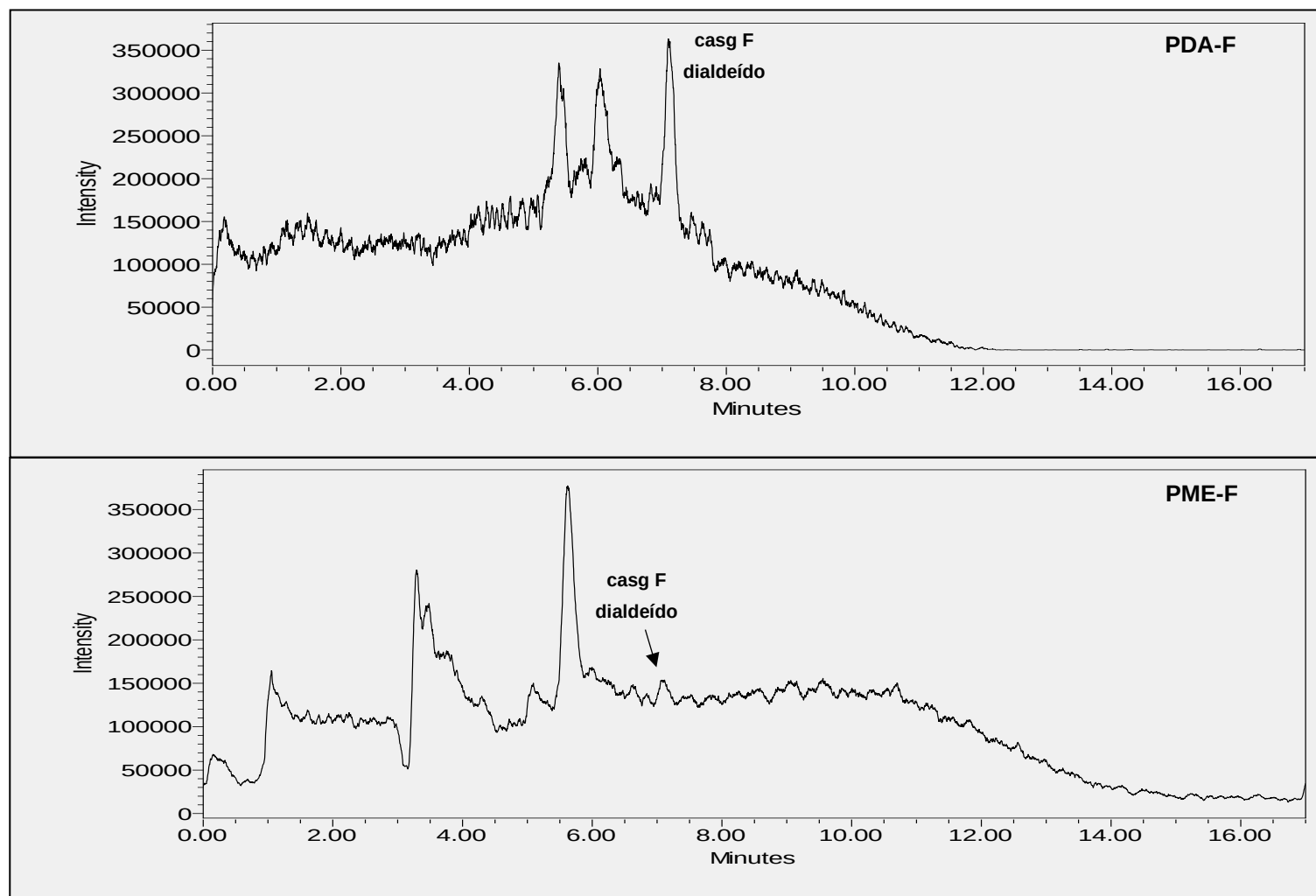
APÊNDICE 36 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) casearina B (t_R 7,9) min do cromatograma dos PME-B obtido por LC-MS.



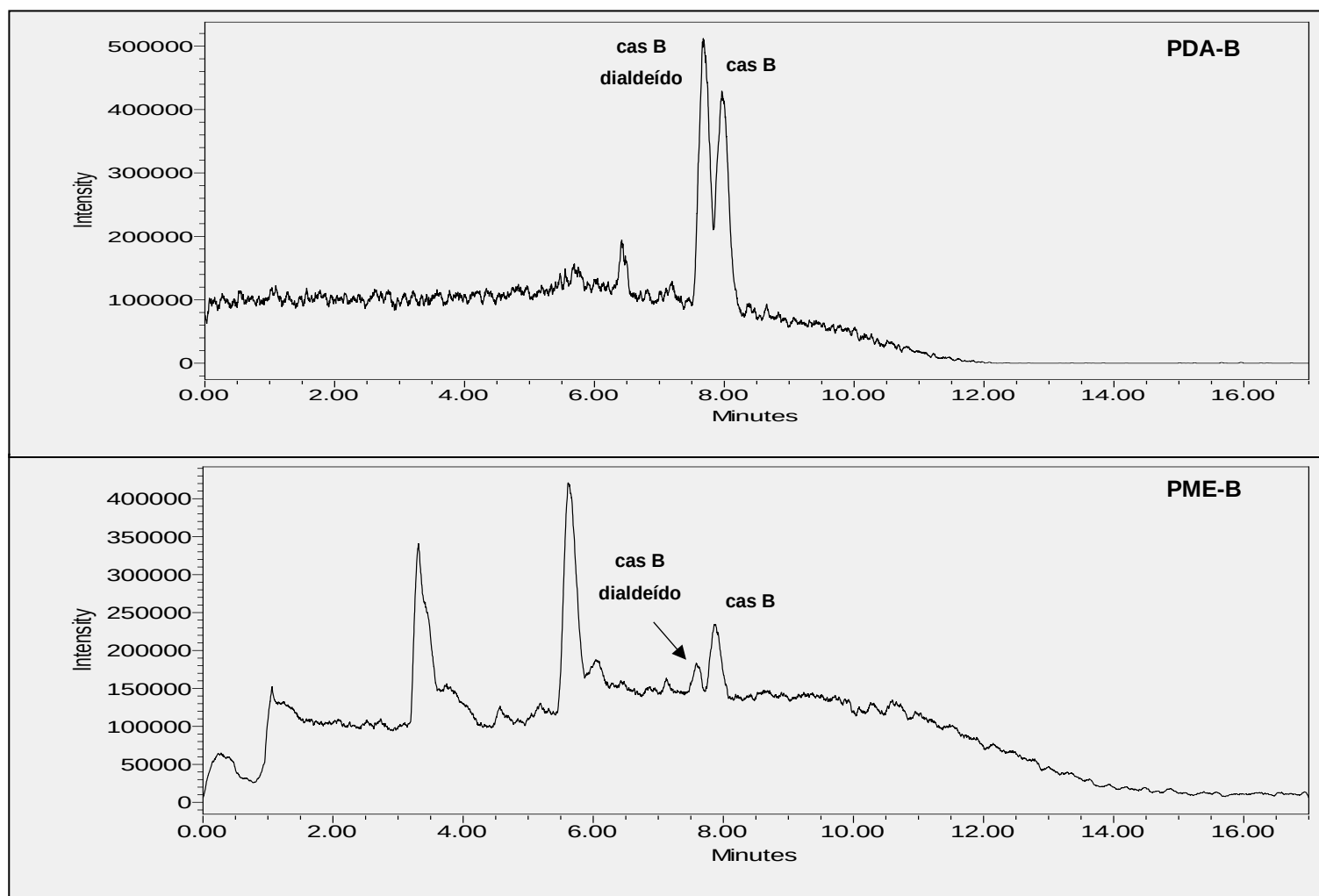
APÊNDICE 37 – Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) do pico de t_R 7,7 min do cromatograma dos PME-B obtido por LC-MS.



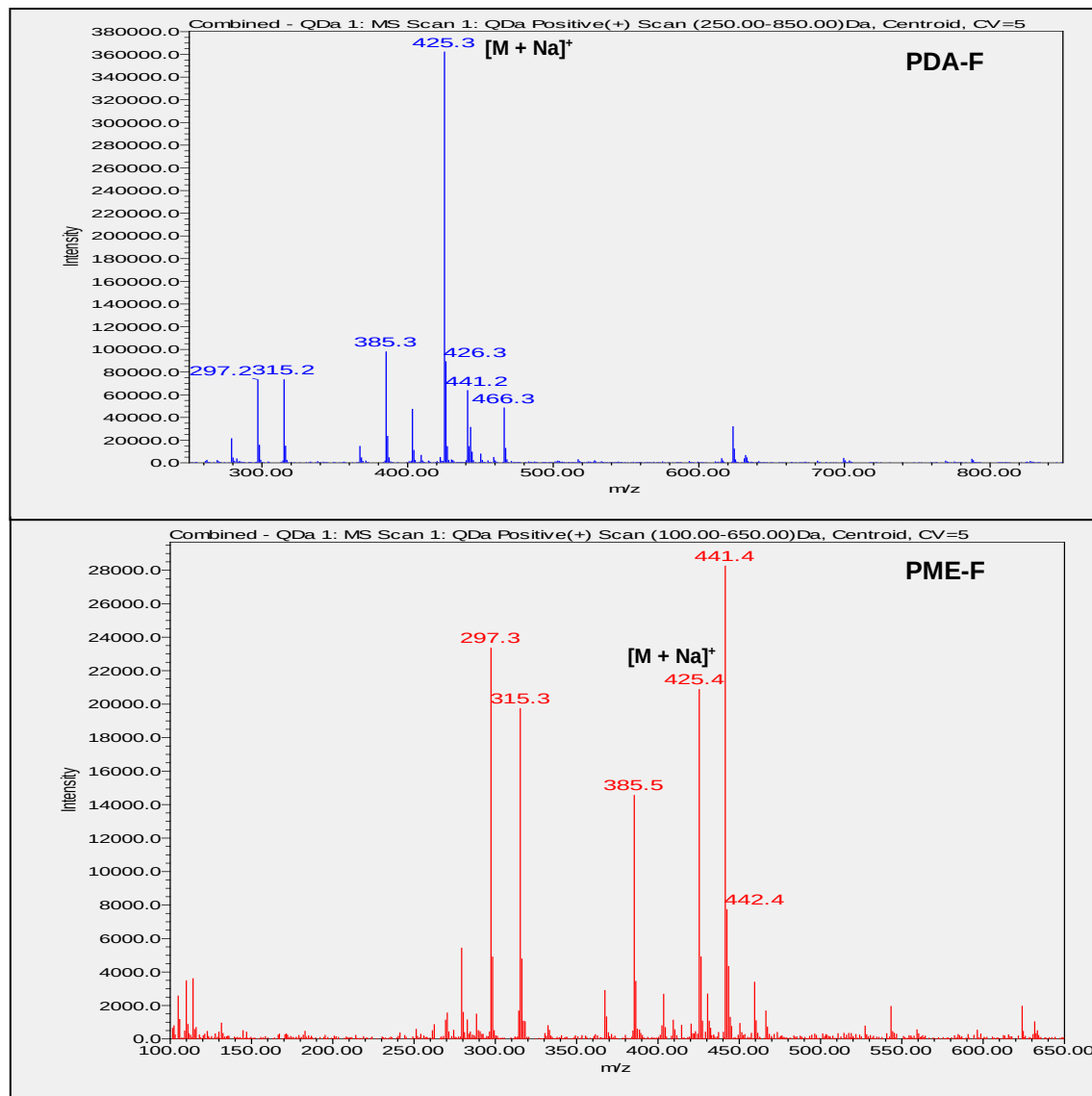
APÊNDICE 38 – Cromatograma (TIC) ESI⁺ dos produtos da caseargrewiina F obtidos após degradação ácida em FGS por 60 min (PDA-F) e metabolização por microsomas hepáticos humano (PME-F) por 30 min. Identificação: dialdeído da casg F (casg F dialdeído, t_R de 7,0 min), demais picos dos PME-F correspondem a componentes da matriz microsomal. Amostras: 10,0 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



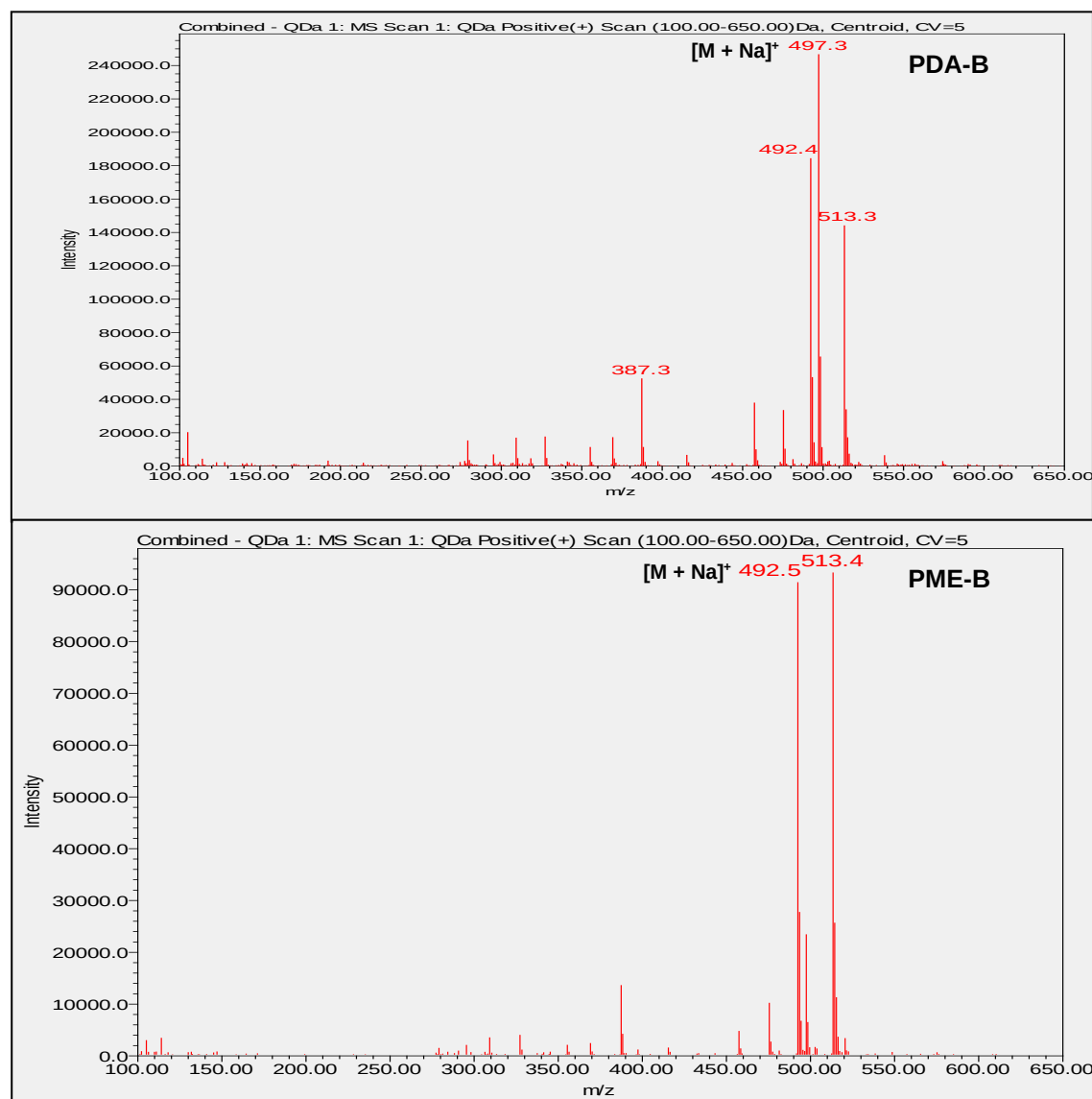
APÊNDICE 39 – Cromatograma (TIC) ESI⁺ dos produtos da casearina B obtidos após degradação ácida em FGS por 60 min (PDA-B) e metabolização por microsossomas hepáticos humano (PME-B) por 30 min. Identificação: casearina B (cas B, t_R de 7,9 min) dialdeído da cas B (cas B dialdeído, t_R de 7,7 min), demais picos dos PME-B correspondem a componentes da matriz microsossomal. Amostras: 10,0 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear de 80-100% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) em 8 min, mantendo isocraticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min.



APÊNDICE 40 – Espectros de massas ESI⁺ (MS¹) do dialdeído da casg F (t_R de 7,0 min) dos cromatogramas dos PDA-F e PME-F obtido por LC-MS.



APÊNDICE 41 – Espectros de massas ESI⁺ (MS¹) do dialdeído da cas B (t_R de 7,7 min) dos cromatogramas dos PDA-B e PME-B obtido por LC-MS.



9. ANEXOS

Anexo I – Certificado do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AC1CEE6

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	AC1CEE6
Usuário:	UNESP
CPF/CNPJ:	48.031.918/0001-24
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético/CTA
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Casearia sylvestris
Casearia sylvestris
Casearia sylvestris

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **ESTUDO FARMACOCINÉTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE DITERPENOS CLERODÂNICOS DE Casearia sylvestris Swartz E DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO IN VITRO**

Equipe

André Gonzaga dos Santos	UNESP
Fernando Bombarda Oda	UNESP
Camilla Alves Vicente	UNESP

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado:	ODA, F. BOMBARDA; CREVELIN, E. JOSÉ; CR
Identificação do meio onde foi divulgado:	Oda, F.B. Derivados de diterpenos clerodânicos
Identificação do meio onde foi divulgado:	ODA, F.B.; CASTRO, R.C.; IFA, D.R.; SANTOS, A.C

Data do Cadastro:	25/09/2018 15:26:49
Situação do Cadastro:	Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:24 de 06/07/2020.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido utilizado para doações de plasma do projeto.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “Estudo farmacocinético e avaliação da atividade anti-inflamatória de diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* Swartz e de seus produtos de degradação *in vitro*”.

O objetivo deste trabalho é estudar o que acontece com os remédios obtidos de plantas no nosso organismo, estudando o movimento e como são transformados no organismo de pessoas saudáveis. Para realizar o estudo será necessário que o(a) Sr.(a) se disponibilize para uma doação de sangue convencional (aproximadamente 1 h) no Hemonúcleo Regional de Araraquara “Professora Doutora Clara Pechmann Mendonça (HN). O intervalo e frequência de doações são: para homens intervalo de 2 meses, com frequência máxima de 4 doações anuais; para mulheres intervalo de 3 meses, com frequência máxima de 3 doações anuais. No dia da coleta o voluntário da pesquisa deve:

- a) trazer documento oficial de identidade com foto (identidade, carteira nacional de habilitação, certificado de reservista ou carteira do conselho profissional);
- b) estar bem de saúde
- c) ter entre 18 e 65 anos e pesar mais de 50 kg;
- d) Não estar em jejum; evitar alimentos gordurosos nas três horas que antecedem a doação.

Os riscos aos voluntários sadios que decidirem participar desse protocolo são aqueles decorrentes de uma coleta de sangue tradicional: hematoma ou dor no local da punção. A coleta de sangue poderá ser levemente desconfortável; a picada causa leve dor, de curta duração, e o local da picada pode ficar com a cor arroxeadada. No dia da coleta, podem acontecer efeitos não desejados como tontura, cansaço, fadiga. Para evitar esses efeitos, deve-se se hidratar bem, através do consumo de água e/ou sucos de frutas. No dia da coleta, não se deve realizar esforços físicos exagerados. Não se deve fumar por cerca de 2 horas após a coleta e evitar bebidas alcoólicas por 12 horas. Deve-se manter o curativo no local da punção por pelo menos quatro horas. No dia da coleta, não se deve dirigir veículos de grande porte, trabalhar em andaimes, praticar paraquedismo ou mergulho.

O material será utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior. Os materiais empregados na coleta serão descartáveis

Esta pesquisa servirá para avaliar a porção do fármaco que se liga às proteínas plasmáticas. Em virtude de as informações coletadas serem utilizadas unicamente com fins científicos, sendo garantidos o total sigilo e confidencialidade, através da assinatura deste

termo, o qual o(a) Sr.(a) receberá uma cópia e se desejar, será informado sobre os resultados dessa pesquisa.

Ao participar desse trabalho estará contribuindo para os pesquisadores entenderem o movimento e a transformação de fármacos obtidos de plantas em humanos, assim como para estudar as interações no organismo. A sua participação como voluntário terá a duração de aproximadamente 1 h e não terá nenhuma despesa ao participar desse estudo; caso ocorra algum dano em decorrência de sua participação, o participante fará jus à reparação.

O(a) Sr.(a) terá o direito e a liberdade de negar-se a participar desta pesquisa total ou parcialmente ou dela retirar-se a qualquer momento, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo ou punição.

Para qualquer esclarecimento no decorrer da sua participação, estarei disponível através do telefone: (16) 997556757 e e-mail: fer_oda@fcfar.unesp.br. O senhor (a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, na Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 – s/n, Bairro: Campos Ville, 14800-903 – Araraquara, SP, telefone (16) 3301-4657 e e-mail: sta@fcfar.unesp.br.

Eu _____, RG _____,
Estado Civil _____, Idade _____ anos, residente na _____,
nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____,
declaro que após ter sido esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a), lido o presente termo, e entendido tudo o que me foi explicado, concordo em participar da Pesquisa intitulada “Estudo farmacocinético e avaliação da atividade anti-inflamatória de diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* Swartz e de seus produtos de degradação *in vitro*”.

Araraquara, ____ de _____ de 20__.

Fernando Bombarda Oda
Pesquisador Responsável
CPF: 394.923.318-02

Assinatura do Voluntário

DECLARAÇÃO

Eu, _____, pesquisador responsável pelo Projeto de Pesquisa “Estudo farmacocinético e avaliação da atividade anti-inflamatória de diterpenos clerodânicos de *Casearia sylvestris* Swartz e de seus produtos de degradação *in vitro*”, declaro que todas as informações ao sujeito da pesquisa serão fornecidas por mim ou pela minha equipe no momento da obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Assinatura

ANEXO III – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp (Araraquara).

	UNESP - FACULDADES DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CAMPUS DE													
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP														
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: ESTUDO FARMACOCINÉTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE DITERPENOS CLERODÂNICOS DE <i>Casearia sylvestris</i> Swartz E DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO IN VITRO Pesquisador: FERNANDO BOMBARDA ODA Área Temática: Versão: 2 CAAE: 96952918.3.0000.5426 Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP Patrocinador Principal: Financiamento Próprio DADOS DO PARECER Número do Parecer: 3.029.803 Apresentação do Projeto: O projeto tem grande importância na área que se insere, esta bem escrito e possui metodologias bem estabelecidas. Objetivo da Pesquisa: Realizar estudos in vitro de simulação de administração oral que contribuam para a compreensão do comportamento farmacocinético de diterpenos clerodânicos do tipo das casearinas e do papel de seus metabólitos ou produtos de degradação na ação anti-inflamatória. Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos aos voluntários sadios que decidirem participar desse protocolo estão demonstrados adequadamente e são aqueles decorrentes de uma coleta de sangue tradicional: hematoma ou dor no local da punção. A coleta de sangue poderá ser levemente desconfortável; a picada causa leve dor, de curta duração, e o local da picada pode ficar com a cor arroxeadada. No dia da coleta, podem acontecer efeitos não desejados como tontura, cansaço, fadiga. Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa é relevante e pode trazer benefícios à sociedade.														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%;">Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1</td> <td style="width: 20%;">CEP: 14.801-902</td> <td style="width: 40%;"></td> </tr> <tr> <td>Bairro: Campus Universitário</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: ARARAQUARA</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (16)3301-4657</td> <td></td> <td>E-mail: sta@fcof.unesp.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1	CEP: 14.801-902		Bairro: Campus Universitário			UF: SP	Município: ARARAQUARA		Telefone: (16)3301-4657		E-mail: sta@fcof.unesp.br
Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1	CEP: 14.801-902													
Bairro: Campus Universitário														
UF: SP	Município: ARARAQUARA													
Telefone: (16)3301-4657		E-mail: sta@fcof.unesp.br												

Continuação do Parecer: 3.029.803

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente nos moldes das normas vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovo, Ad referendum, o referido projeto de pesquisa, estruturado dentro dos padrões ético.

O relatório final e os Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em ABRIL de 2019.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1172916.pdf	12/11/2018 19:16:39		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOC_Fernando_Oda_Final.docx	12/11/2018 19:15:08	FERNANDO BOMBARDA ODA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_Fernando.pdf	28/08/2018 12:08:40	FERNANDO BOMBARDA ODA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_Fernando.doc	28/08/2018 12:08:29	FERNANDO BOMBARDA ODA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOC_Fernando_Oda_vFinal.docx	23/08/2018 16:23:03	FERNANDO BOMBARDA ODA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DOC_Fernando_Oda_vFinal.pdf	23/08/2018 16:22:47	FERNANDO BOMBARDA ODA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_plataforma_etica.pdf	23/08/2018 16:05:26	FERNANDO BOMBARDA ODA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

Bairro: Campus Universitário

CEP: 14.801-902

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-4857

E-mail: sta@fcr.unesp.br



UNESP - FACULDADES DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DO CAMPUS DE



Continuação do Parecer: 3.029.803

ARARAQUARA, 21 de Novembro de 2018

Assinado por:
PAULO INACIO DA COSTA
(Coordenador(a))