

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **TESE** será disponibilizado somente a partir de 28/06/2023.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Câmpus de Araraquara



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.....25
- Figura 2.** *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* (São Miguel Arcanjo-SP), altura aproximada: 12 m..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.** *Casearia sylvestris* var. *lingua* (Estação Experimental de Araraquara, Araraquara-SP), altura aproximada: 2,5 m..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.** Rota biosintética dos terpenos. **Erro! Indicador não definido.**
- 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. . **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6.** Gráfico representativo da cinética enzimática de Michaelis-Menten. V_{max}: velocidade máxima; [S]: concentração de substrato; K_M: constante de Michaelis-Menten. **Erro! Indicador não definido.**
- 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)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 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. **Erro! Indicador não definido.**
- 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. **Erro! Indicador não definido.**
- 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). . **Erro! Indicador não definido.**
- 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..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12.** Estruturas químicas da casearina K, caseargrewiina F e casearina B. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13.** Cromatograma ESI⁺ (TIC) da casearina K (t_R de 15,77 min)..... **Erro! Indicador não definido.**

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

..... **Erro! Indicador não definido.**

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

Indicador não definido.

Figura 16. Espectro de massas ESI⁺ (MS¹) da caseargrewiina F. **Erro! Indicador**

não definido.

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

Indicador não definido.

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

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. **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

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

isocroticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min. **Erro! Indicador não definido.**

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 isocroticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24. Cromatogramas ESI⁺ (TIC) após extração em meio microsomal 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 isocroticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25. Curva analítica log P × log K das substâncias de referência..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26. Estabilidade da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) no meio de fluido gástrico simulado (pH 1,2) (n = 3). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 27. Estabilidade da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) no tampão Hank's (pH 7,4) (n = 3). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 28. Estabilidade da caseargrewiina F (casg F) e casearina B (cas B) no tampão TRIS (pH 8,8) (n = 3)..... **Erro! Indicador não definido.**

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). **Erro! Indicador não definido.**

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). **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

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. . **Erro! Indicador não definido.**

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..... **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 36. Estrutura química do dialdeído da caseargrewiina F (402 Da)..... **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 38. Estrutura química do dialdeído da casearina B (474 Da).**Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

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

Figura 41. Estrutura química das moléculas (C₂₄H₃₆O₆, 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). **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

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

Figura 44. Estrutura química das moléculas (C₂₄H₃₆O₆, 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). **Erro! Indicador não definido.**

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 microssoma 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 microssomal. Amostras: 10,0 µg/mL. Análise em LC-MS, coluna C18 (250 x 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. **Erro! Indicador não definido.**

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 microssoma 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 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 isocriticamente por 5 min, retornando para 80% MeCN (ác. fórmico 0,1%) (v/v) durante 4 min, vazão 0,7 mL/min. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 47. Gráfico da cinética enzimática ($V_0 \times S$) da caseargrewiin F (casg F) e casearina B (cas B) em meio microsomal hepático humano (n = 3). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 48. Gráfico de Eadie-Hofstee ($V_0 \times V_0/S$) da caseargrewiin F (casg F) e casearina B (cas B) em microsomas hepáticos humano (n = 3). **Erro! Indicador não definido.**

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

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®..... **Erro! Indicador não definido.**

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®. **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

ÍNDICE DE TABELAS

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)..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2. Informações farmacocinéticas sobre alguns produtos naturais. ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. (Fonte: o autor) **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3. Informações farmacocinéticas sobre diterpenos clerodânicos (Fonte: o autor). ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4. Valores de concentrações da casg F e cas B utilizados nos ensaios de cinética enzimática com microsomas hepáticos de humanos (µg/mL e µM). **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 5. Valores de massas das subfrações a partir do fracionamento da F 2 por CC em fase normal. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6. Dados espectrométricos de RMN de ¹³C (150 MHz) e ¹H (600 MHz) obtidos para a casearina k, em pentadeuteropiridina... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7. Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) obtidos para a caseargreina F, em pentadeuteropiridina. **Erro! Indicador não definido.**

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

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

Tabela 10. Exatidão e precisão do método analítico em acetonitrila da caseargreina F ($n = 3$). **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 11. Exatidão e precisão do método analítico em acetonitrila da casearina B ($n = 3$). **Erro! Indicador não definido.**

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

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

Tabela 14. Parâmetros de validação do método bioanalítico ponderado ($1/y^2$) para quantificação da caseargreina F e casearina B em microsossoma humano ($n = 5$, $p = 0,05$). **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 15. Valores de log P obtidos para cada substância. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 16. Taxa de ligação a proteínas de plasma e de microsossomas humanos das caseargreina F (casg F) e casearina B (cas B) nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ pelo método de ultracentrifugação ($n = 2$). Média (desvio padrão). **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 17. Dados obtidos por espectrometria de massas (ESI^+) dos produtos de degradação ácida da caseargreina 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. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 18. Dados espectrométricos de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) obtidos para a caseargreina F e seu dialdeído, em deuteroclorofórmio. **Erro! Indicador não definido.**

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.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 20. Dados espectrométricos de RMN de ¹³C (150 MHz) e ¹H (600 MHz) obtidos para a casearina B e seu dialdeído, em deuteroclorofórmio.**Erro! Indicador não definido.**

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

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 microsomais correspondente.....**Erro! Indicador não definido.**

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).....**Erro! Indicador não definido.**

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

Ct: 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	23
2. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
3. REVISÃO DA LITERATURA	Erro! Indicador não definido.
3.1 <i>Casearia sylvestris</i> Swartz	Erro! Indicador não definido.
3.2 Estudos ADME e de farmacocinética	Erro! Indicador não definido.
3.2.1 Produtos naturais	Erro! Indicador não definido.
3.2.2 Diterpenos clerodânicos	Erro! Indicador não definido.
4. MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.1 Material e equipamentos	Erro! Indicador não definido.
4.2 Coleta e preparo do material vegetal.....	Erro! Indicador não definido.
4.3 Obtenção do extrato etanólico de folhas de <i>C. sylvestris</i> (EetCs).....	Erro! Indicador não definido.
4.3.1 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>C. sylvestris</i>	Erro! Indicador não definido.
4.3.2 Análises cromatográficas do extrato e frações.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.3 Purificação e determinação estrutural de diterpenos clerodânicos	Erro! Indicador não definido.
4.4 Identificação e quantificação das substâncias por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....	Erro! Indicador não definido.
4.5 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para a quantificação de diterpenos por LC-MS	Erro! Indicador não definido.
4.5.1 Desenvolvimento de métodos analíticos	Erro! Indicador não definido.
4.5.2 Desenvolvimento de métodos bioanalíticos ..	Erro! Indicador não definido.
4.5.3 Parâmetros de validação.....	Erro! Indicador não definido.
4.6 Determinação de propriedades físico-químicas e biológicas dos diterpenos caseargrewiina F e casearina B	Erro! Indicador não definido.

- 4.6.1 Determinação do coeficiente de partição octanol / água (log P) **Erro! Indicador não definido.**
- 4.6.2 Ensaio de estabilidade química dos diterpenos em soluções aquosas de pHs 1,2; 7,4 e 8,8 **Erro! Indicador não definido.**
- 4.6.3 Ensaio de estabilidade *ex vivo* dos diterpenos em plasma humano **Erro! Indicador não definido.**
- 4.6.4 Determinação da fração de diterpenos livre em plasma e em meio microssomal humanos..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.6.5 Ensaio de estabilidade metabólica dos diterpenos em microssoma humano **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7 Estudo de degradação do EetCs e diterpenos em fluido gástrico simulado **Erro! Indicador não definido.**
- 4.8 Estudo de metabolização *in vitro* dos diterpenos utilizando microssomas hepáticos de humanos **Erro! Indicador não definido.**
- 4.8.1 Cinética enzimática dos diterpenos **Erro! Indicador não definido.**
- 4.8.2 Extrapolação *in vitro-in vivo* (IVIVE) **Erro! Indicador não definido.**
- 4.9 Estudo de modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) para predição do perfil farmacocinético da caseargrewiina F e casearina B em humanos **Erro! Indicador não definido.**
- 4.10 Investigação da ação anti-inflamatória *in vitro* dos diterpenos clerodânicos caseargrewiina F e casearina B **Erro! Indicador não definido.**
- 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) **Erro! Indicador não definido.**
- 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) **Erro! Indicador não definido.**
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.1 Preparação do extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* (EetCs) **Erro! Indicador não definido.**

5.2 Purificação e identificação estrutural de diterpenos clerodânicos **Erro!**

Indicador não definido.

5.2.1 Fracionamento do EetCs e da fração 2 (F 2) **Erro! Indicador não definido.**

5.2.2 Cromatografia líquida semi-preparativa da SF 20-23.1**Erro! Indicador não definido.**

5.2.3 Identificação estrutural de diterpenos clerodânicos da SF 20-23.1 **Erro! Indicador não definido.**

5.2.3.1 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P1**Erro! Indicador não definido.**

5.2.3.2 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P2**Erro! Indicador não definido.**

5.2.3.3 Identificação estrutural de SF 23-23.1 P3**Erro! Indicador não definido.**

5.3 Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e bioanalíticos para a quantificação de diterpenos por LC-MS**Erro! Indicador não definido.**

5.3.1 Método analítico**Erro! Indicador não definido.**

5.3.1.1 Matriz acetonitrila.....**Erro! Indicador não definido.**

5.3.1.2 Matriz tampão Hank's**Erro! Indicador não definido.**

5.3.2 Método bioanalítico**Erro! Indicador não definido.**

5.3.2.1 Matriz plasma humano**Erro! Indicador não definido.**

5.3.2.2 Matriz microssoma hepático humano**Erro! Indicador não definido.**

5.4 Determinação de propriedades físico-químicas e biológicas da caseargrewiina F e casearina B**Erro! Indicador não definido.**

5.4.1 Determinação do coeficiente de partição octanol / água (log P) **Erro! Indicador não definido.**

5.4.1.1 Determinação *in silico***Erro! Indicador não definido.**

5.4.1.2 Determinação por método cromatográfico**Erro! Indicador não definido.**

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	Erro! Indicador não definido.
5.4.2.1 Estabilidade em pH 1,2 (FGS)	Erro! Indicador não definido.
5.4.2.1 Estabilidade em pH 7,4 (Hank's)	Erro! Indicador não definido.
5.4.2.2 Estabilidade em pH 8,8 (TRIS)	Erro! Indicador não definido.
5.4.3 Ensaio de estabilidade <i>ex vivo</i> da casg F e cas B em plasma humano	Erro! Indicador não definido.
5.4.4 Determinação da fração de diterpeno livre em plasma (f_{u_p}) e em meio microsomal humano (f_{u_m})	Erro! Indicador não definido.
5.4.5 Ensaio de estabilidade metabólica dos diterpenos em microsomas hepáticos de humanos	Erro! Indicador não definido.
5.5 Estudo de degradação do EetCs e diterpenos em fluido gástrico simulado	Erro! Indicador não definido.
5.5.1 Análises dos PDA por LC-DAD/UV	Erro! Indicador não definido.
5.5.2 Análises dos PDA por LC-MS	Erro! Indicador não definido.
5.5.3 Análises dos PDA por UPLC-QTOF-MS/MS e RMN	Erro! Indicador não definido.
5.6 Estudo de metabolização <i>in vitro</i> dos diterpenos em microsomas hepáticos de humanos.....	Erro! Indicador não definido.
5.6.1 Análises dos PME por LC-MS	Erro! Indicador não definido.
5.6.2 Cinética enzimática dos diterpenos.....	Erro! Indicador não definido.
5.6.3 Extrapolação <i>in vitro-in vivo</i> (IVIVE)	Erro! Indicador não definido.
5.7 Estudo de modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK) para predição do perfil farmacocinético da caseargrewiina F e casearina B em humanos	Erro! Indicador não definido.
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) ...	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÃO.....	30

7. REFERÊNCIAS.....	32
8. APÊNDICES.....	Erro! Indicador não definido.
9. ANEXOS	Erro! Indicador não definido.

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).

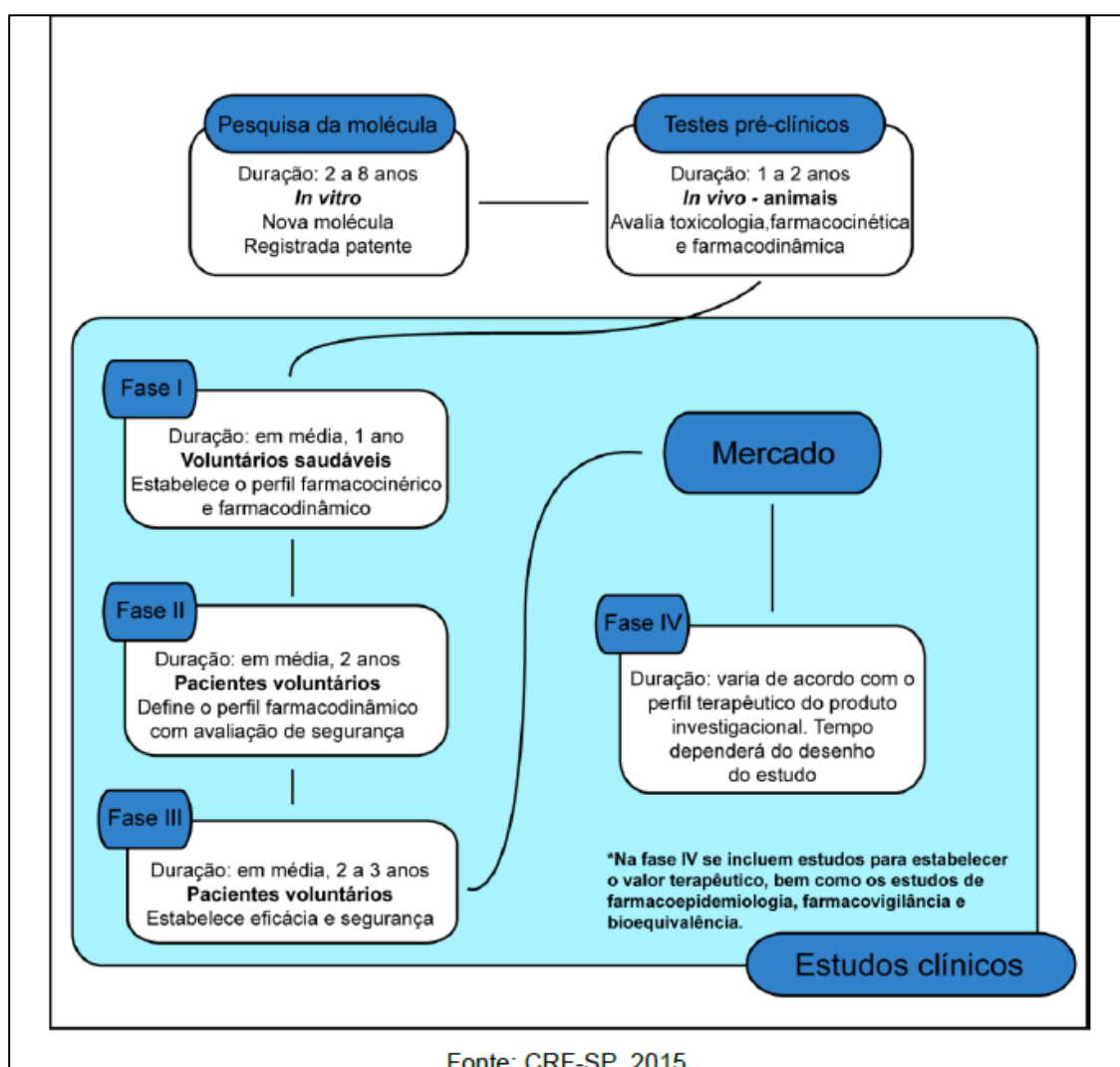
Tendo em vista os resultados de estudos farmacológicos e toxicológicos em conjunto com sua tradição de uso, *C. sylvestris* está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e já faz parte do Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, publicado 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 antidispéptico, 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 fluidos 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 microsomas 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 microsomas 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 microsomas 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).

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 fluido 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.

AMOAH, 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. Acessado 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 histological 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 grewiifolia*. **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 Lu-ying 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 piplartine 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 govaniiana* 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 amyryns 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. **Bolletim 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 *Casaria 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.