UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da
casearina X**

Rodrigo Moreira da Silva

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Rodrigo Moreira da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de Gaitani

Coorientador: Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 14/03/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Moreira da Silva, Rodrigo

Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X. Ribeirão Preto, 2016.

120 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Gaitani, Cristiane Masetto.

1. casearina X. 2. Metabolismo in vitro. 3. Microssomas. 4. Permeabilidade in vitro. 5. Caco-2.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigo Moreira da Silva

Caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da casearina X

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção
do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Masetto de
Gaitani

Coorientador: Prof. Dr. Anderson R. M. de
Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a minha orientadora Profa. Dra. **Cristiane Masetto de Gaitani** por me receber como aluno, pela orientação neste trabalho e na vida profissional, pelos ensinamentos, conselhos, incentivo, paciência e atenção, que foram essenciais para minha formação. Obrigado pela confiança, especialmente pela liberdade de poder tentar e errar e investigar e descobrir.

Ao meu coorientador Prof. Dr. **Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira** pela orientação e amizade. Obrigado pela parceria, pelo incentivo, apoio e aprendizado durante esses anos. Sempre me lembrarei do seu exemplo como orientador, profissional e amigo.

Ao Prof. Dr. **Norberto Peporine Lopez** pela colaboração no projeto, pelo apoio e incentivo. Obrigado por me ajudar a trilhar novos caminhos e pelas portas sempre abertas. Ao Prof. Dr. **Alberto José Cavalheiro**, da UNESP por ter cedido a casearina X para a nossa pesquisa.

À minha orientadora no doutorado sanduíche na Suíça, Profa. Dra. **Veronika Butterweck**, pela oportunidade de me aventurar em outras esferas da ciência, pelas nossas discussões e descobertas que transformaram as dificuldades em um desafio intrigante. Agradeço também ao Prof. Dr. **Georgios Imanidis** pela troca de experiências, atenção e disponibilidade em ajudar.

A todos os professores que tive no doutorado, pela excelência nos ensinamentos em aula e pelo exemplo de docência. Um agradecimento especial às minhas supervisoras no Programa de Aprimoramento de Ensino na Toxicologia, Prof. Dr. **Regina Helena Costa Queiroz** e Prof. Dra. **Vera Lúcia Lanchote**.

A todos os colegas do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos, da FCFRP. Um agradecimento especial a **Aline Ishikawa** e **Luiza Saldanha** pela parceria e amizade. Obrigado **Fernando Armani**, **Jennifer Yokoya**, **Letícia Schiave** e **Luciana Lourenço** pelo ótimo convívio e pela amizade, dentro e fora do lab. Muito obrigado **Mariana Barbieri**, pelo cuidado e atenção, pela amizade e pela sua alegria. Você é especial.

A todos os colegas do Laboratório de Metabolismo In Vitro e Técnicas de Separação, da FFCLRP. Agradeço especialmente aos amigos **Bruno Rocha**, **Daniel Carrão**, **Nayara Albuquerque** e **Simone Fortes**, pelo apoio no trabalho e parceria na vida. Admiro muito vocês e me sinto honrado pela nossa amizade. Muito obrigado caro **Lucas Maciel**, pela amizade, apoio e auxílio práticos nas técnicas de MS.

Aos funcionários da FCFRP, pelo excelente trabalho que realizam e pelo cuidado e atenção altruísta que dispensam a nós. Um agradecimento especial à **Rosemary Ioshimine** da Pós-Graduação, **David Vieira** e **Karina Stefani** do Apoio Acadêmico e aos técnicos **Luís Fernando**, **Tiago Cavassani**, **Jacqueline Mendonça** e **José Carlos Tomaz**.

A todos os colegas do *Institut für Pharmatechnologie, Fachhochschule Nordwestschweiz*, em especial aos amigos **Alexandra Machado**, **Andreas Halsteen**, **Barbora Durciová**, **Camille Adler**, **David Hilber**, **Elisabetta Corradi**, **Jonas Wedler**, **Katerina Simková**, **Kira Nultsch**, **Martin Novak**, **Sheela Verjee**, **Tarik Cheema** e **Wiebke Kirchmeyer**. Foi maravilhoso fazer parte dessa equipe multicultural. Vielen dank!

Aos amigos **Priscila Jordt Evangelista** e **Wolfram Schwarz**, que participaram da minha fase fora do Brasil, me acolheram e tornaram minha estadia na Suíça mais do que especial. Muito obrigado pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos amigos de Ouro Preto que reencontrei em Ribeirão Preto. Obrigado **Ivanildes Vasconcelos**, por me “trazer” para a USP e pela amizade; **Juju Neves**, **Fillipe Leotardo**, **Lu Marcelino** pela amizade e união, pelos *rocks* em casa, sempre os melhores. Especialmente **Paty Goto**, que também me “trouxe” para a USP, amiga para sempre; obrigado pelo cuidado, carinho, preocupação, pelas alegrias, risadas e os melhores momentos em Ribeirão Preto. Obrigado pelo nosso Tufão e por tudo o que compartilhamos no dia a dia.

À minha família, meu pilar e razão de viver: meus pais, **Marília** e **Itamar**, meus irmãos **Renata** e **Rogério**, meus sobrinhos **Raphaella** e **Vitor** e à **Vanilda**. Obrigado pelo amor e apoio incondicional. Aos amigos do peito **Hélcio** e **Cris**, pelo incentivo, apoio e carinho. À **Regina** e **João**, sempre preocupados comigo, **Val**, irmã pra sempre, **William**, grande amigo, **Pablo**, meu afilhado mais legal, ainda vou te roubar pra mim, **Joãozinho**, uma vitória em forma de bebê, **Vanessa** e **Gabriel**, **Fernanda**, **Felipe** e **Francisco**. Aos velhos amigos **Marlon**, **Marcos**, **Well**, **Sula**, **Flávia**, **André** e **Milene**, para a vida inteira. Aos novos amigos, em especial ao **Felipe Miguel**. Aos eternos **Wal** e **Marquinho**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e à Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar este trabalho.

À **FAPESP**, principal financiadora do projeto (processo n. 2012/03446-7), à **CAPES**, **CNPq** e Pró-reitora de Pós-Graduação da **USP** pelo suporte financeiro e ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (**PDSE**), pelo financiamento do estágio realizado na Suíça.

RESUMO

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

As principais propriedades farmacológicas da *Casearia sylvestris*, uma espécie de árvore cujas folhas são utilizadas na medicina popular, já foram descritas na literatura. Recentemente foi demonstrada a potente atividade citotóxica in vitro da casearina X (CAS X), o diterpeno clerodânico majoritário isolado das folhas de *C. sylvestris*, contra linhagens de células tumorais humanas. Apesar dos resultados promissores, sua potente atividade citotóxica in vitro não pode ser extrapolada para uma potente atividade in vivo, a menos que possua boa biodisponibilidade e duração desejável do seu efeito. Tendo em vista que o avanço nas pesquisas de produtos naturais requer a avaliação pré-clínica de propriedades farmacocinéticas, no presente trabalho foi realizada a caracterização in vitro do metabolismo e da absorção intestinal da CAS X, com o objetivo de prever sua biodisponibilidade in vivo. Para os estudos de metabolismo in vitro, foi utilizado o modelo microsomal hepático de ratos e de humanos. Foi desenvolvido um método analítico para a quantificação da CAS X em microsomas, empregando a precipitação de proteínas com acetonitrila no preparo das amostras e a cromatografia líquida de alta eficiência para as análises. O método foi validado de acordo com os guias oficiais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e da *European Medicine Agency* (EMA). A CAS X demonstrou ser substrato para as reações de hidrólise mediada pelas carboxilesterases (CES) e apresentou um perfil cinético de Michaelis-Menten. Foram estimados os parâmetros de V_{max} e K_M , demonstrando que o *clearance* intrínseco em microsomas hepático de humanos foi 1,7 vezes maior que o de ratos. O *clearance* hepático foi estimado por extrapolação in vitro-in vivo, resultando em mais de 90% do fluxo sanguíneo hepático em ambas as espécies. Um estudo qualitativo para a pesquisa de metabólitos foi feito utilizando espectrometria de massas, pelo qual foi possível sugerir a formação da casearina X dialdeído como produto de metabolismo. Nos estudos de absorção intestinal in vitro foi utilizado o modelo de monocamadas de células Caco-2. Um método analítico por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi desenvolvido e validado de acordo com o EMA, para as etapas de quantificação da CAS X no sistema de células. Os parâmetros cinéticos de permeabilidade aparente absorptiva e secretória da CAS X foram estimados em um sistema celular, no qual a atividade hidrolítica da CES foi inibida. Assim, a CAS X foi capaz de permear a monocamada de células Caco-2, provavelmente por transporte ativo, sem a ocorrência de efluxo, mas com significativa retenção do composto dentro das células. Em conjunto, os ensaios in vitro realizados demonstraram a susceptibilidade da CAS X ao metabolismo de primeira passagem, como substrato para as CES específicas expressas no fígado e intestino.

Palavras-chave: casearina X, metabolismo in vitro, microsomas hepáticos, permeabilidade in vitro, Caco-2

ABSTRACT

MOREIRA DA SILVA, R. ***In vitro* characterization of metabolism and intestinal absorption of casearin X**. 2016. 120p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Casearia sylvestris leaves are commonly used by folk medicine and its main pharmacological properties were already described in the literature. Casearin X (CAS X) is the major clerodane diterpene isolated from the leaves of *C. sylvestris*. Recently, the *in vitro* cytotoxic activity of the CAS X was demonstrated against human tumor cells lineages. Despite promising results, the CAS X *in vitro* cytotoxic activity cannot be extrapolated to an *in vivo* activity, unless the compound has good bioavailability and desirable duration of its effect. The advance in natural products research requires a pharmacokinetic preclinical assessment to justify a therapeutic indication. Thereby, this present work aims to predict the CAS X *in vivo* bioavailability, by the *in vitro* characterization of the metabolism and intestinal absorption. The rat and human hepatic microsomal model was used for *in vitro* metabolism studies. An analytical method for quantification of CAS X in microsomes was developed, employing protein precipitation with acetonitrile for sample preparation and High Performance Liquid Chromatography for analysis. This method was validated in according to Agência Nacional de Vigilância Sanitária and European Medicine Agency guidelines (EMA). CAS X demonstrated to be substrate for carboxylesterases (CES) by hydrolysis reaction, with a Michaelis-Menten kinetic profile. The parameters $V_{\max}$ and K_M was estimated and the intrinsic clearance was 1.7-fold higher in humans than rats. The hepatic clearance was estimated by in vitro-in vivo extrapolation, resulting in more than 90% of the hepatic blood flow for both species. A qualitative study was carried out for the metabolite identification, using Mass Spectrometry, suggesting the formation of casearin X dialdehyde as metabolism product. Monolayer of Caco-2 cells was used for the *in vitro* intestinal absorption studies. An analytical method by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry was developed and validated, according to EMA, for the quantification of CAS X in cells systems. The apparent permeability was estimated in both, absorptive and secretory directions, using cells monolayers with inhibited CES hydrolysis. CAS X was able to cross the Caco-2 cells monolayer, probably by active transport, with no significant efflux, but with a high retention of the compound inside the cells. These findings demonstrated that CAS X is susceptible to first-pass metabolism, as substrate for specific CES expressed in both, liver and intestine.

Keywords: casearin X, in vitro metabolism, hepatic microsomes, in vitro permeability, Caco-2

INTRODUÇÃO

O gênero *Casearia* é composto por cerca de 180 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, incluindo África, Ásia, Austrália, América do Norte, América do Sul e Ilhas do Pacífico (Xia et al., 2014). Até 2006, já haviam sido descritas cerca de 70 espécies como pertencentes ao continente americano, das quais 37 estão presentes no Brasil (Carvalho, 2006).

A *Casearia sylvestris* Swartz (*Salicaceae*) é a principal espécie encontrada em diferentes ecossistemas da América do Sul, tais como a Floresta Amazônica Equatorial, a Mata Atlântica e o Cerrado. Conhecida no Brasil como “guaçatonga” e “erva de bugre” nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, ou como “café bravo” no Ceará e Paraná (Carvalho, 2006), a utilização da *C. sylvestris* na medicina popular brasileira está relacionada ao tratamento de várias doenças, mais notadamente para curar feridas dérmicas, úlceras gástricas, para promover anestesia local e como antisséptico (Hoehne, 1939; Correa, 1975; Junges; Schenkel; Simões, 1985). Foi incluída na 1ª Farmacopéia do Brasil como uma espécie em destaque, com preparação à base de extrato hidroalcoólico (EtOH/H₂O, 1:2, v/v) obtido por percolação (1:1, m/v) (Brasil, 1926).

O relato mais antigo encontrado na literatura sobre o uso popular da *C. sylvestris* é datado de 1877 (Santos, 2008). Também há citações da sua utilização em obras clássicas brasileiras como em “Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais” (Hoeme, 1939), “O Jardim Botânico de São Paulo” (Hoeme; Kuhlmann; Handro, 1941), “Notas de Fitoterapia” (Coimbra, 1958) e no “Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas” (Correa, 1975). Com o passar dos anos, as propriedades medicinais da guaçatonga ficaram mais conhecidas e passou a ser divulgada também pela imprensa (Estadão, 2004). Hoje, é possível encontrar produtos à base de guaçatonga à venda como fitoterápico em farmácias, ervanárias, feiras e até pela internet.

1. Estudos farmacológicos e toxicológicos da *Casearia sylvestris* e da casearina X

A literatura científica confirma várias atividades terapêuticas da *C. sylvestris* por estudos farmacológicos de extratos das suas folhas. Por exemplo, o óleo essencial administrado por via oral e intraperitoneal em ratos demonstrou excelentes propriedades anti-inflamatórias. (Basile et al., 1990; Ruppelt et al., 1991; Esteves et al., 2005; Napolitano et al., 2005). O extrato hidroalcoólico bruto das folhas da *C. sylvestris* administrados em camundongos por via oral demonstrou efeito antinociceptivo e revelou o seu potencial terapêutico no tratamento de

condições associadas com a dor inflamatória (Mattos et al., 2007). O extrato metanólico demonstrou efeito anti-hiperlipidêmico, com a inibição da síntese de triglicerídeos em camundongos tratados por via oral (Schoenfelder et al., 2008). Com o extrato hexânico, obtido de diferentes partes da planta (folhas, caules, raízes e frutos), foi demonstrada uma potente ação antiprotozoária, especificamente contra o agente etiológico da doença de Chagas, o *Trypanosoma cruzi*, e contra o agente etiológico da Leishmaniose, *Leishmania donovani* (Espindola et al., 2004; Mesquita et al., 2005).

Já o extrato aquoso (chá), que é a preparação mais comumente empregada na medicina popular, demonstrou ser um poderoso neutralizante de veneno de serpentes, como o da jararaca e de outras espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (Borges et al., 2000; Raslan et al., 2002; Cavalcante et al., 2007). De fato, há relatos de populações indígenas da Amazônia que por muito tempo utilizaram o chá das folhas de *C. sylvestris* para o tratamento de picadas de cobras (Ruppelt et al., 1991; Mors et al., 2000). A própria etimologia da palavra “guaçatonga” é oriunda do tupi-guarani, o que reforça a hipótese do uso empírico da planta em comunidades indígenas.

O chá da guaçatonga também é muito utilizado na medicina popular para o tratamento de ulcerações estomacais. Estudos pré-clínicos demonstraram ação protetora e curativa do extrato etanólico sobre lesão gástrica aguda induzida em ratos, sem alteração do pH estomacal e da secreção de ácido clorídrico, o que representa uma enorme vantagem do uso do extrato em relação a medicamentos comumente empregados na clínica (Basile et al., 1990; Sertiè; Carvalho; Panizza, 2000).

Investigações fitoquímicas dos extratos da *C. sylvestris* mostraram a presença de uma série de substâncias de interesse, como flavonoides, fenilpropanoides, lignanas e terpenoides. Entre esses compostos, predominam os diterpenos clerodânicos tricíclicos oxigenados que podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos do gênero devido às suas características estruturais específicas. Mais de 120 diterpenos do tipo clerodânico já foram isolados de diferentes órgãos da planta, como as casearinas, casearvestrinas e caseargrevinas. As casearinas ocorrem de forma majoritária nas folhas da *C. sylvestris*, havendo relatos da existência de pelo menos 23 variantes (**Figura 1**) (Itokawa et al., 1988; Morita et al., 1991; Oberlies et al., 2002; Santos et al., 2007; Carvalho; Santos; Cavalheiro, 2009; Vieira Júnior et al., 2011; Xia et al., 2014).

casearinas (CAS)	R1	R2	R3	R4	R5
CAS A	OMe	OAc	OAc	OH	Bu
CAS B	OMe	OAc	OAc	OAc	Bu
CAS C	OH	OAc	OAc	OAc	Dc
CAS D	OH	Bu	OAc	OH	Bu
CAS E	OH	OEt	OAc	OH	Dc
CAS F	OH	OEt	OAc	OH	Bu
CAS G	OMe	OAc	OAc	H	Bu
CAS H	OH	OAc	OAc	H	Bu
CAS I	OH	OAc	Bu	H	Bu
CAS J	OMe	Bu	OAc	OH	Bu
CAS K	OAc	OAc	OAc	OH	Bu
CAS L	OMe	Bu	OAc	OAc	OH
CAS M	OH	Bu	Bu	OAc	OH
CAS N	OMe	OAc	Bu	OAc	Bu
CAS O	OMe	Bu	OAc	OAc	Bu
CAS P	OMe	OAc	OAc	OAc	OAc
CAS Q	OH	OAc	OAc	OAc	Bu
CAS R	= O	OAc	OAc	OH	Bu
CAS X	Bu	Bu	OAc	OH	H

OMe: grupo OCH₃ (metoxila); OEt: grupo OC₂H₅ (etoxila) OAc: grupo CH₃CO₂ (acetato); Bu: grupo n-C₃H₇CO₂; Dc: grupo n-C₉H₁₉CO₂; = O: grupo C=O (carbonila); OH: grupo O-H (hidroxila).

Figura 1. Substituintes das casearinas A–X (Carvalho et al., 1998; Itokawa et al., 1990; Morita et al., 1991; Oberlies et al., 2002; Wang et al., 2009; Ferreira et al., 2010; Santos et al., 2010).

O potencial farmacológico destacado das casearinas é devido à ação citotóxica observada em baixas concentrações (Itokawa et al., 1999). No primeiro estudo realizado com células V-79 (fibroblastos pulmonares) de camundongos chineses transgênicos, foram observados valores de IC₅₀ entre 0,2 e 29 µmol/L para as casearinas A–R (Itokawa et al., 1990).

Mais recentemente, estudos realizados com as casearinas B, D, L, O e X em células de leucemia (MOLT-4), melanoma (MDA/MB-435), células de câncer do sistema nervoso (SF-295) e de câncer de cólon (HCT-8), demonstraram que a casearina X (CAS X) exibiu o melhor efeito antiproliferativo, com valores de $IC_{50} < 1 \mu M$. Além disso, foi demonstrada sua baixa citotoxicidade contra células normais (fibroblastos L-929), indicando a possibilidade de ação seletiva em células cancerígenas (Santos et al., 2010).

Posteriormente, as casearinas L, O e X foram avaliadas em 3 linhagens de células de leucemia (CEM, HL-60 e K-562) e, mais uma vez, a CAS X apresentou o maior poder citotóxico contra as células CEM e HL-60, com valores de IC_{50} de $0,4 \mu M$ para ambas as linhagens. Os principais mecanismos de ação citotóxico da CAS X são a fragmentação do núcleo celular, externalização da fosfatidilserina (um marcador da membrana plasmática celular), ativação do efeito das caspases (proteases relacionadas à morte celular programada) e despolarização mitocondrial (Ferreira et al., 2010). Esses eventos são evidências diretas de morte celular por apoptose. Assim, dentre todas as casearinas identificadas, a CAS X, majoritária em *C. sylvestris*, apresentou os melhores resultados quanto ao potencial efeito antitumoral.

Em relação aos aspectos toxicológicos, são poucos os estudos realizados com os extratos da *C. sylvestris* ou com as casearinas isoladas. Estudos de toxicidade aguda realizados pela administração oral em ratos demonstraram o alto índice terapêutico dos extratos aquoso e hidroalcoólico, devido aos baixos valores de dose efetiva média (DE_{50}) para a ação antiulcerogênica, que foi 32 vezes menor que a dose letal média (DL_{50}) (Silva et al., 1988; Basile et al., 1990). Estudos de toxicidade subcrônica em ratos submetidos ao tratamento de longa duração (30 dias, via oral) demonstraram que não houve alterações macroscópicas no fígado, rins e baço (Basile et al., 1990). Além disso, não houve alteração na histopatologia da medula óssea, no hemograma, nos níveis de glicose, colesterol total, albumina, ureia, ácido úrico e proteínas totais, nem nos parâmetros bioquímicos séricos das aminotransferases (Ameni, 2011). Outros estudos demonstraram que não há riscos de efeito hemolítico (Ferreira et al., 2006), nem genotóxico (Maistro; Carvalho; Mantovani, 2004).

Por outro lado, um estudo realizado em ratos adultos tratados pela via oral com a fração rica em casearinas durante 7 dias demonstrou sinais de toxicidade. As análises histopatológicas apresentaram lesões neuronais na área do hipocampo, caracterizadas por vacuolização nuclear, fragmentação da cromatina nuclear (núcleos picnóticos), hipercromasia, desorganização dos axônios e vacuolização na área do corpo estriado. Curiosamente, esses resultados foram

observados nos animais tratados com as doses menores (2,5 e 5,0 mg/mL) e não nos animais tratados com as doses maiores (10 e 25 mg/mL). A fração rica em casearinas, obtida do extrato etanólico, possui um percentual de casearinas totais de 56,5%, sendo a caseargrevina F e a CAS X os principais constituintes, com teor de 9,9 e 14,2%, respectivamente (Araújo, 2013).

Esse relato reforça a importância da avaliação sistemática dos aspectos toxicológicos da *C. sylvestris* e suas preparações populares para fins medicinais, uma vez que os extratos possuem grande variabilidade qualitativa e quantitativa de constituintes químicos, com diferentes mecanismos de ação farmacológica e/ou toxicológica. Além disso, ainda há necessidade de novas investigações toxicológicas das casearinas isoladas, especialmente da CAS X, para avaliar a influência de suas propriedades farmacocinéticas na segurança e eficácia da sua utilização, justificando uma possível indicação terapêutica.

2. Estudos farmacocinéticos de moléculas bioativas

O desenvolvimento de fármacos a partir de uma nova molécula bioativa se inicia com uma fase de descobrimento, seguida por fases de desenvolvimento pré-clínico e clínico. Na fase de descobrimento, um candidato é selecionado com base na sua capacidade de interação com um alvo molecular, muitas vezes determinado por valores de IC_{50} . As características que afetam seu subsequente desenvolvimento, como solubilidade, estabilidade química e facilidade de obtenção, também são usadas na seleção do candidato. Já na fase de estudos pré-clínicos, o que mais influencia no processo de seleção de um candidato são os resultados dos estudos de biodisponibilidade (estabilidade metabólica e absorção) e de toxicidade (formação de metabólitos reativos, efeitos em órgãos alvo e potencial interação com outros compostos). Esses ensaios focam necessariamente na obtenção do máximo de informações que permitirão, ou não, conduzir o primeiro estudo em humanos (Kerns; Di, 2008).

Atualmente, é bem reconhecido que um candidato a fármaco deve ser selecionado com base em um balanço entre potência, segurança e propriedades farmacocinéticas favoráveis. Tradicionalmente, a farmacocinética de uma nova entidade química é estudada *in vivo* no estágio final de desenvolvimento pré-clínico, quando essas informações são requeridas pelas agências regulatórias para o avanço nas pesquisas clínicas. Na fase inicial, o grande número de animais necessário, associado a pouca disponibilidade do composto, principalmente quando obtido de fonte natural, limita a capacidade de obter dados representativos de uma população.

Assim, por razões éticas e econômicas, a farmacocinética devem ser estudados primeiramente *in vitro* (Lin; Lu, 1997).

Devido à simplicidade e à grande utilidade, o uso de sistemas *in vitro* para avaliação da biodisponibilidade de novos compostos ativos tem expandido muito. Os estudos *in vitro* da cinética de metabolismo e absorção, em conjunto com o avanço das técnicas analíticas que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massas (MS), permitem a obtenção de importantes informações para o planejamento de futuros estudos pré-clínicos *in vivo* e clínicos.

2.1. Estudos de metabolismo *in vitro*

O conhecimento da etapa farmacocinética do metabolismo é um fator crucial no processo de desenvolvimento de novos fármacos. A obtenção destas informações no início da fase de desenvolvimento tem se tornado cada vez mais importante para orientar se a substância candidata deve ser submetida às próximas etapas (Nassar; Talaat, 2004). Por esse motivo, a Organização Mundial de Saúde determinou que estudos de metabolismo fossem adotados nos ensaios pré-clínicos de novos fármacos como um princípio de segurança (WHO, 1996).

Os estudos de metabolismo *in vitro* podem ser utilizados para investigar as vias de metabolismo, determinar os metabólitos que provavelmente serão formados *in vivo*, identificar se o principal metabólito circulante trata-se de um composto farmacologicamente ativo ou tóxico, determinar os parâmetros cinéticos enzimáticos e o *clearance* intrínseco de eliminação, e avaliar os efeitos da inibição e/ou indução enzimática. A grande vantagem de realizar estes estudos *in vitro* é a capacidade de isolar o metabolismo a partir da multiplicidade de outros processos envolvidos na administração de um fármaco (Jia; Liu, 2007). Devido à capacidade de diferenciar o metabolismo de fase I e de fase II, é possível realizar um rastreamento inicial, excluindo vias metabólicas errôneas que levariam à realização de ensaios *in vivo* desnecessários. Dessa forma, os estudos de metabolismo *in vitro* podem auxiliar no planejamento e na interpretação de estudos toxicológicos e clínicos, orientando na elaboração de protocolos de estudo mais lógicos (FDA, 1997).

Outras vantagens de utilizar sistemas *in vitro* para o estudo do metabolismo incluem menor custo financeiro, rapidez na obtenção dos resultados e capacidade de comparar dados obtidos de diferentes espécies de animais com humanos (Jia; Liu, 2007). Apesar de existirem

diferenças no perfil enzimático de animais e humanos, os ensaios pré-clínicos toxicológicos ainda são realizados, obrigatoriamente, em animais (Parasuraman, 2011).

O metabolismo de uma substância pode ocorrer em diversos tecidos, como rins, pele, pulmões e intestino. No entanto, o fígado é considerado o principal órgão envolvido no metabolismo sistêmico (Brandon et al., 2003). Os modelos utilizados para a avaliação do metabolismo *in vitro* hepático incluem enzimas recombinantes (por exemplo, CYP e UDP-glicuronosiltransferases), frações subcelulares (por exemplo, microssomas, fração citosólica e fração S-9) além de cultura de hepatócitos, amostras de tecido hepático e fígado perfundido (Fasinu; Bouic; Rosenkranz, 2012; Asha; Vidyavathi, 2010).

Frações subcelulares (microssomas) são utilizadas há décadas em estudos de metabolismo de xenobióticos. Estas preparações apresentam bom rendimento metabólico, são relativamente estáveis ao longo do tempo e oferecem um bom meio de isolar um grupo de enzimas. Além disso, as frações celulares contêm proteínas auxiliares biologicamente relevantes, incluindo aquelas que podem estar relacionadas com a ligação do substrato. Os microssomas hepático, normalmente separado dos outros constituintes da célula por ultracentrifugação diferencial, consistem principalmente de enzimas associadas com o retículo endoplasmático liso. As principais enzimas microssomais são as do citocromo P450 (CYP 450), as esterases, flavinas mono-oxigenases e glutathione S-transferases. Mesmo havendo uma variedade de rotas metabólicas, é possível avaliar o metabolismo mediado por uma enzima específica pela utilização de inibidores seletivos (Lipscomb; Poet, 2008).

Em conjunto, a identificação das enzimas da via metabólica, a determinação dos parâmetros enzimáticos e a identificação de metabólitos, permitem conhecer o perfil metabólico de uma substância biologicamente ativa e prever a influência desses parâmetros na sua biodisponibilidade. No entanto, além do metabolismo, os parâmetros cinéticos de absorção também influenciam diretamente na biodisponibilidade de uma substância e devem, portanto, ser levados em consideração para o sucesso do efeito terapêutico esperado.

2.2. Estudos de absorção intestinal *in vitro*

A via oral é aceita como a mais conveniente para a administração de fármacos. No entanto, o pré-requisito para que um fármaco administrado por via oral exerça seu efeito terapêutico é que ele seja absorvido pelo trato gastrointestinal. Assim, a quantidade do fármaco

absorvido vai determinar sua biodisponibilidade e a exposição sistêmica do organismo. Por isso, a absorção é um importante passo que pode limitar a ação farmacológica de um composto (Abrahamsson; Lennernas, 2005).

Geralmente, nos estágios iniciais de desenvolvimento, os compostos ainda não são bem caracterizados. A avaliação da absorção intestinal de xenobióticos *in vivo* só pode ser realizada com compostos bem conhecidos, a fim de evitar efeitos prejudiciais aos voluntários. Esses estudos também poderiam ser realizados em animais. Ainda assim, questões éticas e econômicas são fatores limitantes da capacidade desses estudos.

Para uma rápida avaliação da permeabilidade de novos compostos, muitos métodos *in vitro* foram desenvolvidos, com diferentes níveis de complexidade e sofisticação. Esses modelos permitem estudar a permeabilidade de compostos em diferentes órgãos do corpo humano, como a absorção intestinal, a permeabilidade pela barreira hematoencefálica, o transporte e metabolismo hepático e o transporte renal. Entre os modelos *in vitro* para estudo de absorção intestinal estão os baseados em sistemas lipídicos artificiais (PAMPA, *parallel artificial membrane permeability assay*), tecidos de animal (segmentos intestinais de porco e intestino de ratos invertido) e culturas celulares (Caco-2, TC-7, MDCK e 2/4/A1) (Awortwe; Fasinu; Rosenkranz, 2014).

O modelo celular mais frequentemente usado para a determinação da permeabilidade intestinal de novos compostos é a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano Caco-2, que emprega monocamadas dispostas em suportes com filtros semipermeáveis. Essas células se diferenciam espontaneamente em enterócitos com uma permeabilidade paracelular semelhante ao cólon humano. Além disso, muitas proteínas transportadoras normalmente encontradas em enterócitos estão presentes. Uma grande vantagem do uso dessa linhagem celular é que rotas paralelas de transporte, passiva e ativa, podem ser estudadas no mesmo modelo, permitindo a elucidação dos diferentes passos da absorção do composto avaliado (Artursson, 1990).

O modelo de células Caco-2 permite realizar uma avaliação geral da permeabilidade de um composto (Artursson; Palm; Luthman, 2001), incluindo o desenvolvimento de relações estrutura-permeabilidade (Chen et al., 2006) e de correlações *in vitro/in vivo* (Yee, 1997), a identificação de transportadores de influxo e efluxo envolvidos (Tran et al., 2005), o estudo da cinética de transporte (Usansky; Sinko, 2005) e das relações entre transporte e metabolismo (Benet; Cummins; Wu, 2004), além da avaliação de interações entre fármacos (Rautio et al., 2006) e efeitos de formulações (Kapitza et al., 2006).

No entanto, o sistema de monocamadas de células Caco-2 requer sua manutenção por um período de três semanas de cultura sobre os filtros semipermeáveis antes de serem utilizados nos experimentos de permeabilidade. Cuidados são necessários devido à variabilidade nos resultados obtidos entre diferentes laboratórios e entre diferentes partidas de experimentos, dependendo do protocolo adotado, da passagem celular, da seleção dos clones e das condições de cultura (Behrens; Kissel, 2003; Behrens et al., 2004, Giacomini et al., 2010). Ademais, artefatos como adsorção às superfícies do aparato e/ou acúmulo intracelular podem resultar em erros nas estimativas de permeabilidade, levando a baixa recuperação dos compostos e falhas no balanço de massas dos experimentos (Balimane; Chong, 2005).

Portanto, a escolha do sistema in vitro mais adequado para realizar, tanto os estudos de metabolismo, como de absorção, depende de vários fatores, como semelhança in vivo, custo, disponibilidade do modelo, considerações éticas e finalidade da aplicação dos resultados. No caso da CAS X, a obtenção de dados que sejam válidos e que possam ser extrapolados de forma realística é fundamental para o avanço nas pesquisas. Apesar dos resultados promissores das atividades farmacológicas já descritas para a CAS X, sua potente atividade citotóxica in vitro não pode ser extrapolada para uma potente atividade in vivo a menos que possua boa biodisponibilidade e desejável duração do seu efeito. Assim, por ser um produto de origem natural com interessantes propriedades terapêuticas em potencial para o tratamento humano, a CAS X foi selecionada como objeto de estudo deste trabalho, que visa prever sua biodisponibilidade por meio de estudos in vitro de metabolismo e de absorção.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Caracterizar o metabolismo in vitro da CAS X, empregando o modelo microsomal hepático de ratos e de humanos, e a sua absorção intestinal in vitro, empregando o modelo de monocamadas de células Caco-2.

2. Objetivos específicos

2.1. Desenvolver um método analítico para a quantificação da CAS X por HPLC e estabelecer as condições de ensaio para os estudos de metabolismo in vitro em modelo microsomal hepático de ratos e de humanos;

2.2. Validar o método analítico para a quantificação da CAS X em meio microsomal hepático de ratos e de humanos;

2.3. Identificar as isoformas enzimáticas responsáveis pelo metabolismo da CAS X empregando microsomas hepático de ratos e de humanos;

2.4. Caracterizar os parâmetros cinéticos enzimáticos de metabolismo in vitro da CAS X empregando microsomas hepático de ratos e de humanos e prever o *clearance* hepático por extrapolação in vitro-in vivo;

2.5. Propor a estrutura do metabólito da CAS X formado pelo metabolismo in vitro em microsomas de ratos e de humanos;

2.6. Desenvolver e validar um método analítico para a quantificação da CAS X no sistema in vitro de monocamadas de células Caco-2;

2.7. Caracterizar os parâmetros cinéticos in vitro de permeabilidade intestinal da CAS X no modelo de células Caco-2 e prever os mecanismos de absorção envolvidos.

CONCLUSÃO

Após o desenvolvimento de todas as etapas propostas neste trabalho, foi determinada a via metabólica da CAS X, demonstrando que ela é substrato para reações de hidrólise mediada pelas CES microssomais hepática de ratos e de humanos, em detrimento das isoformas do CYP 450. O metabolismo microssomal hepático da CAS X na ausência de inibidores seletivos das CES, indicou que ela é substrato para a isoforma hCE-1. Os estudos de cinética enzimática demonstraram que o Cl_{int} observado com os microssomas hepático humano foi 1,7 vezes maior que o observado com microssomas hepático de ratos, o que é consistente com as diferenças na expressão genética de CES entre as espécies estudadas. A previsão do Cl_H da CAS X obtido por extrapolação *in vitro-in vivo* foi semelhante entre as espécies, e correspondeu a quase todo fluxo sanguíneo hepático, sugerindo que a CAS X é quase completamente eliminada após sua passagem pelo fígado. As análises por LC-ESI-MS-IT e MS-ESI-Q-TOF mostraram que o metabólito da CAS X obtido por reações de metabolismo *in vitro* com microssomas hepático de ratos corresponde a casearina X dialdeído.

Nos estudos de permeabilidade intestinal *in vitro*, a CAS X foi capaz de permear a monocamada de células Caco-2, em condições de inibição das CES ativas, demonstrando ter boa capacidade de absorção intestinal. O mecanismo de absorção ocorre provavelmente via transportadores de influxo, sem a ocorrência de efluxo, mas com alta retenção do composto dentro das células. Além disso, esses estudos reforçaram que a CAS X é substrato para a isoforma hCE-1 e os ensaios de hidrólise com a enzima purificada demonstrou que ela também é substrato para a isoforma hCE-2.

Assim, pelos estudos de metabolismo e de absorção *in vitro* da CAS X, pode-se inferir que a sua biodisponibilidade oral *in vivo* tende a ser comprometida pelo metabolismo de primeira passagem, tanto no intestino, quanto no fígado.

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. 495–531.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para Validação de Métodos Bioanalíticos**. Resolução RDC n.27, de 17 de maio de 2012. [Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregado em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos]. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2013.

ALI, B.; KAUR, S., JAMES, E. C.; PARNAR, S. S. Identification and characterization of hepatic carboxylesterases hydrolyzing hydrocortisone esters. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 1881–1886, 1985.

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 774, n. 2, p. 215–222, 2002.

AMENI, A. Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos Wistar**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ARAÚJO, E. J. F. **Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isoladas das folhas da *Casearia sylvestris* Swartz**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

ARTURSSON, P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Boca Raton, v. 8, n. 4, p. 305–330, 1990.

ARTURSSON, P.; PALM, K.; LUTHMAN, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 46, n. 1–3, p. 27–43, 2001.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs – a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 6, p. 1699–1722, 2010.

AWORTWE, C.; FASINU, P. S.; ROSENKRANZ, B. Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences**, Edmonton, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2014.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal of Pharmaceutical and Toxicological Methods**, New York, v. 44, n. 1, p. 301–312, 2000.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. **Drug discovery today**, Kidlington, v. 10, n. 5, p. 335–343, 2005.

BALIMANE, P. V.; HAN, Y.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, Arlington, v. 8, n. 1, p. E1–E13, 2006.

BARR, J. T.; FLORA, D. R.; IWUCHUKWU, O. F. Practical considerations with experimental design and Interpretation. In: TWEEDIE, D. J.; ARGIKAR, U. A.; NAGAR, S. **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism, Fundamentals and Applications**. 1 ed. Springer Protocols, 2014. p. 419–429.

BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*: Preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 30, n. 2, p. 185–197, 1990.

BENET, L. Z.; CUMMINS, C. L.; WU, C. Y. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 277, n. 1–2, p. 3–9, 2004.

BEHRENS, I.; KISSEL, T. Do cell culture conditions influence the carrier-mediated transport of peptides in Caco-2 cell monolayers? **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 19, n. 5, p. 433 – 442, 2003.

BEHRENS, I.; KAMM, W.; DANTZIG, A. H.; KISSEL, T. Variation of peptide transporter (PepT1 and HPT1) expression in Caco-2 cells as a function of cell origin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 93, n.7, p. 1743–1754, 2004.

BEUTLER, J. A.; McCALL, K. L.; HERBERT, K.; JOHNSON, T.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Cytotoxic clerodane diterpenes esters from *Laetia procera*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 3, p. 233–236, 2000.

BEZERRA, R. M. F.; FRAGA, I.; DIAS, A. A. Utilization of integrated Michaelis-Menten equations for inhibition diagnosis and determination of kinetic constants using Solver supplement of Microsoft Office Excel. **Computer Methods and Program in Biomedicine**, Limerick, v. 109, n. 1, p. 26–31, 2013.

BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Phisiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 127, n. 1, p. 21–30, 2000.

BRANDON, E. F. A.; RAAP, C. D.; MEIJERMAN, I.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M. Review: An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v.189, n. 3, p. 233–246, 2003.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, 1. ed., 1926. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/virtuais.htm>>. Acesso em 19 jan. 2016.

BROEDERS, J. J. W.; EIJKEREN, J. C. H.; BLAAUBOER, B. J.; HERMENS, J. L. M. Transport of chlorpromazine in the Caco-2 cell permeability assay: a kinetic study. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 25, n.7, p. 1442–1451, 2012.

BRZEZINSKI, M. R.; ABRAHAM, T. L.; STONE, C. L.; DEAN, R. A.; BOSRON, W. F. Purification and characterization of human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzylicgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 48, n. 9, p. 1747–1755, 1994.

CARRÃO, D. B. **Estudo de metabolismo in vitro do componente majoritário da própolis verde brasileira, artepelin C, empregando microssomas hepáticos**. Dissertação (Mestrado em Química) –

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: EMBRAPA, 2006. v. 2, p. 627.

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**, Araraquara, v. 30, n. 3, p. 277–284, 2009.

CAVALCANTE, W. L.; CAMPOS, T. O.; DAL PAI-SILVA, M.; 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**, Lausanne, v. 112, n. 3, p. 490–497, 2007.

CHATURVEDI, P. R.; DECKER, C. J.; ODINECS, A. Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 5, n. 4, p. 452–463, 2001.

CHEN, I. J.; TANEJA, R.; YIN, D.; SEO, P. R.; YOUNG D.; MACKERELL, A. D.; POLLI, J. E. Chemical substituent effect on pyridine permeability and mechanistic insight from computational molecular descriptors. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 3, n. 6, p. 745–755, 2006.

CHEN, M.; YU, L. The use of drug metabolism for prediction of intestinal permeability. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 6, n. 1, p. 74–81, 2008.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p. 169–170.

CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Espécies Cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura/IBDF, 1975. p. 514–516.

COX, K. Special requirements for metabolite characterization. In: KORFMACHER, W.A. **Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies**. 1 ed. CRC Press. 2005. p. 229–252.

CROW, J. A., BORAZJANI, A., POTTER, P. M., ROSS, M. K. Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 221, n. 1, p. 1–12, 2007.

DANUELLO, A.; PIVATTO, M. VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CAVALHEIRO, A.; LOPES, N. P. Estudo de fragmentação de diterpenos clerodânicos presentes em espécies de *Casearia*, ionizados por *electrospray*. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 35, 2012, Águas de Lindóia. **Anais Eletrônicos da 35ª Reunião Anual da SBQ**. Resumos. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/35ra/resumos/T0911-1.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2014.

DUAN, J.; XIE, Y.; LUO, H.; LI, G.; WU, T.; ZHANG, T. Transport characteristics of isorhamnetin across intestinal Caco-2 cell monolayers and the effects of transporters on it. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 66, p. 313–320, 2014.

ELKINS, S.; RING, B. J.; GRACE, J.; McROBIE-BELLE, D. J.; WRIGHTON, S. A. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 44, n. 1, p. 313–324, 2000.

EMA – European Medicines Agency. **Guideline on Bioanalytical Method Validation**. 2011. Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2013.

EMOTO, C.; MURAYAMA, N.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; YAMAZAKI, H. 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.

ESPINDOLA, L. S.; VASCONCELOS JÚNIOR, J. R.; MESQUITA, M. L.; MARQUIÉ, P.; PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 11, p. 1093–1095, 2004.

ESTEVES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G.; SANTOS, L. S.; SERTIÈ, J. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n. 1, p. 191–196, 2005.

FANDIÑO, A. S.; TOENNES, S. W.; KAUERT, G. F. Studies on in vivo degradation of anhydroecgonine methyl ester (Methylecgonine) in human plasma. **Journal of Analytical Toxicology**, Oxford, v. 26, p. 567–570, 2002.

FASINU, P.; BOUIC, P. J.; ROSENKRANZ, B. Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies – a review. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 13, n. 2, p. 215–224, 2012.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; HARIPARSAD, N.; SANE, R. S.; STROM, S. C.; DESAI, P. B. In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 20, n. 2, p. 135–153, 2006.

FERREIRA, P. M. P.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, n. 188, v. 3, p. 497–504, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry**: Drug metabolism/drug interaction studies in the drug development process: studies in vitro. Rockville, 1997. Disponível em: < <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/CDER/UCM142439.pdf>>. Acesso em 25 jan. 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry**. Drug interaction studies- study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. Rockville, 2012. Disponível em: < <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

GIACOMINI, K. M.; HUANG, S. M.; TWEEDIE, D. J.; BENET, L. Z.; BROUWER, K. L.; CHU, X.; DAHLIN, A.; EVERS, R.; FISCHER, V.; HILLGREN, K. M. HOFFMASTER, K. A.; ISHIKAWA, T.; KEPPLER, D.; KIM, R. B.; LEE, C. A.; NIEMI, M.; POLLI, J. W.; SUGIYAMA, Y.; SWAAN, P. W.; WARE, J. A.; WRIGHT, S. H.; YEE, S. W.; ZAMEK-GLISZCZYNSKI, M. J.; ZHANG, L. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GONZALVO, M. C.; GIL, F.; HERNÁNDEZ, A. F.; VILLANUEVA, E.; PLA, A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 169–179, 1997.

GUAÇATONGA faz úlcera cicatrizar mais rápido. **Estadão**, São Paulo, 12 jul. 2004. Disponível em: < <http://www.estadao.com.br/noticias/geral,guacatonga-faz-ulcera-cicatrizar-mais-rapido,20040712p1706>>. Acesso em 05 ago. 2013.

GUTMANN, H.; FRICKER, G.; TÖRÖK, M.; MICHAEL, S.; BEGLINGER, C.; DREWE, J. Evidence for different ABC-transporters in Caco-2 cells modulating drug uptake. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 16, n. 3, p. 402–407, 1999.

HAN, M.; LI, J.; TAN, Q.; SUN, Y.; WANG, Y. Limitations of the use of MTT assay for screening in drug discovery. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**, Peking, v. 19, n. 3, p. 195–200, 2010.

HIDALGO, I. J.; RAUB, T. J.; BORCHARDT, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 96, n. 3, p. 736–49, 1989.

HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Graphicars, 1939. p. 196–199.

HOEHNE, F. C.; KUHLMANN, M.; HANDRO, O. **O Jardim Botânico de São Paulo**. São Paulo: Departamento de Botânica do Estado de São Paulo, 1941.

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.

HUANG, L.; BERRY, L.; GANGA, S.; JANOSKY, B.; CHEN, A.; ROBERTS, J.; COLLETTI, A.; LIN, M. H. J. Relationship between passive permeability, efflux, and predictability of clearance from in vitro metabolic intrinsic clearance. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 38, n. 2, p. 223–231, 2010.

IMAI, T.; IMOTO, M.; SAKAMOTO, H.; HASHIMOTO, M. 2005. Identification of esterases expressed in Caco-2 cells and effects of their hydrolyzing activity in predicting human intestinal absorption. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 33, n. 8, p. 1185–1190, 2005.

IMAI, T. Human carboxylesterase isoenzymes: catalytic properties and rational drug design. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Tokyo, v. 21, n. 3, p. 173–185, 2006.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. New antitumor principles from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae), structure elucidation of new clerodane diterpenes by 2D NMR spectroscopy. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 36, n. 12, p. 1585–1588, 1988.

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 and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 38, n. 12, p. 384–3388, 1990.

ITOKAWA, H.; TAKEYA, K.; HITOTSUYANAGI, Y.; MORITA, H. Antitumor compounds isolated from higher plants. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, Tokyo, v. 119, n. 8, p. 529–583, 1999.

IWATSUBO, T.; HIROTA, N.; OOIE, T.; SUZUKI, H.; SHIMADA, N.; CHIBA, K.; ISHIZAKI, T.; GREEN, C. E.; TYSON, C. A.; SUGIYAMA, Y. Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 147–171, 1997.

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.

JUNGES, M. J.; SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O. Flavonóides da *Casearia sylvestris* Sw. (erva de bugre). **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 95–101, 1985.

KANG, H. E.; LEE, M. G. Approaches for predicting human pharmacokinetics using interspecies pharmacokinetic scaling. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 34, n. 11, p. 1779–1788, 2011.

KAPITZA, S. B.; MICHEL, B. R.; VAN HOOGEVEST, P.; LEIGH, M. L. S.; IMANIDIS, G. Absorption of poorly water soluble drugs subject to apical efflux using phospholipids as solubilizers in the Caco-2 cell model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.66, n. 1, p. 146–158, 2006.

KERNS, E.; DI, L. Advantages of good drug-like properties. In: KERNS, E.; DI, L. **Drug-Like Properties: Concepts, Structure, Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization**. 1 ed. Oxford: Elsevier, 2008. cap. 1, p. 6–16.

KING, R. S. Factors affecting metabolism. In: NASSAR, A. F. **Drug Metabolism Handbook – concepts and applications**. 1 ed. John Wiley & Sons, Inc. 2009. p. 17–40.

LAKE, B.G. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotics metabolism. In: Snell, K.; Mullock, B. **Biochemical toxicology – a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1987, cap. 8, p. 183–215.

LAIZURE, C.; HERRING, V.; HU, Z.; WITBRODT, K.; PARKER, R.B. The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? **Pharmacotherapy**, Calisle, v. 33, n. 2, p. 210–222, 2013.

LEE, Y.; LIU, K.; MOON, J.; KO, J.; CHOI, H.; HWANG, K.; KIM, E.; KIM, J. **In vitro metabolism of flucetosulfuron by human liver microsomes**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 62, n. 1, p. 3057–3063, 2014.

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.

LIPSCOMB, J. C.; POET, T. S. *In vitro* measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, n. 118, v. 1, p. 82–103, 2008.

LIU, K. H.; MOON, J. K.; SEO, J. S.; PARK, B. S.; KOO, S. J.; LEE, H. S.; KIM, J. H. Characterization of Pyribenzoxim Metabolizing Enzymes in Rat Liver Microsomes, **Toxicological Research**, London, v. 22, n. 1, p. 1–8, 2006.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, Oxford, n. 18, v. 3, p. 337–342, 2004.

MAJORS, R. Sample preparation. In: SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3 ed. Wiley, 2011. p. 720–752.

MARQUES, L. M. M.; SILVA-JÚNIOR, E. A.; GOUVEIA, D. R.; VESSECHI, R.; PUPO, M. T.; LOPES, N. P.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism of the alkaloid piplartine by rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 95, p. 113–120, 2014.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G. M.; KANTER, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, London, v. 2, n. 6, p. 875–894, 2006.

MATTOS, E. S.; FREDERICO, M. J.; COLLE, T. D.; PIERI, D. V.; PETERS, R. R.; PIOVEZAN, A. P. Evaluation of antinociceptive activity of *Casearia sylvestris* and possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 1, p. 1–6, 2007.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J. ; BORIES, C. ; FOURNET, A. ; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 783–787, 2005.

MESSIANO, G. B.; SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, L. S.; SIMÕES, R. A.; JABOR, V. A. P.; KATO, M. J.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T.; OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism study of the promising anticancer agent the lignin(-)-grandisin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, v. 72, p. 240–244, 2013.

MOREIRA, F. L.; SOUZA, G. H. B.; RODRIGUES, I. V.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, A. R. M. A non-michaelian behaviour of the *in vitro* metabolism of the pentacyclic triperpene alfa and beta amyrins by employing rat liver microsomes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, London, 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**, Tokyo, v. 39, n. 3, p. 693–697, 1991.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, B. M. R.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 627–642, 2000.

NAKAMORI, F.; NARITOMI, Y.; FURUTANI, M.; TAKAMURA, F.; MIURA, H.; MURAI, H.; TERASHITA, S.; TERAMURA, T. Correlation of intrinsic *in vitro* and *in vivo* clearance for drugs metabolized by hepatic UDP-glucuronosyltransferases in rats. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Tokyo, v. 26, n. 5, p. 465–473, 2011.

NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SOUZA, M. A.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 99, n. 1, p. 37–41, 2005.

NASSAR, A. E. F.; TALAAT, R. E. Strategies for dealing with metabolite elucidation in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 317–327, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 4 de. W. H. Freeman, 2004, p. 190–237.

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**, Amsterdam, v. 42, n. 9, p. 1514–1521, 2014.

OBACH, R. S.; BAXTER, J. G.; LISTON, T. E.; SILBER, B. M.; JONES, B. C.; MACINTYRE, F.; RANCE, D. J.; WASTALL, P. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 283, n. 1, p. 46–58, 1997.

OBERLIES, N. H.; BURGESS, J. P.; NAVARRO, H. A.; PINOS, R. E.; FAIRCHILD, C. R.; PETERSON, R. W.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R.; KINGHORN, A. D.; WANI, M. C.; WALL, M. E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, n. 2, p. 95–99, 2002.

OHURA, K.; SAKAMOTO, H.; NINOMYIA, S.; IMAI, T. Development of a new system for estimating human intestinal absorption using Caco-2 cell in the absence of esterase activity. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 38, n. 2, p. 323–331, 2009.

PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 74–79, 2011.

PASSARELI, F. **Preparação e caracterização de casearinas de *Casearia sylvestris* como padrão fitoquímico**. 2010. 286p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado de São Paulo, Araraquara, 2010.

PINDEL, E. V.; KEDISHVILI, N. Y.; ABRAHAM, T. L.; BRZEZINSKI, M. R.; ZHANG, J.; DEAN, R. A.; BOSRON, W. F. Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin. **Journal of Biochemical Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 23, p. 14769–14775, 1997.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68–76, 2001.

RANDALL, K.; CHENG, S. W.; KOTCHEVAR, A. T. Evaluation of surfactants as solubilizing agents in microsomal metabolism reactions with lipophilic substrates. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, Columbia, v. 47, n. 9, p. 631–639, 2011.

RANE, A.; WILKINSON, G. R.; SHAND, D. G. Prediction of hepatic extraction ratio from in vitro measurement of intrinsic clearance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 200, n. 2, p. 420–424, 1977.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D.S.; BORGES, M. H.; LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, Milano, v. 141, n. 6, p. 457–460, 2002.

RAUTIO, J.; HUMPHREYS, J. E.; WEBSTER, L. O.; BALAKRISHNAN, A.; KEOGH, J. P.; KUNTA, J. R.; SERABJIT-SINGH, C. J.; POLLI, J. W. In vitro P-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probes substrates. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 34, n. 5, p. 786–792, 2006.

REDINBO, M. R.; POTTER, P. M. Mammalian carboxylesterases: from drug targets to proteins therapeutics. **Drug Discovery Today**, Kindlington, v. 10, n. 5, p. 313–325, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 771–780, 2004.

ROBBI, M.; BEAUFAY, H. Purification and characterization of various esterases from rat liver. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 137, n. 1–2, p. 293–301, 1983.

ROBBI, M.; BEAUFAY, H. Biosynthesis of rat liver pI-6.1 esterase, a carboxylesterase of the cisternal space of endoplasmatic reticulum. **The Biochemical Journal**, London, v. 248, n. 2, p. 545–550, 1987.

ROCHA, B. A.; ASSIS, M. D.; PETI, A. P. F.; MORAES, L. A. B.; MOREIRA, F. L.; LOPES, N. P.; POSPISIL, S.; GATES, P. J.; OLIVEIRA, A. R. M. *In vitro* metabolism of monensin A: microbial and human liver microsomes models. **Xenobiotica**, London, v. 44, n. 4, p. 326–335, 2014.

ROZET, E.; MARINI, R. D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B. HUBERT, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 848–858, 2011.

RUBAS, W.; CROMWELL, M.; SHAHROKH, Z. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 85, n. 2, p. 165–169, 1996.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p. 203–205, 1991.

SANTOS, A. G.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1100–1103, 2007.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico**. 2008. 361p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado de São Paulo, Araraquara, 2008.

SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M. P.; JÚNIOR, G. M. V.; PEREZ, C. C.; TININIS, A. G.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry and Biodiversity**, Zürich, v. 7, n. 1, p. 205–215, 2010.

SATOH, T.; HOSOKAWA, M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 38, p. 257–288, 2001.

SCHOENFELDER, T.; PICH, C. T.; GEREMIAS, R.; AVILA, S.; DAMINELLI, E. N.; PEDROSA, R. C.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casearia sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, Milano, v. 79, n. 6, p. 465–467, 2008.

SEGEL, I. H. Kinetics of unireactant enzymes. In: **Enzyme Kinetics – Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**. 1 ed. John Wiley & Sons, Inc. 1975. p. 18–99.

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. p. 9–22.

SERTIÈ, J. A.; CARVALHO, J. C.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 38, n. 2, p. 112–119, 2000.

SILVA, F. A.; BAISCH, A. L. M.; OLIVEIRA, B.; BATTASTINI, A. M.; TORRES, F.; RACOSKI, G.; SILVA, E. S.; ALAM, M. F.; APOLINARIO, J. C. G.; LAPA, A. J. Estudos farmacológicos preliminares dos extratos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 18, n. 1, p. 219–229, 1988.

SKOLNIK, S.; LIN, X.; WANG, J.; CHEN, X. H.; HE, T.; ZHANG, B. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Easton, v. 99, n. 7, p. 3246–3265, 2010.

SUN, H.; CHOW, E. C.; LIU, S.; DU, Y.; PANG, K. S. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, London, v. 4, n. 4, p. 395–411, 2008.

TANG, J.; CHAMBERS, J. E. Detoxication of paraoxon by rat liver homogenate and serum carboxylesterases and A-esterases. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 13, n. 5, p. 261–268, 1999.

TAKETANI, M.; SHII, M.; OHURA, K.; NINOMIYA, S.; IMAI, T. Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. **Life Sciences**, Oxford, v. 81, n. 11, p. 924–932, 2007.

TININIS, A. G. **Desenvolvimento, otimização, validação e utilização de métodos de extração de casearinas em *Casearia sylvetris* Sw.** 2006. 182 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade do Estado de São Paulo, Araraquara, 2006

TIWARI, G; TIWARI, R. Bioanalytical method validation: an update review. **Pharmaceutical Methods**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 25–38, 2010.

TRACY, T. S. Enzyme Kinetics. In: **Metabolism in Drug Design and Development**. 1 ed. John Wiley & Sons, Inc. 2008. p.89–112.

TRAN, T. T.; MITTAL, A.; ALDINGER, T.; POLLI, J. W.; AYRTON, A.; ELLENS, H.; BENTZ, J. The elementary mass action rate constants of P-gp transport for a confluent monolayer of MDCKII-hMDR1 cells. **Biophysical Journal**, Cambridge, v. 88, n. 1, p. 715–738, 2005.

USANSKY, H. H.; SINKO, P. J. Estimating human drug oral absorption kinetics from Caco-2 permeability using an absorption-disposition model: model development and evaluation and derivation of analytical solutions for K_a and F_a . **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.314, n. 1, p. 391–399, 2005.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; DUTRA, L. A.; FERREIRA, P. M. P; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. DO Ó.; TORRES, R. B.; BORALLE, N.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Cytotoxic Clerodane Diterpenes from *Casearia rupestris*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, n. 4, p. 776–781, 2011.

WEIL, X. L.; HAN, R.; HU, X.; QUAN, L. H.; LIU, C. Y.; CHANG, Q.; LIAO, Y. H. Stabilization of zeylenone in rat plasma by the presence of esterases inhibitors and its LC-MS/MS assay for pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, London, v. 27, n. 5, p. 636–540, 2013.

WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; MILLER, S. J.; BIRKINSHAW, C.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSIFIERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic clerodane

diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the Rainforest of Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 206–209, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Technical Report Series**, n 341, Principles for pre-clinical testing of drug safety. Geneva, 1996.

WU, H.; GUO, J.; CHEN, S.; LIU, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; XU, X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.72, p.267–291, 2013.

XIA, L.; GUO, Q.; TU, P.; CHAI, X. The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 99–135, 2014.

YANG, Y.; ALOYSIUS, H.; INOYAMA, D.; CHEN, Y.; HU, L. Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. Oxford, v. 1, n. 3, p. 143–159, 2011.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption of man-made or myth. **Pharmaceutical Research**, Stuttgart, v. 14, n.16, p. 763–766, 1997.

ZHANG, C., XU, Y., ZHONG, Q., LI, X., GAO, P., FENG, C.; CHU, Q.; CHEN, Y.; LIU, D. 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, H.; DAVIS, C. D.; SINZ, M. W.; RODRIGUES, A. D. Cytochrome P450 reaction-phenotyping: an industrial perspective. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, London, v. 3, n. 5, p. 667–587, 2007.

ZHANG, J.; BURNELL, J. C.; DUMAUAL, N.; BOSRON, W. F. Binding and hydrolysis of meperidine by human liver carboxylesterase hCE-1. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 290, n. 1, p. 314–318, 1999.

ZHANG, Z.; KAMINSKY, L. S. Determination of metabolic rates and enzyme kinetics. In: ZHANG, D.; ZHU, M.; HUMPHREYS, W. G. **Drug Metabolism in Drug Design and Development**. 1 ed. Wiley. 2008. p. 413–446.