

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo*

Ivanildes Vasconcelos Rodrigues

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e validação de um método bioanalítico para avaliação farmacocinética de uma mistura binária de triterpenos pentacíclicos e de seus metabólitos *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia
Orientado (a): Ivanildes Vasconcelos Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 11/08/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2014

RESUMO

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. 122f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A mistura triterpênica α e β -amirinas é comumente encontrada em quantidades significativas em espécies do gênero *Protium* (Burseraceae) e possuem reconhecidas atividades anti-inflamatória, hepatoprotetora, gastroprotetora e analgésica, dentre outras. Entretanto, pouco se sabe sobre sua farmacocinética e metabolismo. Neste sentido, esta tese teve o objetivo de desenvolver metodologias bioanalíticas para determinar a farmacocinética e a eliminação de α e β -amirinas isoladas de *P. spruceanum* bem como avaliar o metabolismo *in vitro* destes triterpenos. A mistura de α e β -amirinas foi isolada em grau de pureza cromatográfica acima de 99%. Foi desenvolvida e caracterizada uma nanoemulsão do tipo O/A contendo α e β -amirinas a fim de viabilizar a administração por vias oral e endovenosa e realizar os estudos de disposição cinética dessas substâncias em camundongos. O tamanho médio das partículas da nanoemulsão foi de $103,5 \pm 0,44$ nm, com porcentagem de encapsulação de acima de 99%. Os estudos de liberação *in vitro* mostraram baixa taxa de liberação após 24 horas. A avaliação da disposição cinética de α e β -amirinas em camundongos mostrou que após administração oral a suspensão de CMC não foi absorvida, entretanto a nanoemulsão contendo as substâncias foi absorvida e a biodisponibilidade oral de α e β -amirinas foi de $1,03 \pm 0,08$ e $1,56 \pm 0,24\%$, respectivamente. O V_d foi elevado e a $T_{1/2}$ foi de $2,61 \pm 0,15$ e $2,57 \pm 0,07$ horas, respectivamente. O Cl_B mostrou-se elevado, comparado ao Cl_R . Após administração oral da nanoemulsão, praticamente toda a mistura foi eliminada inalterada nas fezes devido a baixa absorção. Entretanto, após administração endovenosa cerca de 50% da mistura foi eliminada inalterada pela via biliar. Estudos de eliminação renal de α e β -amirinas mostraram que apenas cerca de 0,2% das substâncias foram eliminadas por via renal após administração endovenosa. O fenômeno Flip-Flop ocorreu para a via extravascular utilizada. Os resultados da eliminação parcial e de baixa liberação *in vitro* sugerem que após administração endovenosa da nanoemulsão pode ocorrer acúmulo extravascular dos compostos, corroborando com altos V_d . As reações biomiméticas de oxidação de α e β -amirinas mostraram baixa taxa de degradação. Apenas um metabólito putativo foi encontrado, entretanto, não foi possível observá-lo nas matrizes biológicas analisadas.

Palavras-chave: produtos naturais; triterpenos; α , β -amirinas; validação bioanalítica; farmacocinética; nanoemulsões; eliminação biliar

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

Nesta tese são apresentados os resultados obtidos durante desenvolvimento do projeto de doutorado intitulado “Desenvolvimento e Validação de um Método Bioanalítico para Avaliação Farmacocinética de uma Mistura Binária de Triterpenos Pentacíclicos e de seus Metabólitos *in vivo*” desenvolvido no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob orientação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Ela está dividido em capítulos segundo a cronologia dos experimentos realizados.

Neste primeiro capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica geral sobre o material vegetal utilizado e sobre o estado da arte da farmacocinética e do metabolismo *in vivo* e *in vitro* de terpenos.

No segundo capítulo serão apresentados os objetivos desta tese. No terceiro capítulo, intitulado “Isolamento e Identificação da Mistura Binária de Alfa e Beta Amirinas” serão descritos metodologia e resultados obtidos para o isolamento dos terpenos foco desta tese. No quarto capítulo serão apresentado o desenvolvimento e a caracterização da formulação que foi utilizada nos ensaios *in vivo*. No quinto capítulo serão descritos o desenvolvimento e a validação de métodos para quantificação de α e β -amirinas nas matrizes biológicas fezes, plasma e urina. Em seguida será relatada a etapa de reações biomiméticas preliminares de oxidação utilizando metaloporfirinas. No sétimo capítulo, serão apresentados os resultados de disposição cinética e eliminação de α e β -amirinas em camundongos.

Para finalizar, serão apresentadas as conclusões deste trabalho, seguida das Referências Bibliográficas e dos Anexos.

1.2 *Protium spruceanum*

A espécie *Protium spruceanum* Benth. Engler (Fig. 1), pertencente à família Burseraceae (tribo Protieae) é encontrada em florestas tropicais úmidas como a Atlântica e Amazônica principalmente no interior de matas ciliares ou em solos encharcados. É uma espécie arbórea semidecídua conhecida popularmente como almécega de casca lisa ou breu. Sua floração ocorre entre os meses de setembro e outubro e a frutificação inicia-se geralmente em setembro. As flores são dispostas

em inflorescências unissexuadas do tipo panículos ramosas axilares e os frutos são compostos por baga subglobosa de superfície lisa e brilhante, de cor vermelha contendo até 2 sementes envoltas por um arilo fino e adocicado que é apreciado pela avifauna (LOBO-FARIA, 1998; VIEIRA, 2005).



Figura 1. Exemplar de *Protium spruceanum* Benth. Engler. À esquerda folhas e frutos; à direita árvore. (Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza)

Existem poucos relatos na literatura sobre a espécie. A maioria deles relata relações de ecologia com o ecossistema nas regiões de Itumirim-MG (LOSCHI *et al.*, 2013), de Lavras-MG (VIEIRA, DE CARVALHO, 2008) na Mata Atlântica (VIERA *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2009) e no Sudeste brasileiro (VAN-DER-BERG, *et al.*, 2012).

Com relação aos estudos fitoquímicos e farmacológicos da espécie, apenas foram realizados três estudos. O componente majoritário dos óleos essenciais de folhas, ramos, casca, frutos e resina de *P. spruceanum* foram sabineno em folhas, ramos e cascas, embora limoneno tenha sido encontrado em maior quantidade nos frutos (ZOGHBI *et al.*, 2002). Estudos de variação sazonal de óleos essenciais de diferentes partes da planta evidenciaram variações sazonais de composição e rendimento de óleo essencial ao decorrer do período analisado (MACHADO *et al.*, 2003). Recentemente foi relatada atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em camundongos de extrato bruto e frações hexânica e metanólica de *P. spruceanum* em doses acima de 200 mg/kg. As atividades do extrato e da fração hexânica foram atribuídas à mistura triterpênica α e β -amirinas. Também foi relatada baixa toxicidade aguda para o extrato em doses até 6g/kg (RODRIGUES *et al.*, 2013).

1.3 O Estado da Arte da Farmacocinética e Metabolismo de Terpenos

Os terpenos são compostos pertencentes a uma importante classe de metabólitos secundários produzidos principalmente por plantas e são bastante importantes e comumente encontrados. Podem ser formados por duas vias biossintéticas, a saber, a via clássica do Mevalonato ou a via da DOXP/MEP ou Rohmer (SCHMIDT *et al.* 2012, GONZALÉZ-BURGOS & GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012). Ambas as vias conduzem a união de unidades de isoprênicas (C5) para construção das subclasses terpênicas (SCHMIDT *et al.* 2012).

Este grupo de Produtos Naturais possuem mais de 40 mil compostos e várias atividades biológicas tem sido relatadas para esta classe como antineoplásica, antimicrobiana, antifúngica, antiparasitária, antiviral, antialérgica, antiespasmódica, hipolipêmica, anti-inflamatória, imunomoduladora dentre outra (TROPPI & BISHAYEE, 2011).

Baseado no número de unidades isoprênicas que os compõem, os terpenos podem ser divididos em hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos > (C45). (GONZALÉZ-BURGOS & GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Na Figura 2 estão representados o somatório do número de artigos encontrados realizando uma pesquisa na literatura através do site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> com os termos “pharmacokinetic”, “*in vitro* metabolism” e “*in vivo* metabolism”.

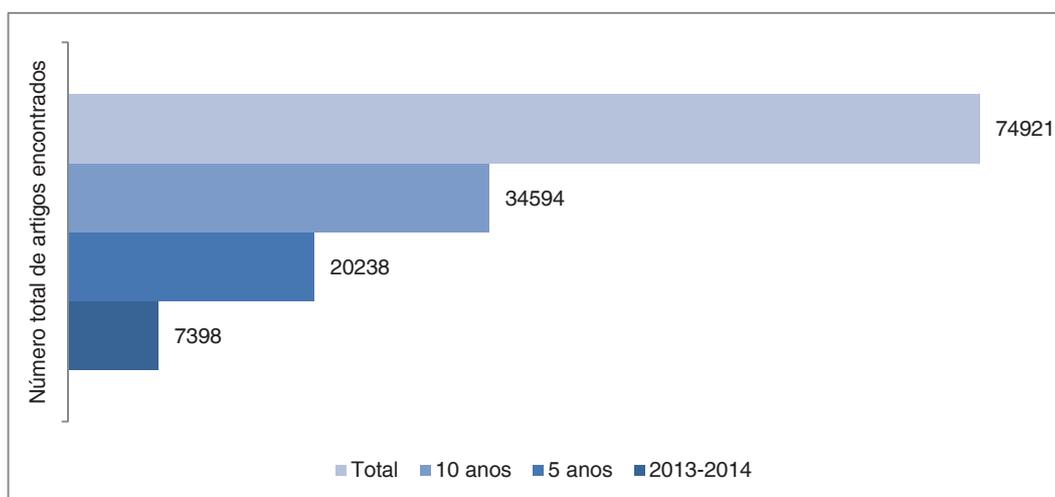


Figura 2: Somatório do número de artigos no período de 10, 5 anos e de 2013 a 2014 para os termos “pharmacokinetic”, “*in vivo* metabolism” e “*in vitro* metabolism”. Data da pesquisa: 26 de junho de 2014.

Já na Figura 3 estão representados os resultados de busca utilizando como termos [“subclasse” AND “pharmacokinetic”] ou [“subclasse” AND “*in vitro* metabolism”] ou [“subclasse” AND “*in vivo* metabolism”] e algumas variações.

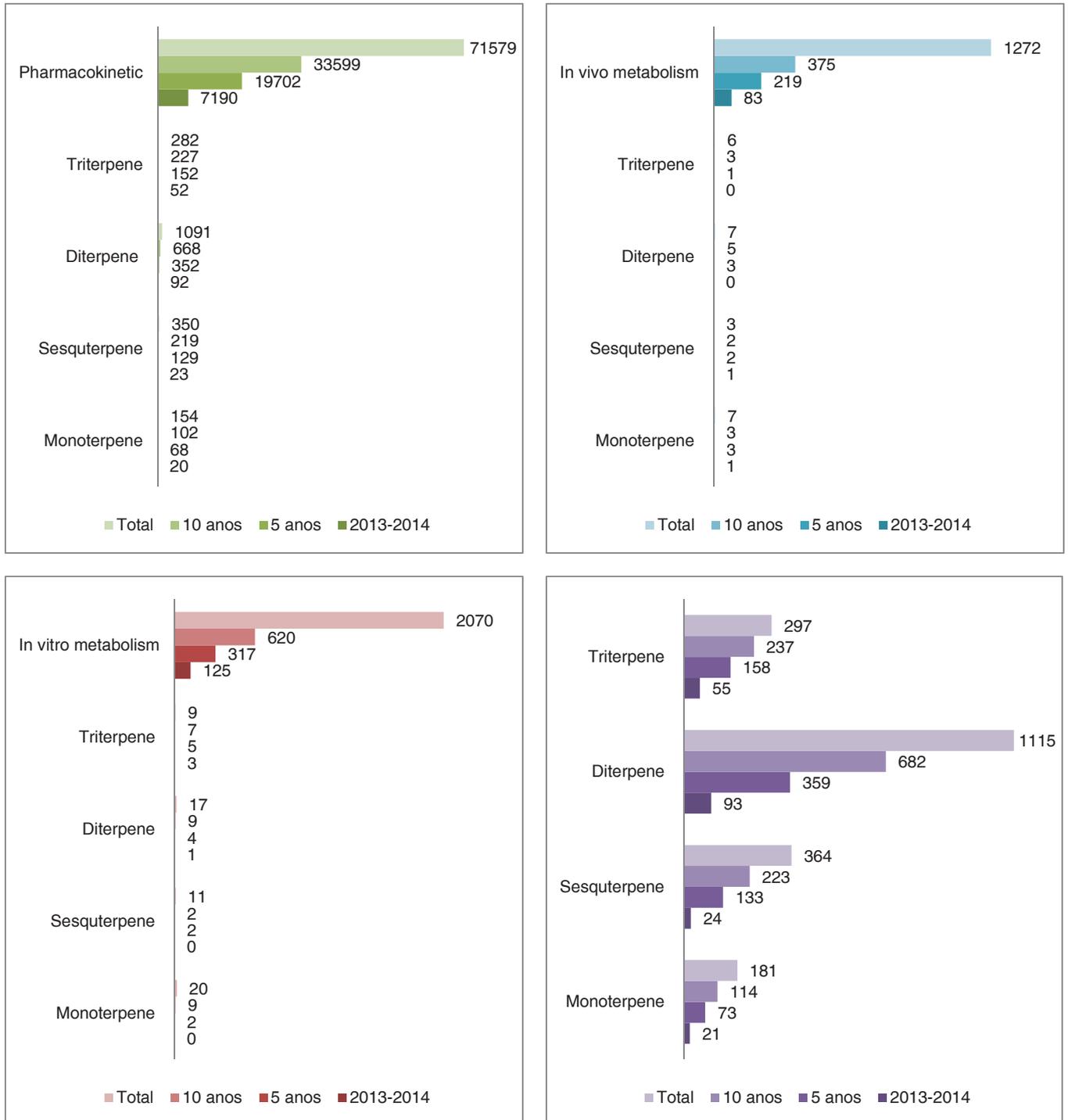


Figura 3: Resultados de número de artigos encontrados para pesquisa no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> para a cada subclasse dos terpenos. Número total de artigos e no período de 10, 5 anos e de 2013 a 2014. A - [“subclasse” AND “pharmacokinetic”]; B - [“subclasse” AND “*in vivo* metabolism”]; C - [“subclasse” AND “*in vitro* metabolism”]; D - Somatório dos artigos encontrados. Data da pesquisa: 26 de junho de 2014.

Os diterpenos são a subclasse com maior número de estudos relacionados ao seu metabolismo e farmacocinética (Fig 3-D). Apesar de não ser a maior subclasse ela é amplamente estudada especialmente pelo seu interesse farmacológico e pela disponibilização de alguns desses compostos já na terapia clínica (MIN, 2011).

Entretanto, como pode ser visualizado na Figura abaixo, menos de 3% dos estudos de farmacocinética, metabolismo *in vitro* ou *in vivo* estão relacionados a terpenos embora os produtos naturais tenham sido considerados a principal fonte de substâncias ativas na terapêutica nos últimos 30 anos uma vez que mais de 50% dos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration se relacionam com Produtos Naturais e caso sejam considerados os biológicos esse percentual passa de 65% (NEWMAN, CRAGG; 2012)

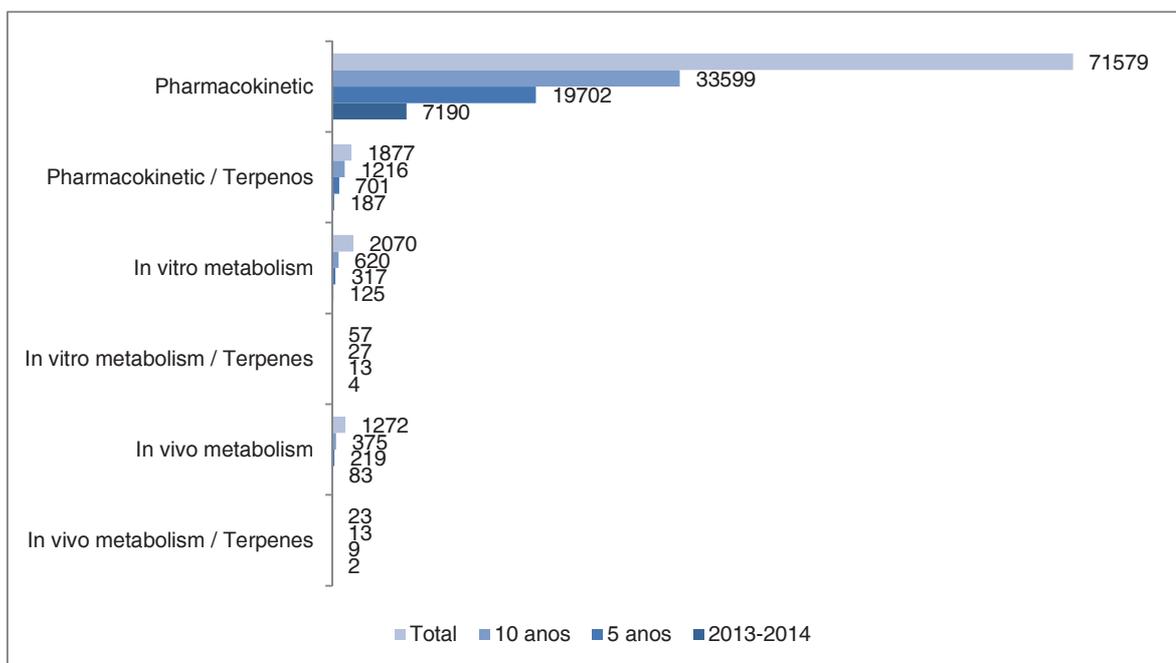


Figura 4: Resultados do somatório do número de artigos encontrados para pesquisa no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> da classe dos terpenos. Número total de artigos e no período de 10, 5 anos e de 2013 a 2014. Comparação entre os termos ["pharmacokinetic"] vs ["terpenes" AND "pharmacokinetic"]; ["*in vivo* metabolism"] vs ["terpenes" AND "*in vivo* metabolism"] e ["*in vitro* metabolismo"] vs ["terpenes" AND "*in vitro* metabolismo"]. Data da pesquisa: 26 de junho de 2014.

1.3.1 Monoterpenos

Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e possuem várias atividades biológicas como antimicrobiana, sedativa, antitumoral, citotóxica, anti-inflamatória dentre outras. Eles são comumente usados na produção

de medicamentos e cosméticos e perfumes devido ao seu odor agradável (ZHANG *et al.* [201-]).

Considerando a farmacocinética de monoterpenos, recentemente métodos foram desenvolvidos para quantificar borneol (1), isoborneol (2), canfora (3) em ratos (CHENG *et al.*, 2013) entretanto não foram realizados estudos farmacocinéticos detalhados dos compostos. Também existem relatos que condições patológicas aumentam o transporte de borneol pela barreira hematoencefálica (XU *et al.*, 2013) e que a presença deste composto aumenta a biodisponibilidade ocular de geniposídeo (4) (SONG *et al.*, 2013). Outros estudos revelam que alterações patológicas também alteram os parâmetros farmacocinéticos após administração oral de paeoniflorina (5) (SUE *et al.*, 2013). Ervas contendo mentol (6) nas mesmas concentrações apresentaram o mesmo perfil farmacocinético, entretanto, em concentrações diferentes há diferença significativas nos parâmetros farmacocinéticos sugerindo cinética não linear (YANG *et al.*, 2013).

Os mais recentes relatos de metabolismo *in vivo* de monoterpenos referem-se a metabolismo de Δ^3 -careno (7) que mostram metabólitos *in vivo* de oxidações de carbonos alílicos (SCHMIDT *et al.*, 2014) e de verprosídeo (8) relatando principalmente produtos de hidrólise e glucuronidação (KIM *et al.*, 2012).

Os últimos estudos publicados sobre metabolismo *in vitro* de monoterpenos relatam hidroxilações nas posições C6 ou C10 pelas isoformas CYP2A6 e CYP2B6 de (+)-fenchona (9) (MIYAZAWA, GYOUBU; 2006) e de (-)-fenchona (10) (MIYAZAWA, GYOUBU; 2007a) além da metabolização de (+)-fenchol (11) pelas isoformas CYP2A6 e CYP2B (MIYAZAWA, GYOUBU; 2007b). CYP2A6 mostrou-se a principal isoforma responsável pela hidroxilação de (-)-cânfora na posição C5 (GYOUBU, MIYAZAWA; 2007) assim como na hidroxilação de (+) e (-)-mentol (MIYAZAWA *et al.*, 2011).

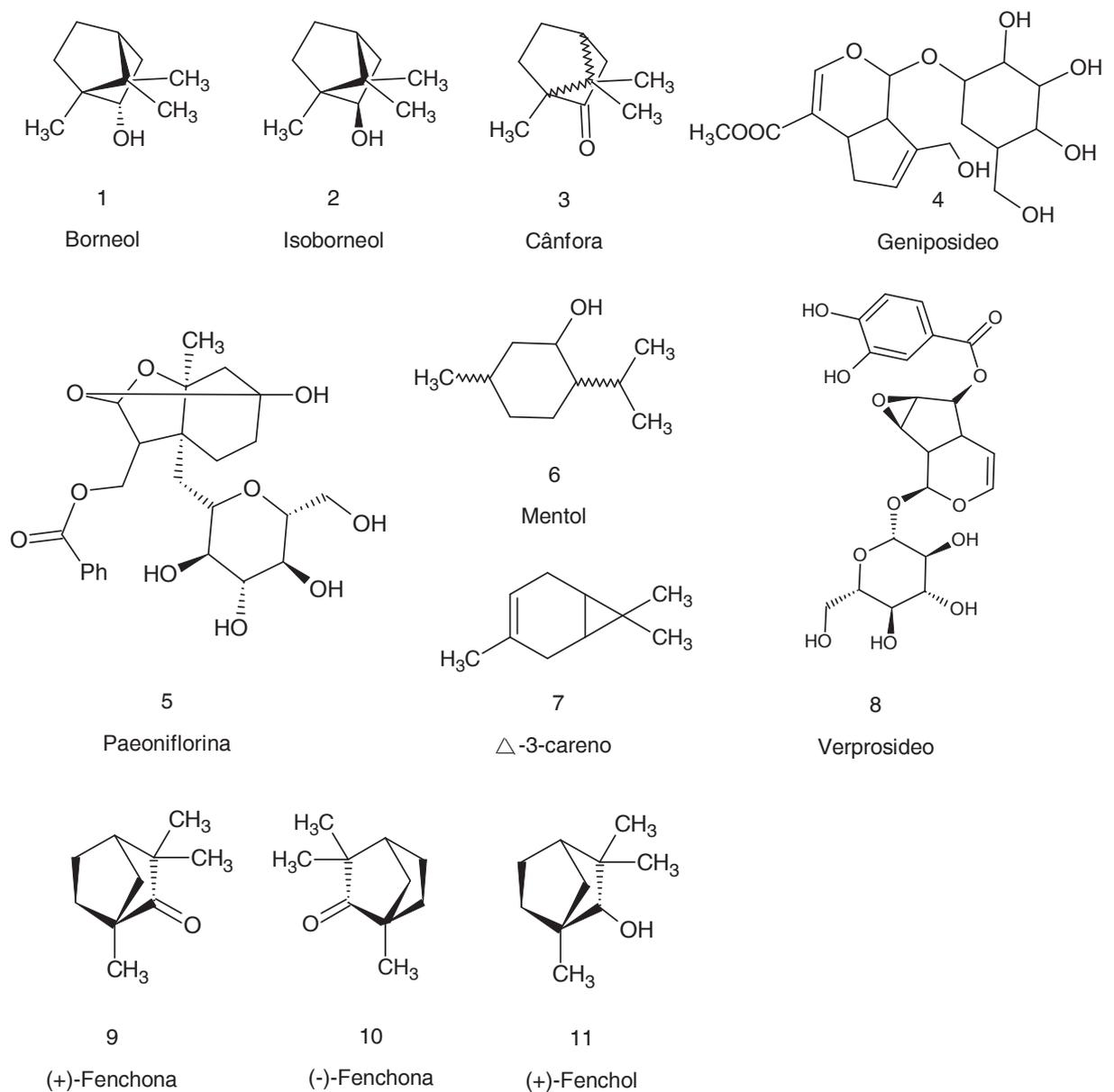


Figura 5: Estruturas químicas de alguns monoterpenos

1.3.2 Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos compõem a menor subclasse dos terpenos e possuem menos de mil compostos conhecidos. Possuem atividades como anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e podem ser encontrados em plantas superiores, fungos, insetos e esponjas. Esses compostos também possuem importante função ecológica de interação planta (HOG *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2011).

As duas classes de sesquiterpenos mais estudados com relação a farmacocinética e metabolismo são a toxina T-2 (12) e os derivados de artemisinina (13), este último especialmente pela utilização contra malária desde 1985 (LESKOVAC, THEOHARIDES; 1991).

Os parâmetros farmacocinéticos em grávidas de artemeter (14) e dihidroartemisinina (15) foram numericamente menores, comparados aos de pacientes não grávidas, entretanto, não houve diferença significativa entre a idade gestacional e estes parâmetros para dihidroartemisinina e artemeter (TARNING *et al.*, 2013). Recentemente dois artigos foram publicados com desenvolvimento de métodos para quantificação de lactonas sesquiterpênicas e aplicação em farmacocinética. Os resultados obtidos para xantatina (16) mostraram meia vida e eliminação curta sem diferenças significativas quando diferentes doses foram utilizadas demonstrando uma cinética de correlação linear por via endovenosa (YAN *et al.*, 2014).

Guo e colaboradores (2014) relataram a quantificação simultânea de isoalantolactona (17) e alantolactona (18) em ratos após administração pela via endovenosa evidenciando que as substâncias são distribuídas e eliminadas rapidamente e possuem meia vida de eliminação curta (GUO *et al.*, 2014).

Com relação a metabolismo de sesquiterpenos, recentemente Wu e colaboradores relataram que a hidroxilação de T-2 está relacionada à atividade de CYP3A29 e a hidrólise à carboxilesterases (WU *et al.*, 2011). A metabolização *in vitro* de artemisinina está relacionada a atividade de CYP2B6 (ASIMUS, ASHTON, 2009).

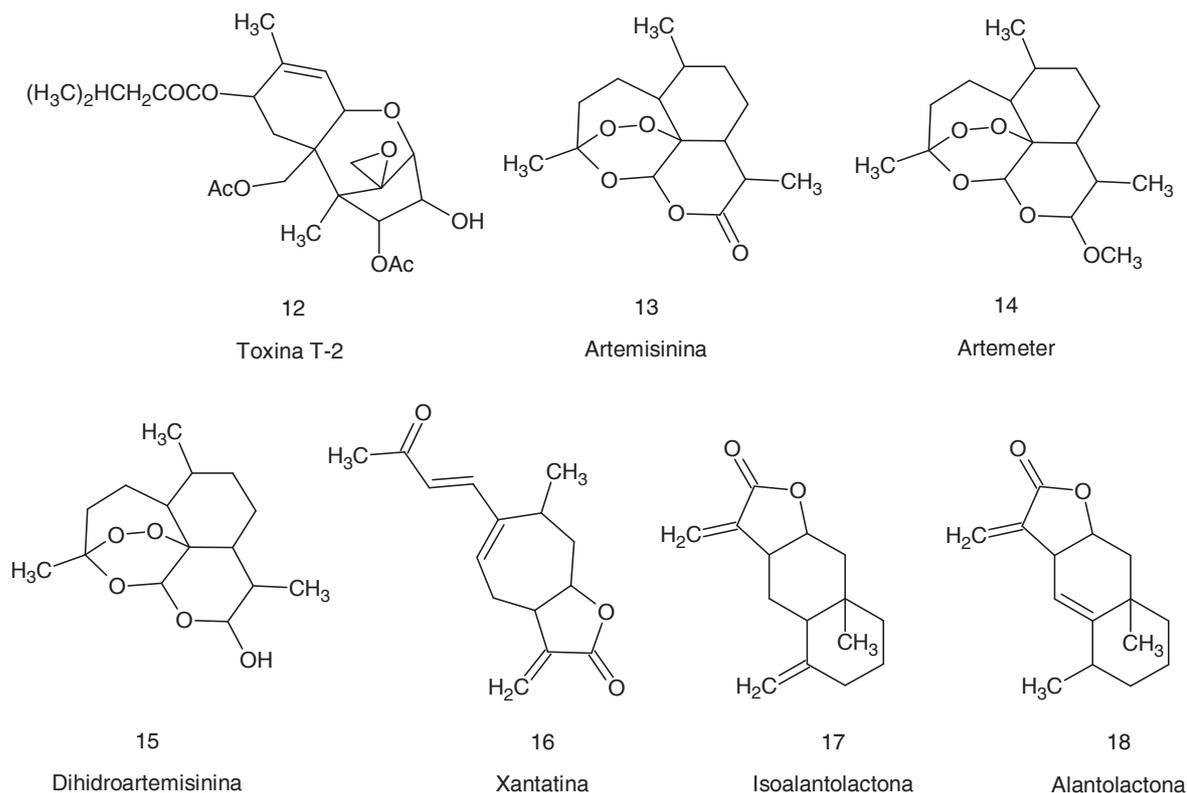


Figura 6. Estruturas químicas de alguns sesquiterpenos

1.3.3 Diterpenos

Os Diterpenos compreendem mais de 12 mil compostos (PETERS, 2010) e são amplamente distribuídos, principalmente nos gêneros *Rhododentron* e *Taxus*, entretanto podem ser encontrados nas famílias Labiatae, Verbenaceae, Celastraceae, Euphorbiaceae e Thymelaeaceae (MIN, 2011). A principal atividade biológica dos diterpenos são antineoplásica contra câncer de ovário, mama e pulmão além das atividades anti-inflamatória e antimicrobiana (GHOSH *et al.*, 2013; MIN, 2011; YANG *et al.*, 2012). Taxol e seus derivados são os mais estudados diterpenos e tem sido amplamente prescritos como medicamentos no tratamento de câncer (MIN, 2011).

A farmacocinética de diterpenos, principalmente Taxol® e derivados, tem sido amplamente estudada, especialmente pela aplicação clínica no tratamento de neoplasias. Os estudos mais recentes sobre docetaxel (19), paclitaxel (20) e derivados relacionam-se com o interesse em alternativas farmacotécnicas para melhorar os parâmetros farmacocinéticos dessas substâncias (MA *et al.*, 2013; ATTILI-QADRI *et al.*, 2013; SAREMI *et al.*, 2013; WANG *et al.* 2013; CHO *et al.*,

2014). A biodisponibilidade de docetaxel em ratos sofreu uma considerável melhora quando o ativo foi veiculado em microemulsão (MA *et al.*, 2013) e quando veiculado em nanocápsulas a biodisponibilidade em minipigs da substância encapsulada aumentou 10 vezes, comparado à substância livre (ATTILI-QADRI *et al.*, 2013). Já nanopartículas preparadas com quitosana contendo docetaxel promoveram aumento em mais de 60% da biodisponibilidade deste diterpeno em ratos (SAREMI *et al.*, 2013). Outra estratégia farmacotécnica para melhorar os parâmetros farmacocinéticos de terpenos foi veicular paclitaxel em lipossomas o que melhorou a biodistribuição deste fármaco em vários órgãos, especialmente no fígado e baço (WANG *et al.* 2013). Estudos comparativos de parâmetros farmacocinéticos de docetaxel e derivados mostraram que não houve diferenças entre os parâmetros calculados para as substâncias testadas em humanos com câncer (CHO *et al.*, 2014).

Existem poucos relatos sobre metabolização de taxol e derivados. Sabe-se que as isoformas CYP3A e CYP2B são responsáveis pela formação de metabólitos hidroxilados desses compostos (KOMOROSKI *et al.*, 2005; GUT *et al.*, 2006)

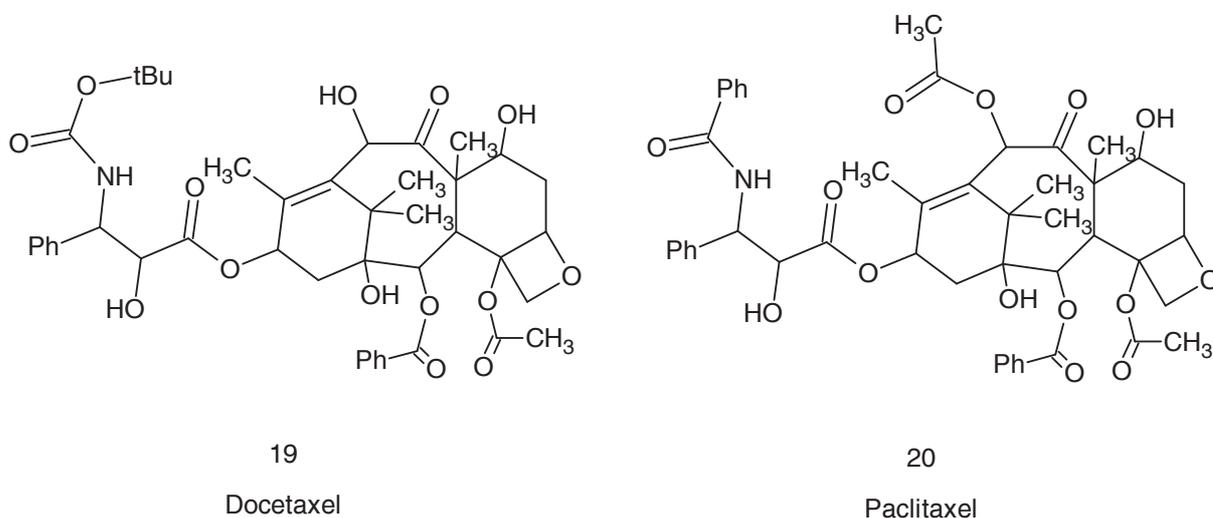


Figura 7: Estruturas químicas de dois diterpenos importantes e amplamente estudados

1.3.4 Triterpenos

Os triterpenos compreendem um grande grupo da classe dos terpenos com diversas atividades biológicas como anti-inflamatória, antinociceptiva, hepatoprotetora, antialérgica, gastroprotetora, antimicótica, antimicrobiana, antiviral,

imunomodulatória dentre outros (DZUBAK *et al.*, 2006, RHOURLI-FRIH *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2013, MUFFER *et al.*, 2011). Esta subclasse possui aproximadamente 20 mil compostos identificados e são sintetizados a partir da ciclização do esqualeno (SHENG & SUN, 2011; DZUBAK *et al.*, 2006). Os triterpenos podem ser encontrados na forma livre ou ligados a porções glicosídicas formando Saponinas Triterpênicas (SCHMIDT *et al.*, 2012). As Saponinas também possuem atividades biológicas como antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e anti-leishmanicida, dentre outras (LAMBERT *et al.*, 2011).

Existem vários relatos sobre farmacocinética de triterpenos. Entretanto, a grande maioria deles relata a análise de compostos após administração de extratos de plantas como no caso da administração de licorina e determinação simultânea das saponinas uralsaponina C (21) e F (22), 22 β -acetoxil-glicirrizina (23), 24-hidroxicorina E2 (24), licorinas G2 (25), E2 (26) e J2 (28) e glicirrizina (27) em plasma de cachorros (TAO *et al.*, 2013).

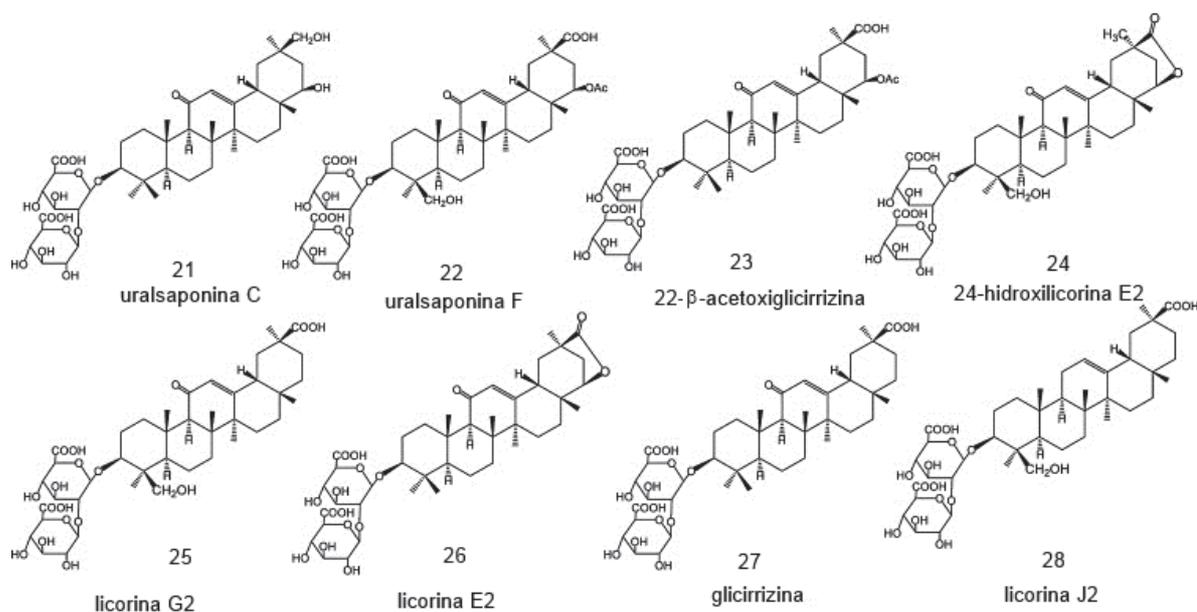


Figura 8: Saponinas triterpênicas relacionadas por Tao e colaboradores. Fonte: TAO *et al.*, 2013

Os parâmetros farmacocinéticos do triterpeno cicloastragenol (29) juntamente com outros 5 compostos não triterpênicos foram calculados após administração oral de 3 doses de *Yu Ping Feng San*, planta comumente utilizada na medicina chinesa (LI *et al.*, 2013). Outra saponina quantificada em plasma de ratos foi gimnemagenina (30) após administração de 400 mg/kg de extrato de *Gymnema sylvestre* por via oral. Esta substância provavelmente está presente no plasma devido à hidrólise de

ácidos gimnêmicos após metabolismo de primeira passagem (KAMBLE *et al.*, 2013). Entretanto a farmacocinética destes compostos não foi amplamente discutida pelos autores.

Após administração oral de 5 mg/kg via intraperitoneal, a saponina cucumariosideo A₂-2 (31) foi rapidamente absorvida e detectada no baço de camundongos sem sofrer transformações metabólicas após 24 horas da injeção via intraperitoneal (PILSLYAGIN *et al.*, 2013).

Em estudos de detecção simultânea dos epímeros 25-metoxidamarano-3 β ,12 β ,20-triol (32) em plasma de ratos após administração endovenosa não foi possível verificar diferenças entre ASC, MRT e T_{1/2} dos dois epímeros, entretanto houve diferenças entre o Cl para os dois isômeros (SHI *et al.*, 2013).

Os estudos de farmacocinética de 20(S)-protopanaxadiol (33) mostraram que a utilização de nanopartículas líquidas cristalinas autoemulsionadas (JIN *et al.*, 2013) ou de nanoestruturas cristalinas líquidas (JIN *et al.*, 2013b) contendo o composto aumentaram em mais de 150% a biodisponibilidade relativa comparada à da substância livre.

Poucos estudos de metabolismo de triterpenos foram realizados. Estudos de metabolismo *in vitro* de ácidos α e β -boswelicos (34) mostraram que esses ácidos foram intensivamente metabolizados por microssomas hepáticos de ratos e de humanos entretanto, ácidos ceto- e acetilboswelicos não foram metabolizados (GERBETH *et al.*, 2013). A mistura binária de α e β -amirinas (35 e 36) também não foram metabolizados por microssomas hepáticos de ratos (MOREIRA *et al.*, 2013).

Saponinas do tipo ginsenosídeos (37), ao serem metabolizadas pela via oral, produzem metabólitos principalmente de hidrólise da porção glicosídica das saponinas ou formação de oxidações de cadeias laterais (YANG *et al.*, 2009; QIAN *et al.*, 2006; QIAN *et al.*, 2005).

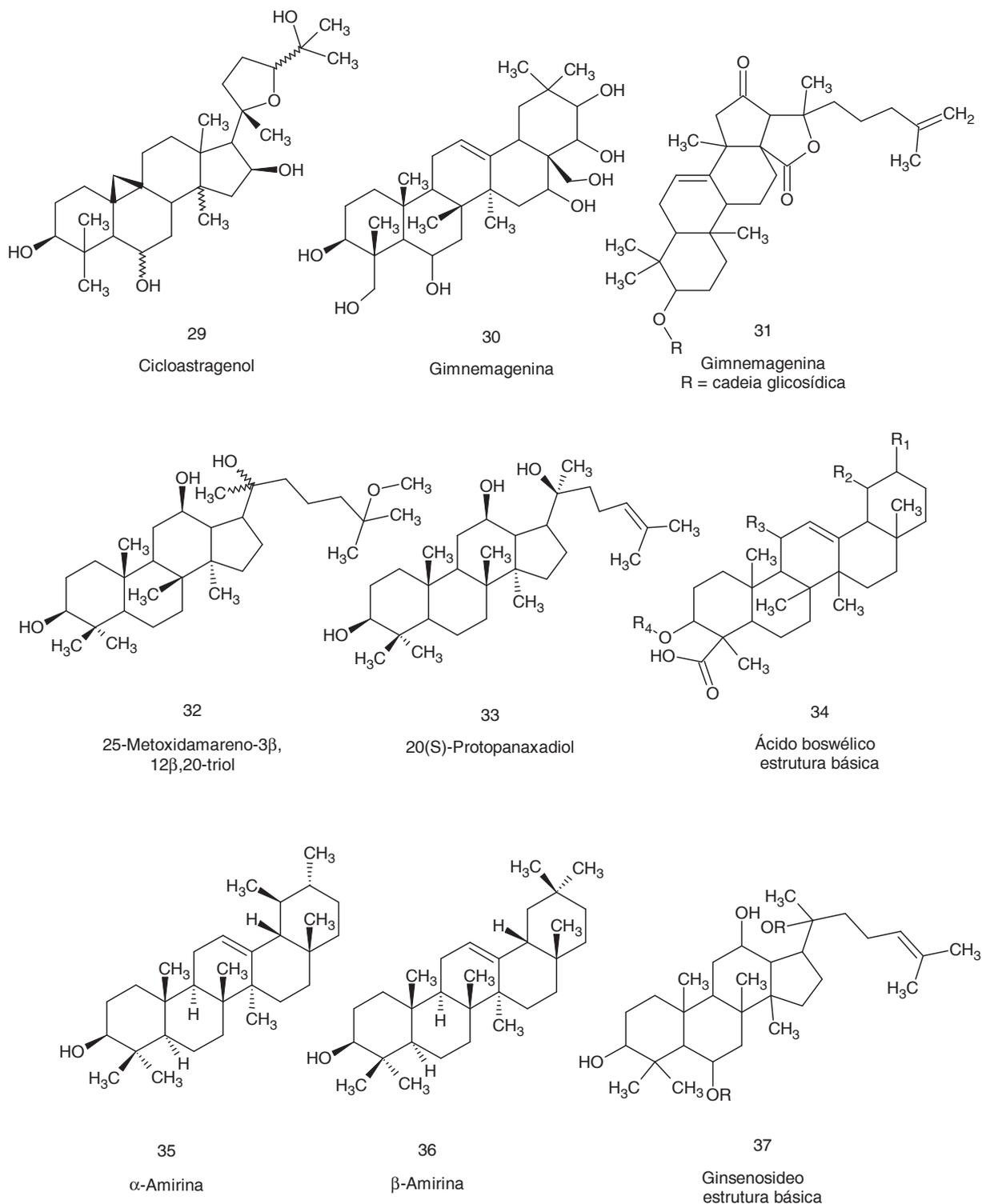


Figura 9: Estruturas químicas de alguns triterpenos e saponinas

Assim, estudar a farmacocinética e a eliminação de substâncias terpênicas bem como buscar estratégias para melhorar a biodisponibilidade de substâncias dessa importante classe se faz necessário para que possam ser inseridas novas substâncias nos testes clínicos de atividade biológica e disposição.

***Capítulo 3 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA
MISTURA BINÁRIA DE ALFA E BETA AMIRINAS***

3.1 Introdução

Muitas são as substâncias produzidas por vegetais e microrganismos com atividades biológicas de interesse e farmacologicamente importantes. Essas substâncias, principalmente os metabólitos secundários, de certa forma, garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie (SIMÕES *et al.*, 2004). Diante da biodiversidade do planeta, as fontes de metabólitos secundários parecem inesgotáveis, considerando as enormes possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância medicinal e comercial (YUNES & CALIXTO, 2001).

Grande é a importância da pesquisa na área de produtos naturais, uma vez que diversos medicamentos no mercado são provenientes direta ou indiretamente de substâncias obtidas a partir de plantas e microrganismos. Estima-se que aproximadamente 34% das entidades químicas registradas até meados da década de 2000 sejam provenientes de produtos naturais. Das entidades registradas de 1981 a 2006, 12% mimetizam substâncias dessa classe e 17% possuem grupos farmacofóricos derivados de metabólitos secundários (ROLLINGER, 2009). Além disso, mais da metade dos anticancerígenos e antibióticos estão relacionados com a pesquisa em produtos naturais (MCCHESENEY, VENKATARAMAN & HENRI, 2007).

Uma importante classe de metabólitos secundários são os terpenos que se distribuem amplamente na natureza e representam a maior classe de metabólitos secundários com mais de 20 mil compostos conhecidos (PHILLIPS *et al.*, 2006). São constituídos de unidades isoprênicas e podem ser divididos em subclasses de acordo com o número dessas unidades.

Os triterpenos, foco de nosso interesse, são constituídos de seis unidades isoprênicas e sintetizados a partir da ciclização do esqualeno (SHENG & SUN, 2011). Apresentam uma variedade de atividades farmacológicas e por isso o interesse nessa subclasse tem sido bastante crescente. Dentre as atividades farmacológicas dos triterpenos destacam-se a anti-inflamatória e antinociceptiva (CHICCA, *et al.*, 2012; MATOS *et al.*, 2013; PASSOS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2005b; OTUKI *et al.*, 2005; HOLANDA PINTO *et al.*, 2008), antipruriginosa (OLIVEIRA *et al.*, 2004b), hepatoprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2005a), antimicrobiana e antiviral (JOSHI *et al.*, 2013; RHOORRI-FRIH *et al.*, 2013, GAO *et al.*, 2010).

Vários são os triterpenos com atividade anti-inflamatória comprovada, principalmente da classe dos ursanos, oleananos e lupanos tais como ácido ursólico (MÁÑEZ *et al.*, 1997; BARICEVIC *et al.*, 2001), α - e β - amirinas (OLIVEIRA *et al.*, 2004a,b; VILLASEÑOR *et al.*, 2004; OTUKI *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2007; HOLANDA PINTO *et al.*, 2008; SOLDI *et al.*, 2008), ácido boswélico (AMMON, 2002; KIELA *et al.*, 2005), ácido 23-hidroxiursólico (TOPONDJOU *et al.*, 2003; SHIN *et al.*, 2004), lupeol (NIKIEMA *et al.*, 2001); breína (YASUKAWA *et al.*, 1996).

Acredita-se que, devido à semelhança estrutural dos triterpenóides com os compostos esteroidais, exista uma semelhança também com relação ao mecanismo de ação dessas substâncias.

É de grande importância a comprovação de atividade anti-inflamatória de triterpenos, uma vez que os medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento de inflamações provocam vários efeitos adversos tanto pelo uso esporádico quanto pelo uso contínuo (DE FRANCISCHI, 2005). Entretanto, apesar de diversas comprovações científicas da atividade biológica, em especial anti-inflamatória de triterpenos, pouco se sabe sobre a farmacocinética e sobre o metabolismo dessas substâncias.

As substâncias α e β -amirinas (Fig. 10) são triterpenos pentacíclicos que se diferem pela posição de um grupo metila na posição C19 e C20, respectivamente (BISKUP *et al.*, 2012). Além de serem encontradas em resinas das espécies dos gêneros *Protium* e *Bursera*, essa mistura é comumente encontrada em outras espécies como *Anemone rivulgaris* (ZHAO *et al.*, 2012) e *Manilkara bidentata* (RHOURRI-FRIH *et al.*, 2013; HERNANDEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2013)

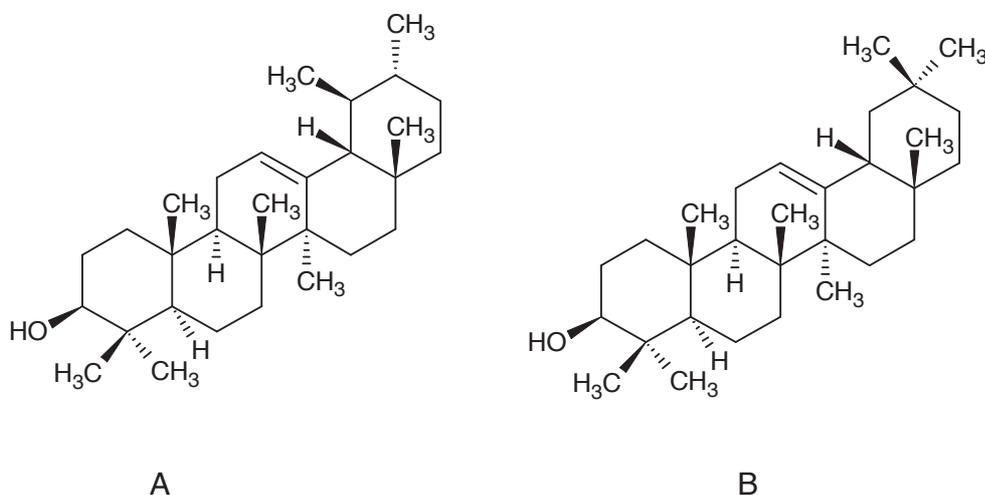


Figura 10: Estruturas químicas de α (A) e β (B) amirinas

A α -amirina é também encontrada em quantidades significativas em *Cassia obtusifolia*, e *Commiphora holtzian* (HERNANDEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2010; SOB *et al.*, 2010; MANGURO *et al.*, 2009)

A principal fonte de β -amirina são *Nelumbo nucifera* e na raiz “cuachalalate” (*Amphipterygium adstringens*) (HERNANDEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2012; ROSAS-ACEVEDO *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2011). Varias atividades biológicas tem sido reportadas para essa mistura ao longo dos anos, dentre elas anti-inflamatória, analgésica, hepatoprotetora e gastroprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2004a,b; 2005 a,b; OTUKI *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2007; HOLANDA PINTO *et al.*, 2008; SOLDI *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2013; CHICCA, *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2012).

***Capítulo 4 - DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO CONTENDO
ALFA E BETA-AMIRINAS***

4.1 Introdução

Mais de 40% das novas entidades químicas com atividade biológica descobertas possuem baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade oral. Este fato torna necessária a utilização de alguma estratégia farmacotécnica para melhorar essas propriedades a fim de que essas entidades sejam viáveis para utilização como medicamentos. Preparar nanoemulsões tem sido uma estratégia importante para administrar substâncias de baixa solubilidade com eficiência no organismo (GONG, *et al.*, 2012; KOTTA *et al.*, 2012).

O termo nanoemulsão é utilizado para definir emulsões com partículas menores que 1000 nanômetros (nm) que podem ser chamadas de emulsões ultrafinas ou miniemulsões (KOROLEVA & YURTOV, 2012). Esse tipo de emulsão é composto por gotas em escala nanométrica de um líquido imiscível dispersas em outro líquido e tem sido foco de pesquisa, pois, além de melhorar as propriedades dos fármacos insolúveis em água, possuem a capacidade de transporte de compostos ativos variados com propriedades únicas (LIU, QI & WU, 2012).

Surfactantes etoxilados iônicos ou não-iônicos são frequentemente utilizados para estabilizar nanoemulsões do tipo óleo em água (O/A) (KOROLEVA & YURTOV, 2012).

Recentemente, *Food and Drug Administration* tem aprovado algumas nanoemulsões de fármacos insolúveis como Estrasorb[®], Flexogan[®] e Restasis[®] para aplicações clínicas (GONG *et al.*, 2012).

Existem relatos de que a taxa de absorção de medicamentos nanoemulsionados é superior quando comparado com outras formas farmacêuticas (KOROLEVA & YURTOV, 2012).

Estudos comparativos entre nanoemulsão lipídica e suspensão de ceforoxima, um antibiótico da classe das cefalosporinas, mostraram que a biodisponibilidade da nanoemulsão é quase duas vezes maior e que as concentrações plasmáticas máximas atingidas para nanoemulsão também foram consideravelmente maiores (PATEL, PODDAR & SAWANT, 2012). A biodisponibilidade e a atividade antioxidante de vitamina E foi consideravelmente maior para nanoemulsões comparada a de cápsulas gelatinosas desse composto, ambos administrados por via oral (GONG *et al.*, 2012).

Estudos com o flavonoide fisetina mostraram que não houve diferença na biodisponibilidade para a nanoemulsão comparada a do flavonoide livre em exposição sistêmica, ou seja, quando administrada por via endovenosa. Entretanto, quando administrado intraperitonealmente, a biodisponibilidade da nanoemulsão foi 24 vezes maior, comparada a do flavonoide livre. Além disso, a dose antitumoral para a nanoemulsão foi consideravelmente menor (36,6 mg/kg) comparada a da substância livre (223 mg/kg) (RAGELLE *et al.*, 2012).

Considerando que a mistura de α e β -amirinas possui caráter lipofílico bastante pronunciado, e que estudos de disposição cinética de β -amirina em ratos mostraram baixa biodisponibilidade para o composto puro e no extrato (0,86% vs 3,83%) (CHING, 2011), torna-se importante o desenvolvimento de uma formulação que permita a administração endovenosa, bem como possa promover a melhoria nos parâmetros farmacocinéticos da mistura.

***Capítulo 5 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIAS BIOANALÍTICAS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ALFA E BETA-AMIRINAS***

5.1 Introdução

Com o avanço das técnicas cromatográficas e espectroscópicas, inúmeros procedimentos para medições analíticas e bioanalíticas são realizados ao redor do mundo e a validação desses procedimentos se faz necessária para que os resultados obtidos sejam confiáveis e adequados ao que o método se propõe (DE BARROS, 2002).

Segundo a RDC N^o 27, de 17 de maio de 2012, validação é a confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ANVISA, 2012).

A fim de demonstrar o desempenho de métodos analíticos e bioanalíticos (onde se usam matrizes biológicas) é necessário investigar algumas características realizando ensaios de seletividade, efeito residual, efeito de matriz, linearidade, precisão, exatidão e estabilidade para que o método possa ser utilizado com confiabilidade e segurança (ANVISA, 2012).

***Capítulo 6 - REAÇÕES BIOMIMÉTICAS DE OXIDAÇÃO
DE ALFA E BETA AMIRINAS USANDO
METALOPORFIRINAS***

6.1 Introdução

Monooxigenases do citocromo P450 (CYP450) são um tipo de hemoproteínas possuidoras de porfirina de ferro como centro ativo, estão amplamente distribuídas nos organismos e são responsáveis por catalisar hidroxilações em ligações C-H inertes utilizando oxigênio em condições suaves (GIANG & CANCHENG, 2012). Nessas reações ocorre a incorporação de um átomo de oxigênio em um substrato enquanto outro átomo de oxigênio é reduzido por dois elétrons gerando água (LOHMANN & KARST, 2008).

Com o surgimento de novas entidades químicas é de extremo interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos que sejam realizados estudos de metabolismo *in vitro* a fim de direcionar o estudo de biotransformação de maneira rápida já nos primeiros estágios de pesquisa a fim de definir a viabilidade do uso desse candidato (LOHMANN & KARST, 2008).

Alguns testes de biotransformação *in vitro* podem ser realizados utilizando matrizes contendo CYP450. Dentre eles podem ser citados os modelos de fígado isolado perfundido, pedaços de fígado, utilização de hepatócitos isolados, homogenato de fígado ou frações desse homogenato (LOHMANN & KARST, 2008).

Entretanto, utilizar diretamente CYP450 como catalizador de oxidações na indústria torna-se difícil uma vez que as hidroxilações que ocorrem no organismo por essa via envolvem múltiplas etapas de processos complicados de transferência de elétrons (GIANG & CANCHENG, 2012).

Dentre esses métodos o de mais fácil obtenção e manuseio é o de frações de homogenato de fígado que são obtidas por centrifugação diferencial desse homogenato. Cada fração é composta por um tipo de enzimas: a fração microssomal contém enzimas do CYP450, a fração citosólica contém enzimas de fase II e a fração S9 contém ambas as enzimas de fase I e II e oferece a mais completa representação de enzimas do perfil metabólico. A fração microssomal é bastante popular, entretanto exigem adição de cofatores e possuem a desvantagem de impossibilidade de modelação enzimática e limitações das medições quantitativas (LOHMANN & KARST, 2008)

Em 1979 foi relatada pela primeira vez a utilização de um sistema empregando uma metaloporfirina sintética (clorotetrafenilporfirina de ferro III)

utilizando iodosilbenzeno como oxidante a fim de realizar reações biomiméticas de oxidação de ligações C-H inertes. Este sistema que mimetiza a ação de enzimas do CYP450 tem sido amplamente utilizado como modelo para estudos de hidroxilações sob condições ambientes (GIANG & CANCHENG, 2012; DE FARIA *et al.*, 2011) e desde então tem sido amplamente utilizadas na geração de moléculas para aplicação na química fina e na indústria farmacêutica (DE FARIA *et al.*, 2011).

Atualmente, as metaloporfirinas de ferro são as mais comumente utilizadas para estes estudos pois são capazes de catalisar oxidações orgânicas de maneira bastante semelhante ao que ocorre com a enzima biológica (DE FARIA *et al.*, 2011), entretanto podem ser utilizadas estruturas contendo manganês e zinco por exemplo como metais de coordenação. Já como oxidantes podem ser utilizados hipoclorito de sódio (NaOCl), iodosilbenzeno (PhIO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), terc-butil-hidroperóxido (*t*-BuOOH) ou ácidos peroxicarboxílicos como o ácido 3-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA) (LOHMANN & KARST, 2008).

Vários sistemas porfirínicos tem sido reportados na literatura e tem sido preparados catalizadores de 3 gerações diferentes, como exemplificado na Figura 15.

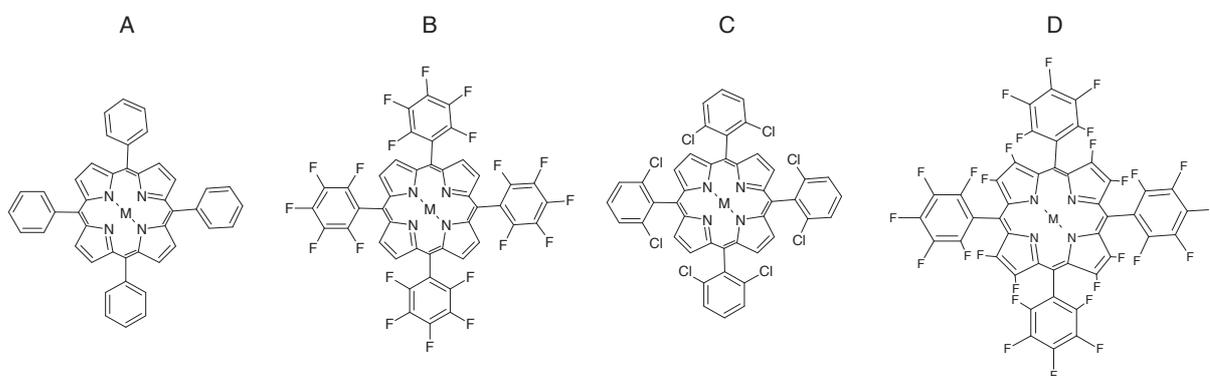


Figura 15: Fórmula estrutural de metaloporfirinas de 1^a geração (A) 2^a geração (B-C) 3^a geração (D). M corresponde ao metal (Fe ou Mn)

A aplicação de reações catalíticas biomiméticas utilizando metaloporfirinas na oxidação de produtos naturais é bastante promissora, uma vez que pode auxiliar no descobrimento de novas drogas para utilização clínica e tem sido realizada para algumas classes de compostos naturais como lignanas e óleos essenciais (DE FARIA *et al.*, 2011). Outro composto de origem natural que teve sua metabolização *in vitro* recentemente publicada foi o lapachol cuja metabolização com catalizador de

Jacobsen produziu onze derivados de oxidação (NIEHUES *et al.*, 2012). Já as reações biomiméticas utilizando metaloporfirinas para metabolização de grandisina produziu apenas um metabólito putativo (FERREIRA *et al.*, 2012). Entretanto, diante da diversidade de classes e substâncias naturais, muito ainda deve ser feito a fim de elucidar os processos de metabolismo *in vitro* e *in vivo* de diversas substâncias.

***Capitulo 7 - DISPOSIÇÃO CINÉTICA E ELIMINAÇÃO
DE ALFA E BETA AMIRINAS***

7.1 Introdução

Ao entrar no organismo, as diversas substâncias exógenas seguem um curso para que possam ocorrer os processos de absorção, distribuição, metabolismo ou biotransformação e excreção, com a finalidade de serem eliminadas após exercerem seu papel. A farmacocinética é a ciência que estuda esta transferência de moléculas através do sistema biológico e é de extrema importância para que os processos de passagem das substâncias pelo organismo possam ser entendidos (STORPIRTIS *et al.*, 2011).

Existem muitos relatos sobre a farmacodinâmica de α - e β -amirina na literatura, entretanto pouco se sabe sobre sua farmacocinética e metabolismo.

Atividades anti-inflamatória e analgésica de extratos ou frações de plantas ricas em α - e β -amirina foram relatados quando houve administração desses extratos por via intraperitoneal de doses acima de 5 mg/kg ou por via oral acima de 100 mg/kg (OTUKI *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2013). Também foram relatadas atividades gastroprotetoras de resinas ricas em α - e β -amirinas, em doses acima de 200 mg/kg por via oral em camundongos por mecanismo diferente daquele da N-acetil-cisteína. Em doses maiores a resina também diminuiu a permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos. Já em ratos, a resina reduziu a acidez total sem mudança no volume de secreção gástrica além de exercer efeito inibitório na formação de colágeno, mas não reduziu o edema agudo (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

Estudos da mistura triterpênica α e β -amirina em camundongos mostraram que nas doses de 100 e 200 mg/kg por via oral elas possuem efeito antialérgico pelo mecanismo de estabilização da membrana do mastócito, entretanto sem efeitos sedativos (OLIVEIRA *et al.*, 2004). O tratamento com doses intraperitoneais de 50 e 100 mg/kg de α e β -amirinas promove efeito hepatoprotetor (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em doses de 10 a 50 mg/kg, por vias oral ou intraperitoneal, α e β -amirinas promovem efeitos ansiolíticos e antidepressivos (ARAGÃO *et al.*, 2006) e são capazes de reduzir a dor visceral e o edema nas doses de 30 e 100 mg/kg por via oral pelo mecanismo de bloqueio de liberação de substância P ou agindo sobre seu receptor (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2007). A aplicação tópica de α -amirina em camundongos nas doses de 0,1 a 1 mg/orelha exerce atividade anti-inflamatória

forte e rápida dose-dependente sobre a pele diminuindo os níveis de prostaglandinas (OTUKI, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2007). Quando administradas oralmente na dose de 30 mg/kg reduzem significativamente a inflamação e a dor neuropática persistente em camundongos por ativação e receptores canabinóides (DA SILVA *et al.*, 2011) além de reduzir o edema pancreático em camundongos e suprimir a infiltração de células inflamatórias, de células de necrose e a produção de mediadores da inflamação quando administrada por via oral em doses de 10 a 100 mg/kg (MELO *et al.*, 2011).

Poucos estudos são relatados para atividades biológicas de α e β -amirina em ratos. Na fase aguda de periodontite em ratos, α e β -amirinas possuem atividade na dose de 5 mg/kg (HOLANDA PINTO, *et al.*, 2008) e nas doses de 30 e 100 mg/kg por via intraperitoneal, reduzem a dor orofacial pelo mecanismo opióide periférico (HOLANDA PINTO, *et al.*, 2008b).

O único relato sobre disposição cinética desses compostos mostrou que β -amirina possui $T_{1/2}$ longa e baixo Cl. A biodisponibilidade de β -amirina quando administrada na dose de 3 mg/kg pura mostrou-se consideravelmente menor que quando administrada em dose equivalente no extrato bruto de *Ardisia elliptica* (CHING *et al.*, 2011).

Sobre metabolismo, existe apenas um relato recente da ação de CYP450 de microsomas de ratos sobre α e β -amirinas *in vitro* evidenciando baixa taxa de metabolismo para esses compostos (MOREIRA *et al.*, 2013).

Pouco se sabe sobre a toxicidade desta mistura. Sabe-se em especial que a mistura de α e β -amirinas em doses de até 2g/kg não promovem efeitos tóxicos agudos (OLIVEIRA, 2005).

Uma vez que a maioria dos relatos na literatura referem-se a atividades em camundongos e que nada se sabe sobre a farmacocinética dessas substâncias em camundongos faz-se necessário estender os conhecimentos sobre esses animais, uma vez que existem diferenças fisiológicas e metabólicas consideráveis entre esses dois roedores (NEERVANNAN, 2006).

Capítulo 8 - CONCLUSÕES

- 1) A mistura triterpênica de α e β -amirinas foi isolada com alto grau de pureza.
- 2) Foi desenvolvida e caracterizada uma nanoemulsão com alta taxa de encapsulação, com tamanho de partícula e índices de polidispersão estáveis preparadas com excipientes comerciais que podem garantir seguramente a administração nos animais tanto via oral quanto endovenosa.
- 3) A reação biomimética de oxidação de α e β -amirinas produziu metabólitos em baixa quantidade e foi parcialmente seletiva para β -amirina. Entretanto, não foi viável produzir estes metabólitos em larga escala para a identificação, pois nos estudos de disposição cinética e eliminação biliar e renal não foi possível encontrar nenhum dos metabólitos formados o que confirmou a baixa taxa de metabolização *in vitro* de α e β -amirinas por microsomas hepáticos, já reportada previamente.
- 4) Os estudos de disposição cinética via endovenosa mostraram alto V_d . O Cl_R baixo e Cl_B elevado. A maior parte das α e β -amirinas foram eliminadas inalteradas nas fezes após 24 horas da administração endovenosa e as substâncias praticamente não foram eliminadas na urina. A disposição cinética oral comportou-se segundo o modelo *Flip-Flop* comumente encontrado em substâncias de alta polaridade e em formulações de liberação controlada.
- 5) A biodisponibilidade oral de α e β -amirina foi baixa, entretanto, a formulação desenvolvida promoveu a absorção de α e β -amirinas, enquanto a suspensão não foi absorvida, comprovando que nanoemulsões promovem o aumento da biodisponibilidade de substâncias de baixa solubilidade.
- 6) A ausência de metabólitos, o alto V_d , a eliminação parcial nas fezes e a praticamente nula eliminação renal corroboram com os estudos de liberação *in vitro* e sugerem que α e β -amirinas permanecem armazenadas em órgãos como pulmão, fígado, baço e rins após administração endovenosa, entretanto estudos de biodistribuição são necessários para confirmação desse fato.
- 7) Embora os resultados de biodisponibilidade oral sejam baixos, α e β -amirinas parecem substâncias promissoras para utilização na terapêutica, uma vez que possuem atividade biológica em doses baixas. Entretanto, é necessário pesquisar alternativas para melhorar a biodisponibilidade destes isômeros.

Capítulo 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASS, K.; REPONEN, P.; MATTILA, S.; PELKONEN, O. Metabolism of α -thujone in human hepatic preparations *in vitro*. *Xenobiotica*, 2011, 41 (2), 101-111.

AMMON, H. P. Boswellic acids (components of frankincense) as the active principle in treatment of chronic inflammatory diseases. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 152(15-16), 373-378, 2002.

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, RDC Nº 27, de 17 de maio de 2012. Brasília, DF, 2012. Disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, RE Nº 899, de 29 de maio de 2003. Brasília, DF, 2003. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br>

ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 85, 827-834, 2006.

ASIMUS, S.; ASHTON, M. Artemisinin – A possible CYP2B6 probe substrate? *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 30, 265-275, 2009.

ATTILI-QADRI, S.; KARRA, N.; NEMIROVSKI, A.; SCHWOB, O.; TALMON, Y.; NASSAR, T.; BENITA, S. Oral delivery system prolongs blood circulation of docetaxel nanocapsules via lymphatic absorption. *Proceedings of the Natrual Academy of Sciences fo the USA* 110(43):17498-17503, 2013.

BARICEVIC, D.; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SIMONOVOSKA, B.; KRASNA, A.; ZUPANCIC, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 75 (2-3), 125-132, 2001.

BISKUP, E. GOLEBIEWSKI, M.; GNIADDECKI, R.; STEPNOWSKI, P. Triterpenoid α -amyrin stimulates proliferation of human keratnocytes but does not protect them against UVB damage. *Acta Biochimica Polonica* 59 (2), 255-260, 2012.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsoes como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Quimica Nova*, 35 (9), 1827-1840, 2012.

BUGGINS, T. R.; DICKINSON, P. A.; TAYLOR, G. The effect of pharmaceutical

excipients on drug disposition. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1482-1503, 2007.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova*, 32 (4), 2009.

CHEN, Q. F.; LIU, Z. P.; WANG, F. P. Natural sesquiterpenoids as cytotoxic anticancer agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 11, 1153-1164, 2011.

CHEN, Q.; LUO, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Z. 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* 399 (8), 2877-2884, 2011.

CHENG, C.; LIU, X. W.; DU, F. F.; LI, M. J.; XU, F.; WANG, F. Q.; LIU, Y.; LI, C.; SUN, Y. Sensitive assay for measurement of volatile borneol, isoborneol, and the metabolite camphor in rat pharmacokinetic study of *Borneolum* (Bingpian) and *Borneolum syntheticum* (synthetic Bingpian). *Acta Pharmacologica Sinica* 34(10), 1337-48, 2013.

CHICCA, A.; MARAZZI, J.; GERTSCH, J. The antinociceptive triterpene beta-amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol(2-AG) hydrolysis without directly targeting CB receptors. *British Journal of Pharmacology* 167, 1596–1608, 2012.

CHING, J., LIN, H.-S., TAN, C.-H. AND KOH, H.-L. Quantification of α - and β -amyrin in rat plasma by gas chromatography–mass spectrometry: application to preclinical pharmacokinetic study. *Journal of Mass Spectrometry*, 46, 457–464, 2011.

CHO, E. K.; PARK, J. Y.; LEE, K. H.; SONG, H. S.; MIN, Y. J.; KIM, Y. H.; KANG, J. H. Open-label, randomized, single-dose, crossover study to evaluate the pharmacokinetics and safety differences between two docetaxel products, CKD-810 and Taxotere injection, in patients with advanced solid cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 73(1), 9-16, 2014.

CHU, Y.; ZHANG, H. C.; LI, S. M.; WANG, J. M.; WANG, X. Y.; LI, W.; ZHANG, L. L.; MA, X. H.; ZHOU, S. P.; ZHU, Y. H.; LIU, C. X. Determination of ginsenoside R_c in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*.75(8), 919-920, 2013.

CUSATO, M.; ALLEGRI, M. NIEBEL, T.; INGELMO, P.; BOGLIA, M.; BRASCHI, A.; REGAZZI, M. *Flip-flop* kinetics of ropivacaine during continuous epidural infusion

influences its accumulation rate. *European Journal of Clinical Pharmacology* 67, 399-406, 2011.

DA SILVA, K. A. B.; PASZCUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene α,β -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain* 152, 1872-1887, 2011.

DE BARROS, C. B. Validação de Metodos Analiticos. *Biológico*, 64 (2), 175-177, 2002.

DE FARIA, E. H.; RICCI, G. P.; LEMOS, F. M.; E SILVA, M. L. A.; DA SILVA FILHO, A. A.; CALEFI, P. S.; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J. Green oxidation reactions of drugs catalysed by bio-inspired complexes as an Efficient methodology to obtain active molecules, biomimetic based applications. *In: Biomimetic based applications*. CAVRAK, M (Ed.). Editora In Tech. 2011.

DE FRANCISCHI, J. N. *A Farmacologia em Nossa Vida* Editora UFMG, p. 140, Belo Horizonte, 2005.

DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D.; MARKIVA, L.; URBAN, M.; SAREK, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* 23, 394-411, 2006.

FERREIRA, L. S.; CALLEJON, D. R.; ENGEMANN, A.; CRAMER, B.; HUMPF, H. U.; DE BARROS, V. P.; ASSIS, M. D.; DA SILVA, D. B.; DE ALBUQUERQUE, S.; OKANO, L. T.; KATO, M. J.; LOPES, N. P. *In vitro* metabolism of grandisin, a lignan with anti-chagasic activity. *Planta Medica* 78 (18), 1939-1941, 2012.

FONTANA, M.C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5 (3), 254-263, 2009.

FÖRSTER, T. H.; SCHAMBIL, F.; TESMANN, H. Emulsification by the phase inversion temperature method: the role of self-bodying agents and the influence of oil polarity. *International Journal of Cosmetic Science* 12, 217-227, 1990.

GAO, Y.; JIN, S.; JIA, J.; WANG, J; SUN, X. New 3-O-caffeic acyl oleanane type pentacyclictriterpene ester derivative used in medicinal composition to produce medicines, such as anti-inflammatory medicines, antiallergic medicines, hepatoprotective medicines, and antiviral medicines, China. Patent CN102344481-A, 2010.

- GERBETH, K.; HÜSCH, J.; FRICKER, G.; WERZ, O.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; ABDEL-TAWAB, M. *In vitro* metabolism, permeation, and brain availability of six major boswellic acids from *Boswellia serrata* gum resins. *Fitoterapia* 84, 99-106, 2013.
- GHOSH, S.; INDUKURI, K.; BONDALAPATI, S.; SAIKIA, A. K.; RANGAN, L. Unveiling the mode of action of antibacterial labdane diterpenes from *Alpinia nigra* (Gaertn.) B. L. Burtt seeds. *European Journal of Medicinal Chemistry* 66, 101-105, 2013.
- GIANG, L.; CANCHENG, G. Theoretical studies and industrial applications of oxidative activation of inert C-H Bond by metalloporphyrin-based biomimetic catalysis. *Science China Chemistry*, 55 (10), 2036-2053, 2012.
- GONG, Y.; WU, Y.; ZHENG, C.; FAN, L.; XIONG, F.; ZHU, J. An excellent delivery system for improving the oral bioavailability of natural vitamin E in rats. *AAPS PharmSciTech*, 13(3), 961-966, 2012.
- GONZÁLEZ-BURGOS, E. & GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry* 19, 5319-5341, 2012.
- GOTO, P. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; SANTOS, O. D. H. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in situ polymerization from nanoemulsions produced by direct emulsification. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 34 (2), 228-233, 2013.
- GUO, C.; ZHANG, S.; TENG, S.; NIU, K. Simultaneous determination of sesquiterpene lactones isoalantolactone and alantolactone isomers in rat plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study. *Journal of Separation Science* 37(8), 950-6, 2014.
- GYOUBU, K.; MIYAZAWA M. *In Vitro* Metabolism of (-)-Camphor Using Human Liver Microsomes and CYP2A6. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30 (2), 230-233, 2007.
- HADNADEV, T. D.; DOKIC, P.; KRSOTNOSIC, V.; HADNADEV, M. Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 313-321, 2013.
- HERNANDEZ-VÁZQUEZ, L., MANGAS, S., PALAZÓN, J., NAVARRO-OCAÑA, A. Valuable medicinal plants and resins: Commercial phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products* 31, 476-480, 2010.

- HERNANDEZ-VÁZQUEZ, L.; PALAZON, J.; NAVARRO-OCAÑA, A. *The Pentacyclic Triterpenes α,β -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities, Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshewer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech, 2012. <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-andhealth/the-pentacyclic-triterpenes-amyryns-a-review-of-sources-and-biological-activities> (acessado: 29 de agosto de 2013)
- HOG, D . T.; WEBSTER, R.; TRAUNER, D. Synthetic approaches toward sesterpenoids. *Natural Product Reports* 29, 752-779, 2012.
- HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M. S.; GUEDES, M. A.; CUNHA, G. M. A.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antinociceptive effect of triterpenoid α,β -Amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*, 15, 630-634, 2008b.
- HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 16(1), 48-52, 2008.
- HUANG, Y.; JIANG, B.; NUNTANAKORN, P.; KENNELLY, E. J.; SHORD, S.; LAWAL, T. O.; MAHADY, G. B. Fukinolic Acid Derivatives and Triterpene Glycosides from Black Cohosh Inhibit CYP Isozymes, but are not Cytotoxic to Hep-G2 Cells *in Vitro*. *Current Drug Safety* 5 (2), 118-124, 2010.
- JI, H. Y.; SHIN, B. S.; JEONG, D. W.; PARK, E. J.; PARK, E. S.; YOO, S. D.; LEE, H. S. Interspecies scaling of oleanolic acid in mice, rats, rabbits and dogs and prediction of human pharmacokinetics. *Archieves of Pharmacal Research* 32 (2), 251-257, 2009.
- JIN, X.; ZHANG, Z. H.; LI, S. L.; SUN, E.; TAN, X. B.; SONG, J.; JIA, X. B. A nanostructured liquid crystalline formulation of 20(S)-protopanaxadiol with improved oral absorption. *Fitoterapia*. 84, 64-71,2013b.
- JIN, X.; ZHANG, Z. H.; SUN, E.; TAN, X. B.; LI, S. L.; CHENG, X. D.; YOU, M. JIA, X. B. Enhanced oral absorption of 20(S)-protopanaxadiol by self-assembled liquid crystalline nanoparticles containing piperine: *in vitro* and *in vivo* studies. *International Journal of Nanomedicine*. 8, 641-52, 2013.
- JOSHI, R.; SOOD, S.; DOGRA, P.; MAHENDRU, M.; KUMAR, D.; BHANGALIA, S.; PAL, H.C.; KUMAR, N.; BHUSHAN, S.; GULATI, A.; SAXENA, A.K.; GULATI, A. *In vitro* cytotoxicity, antimicrobial, and metal-chelating activity of

triterpenessaponins from tea seed grown in Kangra valley, India. *Medicinal Chemistry Research* 22 (8), 4030-4038, 2013.

KAMBLE, B.; GUPTA, A.; PATIL, D.; KHATAL, L.; JANRAO, S.; MOOTHEDATH, I.; DURAISWAMY, B. Determination of gymnemagenin in rat plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetics after oral administration of *Gymnema sylvestre* extract. *Biomedical Chromatography* 27(5), 669-75, 2013.

KIELA, P. R.; MIDURA, A. J.; KUSCUOGLU, N.; JOLAD, S. D.; SOLYOM, A. M.; BESSELSSEN, D. G.; TIMMERMANN, B. N.; GHISHAN, F. K. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 288 (4), 798-808, 2005.

KIM, M. G.; HWANG, D. K.; JEONG, H. U.; JI, H. Y.; OH, S. R.; LEE, Y.; YOO, J. S.; SHIN, D. H.; LEE, H. S. *In vitro* and *in vivo* metabolism of verproside in rats. *Molecules* 17 (10) 1990-2002, 2012.

KOROLEVA, M. YU; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, 81(1), 21-43, 2012.

KOTTA, S., KHAN, A. W.; PRAMOD, K.; ANSARI, S. H.; SHARMA, R. K.; ALI, J. Exploring oral nanoemulsions for bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion Drug Delivery* 9(5), 585-598, 2012.

LAMBERT, E.; FAIZAL, A.; GEELLEN, D. Modulation of Triterpene Saponin Production: *In Vitro* Cultures, Elicitation, and Metabolic Engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164, 220-237, 2011.

LESKOVAC, V.; THEOHARIDES, A. D. Hepatic metabolism of artemisinin drugs – I. Drug metabolism in rat liver microsomes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99C (3), 382-390, 1991.

LI, J.; YU, H.; LI, S.; WANG, G. J. Enhanced distribution and extended elimination of glycyrrhetic acid in mice liver by mPEG-PLA modified (mPEGylated) liposome. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (5), 1147-1153, 2010.

LI, S-Q.; BJÖRKMAN, A.; ANDERSON, T. B.; GUSTAFSSON, L. L.; MASIMIREMBA, C. M. Identification of human cytochrome P450s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of *in vivo* drug hepatic clearance from *in vitro* data. *European Journal of Clinical Pharmacology* 59, 429-442, 2003.

- LI, T.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIANG, R.; ZHANG, D.; ZHANG, H.; CHEN, L.; YANG, W. Development of an SPE-HPLC-MS method for simultaneous determination and pharmacokinetic study of bioactive constituents of Yu Ping Feng San in rat plasma after oral administration. *Journal of Ethnopharmacology* 145(3), 784-792, 2013b.
- LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SOUSA, D. I. M.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S. N.; SANTOS, F. A. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α , β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachikinin NK₁-receptors, and K⁺_{ATP} channels. *Inflammation Research* 56, 487-494, 2007.
- LIRONG, F.; HAIMING, S.; XIAOBO, L. Advances in studies on metabolism and biotransformation of ginsenosides *in vitro*. *China Journal of Chinese Materia Medica* 36 (15), 2021-2026, 2011.
- LIU, L.; XIAO, J.; PENG, Z-H.; CHEN, Y. *In vitro* metabolism of glycyrrhetic acid by human cytochrome P450. *Acta Pharmaceutica Sinica* 46 (1), 81-87, 2011.
- LIU, L.; XIAO, J.; PENG, Z-H.; WU, W.-H.; DU, P.; CHEN, Y. *In vitro* metabolism of strychnine by human cytochrome P450 and its interaction with glycyrrhetic acid. *Chinese Herbal Medicines*, 4 (2), 118-125, 2012.
- LIU, Q.; ZHAO, D.; CHEN, X.; LI, Z.; LI, N.; HAN, D.; TALBI, A.; BIWOELE, T. Determination of corosolic acid, a natural potential anti-diabetes compound, in rat plasma by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application to pharmacokinetic and bioavailability studies. *Planta Medica* 77 (15), 1707-1711, 2011.
- LOBO-FARIA, P. C. Estratégias adaptativas de espécies arbóreas típicas de ambiente com solo hidricamente saturado: uma abordagem morfológica, bioquímica e ecofisiológica. *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- LOHMANN, W.; KARST, U.. Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391, 79-96, 2008.
- LOSCHI, R. A.; PEREIRA, J. A. A.; MACHADO, E. L. M.; CARLOS, L.; GONZAGA, A. P. D.; CARMO, I. P.; GOMES, D. J. S. Structural and environmental variations in a continuum of gallery Forest/Savana stricto sensu in Itumirim, MG. *Cerne* 19 (2), 213-227, 2013.
- LU, Y.; QI, J.; WU, W. Absorption, disposition and pharmacokinetics of nanoemulsions. *Current Drug Metabolism*, 13(4), 396-417, 2012.

- LUPE, F. A. Estudo da comparação química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazonia. *Dissertação de mestrado*. Campinas, SP. 2007.
- MA, S.; CHEN, F.; YE, X.; DONG, Y.; XUE, Y.; XU, H.; ZHANG, W.; SONG, S.; AI, L.; ZHANG, N.; PAN, W. Intravenous microemulsion of docetaxel containing an anti-tumor synergistic ingredient (*Brucea javanica* oil): formulation and pharmacokinetics. *International Journal of Nanomedicine* 8, 4045-4052, 2013.
- MACHADO, L. B.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Flavour and Fragrance Journal* 18 (4), 338-341, 2003.
- MÁÑEZ, S.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; RÍOS, J. L. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 334, 103-105, 1997.
- MANGURO, L.O.A., OPIYO, S.A., HERDTWECK, E., LEMMEN, P. Triterpenes of *Commiphora holtziana* oleo-gum resin. *Canadian Journal of Chemistry* 87, 1173-1179, 2009.
- MATOS, I.; BENTO, A.F.; MARCON, R.; CLAUDINO, R.F.; CALIXTO, J.B. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclitriterpene α , β -amyirin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: The relevance of cannabinoid system. *Molecular Immunology* 54 (3-4), 482-492, 2013.
- MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68 (14), 2015-2022, 2007.
- MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic tripterene α -amyirin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology* 559, 227-235, 2007.
- MELO, C. M.; MORAIS, T. C.; TOMÉ, A. R.; BRITO, G. A. C.; CHAVES, M. H.; RAO, V. S.; SANTOS, F. A. Anti-inflammatory effect of α , β -amyirin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation Research* 60, 673-681, 2011.
- MIN, Z.-D. Diterpenes. In: *Introduction to Natural Products Chemistry*. Editor: Zhao, W. CRC Press, 101-123, 2011.

- MIYAZAWA, M. & GYOUBU, K. Metabolism of (-)-fenchone by CYP 2A6 and CYP 2B6 in human liver microsomes. *Xenobiotica* 37 (2), 194-204, 2007.
- MIYAZAWA, M. & GYOUBU, K. Metabolism of (+)-fenchone by CYP 2A6 and CYP 2B6 in human liver microsomes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29 (12), 2354-2358, 2006.
- MIYAZAWA, M. & GYOUBU, K. Roles of human CYP2A6 and rat CYP2B1 in the oxidation of (+)-fenchol liver microsomes. *Xenobiotica* 37 (9), 943-953 b, 2007b.
- MIYAZAWA, M.; MARUMOTO, S.; TAKAHASHI, T. NAKAHASHI, H.; HAIGOU, R.; NAKANISHI, K. Metabolism of (+)- and (-)-menthols by CYP2A6 in human liver microsomes. *Journal of Oleo Science* 60 (3), 127-132, 2011.
- MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola Oil/Water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 27, 109–115, 2006.
- MOREIRA, F. L.; SOUZA, G, H. B.; RODRIGUES, I. V.; LOPES, N. P.; OLIVEIRA, A. R. M. A non-michaelian behavior of the *in vitro* metabolism of the pentacyclic triterpene alfa and beta amyryn by employing rat liver microsomes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 84, 14-19, 2013.
- MUFFER, K.; LEIPOLD, D.; SHELLER, M.-C.; HAAS, C.; STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; NEUHAUS, H. E.; MIRATA, M. A.; SCHRADER, J.; ULBER, R. Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* 46, 1-15, 2011.
- NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 2(5), 715-731, 2006.
- NEWMAN, J. D; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75, 311-335, 2012.
- NIEHUES, M.; BARROS, V. P.; EMERY, F. S.; DIAS-BARUFFI, M.; ASSIS, M. D.; LOPES, N. P. 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*, 54, 804-812, 2012.
- NIKIEMA, J.B.; VANHAELEN-FASTRE, R.; VANHAELEN, M.; FONTAINE, J.; DE GRAEF, C.; HEENEN, M. Effects of antiinflammatory triterpenes isolated from

Leptadenia hastata látex on keratinocyte proliferation. *Phytotherapy Research*, 15 (2), 131-134, 2001.

- OLIVEIRA, F. A. Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. e de seus principais constituintes, mistura de α - e β -amirina. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; LIMA JR.; R. C. P.; SILVA, R. M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 103-108, 2005a.
- OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; CAVALCANTE, I. J. M.; LIMA, A. F.; LIMA JR., R. C. P.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sciences*, 77(23), 2942-2952, 2005b.
- OLIVEIRA, F. A.; LIMA JUNIOR.; R. C. P.; CORDEIRO, W. M.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Pentacyclic triterpenoids, α , β -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 78, 719-725, 2004a.
- OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA JUNIOR.; R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Gastroprotective and antiinflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research* 49, 105-111, 2004b.
- OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life Sciences* 69, 2225-2236, 2001.
- OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium Kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* 507, 253-259, 2005.
- PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; MARCON, R.; NASCIMENTO, A.F.Z.; CALIXTO, J.B.; PIANOWSKI, L.F. The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-

inflammatory effect of tetracyclitriterpeneeuphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology* 698 (1-5), 413-420, 2013.

PATEL, Y.; PODDAR, A.; SAWANT, K. Formulation and characterization of Cefuroxime Axetil nanoemulsion for improved bioavailability. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 4(1), S4-S5, 2012.

PETERS, R. J. Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. *Natural Product Reports* 27, 1521-1530, 2010.

PHILLIPS, D. R.; RASBERY J. M.; BARTEL, B.; MATSUDA, S. P. T. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 305–314, 2006.

PISLYAGIN, E. A.; DMITRENOK, P. S.; GORPENCHENKO, T. Y.; AVILOV, S. A.; SILCHENKO, A. S.; AMININ, D. L. Determination of cucumarioside A₂-2 in mouse spleen by radiospectroscopy, MALDI-MS and MALDI-IMS. *European Journal Pharmaceutical Sciences* 49(4), 461-467, 2013.

PRISTA, N. L.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Culbenkian, 1995.

QIAN, T.; CAI, Z.; WONG, R. N.; JIANG, Z. H. Liquid chromatography/mass spectrometric analysis of rat samples for *in vivo* metabolism and pharmacokinetic studies of ginsenoside Rh₂. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19(23), 3549-3554, 2005.

QIAN, T.; JIANG, Z. H.; CAI, Z. High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applied for metabolic study of ginsenoside Rb₁ on rat. *Analytical Biochemistry* 352(1), 87-96, 2006.

RAGELLE, H.; CRAUSTE-MANCIET, S.; SEGUIN, J.; BROSSARD, D.; SCHERMAN, D.; ARNAUD, P.; CHABOT, G. G. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumor activity in mice. *International Journal of Pharmaceutics* 427 (2), 452-459, 2012.

RHOORRI-FRIH, B.; RENIMEL, I.; CHAIMBAULT, P.; ANDRÉ, P.; HERBETTE, G.; LAFOSSE, M. Pentacyclitriterpenes from *Manilkara bidentata* resin. Isolation, identification and biological properties. *Fitoterapia* 88, 101-108, 2013.

RODRIGUES, I. V.; SOUZA, J. N. P.; SILVA, A. C. G.; CHIBLI, L. A.; CABRAL, V. A. R.; VIEIRA FILHO, S. A.; PERAZZO, F. F.; GUIMARAES, A. G.; SOUZA, G.; H.

- B. (2013) Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth (Engler.). *Pharmacognosy Journal* 5, 6-12, 2013.
- ROLLINGER, J. M. Accessing target information by virtual parallel screening – The impact on natural product research. *Phytochemistry Letters* 2 (2), 53-58, 2009.
- ROSAS-ACEVEDO, H., TERRAZAS, T., GONZÁLEZ-TRUJANO M.E., GUZMÁN, Y., SOTO-HERNÁNDEZ, M. Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 67-73, 2011.
- SANTOS, F.A., FROTA, J.T.; ARRUDA, B.R.; MELO, T.S.; SILVA, A.A.C.A., BRITO, G.A.C.; CHAVES, M.H.; RAO, V.S. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids Health Disease* 11-98, 2012.
- SAREMI, S.; DINARVAND, R.; KEBRIAEEZADEH, A.; OSTAD, S. N.; ATYABI, F. Enhanced oral delivery of docetaxel using thiolated *chitosan nanoparticles*: preparation, *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomed Research Internatinal* 1-8, 2013.
- SARTORI, T. Preparação e caracterização de nanopartículas contendo metotrexato. Avaliação da estabilidade e viabilidade do tecido corneal após administração tópica ocular. *Dissetação de mestrado*. Florianópolis, SC. 2007.
- SCHMIDT, L.; BELOV, V. N.; GÖEN, T. Human metabolism of Δ^3 - carene and renal elimination of Δ^3 - caren-10-carboxylic acid (chaminic acid) after oral administration. *Archives of Toxicology* May, 2014.
- SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIN, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. The potencial of secondary metabolites from plants as drugs or leads against neglected diseases – part I. *Current Medicinal Chemistry* 19, 2128-2175, 2012.
- SHAFFER, S. A.; BAKER-LEE, C.; KENNEDY, J.; LAI, M. S.; DE VRIES, P.; BUHLER, K.; SINGER, J. W. *In vitro* and *in vivo* metabolism of paclitaxel poliglumex: identification of metabolites and active proteases. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 59, 537-548, 2007.
- SHENG, H., SUN, H. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclitriterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of

metabolic and vascular diseases. *Natural Products Reports* 28, 543–593, 2011.

- SHI, C.H.; ZHANG, X.; SUO, H.; YIN, T.; XU, H.; YUAN, B.; ZHAO, Y. Simultaneous determination by LC-MS/MS of 25-methoxydammarane-3 β ,12 β ,20-triol epimers and active metabolites in rat plasma after intravenous administration. *Xenobiotica*. 43(10), 868-874, 2013.
- SHIN, K. M.; KIM, R. K.; AZEFACK, T. L.; DAVID, L.; LUC, S. B.; CHOUDHARY, M. I.; PARK, H. J.; CHOI, J. W.; LEE, K. T.; *In vitro* anti-inflammatory activity of 23-hydroxyursolic acid isolated from *Cussonia bancoensis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Planta Medica*, 70 (9), 803-807, 2004.
- SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 5a edição, Editora da UFRGS, Florianópolis, Porto Alegre, 1102p., 2004.
- SOB, S.V.T., K. WABBO, H.K., TCHINDA, A.T., TANE, P., NGADJU, B.T., YE, Y. Anthraquinones, sterols, triterpenoids and xanthenes from *Cassia obtusifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 342-345, 2010.
- SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L. A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(6), 3377-3386, 2008.
- SONG, J.; BI, H.; XIE, X.; GUO, J.; WANG, X.; LIU, D. Natural borneol enhances geniposide ophthalmic absorption in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* 445(1-2), 163-70, 2013.
- STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; DE CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. *Farmacocinética Básica e Aplicada*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2011.
- SU, S.; CUI, W.; DUAN, J. A.; HUA, Y.; GUO, J.; SHANG, E.; LIU, P.; TANG, Y. UHPLC-MS simultaneous determination and pharmacokinetic study of three aromatic acids and one monoterpene in rat plasma after oral administration of Shaofu Zhuyu decoction. *American Journal of Chinese Medicine* 41(3), 697-715, 2013
- SUN, H.Y.; LI, Q.; CHEN, W.; GENG, L. L.; LI, X.; CHEN, X. H.; BI, K. S. Pharmacokinetic analysis of alpha and beta epimers of glycyrrhetic acid in rat plasma: differences in singly and combined administrations. *Yao Xue Xue Bao* 47 (1), 94-100, 2012.

- TAO, W.; DUAN, J.; GUO, J.; LI, J.; TANG, Y.; LIU, P.; YANG, N. Simultaneous determination of triterpenoid saponins in dog plasma by a validated UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after administration of total saponin of licorice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 75, 248-255, 2013.
- TARNING, J.; KLOPROGGE, F.; DHORDA, M.; JULLIEN, V.; NOSTEN, F.; WHITE, N. J.; GUERIN, P. J.; PIOLA, P. Pharmacokinetic properties of artemether, dihydroartemisinin, lumefantrine, and quinine in pregnant women with uncomplicated plasmodium falciparum malaria in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57(10):5096-103, 2013.
- TOPONDJOU, L. A.; LONTSI, D.; SONDEGAM, B. L.; CHOI, J.; LEE, K. T.; JUNG, H. J.; PARK, H. J. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Archives of Pharmacal Research*, 26 (2), 143-146, 2003.
- TOUTAIN, P. L.; FERRAN, A.; BOUSQUET-MÉLOU, A. SPECIES differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handbook of Experimental Pharmacology* 199, 19-48, 2010.
- TROPPIEL, R.J. & BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World Journal of Hepatology* 3 (9), 228-249, 2011.
- VACLAVIKOVA, R.; SOUCEK, P.; SVOBODOVA, L.; ANZENBACHER, P.; SIMEK, P.; GUENGERICH, F. P.; GUT, I. Different *in vitro* metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs, and minipigs. *Drug Metabolism and Disposition* 32 (6), 666-674, 2004.
- VAN-DEN-BERG, E.; CHAZDON, R.; CORREA, B. S. Tree growth and death in a tropical gallery forest in Brazil: understanding the relationships among size, growth, and survivorship for understory and canopy dominant species. *Plant Ecology* 213 (7), 1081-1092, 2012.
- VIEIRA, F. A. Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande – MG. 2005.
- VIEIRA, F. A.; DE CARVALHO, D. Genetic differentiation of the neotropical tree species *Protium spruceanum* (Benth.) Engler (Burseraceae) between fragments and vegetation corridors in Brazilian Atlantic forest. *Acta Botanica Brasilica* 23 (4), 1180-1185, 2009.

- VIEIRA, F. A.; DE CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. *Biodiversity and Conservation* 17 (10), 2305-2321, 2008.
- VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; DE SOUZA, A. M.; REIS, C. A. F.; CARVALHO, D. Fine-scale genetic dynamics of a dominant neotropical tree in the threatened Brazilian Atlantic Rainforest. *Tree Genetics and Genomes* 8 (6), 1191-1201, 2012.
- VIEIRA-JUNIOR, G. M.; DE SOUZA, C. M. L. & CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização e avaliação das propriedades térmicas. *Quimica Nova* 28 (2) 2005.
- WANG, X.; SONG, L.; LI, N.; QIU, Z.; ZHOU, S.; LI, C.; ZHAO, J.; SONG, H.; CHEN, X. Pharmacokinetics and biodistribution study of paclitaxel liposome in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Research (Stuttg)* 63 (11), 603-6, 2013.
- WASHINGTON, C. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *International Journal of Pharmaceutics* 58, 1-12, 1990.
- WU, Q.; HUANG, L.; LIU, Z.; YAO, M.; WANG, Y.; DAI, M.; YUAN, Z. A comparison of hepatic *in vitro* metabolism of T-2 toxin in rats, pigs, chickens, and carp. *Xenobiotica* 41 (10), 863-873, 2011.
- WU, X.J.; ZHANG, M. L.; CUI, X.Y.; PAUL FAWCETT, J.; GU, J. K. Comparative pharmacokinetics and the bioavailability of escin Ib and isoescin Ib following the administration of escin, pure escin Ib and isoescin Ib in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151 (2), 839-845, 2014.
- XU, P.; DU, S. Y.; LI, Y.; LU, Y.; BAI, J.; GUO, Q. L.; Comparative pharmacokinetic studies of borneol in brain and plasma of stroke or sham-operated rats after administration of Xingnaojing. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 38(21), 3763-7, 2013.
- XU, X., DONG, J., MU, X., SUN, L. Supercritical CO₂ extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) bee pollen. *Food and Bioproducts Processing* 89(1), 47-52, 2011.
- YAN, C.; LI, H.; WU, Y.; XIE, D.; WENG, Z.; CAI, B.; LIU, X.; LI, W.; CHEN, Z. Determination of xanthatin by ultra high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of xanthatin in rat plasma. *Journal of Chromatography B* (1), 947-948:57-61, 2014.

- YÁÑEZ, J. A.; REMSBERG, C. M.; SAYRE, C. L.; FORREST, M. L.; DAVIES, N. M. *Flip-flop pharmacokinetics – delivering a reversal of disposition: challenges and opportunities during drug development. Therapy Delivery* 2 (5), 643-672, 2011.
- YANG, B.; ZHOU, X.-F.; LIN, X.-P.; LIU, J.; PENG, Y.; YANG, X.-W.; LIU, Y. *Cembrane Diterpenes Chemistry and Biological Properties. Current Organic Chemistry* 16, 1512-1539, 2012.
- YANG, B.; LIU, D.; DU, C.; WANG, J. L.; WANG, L. F.; WANG, Y.; LIU, J. J. Study on pharmacokinetics and in vitro/in vivo correlation of menthol in Zhike Chuanbei Pipa dropping pills in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 38(9),1421-5, 2013.
- YANG, L.; XU, S.; LIU, C.; SU, Z. *In vivo* metabolism study of ginsenoside Re in rat using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(5), 1441-51, 2009.
- YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; YAMANOUCHI, S.; KUMARI, K.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of di- and trihydroxy triterpenes from the flowers of compositae on 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetat-induced inflammation in mice. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 19(10), 1329-1331, 1996.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*, 501p., Chapecó, Argos, 2001.
- ZHANG, H; QIU, M.; CHEN, Y; CHEN, J.; SUN, Y.; WANG, C.; FONG, H. H. S. Plant Terpenes. In: *Phytochemistry and Pharmacognosy. EOLSS – UNESCO*. Disponível em <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C06/E6-151-05-00.pdf>, [201-].
- ZHANG, W.; DI, L. Q.; LI, S. J.; SHAN, J. J.; KANG, A.; QIAN, S.; CHEN, L. T. The effects of *Glycyrrhizae uralenis* and its major bioactive components on pharmacokinetics of daphnetin in Cortex daphnes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 154 (3), 584-592, 2014.
- ZHAO, C.; SHAO, J.; FAN, J. A new triterpenoid with antimicrobial activity from *Anemone rivularis*. *Chemical Natural Compounds* 48 (5), 803-805, 2012.
- ZHAO, K.; DING, M.; CAO, H.; CAO, Z.-X. *In vitro* metabolism of glycyrrhetic acid by human and rat liver microsomes and its interactions with six CYP substrates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 64, 1445-1451, 2012b.
- ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Composition of the essential

oils from leaves, wood, fruits and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Journal of Essential Oil Research* 14 (3), 169-171, 2002.

ZORNOZA, T.; CANO-CEBRIÁN, M. J.; HIPÓLITO, L.; GRANERO, L.; POLACHE, A. Evidence of a *flip-flop* phenomenon in acamprosate pharmacokinetics: na *in vivo* study in rats. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 27, 305-311, 2006.