UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina

Leandro De Santis Ferreira

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina

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

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientado(a): Leandro De Santis
Ferreira

Orientador(a): Prof. Dr. Norberto
Peporine Lopes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas em 24/07/2013. A versão original encontra-se disponível na
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

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.

Ferreira, Leandro De Santis

Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina. Ribeirão Preto, 2013.

86 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. Grandisina. 2. *Piper solmsianum*. 3. Metabolismo *in vitro*. 4. Metabolismo *in vivo*. 5. Farmacocinética. 6. Deidrograndisina.

*A estrutura desenhada na capa foi feita por mim.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Leandro De Santis Ferreira

Título do trabalho: Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina

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

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientador(a): Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho todas as pessoas que contribuíram para a minha formação pessoal. Também dedico a Deus, que nos momentos bons e ruins da minha vida sempre esteve comigo.

AGRADECIMENTOS

À minha família por me apoiar incondicionalmente sempre.

À Le, minha companheira, que está sempre comigo e me apóia em todos os momentos da minha vida.

À Ao professor doutor Beto, que sempre foi amigo, sempre confiou no meu trabalho, e me ensinou muito nesses anos todos de laboratório.

Aos amigos Daniel Pavarini, Dayana Rubio, Eduardo Alves e Denise Brentan pelos vários momentos que passamos nesses anos de laboratório e alemão.

Ao Tomaz e Cris pela ajuda e ensinamento das técnicas que utilizamos e por serem sempre amigos e prestativos.

Aos professores da Química Orgânica que contribuíram para minha formação.

A todos os alunos do NNPNS que sempre me apoiaram, discutiram as várias ideias nos seminários e assim contribuíram com a minha formação.

À Ivanildes, Natália, Gisele, Michael, Vessechi e todos os demais pesquisadores que contribuíram de maneira direta ou indireta para o meu trabalho.

Aos pesquisadores nos diversos grupos de pesquisas que contribuíram para a realização do trabalho tanto no Brasil quanto na Alemanha.

Ao Daniel Callejon, que sempre me motivou a não me restringir somente em uma área e a buscar novos conhecimentos e novas áreas de atuação na pesquisa sempre aprimorando o que eu aprendi.

Ao pessoal da Lychnoflora que sempre estiveram do meu lado e me apoiaram no desenvolvimento deste grande projeto.

Aos demais professores da FCFRP-USP e funcionários da unidade que contribuíram para minha formação durante a graduação, o mestrado e o doutorado.

À FAPESP, CNPq e Capes pelo auxílio para execução do projeto.

*“O progresso calmo e constante, livre de
precipitação, conduz ao objetivo.”
Provérbio Chinês*

RESUMO

FERREIRA, L. S. **Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina**. 2013. 86f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A grandisina é uma lignana tetrahydrofurânica biologicamente ativa, sendo sua ação antiparasitária a mais abordada. A doença de Chagas é um problema endêmico do Brasil e considerado um grande problema de saúde pública no mundo. Estudos que permitam o desenvolvimento de tratamentos alternativos são necessários, uma vez que essa iniciativa costuma ficar mais restrita ao nível governamental. Nesse sentido, várias alternativas de emprego de extratos e substância de origem natural têm sido avaliadas, porém, ainda há a necessidade de um estudo mais amplo, visando compreender o real potencial terapêutico e os fenômenos envolvidos com a farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade. No presente trabalho foi possível verificar que o metabolismo inicial pela microbiota de ceco de porco, muito similar humana, não atuou sobre a grandisina o que sugere um possível uso por via oral. Em reações biomiméticas foi obtida como produto de oxidação majoritário a deidrograndisina, molécula esta inédita na literatura, a qual também foi observada como metabólito no modelo que empregaram microssomas hepáticos de ratos. Esses dados indicaram uma possível metabolização de fase I, o que foi confirmado posteriormente em animais. Devido a sua polaridade foi desenvolvida uma emulsão para administração da lignana a qual pode posteriormente ser utilizada no ensaio de eficácia *in vivo* da grandisina. O ensaio *in vivo* indicou que os parâmetros farmacocinéticos desta lignana foram Cp_0 728,16 ng mL⁻¹, K_e 0,023 h⁻¹, V_d 53,0 L Kg⁻¹, $t_{1/2}$ 29,8 h, $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ 40510,65 ng mL⁻¹ h e Clearance 1,2 L h⁻¹ Kg⁻¹. Portanto, o trabalho relata de forma pioneira estudos pré-clínicos com um produto natural brasileiro contribuindo e dando suporte para possíveis estudos clínicos posteriores essenciais e obrigatórios para o registro de um novo medicamento para o tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: Grandisina, *Piper solmsianum*, metabolismo *in vitro*, metabolismo *in vivo*, farmacocinética, deidrograndisina.

ABSTRACT

FERREIRA, L. S. **Metabolism and pharmacokinetics parameters of lignan grandisin.** 2013. 86f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Grandisin is a tetrahydrofuranic lignan for which many biological activities have been described. The antiparasitic action is the most studied biological activity. Chagas disease is endemic to Brazil and considered a big healthcare problem worldwide. Studies that allow the development of alternative treatment are necessary since research in this area is usually done by the government. Out of this reason, natural extracts and substances have been evaluated as alternative. However, a broader study still will be needed to recognize the real therapeutical potential and the phenomena related to pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity. In this study, it was possible to verify that the initial metabolism of grandisin by pig ceacum microbiota, which is very similar to the human one, has not occurred what could suggest an oral use. In the biomimetic reactions, dehydrograndisin was obtained as the major oxidation product. This new compound has also been cited in literature as a metabolite produced by hepatic rat microsomes. These data suggest a possible phase I metabolism reaction, which later was confirmed in the animal model. Due to the low polarity of grandisin, an emulsion for intravenous administration was developed and may be used later in an *in vivo* efficacy assay. The *in vivo* assay has been evaluated and the lignan pharmacokinetic parameters were Cp_0 728,16 ng mL⁻¹, K_e 0,023 h⁻¹, V_d 53,0 L Kg⁻¹, $t_{1/2}$ 29,8 h, $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ 40510,65 ng mL⁻¹ h and Clearance 1,2 L h⁻¹ Kg⁻¹. Therefore, this study pioneeringly reports the pre-clinical study of a Brazilian natural product contributing to and supporting later clinical studies that are essential and mandatory for a new medicine registration for the treatment of Chagas disease.

Keywords: Grandisin, *Piper solmsianum*, *in vitro* metabolism, *in vivo* metabolism, pharmacokinetics, dehydrograndisin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da lignana grandisina.	03
Figura 2 – Algumas metaloporfirinas utilizadas em ensaio biomiméticos.	08
Figura 3 – Foto de uma coluna realizada para isolamento de grandisina a partir do extrato de acetato de etila das folhas de <i>P. solmsianum</i> .	39
Figura 4 – Concentração de fração rica em grandisina realizada em evaporador rotativo. As manchas brancas presentes no balão são cristais de grandisina.	40
Figura 5 – Cristais de grandisina obtidos após recristalização. Em A, um dos maiores cristais obtidos com aproximadamente 1,2 cm; em B, frasco onde foi realizada uma das recristalizações com vários cristais no fundo do frasco.	40
Figura 6 – Espectro de massas (IES-EM) obtido para a grandisina. É possível observar a molécula de grandisina protonada e cationizada com sódio.	41
Figura 7 – Espectro de massas (IE-EM) obtido para a grandisina.	42
Figura 8 – Espectro de RMN ^1H obtido para a grandisina.	42
Figura 9 – Espectro de RMN ^{13}C obtido para a grandisina.	43
Figura 10 - Espectro de dicroísmo circular CD obtidos para a grandisina ($0,7 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em acetonitrila.	43
Figura 11 - Espectro de UV-Vis obtido para grandisina ($0,7 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em acetonitrila.	44
Figura 12 – Cromatograma obtido em CG-EM para demonstrar a pureza cromatográfica da grandisina.	44
Figura 13 – Cromatograma obtido em CLAE-DAD para demonstrar a pureza cromatográfica da grandisina.	45
Figura 14 – Cromatogramas em 236 nm para as amostras analisadas para demonstrar seletividade da metodologia analítica utilizada na análise das amostras de degradação forçada.	48
Figura 15 – Curva de calibração linear obtida para grandisina na faixa de concentração entre 99,2 $\mu\text{g/mL}$ e 992 $\mu\text{g/mL}$.	49
Figura 16 – Comparação entre quantidade de grandisina remanescente no ensaio com grandisina após a exposição a base, ácido, peróxido de hidrogênio e metais.	50
Figura 17 – Comparação entre quantidade de grandisina remanescente no ensaio com grandisina após a exposição a luminosidade, temperatura elevada e alta umidade.	50

Figura 18 - O tratamento com grandisina não promoveu alterações nos parâmetros do perfil lipídico de camundongos Balb/c. Os animais (n=6) foram tratados com grandisina 300mg/Kg via oral por 24 horas. Após este período, o sangue foi retirado e o soro foi obtido. Para as análises, foi realizada a reunião do soro, sendo constituída de 100µL de soro de cada animal. NT: animais não tratados. PEG: polietilenoglicol 300. GR: Grandisina. HDL: Lipoproteína de alta densidade - High Density Lipoprotein. LDL: Lipoproteína de baixa densidade - Low Density Lipoprotein. VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade - Very Low Density Lipoprotein.

Figura 19 - O tratamento com grandisina promoveu redução das enzimas ALT, γ -GT e bilirrubina. Os animais (n=6) foram tratados com Grandisina 300mg/Kg via oral por 24 horas. Após este período, o sangue foi retirado e o soro foi obtido. Para as análises, foi realizada a reunião do soro, sendo constituída de 100µL de soro de cada animal. NT: animais não tratados. PEG: polietilenoglicol 300. GR: Grandisina. AST: aminotransferase do aspartato. ALT: aminotransferase da alanina. γ -GT: gamaglutamiltransferase.

Figura 20 - O tratamento com grandisina não promoveu alteração em parâmetros bioquímicos avaliados. Os animais (n=6) foram tratados com grandisina 300mg/Kg via oral por 24 horas. Após este período, o sangue foi retirado e o soro foi obtido. Para as análises, foi realizada a reunião do soro, sendo constituída de 100µL de soro de cada animal. NT: animais não tratados. PEG: polietilenoglicol 300. GR: grandisina.

Figura 21 - Curvas de calibração (A) e de recuperação (B) obtidas para a lignana grandisina em UPLC-DAD no comprimento de onda de 236 nm em experimento de metabolização usando modelo do ceco de porco.

Figura 22 – Comparação entre a concentração média de grandisina utilizando as bactérias ativas e inativadas proveniente do ceco de porco nos diferentes tempos de incubação estudados.

Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CG-EM: (A) para os diferentes agentes oxidantes testados PhIO (azul), MCPBA (preto) e THBP (vermelho) e em aproximação (B).

Figura 24 - Cinética de oxidação da grandisina utilizando o modelo químico com catalisador de Jacobsen.

Figura 25 - Comparação dos cromatogramas do controle (vermelho) e reação de metabolização por microssoma (preto), ao lado encontra-se a figura ampliada (A); e B da metabolização por microssoma hepático de ratos (preto) e oxidação com catalisador de Jacobsen (vermelho). Em ambos os casos o primeiro sinal é referente à grandisina e o segundo é referente ao metabólito. Espectro de massas do metabólito (C) e produto de oxidação respectivamente (D).

Figura 26 - Espectro de ESI-MS obtido para a deidrograndisina (valor teórico calculado como m/z 431,2064; erro experimental de 0,5 ppm).

Figura 27 - Comparação entre os espectros de RMN ^1H obtidos para grandisina (espectro inferior) e deidrograndisina (espectro superior) em CDCl_3 .

Figura 28 - Comparação entre os espectros de UV-Vis obtidos para grandisina ($0,7 \cdot 10^{-4}$ mol/L) e deidrograndisina ($4,4 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em acetonitrila.

Figura 29 - Comparação entre os espectros de dicroísmo circular CD obtidos para a grandisina ($0,7 \cdot 10^{-4}$ mol/L) e deidrograndisina ($4,4 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em acetonitrila.

Figura 30 - Deidrograndisina, o metabólito formado a partir da grandisina pela técnica de metabolização *in vitro* que utiliza microssoma hepático de ratos e o produto de oxidação obtido através da reação com o catalisador de Jacobsen (catálise química).

Figura 31 - Curvas obtidas para a linearidade (A) e precisão intermediária (B, C e D) no processo de validação da metodologia analítica para determinação de grandisina em plasma de camundongos da linhagem Balb/c.

Figura 32 - Cromatogramas obtidos na metodologia analítica desenvolvida que demonstram a seletividade do método. Em A, solvente no modo SCAN; em B, branco (plasma) no modo SCAN; em C, licarina no modo SCAN; em D, deidrograndisina (M1) no modo SCAN; em E, grandisina no modo SCAN.

Figura 33 - Cromatogramas obtidos na metodologia analítica desenvolvida que demonstram a seletividade do método. Em A, solução de licarina e grandisina no modo SCAN; em B, solução de licarina e deidrograndisina no modo SCAN; em C, solução de deidrograndisina e grandisina no modo SCAN.

Figura 34 - Cromatogramas obtidos na metodologia analítica desenvolvida que demonstram a seletividade do método. Em A, solução de licarina, deidrograndisina e grandisina no modo SCAN; e finalmente em B, C e D análise no modo MRM de solução contendo licarina, grandisina e deidrograndisina com seus respectivos

sinais.

Figura 35 – Cromatograma no modo SCAN para demonstrar a ausência de efeito da matriz na supressão de íons dos analitos (“efeito matriz”). 71

Figura 36 – Cromatogramas da análise do plasma pertencente ao animal 5 no tempo de 5 minutos (A); animal 3 no tempo de 40 minutos (B); e animal 5 no tempo de 4 horas (C) após a administração de formulação contendo grandisina. O cromatograma está com ênfase na região de monitoramento da deidrograndisina (431,1 → 195) tempo de retenção entre 3,0 e 3,75 minutos. 73

Figura 37 – Gráfico da concentração plasmática de grandisina após a administração de formulação por via intravenosa. 74

Figura 38 – Gráfico em escala logarítmica da concentração plasmática de grandisina após a administração de formulação por via intravenosa. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Plantas nas quais foram relatadas a presença de grandisina e seu respectivo local de incidência.	03
Tabela 2 – Gradiente de fase móvel desenvolvido para estudo de degradação forçada da grandisina.	19
Tabela 3 – Gradiente de fase móvel para análise no UPLC-DAD-MS/MS.	32
Tabela 4 – Amostras analisadas na seletividade e suas respectivas composições.	33
Tabela 5 – Composição das soluções utilizadas para a confecção das curvas de calibração e dos controles de qualidade.	35
Tabela 6 – Volume administrado conforme peso dos animais.	37
Tabela 7 - Comparação entre os dados de RMN de ^1H previamente publicados (LOPES, 1996) e experimentais (CDCl_3 , dados publicados obtidos em 200 MHz e experimentais em 300 MHz, δ e J em Hz).	46
Tabela 8. Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C previamente publicados (LOPES, 1996) e experimentais (CDCl_3 , dados publicados obtidos em 50 MHz e experimentais em 75 MHz, δ em Hz).	47
Tabela 9 – Quantidade de grandisina em % remanescente após diferentes períodos de exposição aos agentes degradantes conforme preconizado para o ensaio de estabilidade por degradação forçada (informe técnico da ANVISA nº1 de 15 de julho de 2008).	51
Tabela 10 – Principais metabólitos formados a partir da grandisina e sua respectiva técnica utilizada ou agente biotransformador.	61
Tabela 11 - Resultados para exatidão intracorrida e intercorrida.	71
Tabela 12 - Resultados para precisão intracorrida e intercorrida.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LC/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas
LC/MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a Espectrômetro de Massas que analisa fragmentos de íons selecionados
CYP450	Citocromo P450
UGT	Uridina Difosfoglucuronosil Transferase
GST	Glutathione S-Transferase
NAT	N-Acetil Transferase
ST	Sulfo Transferase
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato na forma Reduzida
UDPGA	Ácido Uridina Difosfato Glicurônico
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta e Visível
CLAE-DAD	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos
CG-EM	Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
PA	Para Análise
IE-EM	Espectrômetro de Massas com Ionização por Elétrons
ESI-EM	Espectrômetro de Massas com Ionização por Elétron-Spray
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
C18	Fase estacionária com Octadecilsilanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
PTFE	Politetrafluoretileno
UFLC	Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido
PEG	Polietilenoglicol
UPLC-DAD	Cromatógrafo Líquido de Alta Performance acoplado a Detector de Arranjo de Diodos
EPR	Erro Padrão Relativo
SCAN	Modo de aquisição do espectrômetro de massas por Varredura
SIM	Modo de aquisição do espectrômetro de massas por Monitoramento do Íon Selecionado
CV	Coefficiente de Variação
SUS	Sistema Único de Saúde

USP	Universidade de São Paulo
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
ESI	Ionização por Electrospray
IE	Ionização por Elétrons
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FDA	Food and Drug Administration
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
NT	Não Tratados
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
γ -GT	Gama Glutamiltransferase
CPK	Creatinofosfoquinase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
CT	Colesterol Total
PBS	Tampão Fosfato Salina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
FFCLRP-USP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo
NPPNS	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (grau de pureza do solvente)
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
MCPBA	Ácido <i>m</i> -Cloroperoxibenzóico
TBHP	<i>tert</i> -Butilidroperóxido
DC	Dicroísmo Circular
DMSO	Dimetilsulfóxido
CPRG	Chlorophenol Red β D-Galactopyranoside
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
QT	Analisador de Triplo Quadrupólo em sequência
MRM	Monitoramento de Múltiplas Reações
RF	Radio Frequência

UPLC-DAD-MS/MS	Cromatógrafo Líquido de Alta Performance acoplado a Detector de Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas que analisa fragmentos de íons selecionados
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
CQA	Amostra de Controle de Qualidade de Alta concentração
CDD	Amostra de Controle de Qualidade de Diluição
q.s.p.	Quantidade suficiente para
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada

LISTA DE SÍMBOLOS

V	Volts
eV	Eletronvolts
kV	Kilovolts
L	Litros
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
H	Hora
min	Minutos
S	Segundos
MHz	mega Herz
Hz	Herz
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
m Ω	Miliohms
Kg	Kilogramas
G	Grama
mg	Miligrama
μ g	Micrograma
ng	Nanograma
β	Beta
$\rightarrow$	sentido da fragmentação
%	Porcentagem
mdeg	Miligraus
θ	Elipicidade
D	Pureza isotópica
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
N	Normal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
CuSO ₄	Sulfato de cobre

$\pm$	Mais ou menos
v/v	Relação volume/volume
MeOH	Metanol
rpm	Rotações por minuto
H ₂ O	Água
nm	Nanômetros
cm	Centímetro
PhIO	Iodosilbenzeno
Fe(TPP)Cl	Tetrafenilporfirina
μmol	Micromol
$[\alpha]_D$	Rotação específica
NaCl	Cloreto de sódio
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% de algum agente biológico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
m/z	Relação massa/carga
U	Unidade de massa
δ	Deslocamento químico
δ_H	Deslocamento químico do hidrogênio
J	Constante de acoplamento
ppm	Parte por milhão
pH	Potencial hidrogeniônico
λ_{max}	Comprimento de onda máximo
k_e	Constante de eliminação
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
$ASC_{0 \rightarrow \infty}$	Área sob a curva do tempo zero a infinito
V_d	Volume de distribuição
C_{p0}	Concentração plasmática no tempo zero

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e siglas	viii
Lista de símbolos	xi
<i>Introdução</i>	01
<i>Objetivos</i>	10
<i>Materiais e métodos</i>	12
<i>1. Purificação de grandisina a partir de extratos de Piper solmsianum</i>	13
<i>1.1 CLAE-DAD</i>	14
<i>1.2. ESI-EM</i>	14
<i>1.3. CG-EM</i>	14
<i>1.4 RMN ^1H e ^{13}C</i>	15
<i>1.6. Dicroísmo circular</i>	15
<i>2. Determinação da estabilidade da grandisina</i>	16
<i>2.1. Metodologia para estudo de estabilidade por degradação forçada</i>	16
<i>2.1.1. Degradação por ácido</i>	17
<i>2.1.2. Degradação por base</i>	17
<i>2.1.3. Degradação por peróxido de hidrogênio</i>	17
<i>2.1.4. Degradação fotólica</i>	18
<i>2.1.5. Degradação por metais</i>	18
<i>2.1.6. Degradação térmica</i>	18
<i>2.1.7. Degradação por umidade</i>	19

2.2. Desenvolvimento de metodologia analítica	19
2.3. Curva de Calibração	20
3. Avaliação da toxicidade aguda em camundongos tratados com grandisina	21
3.1. Avaliação dos parâmetros bioquímicos no soro de animais tratados com grandisina	21
3.2. Análise estatística	22
4. Metabolismo in vitro de grandisina	23
4.1. Avaliação de metabólitos através do modelo utilizando ceco de porco	23
4.1.1. Animais e coleta do material fecal	23
4.1.2. Preparo das amostras e incubação	23
4.1.3. Inativação das bactérias e preparo das amostras para análises cromatográficas	24
4.1.4. Análise em UPLC-DAD	24
4.2. Metodologia de oxidação utilizando reagente de Jacobsen	25
4.2.1. Reações de oxidação utilizando reagente de Jacobsen e padronização da técnica	25
4.2.2. Metodologia de análise da oxidação utilizando reagente de Jacobsen	26
4.2.3. Cinética da oxidação utilizando reagente de Jacobsen	26
4.2.4. Isolamento do produto de oxidação e caracterização estrutural	26
4.2.4.1. ESI-EM	27
4.2.4.2. CG-EM	27
4.2.4.3. RMN ^1H	27
4.2.4.4. Rotação específica	28
4.2.4.5. Dicroísmo circular	28
4.3. Comparação dos resultados obtidos pelos ensaios de oxidação com catalisador de Jacobsen e metabolização in vitro com microssomas hepáticas	28
4.3.1. Preparação dos microssomas	28
4.3.2. Identificação dos metabólitos obtidos por microssomas e comparação com os resultados da oxidação com catalisador de Jacobsen	29
4.4. Ensaio de atividade tripanossomicida do produto de oxidação	29

5. Farmacocinética da Grandisina e estudo do metabolismo in vivo	30
5.1. Animais	30
5.2. Coleta de plasma	30
5.3. Preparo das amostras	31
5.4. Desenvolvimento de Metodologia Analítica	31
5.5. Validação de metodologia analítica para determinação de grandisina em plasma	32
5.5.1. Seletividade e Efeito Matriz	33
5.5.2. Linearidade (Curva de calibração) e Limites de detecção e quantificação	34
5.5.3. Precisão e Acurácia	35
5.5.4. Estabilidade	36
5.6. Preparação da solução de grandisina para administração intravenosa	36
5.7. Ensaio de Farmacocinética com administração intravenosa	36
Resultados e Discussão	38
1. Purificação de grandisina a partir de extratos de <i>P. solmsianum</i>	39
1.1. Caracterização estrutural e determinação da pureza	41
2. Determinação da estabilidade da grandisina	48
2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica e curva de calibração	48
2.2. Estudo de Estabilidade por Degradação Forçada	49
3. Investigação da toxicidade oral aguda e das alterações bioquímicas séricas em camundongos tratados com grandisina	52
4. Metabolismo in vitro de grandisina	56
4.1. Metabolização de grandisina através do modelo utilizando bactérias do ceco de porco	56
4.2. Metabolização através de catálise química e por sistema microssomal hepático de ratos	58
4.3. Caracterização da deidrograndisina e atividade tripanossomicida	61
5. Farmacocinética da Grandisina	66
5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de	66

<i>grandisina em plasma</i>	
<i>5.2. Farmacocinética e metabolismo in vivo</i>	72
<i>Conclusões</i>	76
<i>Referências Bibliográficas</i>	78

Introdução

O uso de plantas para o tratamento de doenças é muito antigo e difundido por todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que entre 70 e 80 % da população do mundo utiliza plantas medicinais como medicamentos (World Health Organization, 2008). Nas décadas de 80, 90 e 2000, das 1130 novas drogas desenvolvidas, 50 eram originárias de plantas ou produtos naturais, e um número significativo, aproximadamente 22 %, são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (Newman & Cragg, 2012). No Brasil, das cerca de 35 mil espécies vegetais (Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013), apenas 71 espécies estão na lista do RENISUS e são reconhecidas pelo Ministério da Saúde como plantas medicinais (Ministério da Saúde, 2010). Além disso, uma análise das espécies vegetais presentes nesta lista e consideradas como medicinais revela que poucas são as nativas do país. Este cenário, por sua vez, contrasta com o fato do Brasil deter uma das maiores biodiversidades do planeta e aponta o quanto o país deixa de ganhar ao não investir na exploração sustentável de sua biodiversidade.

Tendo em vista este cenário e entendendo essa necessidade para o país, o Governo Federal passou então a posicionar a pesquisa e o desenvolvimento de fitoterápicos como um ponto estratégico para o fortalecimento do Complexo Industrial da Saúde. A implantação de políticas de incentivo como a pesquisa de novos ativos ou de novos medicamentos baseados em princípios ativos originários da biodiversidade nacional visa promover o fortalecimento do setor farmacêutico nacional e a inclusão destes medicamentos no Sistema Único de Saúde (SUS). Assim, estas medidas visam fortalecer o setor farmacêutico nacional e o Sistema Único de Saúde.

A grandisina, figura 1, é uma lignana tetrahidrofurânica isolada de várias espécies vegetais de diferentes famílias, inclusive em três espécies presentes no Brasil (tabela 1). Essa substância apresenta diversas atividades biológicas como larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, atividade antinoceptiva, anti-inflamatória, antitumoral (Cabral *et al.*, 2009, Carvalho *et al.*, 2010; Valadares *et al.*, 2009; Valadares *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2011) e antiparasitária (Lopes *et al.*, 1998). Estudos anteriores mostraram que as lignanas, em especial as tetraidrofurânicas veraguensina e grandisina, possuem significativa atividade tripanossomicida e os estudos de toxicidade demonstraram a segurança desta lignana. Os resultados destes estudos demonstraram que as lignanas citadas apresentaram uma eficiência aproximadamente 50 vezes maior que a violeta de genciana o controle positivo desse tipo de ensaio (Lopes *et al.*, 1998). Este fato motivou os pesquisadores a realizar um pedido de patente, o qual não foi concedido devido a publicações anteriores descrevendo essa ação, o que atesta ainda mais sua importância. Desse modo, a eficácia comprovada *in vitro* contra o

parasita causador de uma doença negligenciada, que é epidêmica no Brasil, estimula a realização de estudos mais aplicados que possibilitem o ensaio *in vivo* em cobaias e com resultados positivos permitirá futuramente embasar estudos clínicos em humanos. O sucesso dessa ação conjunta poderá permitir, no futuro, o desenvolvimento de um medicamento de origem natural utilizando a grandisina.

Figura 1 – Estrutura química da lignana grandisina.

Tabela 1 – Plantas nas quais foram relatadas a presença de grandisina e seu respectivo local de incidência.

Espécie	Nome Popular	Família	Local de incidência*	Referência Bibliográfica
<i>Aglaia leptantha</i>	Segera	Meliaceae	Ilha de Borneo	Greger <i>et al.</i> , 2000; Chai, 2000
<i>Cryptocarya crassinervia</i>	Medang	Lauraceae	Indonésia e Malásia	Saad <i>et al.</i> , 1991; Chai, 2000
<i>Kadsura longipedunculata</i>	Pi Zhen Ye Nan Wu Wei Zi (Lanceolate Kadsura)	Schisandraceae	China	Pu <i>et al.</i> , 2008; Zhou, Xie & Yang, 2011
<i>Licaria aurea</i>	Folha de ouro; folha dourada	Lauraceae	Amazônia	Barbosa-Filho <i>et al.</i> , 1989; Instituto de Pesquisa do

				Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013
				Holloway & Scheinmann, 1974; Chai, 2000
<i>Litsea grandis</i>	Medang	Lauraceae	Ásia tropical	
	Zahng Ye Hu			
<i>Piper polysyphorum</i>	Jiao (Camphortreeleaf Pepper)	Piperaceae	China	Ma <i>et al.</i> , 1991; Zhou, Xie & Yang, 2011
<i>Piper solmsianum</i>	Caapeba; pariparoba	Piperaceae	Brasil (Mata Atlântica dos estados: SP, ES, RJ, PR, SC)	Martins <i>et al.</i> , 2000; Guimarães & Monteiro, 2006
<i>Rhaphidophora decursiva</i>	-	Araceae	Vietnã e Tailândia	Zhang <i>et al.</i> , 2001
<i>Virola surinamensis</i>	Andiroba; Ucuúba	Myristicaceae	Amazônia, Costa Rica e Trinidad & Tobago	Lopes <i>et al.</i> , 1996

* para o registro de localização da distribuição da espécie vegetal, além da referência que cita a ocorrência da grandisina o local de coleta do material vegetal utilizado, também foi utilizado o sítio: www.tropicos.org, o qual pertence ao Jardim Botânico da Universidade do Mississippi.

Apesar do interesse de desenvolvermos um medicamento a base de grandisina não podemos esquecer que o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo demorado e de alto custo (Paul *et al.*, 2010). Alguns fatores podem contribuir para este longo tempo, tais como a perda de eficácia e constatação de efeitos adversos durante estudos clínicos. Esse segundo ponto responde por 60% de insucesso, enquanto que o conhecimento insuficiente das propriedades metabólicas e farmacocinéticas representa uma fonte de insucesso em torno de 10% dos compostos avaliados durante o desenvolvimento de um novo fármaco (Kola & Landis, 2004). Assim, os estudos de metabolismo e de farmacocinética podem ser de fundamental importância nas fases de descoberta de medicamentos e pode proporcionar uma redução de tempo e custos para o desenvolvimento do medicamento (Paul *et al.*, 2010).

A avaliação do metabolismo de uma substância fornece informações relevantes, como por exemplo, a via de metabolização e quais são os metabólitos formados. Essas informações podem impactar diretamente na estratégia de desenvolvimento de novos medicamentos e influenciar no desenvolvimento de novas drogas indicando uma necessidade de alteração da estrutura da molécula para aumentar a eficácia e/ou segurança (Gunaratna, 2000).

O estudo de metabolismo compreende diversos testes *in vitro* e testes farmacocinéticos *in vivo*, os quais necessitam ser realizados antes de serem utilizados nos ensaios clínicos em humanos. Além disso, este tipo de estudo está incluído nas exigências das agências reguladoras para permitir que uma substância possa ser avaliada clinicamente (Baranczewski *et al.* 2006).

Atualmente, a fase de avaliação de metabolismo *in vitro* apresentou um grande avanço gerando resultados que são complementares aos estudos de metabolismo *in vivo*. Este avanço foi obtido pela evolução das técnicas de separação e identificação de compostos, tais como LC/MS e LC/MS/MS, que aumentaram a sensibilidade e a robustez dos métodos desenvolvidos além do desenvolvimento de reagentes e enzimas que simulam as reações de metabolização *in vitro*. Assim, os ensaios *in vitro* podem proporcionar resultados que auxiliam o processo de desenvolvimento de novos fármacos e diminuem o número de animais utilizados em ensaios *in vivo*.

A metabolização de fármacos ou xenobióticos compreende reações catalisadas por enzimas que são divididas em duas fases: reações de fase I e de fase II. A primeira etapa do metabolismo (fase I) engloba reações de oxidação, redução e hidrólise. Por sua vez, a segunda fase (fase II) do metabolismo compreende a etapa de conjugação, envolvendo reações de glicuronidação, sulfatação, acilação, metilação e a formação de adutos de glutathione (Laine, 2008). Vários órgãos podem atuar nestas fases, tais como rins, intestinos, pulmões, cérebro, epitélio nasal e pele, entretanto o fígado é o principal órgão envolvido no processo de metabolização.

O fígado possui um grupo de hemoproteínas oxidativas, denominadas citocromo P450 (CYP450), que são as principais responsáveis pelas reações de biotransformação de fase I. Já as principais enzimas envolvidas nas reações de fase II são: uridina difosfoglicuronosil transferase (UGT), glutathione S-transferase (GST), N-acetil transferase (NAT) e sulfotransferase (ST) (Asha & Vidyavathi, 2010). Assim, para a realização dos estudos *in vitro*, os tecidos e/ou frações hepáticas são os sistemas mais adequados à realização de estudos metabólicos, entre os quais se destacam os microsossomas hepáticos e enzimas recombinantes (superssomas) (Li, 2004; Lahoz *et al.*, 2008).

O sistema microsossomal hepático é o modelo *in vitro* mais empregado em estudos de metabolismo, o qual consiste em uma fração sub-celular do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos e são obtidos por meio de homogeneização do fígado e centrifugação diferencial (Omura & Sato, 1964). Estes microsossomas isolados são utilizados na avaliação das reações de fase I do metabolismo e pela adição de um cofator como NADPH. Entretanto, os microsossomas também podem ser usados em estudos de glicuronidação pela adição de ácido uridina difosfato glicurônico (UDPGA).

As principais vantagens do uso dos microsossomas hepáticos são a simplicidade e o baixo custo além de ser um modelo bem caracterizado. A principal limitação deste modelo *in vitro* é que os microsossomas não apresentam enzimas citosólicas (GST e ST) e geralmente a quantidade de metabólito produzida não é muito alta (Brandon *et al.*, 2003).

Outra estratégia experimental utilizada nos testes *in vitro* são as catálises biomiméticas utilizando metaloporfirinas. Estes reagentes possuem estrutura muito semelhante ao CYP P450, logo podem induzir reações de oxidação nos fármacos as quais podem ocorrer no CYP 450. Assim, as reações biomiméticas podem gerar possíveis metabólitos dos compostos sob investigação em uma escala maior do que no sistema microsossomal e auxiliar no entendimento da via de metabolização destes pelo CYP 450 (Melo *et al.*, 2005). Além disso, os produtos

gerados nesta reação podem ser utilizados em estudos de toxicidade e farmacológicos para melhor compreensão da segurança e eficácia do futuro fármaco (Bernadou & Meunier, 2004).

Os primeiros estudos utilizando este sistema biomimético foram desenvolvidos na década de 70. Groves e colaboradores (1979) estudaram a oxidação de hidrocarbonetos pouco reativos e utilizaram porfirinas da primeira geração. As primeiras metaloporfirinas desenvolvidas permitiam poucos ciclos catalíticos e se oxidavam facilmente. Posteriormente, a segunda geração de metaloporfirinas aumentou a reatividade do complexo oxidativo e diminuiu a degradação deste catalisador através da inserção de grupos retiradores de elétrons na posição meso-porfirínica. A terceira geração apresentou a inserção de grupos retiradores de elétrons na posição β -pirrólica (Reedjik & Bouwman, 1999). Alguns exemplos de metaloporfirinas de diferentes gerações estão presentes na figura 2.

As vantagens do uso das metaloporfirinas para os estudos *in vitro* de metabolismo são: ausência de utilização de animais, reprodutibilidade e maior rendimento da reação quando comparados com os microsossomas hepáticos. Logo também fica clara a maior facilidade de isolamento dos produtos do meio reacional em comparação aos produtos gerados pelos microsossomas hepáticos (Bernadou & Meunier, 2004; Santos, Lopes & Iamamoto, 2008).

Essa comparação é fundamental para o direcionamento das reações biomiméticas, uma vez que essas reações podem levar a uma produção de metabólitos em número maior que os produzidos nas reações de fase I. Recentemente Niheus e colaboradores (2012) mostraram que a catalise biomimética com o produto natural lapachol levou a formação de 11 metabólitos, enquanto apenas 3 deles são formados *in vivo*, confirmando a necessidade de reconhecer quais são os metabólitos de interesse antes da obtenção em maior escala.

Figura 2 – Algumas metaloporfirinas utilizadas em ensaio biomiméticos.

Portanto, os modelos acima apresentados são empregados na obtenção de informações preliminares quanto à biotransformação e também podem prever algum tipo de interação fármaco-receptor (Ekins *et al.*, 2000). O melhor modelo empregado, para uma dada situação, depende de alguns fatores, como a semelhança com o resultado esperado em um ensaio *in vivo*, custo, disponibilidade do modelo e considerações éticas.

Alguns dados de biotransformação da grandisina estão descritos em estudos empregando fungos, insetos e lagartas (Ramos *et al.*, 2008; Verza *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2011). Entretanto, é necessário mais informações sobre o metabolismo da grandisina, principalmente em modelos de mamíferos, para que se possa avaliar a possibilidade de desenvolvimento de um fármaco contendo a grandisina como ativo. Também é importante avaliar os parâmetros de farmacocinética, como por exemplo, a eliminação e a metabolização *in vivo* deste composto.

Uma substância com média a baixa polaridade pode possuir problemas em sua administração, principalmente porque diversos modos de administração requerem sistemas aquosos ou que contenham água. Essa característica físico-química também indica que pode haver uma grande distribuição e possuir diferentes vias de metabolização resultando em uma baixa eliminação e um tempo de meia-vida elevado. Dessa forma, os metabólitos devem ser caracterizados para garantir que não sejam tóxicos e tentar descrever a via de metabolização.

Assim, os principais objetivos deste estudo foram, a partir do isolamento da lignana, caracterizar o metabolismo *in vitro* e *in vivo* da grandisina e calcular os parâmetros farmacocinéticos através da administração intravenosa desta lignana. Para isso, estudos complementares foram realizados para garantirem a segurança na administração, ensaio de toxicidade, e comprovarem a estabilidade da lignana, degradação forçada.

Objetivos

Os objetivos gerais desse trabalho foram a caracterização do metabolismo *in vitro* e *in vivo* da grandisina e a obtenção dos parâmetros farmacocinéticos através da administração intravenosa desta lignana. Para isso, estudos complementares foram realizados para garantirem a segurança na administração, ensaio de toxicidade; e comprovarem a estabilidade da lignana, degradação forçada.

Objetivos específicos:

- a) Obter a grandisina a partir de *Piper solmsianum*;
- b) Caracterizar a grandisina obtida e determinar seu grau de pureza;
- c) Verificar a estabilidade da grandisina em ensaio de degradação forçada;
- d) Verificar a toxicidade da grandisina;
- e) Verificar a metabolização da grandisina pela microbiota intestinal de porcos;
- f) Verificar a oxidação da grandisina no modelo biomimético com metaloporfirinas como catalisadores organometálicos;
- g) Caracterizar os metabólitos produzidos nos ensaios de metabolização *in vitro* da grandisina;
- h) Validar metodologia analítica para quantificar grandisina em plasma e verificar a formação de metabólitos *in vivo*;
- i) Realizar estudo piloto da farmacocinética da grandisina por administração intravenosa em camundongos e verificação da metabolização *in vivo* desta lignana.

Material e Métodos

1. Purificação de grandisina a partir de extratos de *Piper solmsianum*

Os extratos utilizados para a obtenção da grandisina utilizada neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato do Instituto de Química da USP campus São Paulo. A coleta de *P. solmsianum* foi realizada em Ubatuba (SP) pelo Prof. Dr. Kato sob autorização do CGEN nº 005/2009. A identificação foi realizada pelo Dr. Elci Franklin Guimarães do Jardim Botânico do Rio de Janeiro onde um *voucher* da espécimen foi depositado com o nº 329676.

Os extratos foram obtidos a partir da maceração de folhas rasuradas de *P. solmsianum* sendo que se diferenciavam pelo solvente extrator. Um extrato utilizava acetato de etila e o outro diclorometano. Para o isolamento da grandisina, a técnica de *short column* foi utilizada, com o objetivo de se obter mais rapidamente a quantidade suficiente da lignana para todo o estudo proposto.

Inicialmente foi preparada uma pastilha a partir da adição de 2 g de sílica gel a 8g do extrato seco e adição de pequeno volume de acetato de etila. A pastilha foi depositada em uma coluna (28,5 x 4,5 cm) com 90g de sílica gel 60 e condicionada com a fase móvel *n*-hexano/acetato de etila na proporção 8:2. A coluna foi eluída com esta fase móvel. Após a coleta dos 500 mL iniciais, foram recolhidas aproximadamente 15 frações de 200 mL. Todas as frações foram analisadas em CCDC (Merck®) utilizando como fase móvel uma solução de acetato de etila/*n*-hexano na proporção 55:45. As placas de CCDC foram reveladas com luz UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e solução de anisaldeído ou sulfato cérico. Após a observação que a grandisina havia eluído o processo de fracionamento foi interrompido e foi coletado 500 mL como pós-coleta utilizando metanol como solvente. Em todas as colunas realizadas, a grandisina eluiu aproximadamente entre as frações 5 e 12. As frações que continham grandisina foram reunidas e submetidas à recristalização utilizando metanol como solvente. Os solventes utilizados eram da marca Synth® com grau de pureza PA, o sulfato cérico e o anisaldeído eram da marca Sigma Aldrich®.

Após o isolamento, a grandisina foi analisada em CLAE-DAD e CG-EM para se determinar sua pureza cromatográfica. Também foram obtidos os seus espectros de massas por IE-EM, durante análise no CG-EM e ESI-EM, além dos espectros de RMN ¹H e ¹³C para identificação do produto isolado. A seguir seguem as especificações dos equipamentos e as condições experimentais das técnicas utilizadas.

1.1 CLAE-DAD

As análises em CLAE-DAD foram realizadas em equipamento da marca Shimadzu®, equipado com bombas de solvente LC-20AD, sistema de controle CBM-20A Shimadzu, detector arranjo de diodos UV/VIS SPD-M20AV Shimadzu e injetor manual. A coluna utilizada foi Shim-pack, C₁₈ (250mm x 5mm x 4,6 µm, Shimadzu) equipada com uma pré-coluna de mesmo material. As amostras foram solubilizadas em metanol para serem analisadas. A fase móvel era composta por acetonitrila e água, ambas contendo 1% de ácido acético, e o gradiente de eluição utilizado foi um aumento na proporção de acetonitrila de 10 a 100 % entre 0 e 30 minutos com a manutenção em 100% da fase orgânica durante 10 minutos. O detector foi ajustado para monitorar entre 190 e 800 nm durante todo o período de análise.

1.2. ESI-EM

As análises foram realizadas em espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupolo e tempo de voo (UltrTOF-Q Bruker-Daltonics®) com ionização por electrospray (ESI), operando no modo positivo. As condições experimentais consistiam em voltagem do capilar de 4000 V; o gás nebulizador foi o nitrogênio; e a temperatura do gás foi 160°C; o fluxo do gás foi 4 L/h. As amostras foram solubilizadas em solução de metanol/água na proporção 9:1 e infundidas diretamente no espectrômetro.

1.3. CG-EM

O equipamento utilizado é da marca Shimadzu® modelo QP2010, com autoinjeter e autoamostrador modelo AOC5000. As condições de análise no equipamento foram: volume de injeção 1,0 µL; com divisão da amostra na injeção com taxa de 1:40; temperatura do injetor de 250°C; a temperatura da interface foi de 280°C e a da fonte de ionização 250°C; o modo de ionização foi ionização por elétrons, utilizando energia de 70 eV para fragmentação e modo de aquisição como varredura de compostos com m/z entre 40 e 500. O tempo de início de aquisição de dados foi de 4 minutos. O gradiente de temperatura teve início com a manutenção do forno a 120°C durante 4 minutos. A temperatura foi elevada a uma taxa de 8°C/min até 300°C quando a temperatura foi novamente mantida constante por mais 12 minutos.

1.4 RMN ^1H e ^{13}C

As análises foram realizadas em espectrômetro Bruker-Advance® modelo DPX 300 do departamento de química da FFCLRP. O equipamento operou respectivamente em 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C . As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado (CDCl_3 (d = 99,8 %), Sigma-Aldrich, Co.) e transferidas para tubos de RMN de 175 x 5 mm (Sigma-Aldrich®). As estruturas das substâncias isoladas foram propostas e os dados comparados com dados previamente publicados na literatura.

1.6. Dicroísmo circular

A análise de dicroísmo circular (DC) foi utilizada para se determinar o perfil referente aos centros estereoquímicos *R,R,R,R* no anel tetraidrofurânico. Assim, o espectro foi adquirido para a concentração de $0,7 \times 10^{-4}$ mol/L utilizando a acetonitrila como solvente. O equipamento utilizado foi o polarímetroespectroscópico da marca Jasco® modelo J-180 acoplado ao dispositivo PTC-423S para controle da temperatura. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,2 cm. O espectro apresentado como resultado é referente a uma média de duas análises adquiridas pelo equipamento. A linha de base, obtida pela análise do solvente, foi subtraída de todas as análises. As condições da varredura foram taxa de 200 nm/min no modo contínuo, *spectral bandwidth* de 0,50 nm, e resposta de 0,5 s. Os espectros foram adquiridos entre 200 nm e 550 nm na temperatura de 25 °C. Através dos dados obtidos, também foi possível determinar o espectro de UV na faixa analisada.

2. Determinação da estabilidade da grandisina

2.1. Metodologia para estudo de estabilidade por degradação forçada

O estudo de estabilidade da grandisina foi baseado no informe técnico da ANVISA nº1 de 15 de julho de 2008 para verificar o efeito dos agentes degradantes diretamente na lignana. O estudo foi realizado durante o período de 10 dias, porém todos os parâmetros também foram avaliados em intervalos inferiores ao período máximo do estudo. A justificativa para o ensaio em intervalos menores de tempo foi verificar o início de qualquer degradação e para, caso necessário, cessar o estudo quando a degradação atingisse o valor de 30 %, conforme é preconizado pela legislação. Dessa forma, foram avaliados todos esses parâmetros após 3 horas da exposição aos agentes degradantes, além de 1, 3 e 7 dias após a exposição.

Apesar de alguns ensaios utilizarem solução aquosa, a baixa solubilidade da grandisina nesse solvente poderia não permitir uma interação efetiva da grandisina com o agente degradante. Assim, os estudos foram padronizados e os ensaios foram realizados com a lignana solubilizada em metanol na concentração de 992 µg/mL. Também é importante destacar que, em todos os ensaios, as soluções eram filtradas em filtro de PTFE com poros de 0,22 µm de diâmetro da marca Millipore® para serem analisadas no UFLC. Exceto no ensaio de degradação fotólica, as amostras de grandisina foram armazenadas em armário ao abrigo da luz e a temperatura foi mantida constantemente à 25 °C com auxílio de aparelho de ar-condicionado. A água deionizada utilizada (18 mΩ, Milli-Q) foi obtida através de sistema de ultrapurificação da marca Gehaka® e os microtubos plásticos tipo ependorff com capacidade de 2 mL eram da marca Axygen®.

2.1.1. Degradação por ácido

Para o ensaio de maior tempo de duração (7 e 10 dias), foram adicionados 200 µL de solução de HCl (F. Maia[®]) 0,1 N à 1 mL de solução de padrão de grandisina. Após esse período, as amostras eram neutralizadas com 200 µL de solução de NaOH 0,1 N e o volume completado para 2 mL com metanol. Para os demais dias de teste (0, 1 e 3 dias) a proporção foi ajustada para um volume final de 0,5 mL. Assim, 50 µL de solução de HCl 0,1 N foram adicionados à 250 µL de solução de padrão de grandisina. Após o período do ensaio a amostra era neutralizada com 50 µL de solução de NaOH 0,1 N e o volume era completado para 0,5 mL com metanol.

2.1.2. Degradação por base

Foram adicionados 200 µL de solução de NaOH (Quemis[®]) 0,1 N à 1 mL de solução de padrão de grandisina nos ensaios para 7 e 10 dias. Após esse período, as amostras eram neutralizadas com 200 µL de solução de HCl 0,1 N e posteriormente o volume era completado para 2 mL com metanol. Para os demais dias de teste (0, 1 e 3 dias) a proporção foi ajustada para um volume total final de 0,5 mL. Assim, 50 µL de solução de NaOH 0,1 N foram adicionados à 250 µL de solução de padrão de grandisina. Após o período do ensaio a amostra era neutralizada com 50 µL de solução de HCl 0,1 N e o volume era completado para 0,5 mL com metanol.

2.1.3. Degradação por peróxido de hidrogênio

Para o teste apenas com a lignana, nos ensaios para 7 e 10 dias, foram adicionados 200 µL de solução de H₂O₂ (Synth[®]) 3% à 1 mL de solução de padrão de grandisina. Após esse período, o volume era, então, completado para 2 mL com metanol. Para os demais dias de teste (0, 1 e 3 dias) a proporção foi ajustada para um volume total final de 0,5 mL. Assim, foram adicionados 50 µL de solução de H₂O₂ 3% à 250 µL de solução de padrão de grandisina. O volume foi completado com metanol para 0,5 mL após o período do ensaio.

2.1.4. Degradação fotólica

Para o teste apenas com a grandisina (sem nenhum outro agente indutor), foram utilizados 1 mL de solução de padrão nos ensaios para 7 e 10 dias e 250 µL de solução de padrão para os demais dias de teste (0, 1 e 3 dias). As soluções foram, então, expostas à irradiação de luz branca em um local fechado e após o período do ensaio as soluções tiveram o solvente eliminado. As amostras dos ensaios de 7 e 10 dias foram ressuspensas em 2 mL de metanol e as demais ressuspensas em 0,5 mL com metanol.

2.1.5. Degradação por metais

Para os ensaios de maior tempo de duração (7 e 10 dias), foram adicionados 200 µL de solução de CuSO_4 0,05 mol/L à 1 mL de solução de padrão de grandisina e o volume completado para 2 mL com metanol. Para os demais dias de teste (0, 1 e 3 dias) a proporção foi ajustada para um volume total final de 0,5 mL. Assim, 50 µL de solução de CuSO_4 0,05 mol/L à 250 µL de solução de padrão de grandisina. Após o período do ensaio o volume era completado para 0,5 mL com metanol.

2.1.6. Degradação térmica

Para o teste apenas com a grandisina, foram utilizados 1 mL de solução de padrão de grandisina nos ensaios para 7 e 10 dias e 250 µL de solução de padrão para os demais dias de teste (0, 1 e 3 dias). As soluções foram, então, armazenadas na mesma estufa seca (Odontobras® modelo EL 1.3) à 60°C e após o período do ensaio, as soluções foram secas. As amostras do ensaio de 7 e 10 dias foram ressuspensas em 2 mL de metanol e as demais ressuspensas em 0,5 mL do mesmo solvente.

2.1.7. Degradação por umidade

Para o teste apenas com a lignana, foram utilizados 1 mL de solução de padrão de grandisina nos ensaios para 7 e 10 dias e 250 µL de solução de padrão para os demais dias de teste (0, 1 e 3 dias). As soluções foram, então, armazenadas na câmara climática (Solab® modelo SL206) com programação para 25°C e 75 UR. Após o período do ensaio, as soluções foram secas. As amostras dos ensaios de 7 e 10 dias foram ressuspensas em 2 mL de metanol e as demais ressuspensas em 0,5 mL.

2.2. Desenvolvimento de metodologia analítica

Para a análise de possíveis degradações da grandisina, foi desenvolvida uma metodologia em equipamento de cromatografia líquida UFLC certificado da marca Shimadzu® com bombas, degaseficador, controlador, autoinjeter, forno e detector modelo 20A. A coluna utilizada foi uma Shimpack® XR-ODS (50 mm x 2 mm x 2,2 µm). Após a obtenção de uma metodologia rápida para a determinação do padrão de grandisina e que também permitisse a observação de eventuais produtos de degradação, foram obtidos os cromatogramas para evidenciar a seletividade do método analítico, ou seja, do solvente e do padrão de grandisina na concentração de 992 µg/mL. O fluxo utilizado foi de 0,3 mL/min e o forno mantido a 40°C. A fase móvel era constituída por água deionizada (A) e acetonitrila (B, J T Baker®). Ambas as fases foram acidificadas com 1:% de ácido acético glacial (J T Baker®). O gradiente da fase móvel está resumido na tabela 2.

Tabela 2 – Gradiente de fase móvel desenvolvido para estudo de degradação forçada da grandisina.

Tempo (minutos)	%B (acetonitrila acidificada)
0,00	30
1,00	30
3,00	80
4,00	80
4,50	90
5,25	90
5,50	100

2.3. Curva de Calibração

Para quantificação da grandisina foi gerada uma curva de calibração com padrão de grandisina solubilizado em metanol. A solução estoque de grandisina foi a mesma utilizada nos ensaios de degradação forçada e possuía a concentração de 992 µg/mL. Esta solução foi utilizada como maior concentração da curva de calibração. As demais soluções foram obtidas a partir da diluição da solução estoque em metanol. As concentrações utilizadas para a confecção da curva de calibração foram 992 µg/mL; 744 µg/mL; 496 µg/mL; 248 µg/mL; e 99,2 µg/mL.

3. Avaliação da toxicidade aguda em camundongos tratados com grandisina

O protocolo para avaliar a toxicidade aguda foi realizado conforme procedimento estabelecido pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos. O desenho experimental avaliado foi o estudo de sinais para a toxicidade oral aguda utilizando doses fixas (OECD, 2001). Os animais foram submetidos a jejum por 12-18 horas antes da administração da grandisina por via oral. Os animais foram pesados para o preparo das amostras nas doses de 5; 50; 300 e 2000mg/Kg de animal. O veículo utilizado para administração da grandisina foi polietilenoglicol (PEG) 300 (Synth[®]). Para a administração das concentrações de 5, 50 e 300mg/Kg foi utilizado 100µL de PEG em uma única dose. Já para dose de 2000mg/Kg foi utilizado 600µL em 3 doses de 200µL, tendo um intervalo de 1 hora entre cada dose. Como controle foram utilizados os animais tratados com PEG em dose única ou com 3 doses de 200µL.

Cada dose foi testada em um animal na ordem crescente de concentração, sendo respeitado o intervalo de 24 horas entre a administração de cada dose (5; 50; 300; 2000mg/Kg). Nas primeiras 2 horas após a administração da grandisina os animais foram monitorados para verificação do aparecimento de sinais de toxicidade, tais como contorções (sofrimento), enrijecimento dos membros e dificuldades no andar. Para a análise dos efeitos crônicos os animais ficaram em observação por 14 dias e após este período foram sacrificados e realizados exames macroscópicos de órgãos (fígado, coração e rins).

3.1. Avaliação dos parâmetros bioquímicos no soro de animais tratados com grandisina

Com base nos resultados do ensaio de toxicidade aguda *in vivo*, a dose de 300mg/Kg foi escolhida para verificar alterações de parâmetros bioquímicos do soro de animais tratados com grandisina. Os principais parâmetros analisados foram: perfil lipídico, níveis de lipoproteínas, indicadores de função hepática e de função renal. Os animais foram separados em 3 grupos, com 6 animais por grupo, sendo estes grupos: animais não tratados (NT), tratados com o veículo (PEG) e tratados com grandisina na dose de 300 mg/Kg por 24 horas.

Após este período, o sangue dos animais coletado foi agrupado (*pool*) contendo 100µL de soro de cada animal. Os parâmetros bioquímicos séricos avaliados foram: glicemia, colesterol total, HDL-colesterol (*High Density Lipoprotein*, Lipoproteína de alta densidade), triglicerídeos, ALT (Alanina aminotransferase), AST (Aspartato aminotransferase), γ -GT

(Gama glutamiltransferase), fosfatase alcalina, amilase, compostos nitrogenados não-proteicos (uréia, creatinina e ácido úrico), bilirrubina total e direta, creatianofosfoquinase (CPK), íons sódio e potássio, em aparelho automatizado Wiener Lab BT 3000 plus® (Wiener Lab), em ensaios enzimáticos e cinéticos.

Os níveis de LDL-colesterol (*Low Density Lipoprotein*, Lipoproteína de baixa densidade) foram calculados pela fórmula de Friedewald (1). Os níveis de VLDL-colesterol (*Very Low Density Lipoprotein*, Lipoproteína de densidade muito baixa) foram calculados por meio da fórmula 2 (Bachorik, Rifkind & Kwiterovich, 1999). Também foi calculada a razão entre os níveis de colesterol total (CT) e os níveis de HDL, sendo representada por CT/HDL.

$$(1) \text{ [LDL - colesterol]} = \frac{[\text{colesterol total}] - [\text{HDL colesterol}] - [\text{triglicerídeos}]}{5}$$

$$(2) \text{ [VLDL]} = \frac{[\text{triglicerídeos}]}{5}$$

3.2. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism (versão 4 Prism, Graph Pad®, USA). Utilizou-se a análise de variância entre os grupos (ANOVA) “one-way”, e o teste complementar de Bonferroni, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$.

4. Metabolismo in vitro de grandisina

4.1. Avaliação de metabólitos através do modelo utilizando ceco de porco

4.1.1. Animais e coleta do material fecal

Para a realização do estudo de metabolismo através desse modelo, é necessário que os animais não possuam tratamento prévio com antibióticos o que não ocorre neste país. Portanto, esse procedimento foi realizado no laboratório do prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf no Instituto de Química dos Alimentos da Universidade *Westfälische Wilhelms-Universität Münster* na cidade de Münster, Alemanha, o qual possui cooperação com o nosso laboratório.

Após a fase de crescimento os animais foram sacrificados com finalidade comercial e o ceco de cada animal foi removido de forma a garantir que o material no seu interior continue em meio anaeróbico. O material foi levado imediatamente ao laboratório para a preservação dos microorganismos. Dentro de uma câmara incubadora de nitrogênio, a qual foi utilizada durante todo o processo de preparo da amostra, as fezes foram distribuídas em alíquotas de aproximadamente 20 g ($\pm 10\%$) em tubos cônicos plásticos de 50 mL (BD Falcon®). Uma parte foi utilizada no estudo e outra parte autoclavada (autoclave da marca Astell®) para utilização posterior como controle negativo, uma vez que as bactérias foram inativadas termicamente. Nesse estudo, são utilizados pelo menos três animais (n= 3) para minimizar possíveis diferenças na microbiota entre os indivíduos.

4.1.2. Preparo das amostras e incubação

Inicialmente, uma solução de sulfeto de sódio foi preparada pela dissolução de 100 mg do sal em 20 mL de solução de NaOH 1 mol/L e 160 mL de PBS pH 6,4. Então, 20 mL dessa solução foram adicionados a um tubo cônico plástico de 50 mL (BD Falcon®) que continha 20g de material fecal fresco. Após homogeneização, o material foi filtrado apenas para remoção de grandes partículas sólidas. Então, 900 μ L da solução filtrada foram adicionados a 100 μ L de solução 1 mmol/L do padrão da lignana a ser analisado. Esse processo foi realizado em duplicata para cada um dos seis tempos de incubação (20, 40, 60, 120, 240 e 480 minutos). Todos os tubos cônicos plásticos de 2 mL (Ependorff®) com as misturas foram levados à estufa de incubação na temperatura de 37°C.

O controle negativo foi submetido ao mesmo procedimento experimental descrito, porém foi utilizado material fecal inativado em autoclave ao invés de fresco. O branco consistia na utilização de 100 µL de metanol (J. T. Baker®) ao invés da solução de grandisina. O controle positivo foi realizado com a utilização de 100 µL de solução de quercetina 1 mmol/L, flavonóide onde já foi verificada metabolização utilizando esse modelo, ao invés da solução da lignana.

4.1.3. Inativação das bactérias e preparo das amostras para análises cromatográficas

A cada tempo determinado de incubação foram retiradas as amostras, controles positivos, controles negativos e brancos, da estufa de incubação. Estas foram imediatamente levadas ao freezer com temperatura de -80°C. Esse procedimento foi aplicado para todos os tempos de incubação. Depois de congeladas completamente, as amostras foram, então, descongeladas em banho térmico com temperatura de 37°C. Imediatamente, adicionou-se 1,0 mL de solução de ácido clorídrico em metanol (1%, v/v). Também foram testadas soluções de ácido clorídrico e SDS em MeOH (1 e 2% respectivamente) e DMSO em MeOH (1%) como soluções de inativação no ensaio com a licarina. Para garantir a completa inativação, as misturas foram levadas a banho de ultrassom por 15 minutos. Após a inativação, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Narco® modelo 2019R) à temperatura de 20 °C e 13000 rpm durante 10 minutos. Uma alíquota de 150 µL foi separada para análise em UPLC-DAD para quantificação dos metabólitos formados. O restante da solução foi armazenado em freezer para posteriormente ser analisado em CG-EM e CLAE-UV-EM para identificação dos metabólitos caso fossem formados.

4.1.4. Análise em UPLC-DAD

Para verificar a formação de metabólitos foi desenvolvida metodologia analítica em UPLC-DAD (Jasco® modelo XLC, o detector UV-DAD Jasco® modelo MD2010, o forno Jasco® modelo CO2060, controlador Jasco® modelo JascoLC-NeII/ADC, bomba modelo PU-2085Plus, degaseficador Jasco® modelo DG2080-53 e misturador Jasco® LG-2080-02S). A fase móvel escolhida foi MeOH (J. T. Baker®, bomba A) e H₂O, com 0,1% de ácido fórmico (água deionizada obtida de equipamento Millipore® e ácido da marca Merck®, bomba B). Foi utilizado gradiente linear de fase móvel, onde em 25 minutos a concentração de MeOH aumentava de 5 para 100%.

A coluna cromatográfica utilizada foi a Nucleodur[®] C₁₈ Isis (150mm x 2mm x 5µm). A temperatura do forno utilizada foi de 30°C, o volume de injeção foi de 50 µL e o fluxo 0,4 mL/min. O monitoramento foi realizado nos comprimentos de onda de 280 e 236 nm. Para quantificação de cada composto foi obtida uma curva de calibração utilizando as concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µmol/L e foi realizado o teste de recuperação da amostra com os tempos de incubação de 0, 20, 40, 60 e 120 minutos.

4.2. Metodologia de oxidação utilizando reagente de Jacobsen

4.2.1. Reações de oxidação utilizando reagente de Jacobsen e padronização da técnica

As reações com reagente de Jacobsen, catalisador, foram realizadas com o auxílio da Profa. Dra. Marilda D. Assis, professora da FFCLRP-USP, e Dra. Valéria P. Barros, pós-doutoranda do NPPNS da FCFRP.

Para a padronização das condições experimentais, todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente, sob atmosfera de ar, em frascos de vidro e com agitação magnética durante 24 horas. Neste estudo, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] e os solventes que possuíam grau de pureza HPLC eram da marca J. T. Baker[®].

Assim, o teste inicial foi realizado utilizando o reagente de Jacobsen como catalisador organometálico, a lignana grandisina como substrato e três diferentes agentes oxidantes: iodosilbenzeno (PhIO), ácido metacloroperoxibenzóico (MCPBA) e *tert*-butilidroperóxido (TBHP). Após a seleção do oxidante foi testado o meio reacional consistindo de um sistema em diclorometano 100%, outro sistema em diclorometano/acetonitrila na proporção 2:1, e o último em acetonitrila com gotas de acetato de etila (2 gotas/4,5 mL). Após a definição do solvente e do oxidante, foram analisadas diferentes proporções de cada um dos constituintes (catalisador, oxidante e substrato). Posteriormente, na melhor condição experimental, foram testados catalisadores comerciais disponíveis no laboratório (reagente de Jacobsen e Fe(TPP)Cl).

4.2.2. Metodologia de análise da oxidação utilizando reagente de Jacobsen

Após o período de reação, foram retiradas alíquotas de 100 μ L para serem analisadas no CG-EM. As condições de análise no equipamento foram as mesmas descritas no item 1.3. O restante do meio reacional foi seco e diluído em 1,0 mL de acetonitrila com o auxílio do banho de ultrassom. As amostras foram então filtradas em filtro com poro de 0,45 μ m e analisadas em CLAE no comprimento de onda de 236 nm. O gradiente a fase móvel utilizados foram idênticos ao descrito no item 4.1.4. O volume de injeção foi 50 μ L.

4.2.3. Cinética da oxidação utilizando reagente de Jacobsen

A reação foi realizada em frasco transparente de 10 mL fechado com tampa sem orifícios. Para a reação, uma solução de grandisina em metanol (3,0 μ mol) e posteriormente o oxidante PhIO (3,0 μ mol) foram adicionados ao frasco contendo o reagente de Jacobsen (0,1 μ mol) em diclorometano (4,5 mL). A reação foi mantida sob agitação magnética a temperatura ambiente. O desenvolvimento da reação foi acompanhado durante 50h (0-50 h) após a adição do PhIO com a interrupção da agitação magnética em intervalos regulares e retirada de uma alíquota do meio reacional (50 μ l) para análise no CG-EM. As condições de análise estão descritas previamente no item 1.3.

4.2.4. Isolamento do produto de oxidação e caracterização estrutural

Algumas tentativas de escalonamento da reação foram testadas, porém o aumento de escala para o isolamento do metabólito mostrou-se ineficaz e assim decidimos realizar diversas repetições das reações (conforme descrito no item 4.2.3) utilizando um total de 300 mg de grandisina. Para o isolamento dos produtos de oxidação obtidos pela reação química, foi desenvolvida uma fase móvel contendo acetato de etila/*n*-hexano (Synth[®], PA) na proporção 55:45 para a realização de uma CCDP. Esta etapa permitiu concentração do possível metabólito de interesse em uma única fração e o reaproveitamento da grandisina que estava pura em outra fração para a realização de novas reações. Posteriormente, foi realizada uma nova CCDP com a fração que continha o metabólito, utilizando como fase móvel acetato

de etila/*n*-hexano na proporção 4:6. O metabólito foi então submetido a análises com diversas técnicas espectroscópicas e espectrométricas para sua caracterização estrutural e que permitiram determinar sua pureza.

4.2.4.1. ESI-EM

As análises foram realizadas em espectrômetro de massas híbrido triplo quadrupolo e tempo de voo (UltrOTOF-Q Bruker- Daltonics) com ionização por electrospray (ESI), operando no modo positivo. As condições experimentais consistiam em voltagem do capilar de 4000 V; o gás nebulizador foi o nitrogênio; e a temperatura do gás foi 160°C; o fluxo do gás foi 4 L/h. A amostra foi solubilizada em acetonitrila e infundida diretamente no espectrômetro.

4.2.4.2. CG-EM

A amostra foi solubilizada em 1,0 mL de acetato de etila para ser analisada em condição idêntica à descrita no item 1.3.

4.2.4.3. RMN 1H

As análises foram realizadas em espectrômetro Bruker-Advance DPX 300 do departamento de química da FFCLRP. O equipamento operou respectivamente em 300 MHz. A massa de 0,9 mg da amostra foi solubilizada em solvente deuterado ($CDCl_3$ (d = 99,8 %), Sigma-Aldrich®) e transferidas para tubos de RMN de 175 x 5 mm (Sigma-Aldrich®). A estrutura da substância isolada foi proposta e os dados comparados com dados referentes à grandisina que foi substrato da reação.

4.2.4.4. Rotação específica

A massa da amostra, 0,9 mg, foi solubilizada em 1 mL de acetonitrila, ou seja, 0,09g/100mL de acetonitrila. Essa solução foi transferida para a cela do polarímetro que possuía a capacidade de 1 mL e caminho óptico de 50 mm. A análise de rotação específica, $[\alpha]_D$, foi realizada em polarímetro digital da marca Jasco® modelo DIP-370 à 27 °C que realizou automaticamente o cálculo e forneceu o resultado a partir de uma média aritmética de 5 resultados que são originados a partir da média de 5 medidas, ou seja, o resultado final é o valor médio de 25 medidas.

4.2.4.5. Dicroísmo circular

A análise de dicroísmo circular (DC) foi utilizada para se determinar a manutenção da estereoquímica das posições remanescente no anel di-idrofurânico. Assim, o espectro obtido foi comparado com o da grandisina. Para isso, as condições de análises foram idênticas às da grandisina e estão presentes no item 1.6. A solução do produto de oxidação analisada possuía a concentração de $4,4 \times 10^{-4}$ mol/L e foi preparada utilizando acetonitrila com solvente. Novamente o espectro apresentado como resultado é referente a uma média de duas análises adquiridas pelo equipamento. Também foi determinado o espectro de UV para o produto de oxidação na faixa analisada e este foi comparado com o obtido para a grandisina.

4.3. Comparação dos resultados obtidos pelos ensaios de oxidação com catalisador de Jacobsen e metabolização *in vitro* com microssomas hepáticas

4.3.1. Preparação dos microssomas

Essa etapa foi realizada pela Dra. Gisele B. Messiano, pós-doutoranda do laboratório de Química Farmacêutica da FCFRP, sob orientação da Prof. Dra. Mônica T. Pupo, professora do mesmo laboratório da pesquisadora, e colaboração do Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira, professor da FFCLRP-USP. Os dados obtidos foram analisados no sistema cromatográfico desenvolvido nesse trabalho.

4.3.2. Identificação dos metabólitos obtidos por microssomas e comparação com os resultados da oxidação com catalisador de Jacobsen

Foi realizada uma análise em CG-EM nas condições descritas no item 1.3 em modo de injeção por *splitless* para a comparação dos resultados das técnicas utilizadas e a identificação dos metabólitos produzidos pelos microssomas. Como a concentração utilizada de grandisina foi baixa e consequentemente a concentração dos possíveis metabólitos seriam baixas também, foram analisados misturas (“pools”) de 10 reações. O procedimento de reunir 10 reações também foi realizado para o controle. No final, foram analisados três misturas distintas de reações e um controle. Para a comparação, foi utilizado o cromatograma da análise de uma reação de oxidação já nas condições ideais (cromatograma de uma amostra antes de ser utilizada para o isolamento dos produtos).

4.4. Ensaio de atividade tripanossomicida do produto de oxidação

Essa etapa foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque do laboratório de Parasitologia FCFRP. O ensaio foi realizado utilizando as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (clone CL-B5) as quais contêm o gene da β -galactosidase que confere alta especificidade e sensibilidade ao ensaio (Buckner *et al.*, 1996). As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de cultura de células (LLCMK2) e distribuídas em microplacas com 96 poços (105 parasitas/mL). A solução estoque do produto de oxidação com concentração de 2,0 mg/mL foi preparada através da diluição do composto em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% em solução salina (NaCl 0,9%).

Alíquotas da solução estoque foram adicionadas no meio infectado para a obtenção das concentrações finais de 0,5; 2,0; 8,0; e 32,0 μ mol/L. O benznidazol ($IC_{50} = 43 \mu$ mol/L) foi usado no controle positivo e o DMSO 0,5% como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 4°C durante 24 horas sob agitação constante. Para a reação colorimétrica, 50 μ L de CPRG (*chlorophenol red β D-galactopyranoside*, 400 μ mol/L em 0,3% Triton X-100, pH 7,4) foi adicionado em cada poço a placa foi incubada a 37 °C durante 6 h. A absorbância foi mensurada em 595 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram comparados com o da grandisina, em que 2,5 μ g/mL de solução de grandisina no mesmo solvente do ensaio lisa 62 % das formas tripomastigotas (Lopes *et al.*, 1998).

5. Farmacocinética da Grandisina e estudo do metabolismo *in vivo*

5.1. Animais

Inicialmente, foi obtida autorização do CEUA (Comitê de Ética para Uso de Animais) da prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto para todos os experimentos descritos nesta etapa com o número 09.1.112.53.4, conforme anexo. Para evitar variações referentes à parte hormonal e de metabolismo, este trabalho foi realizado apenas com camundongos da linhagem Balb/c machos e adultos (peso entre 25 e 30 g e com mais de 4 semanas de vida). Todos os experimentos realizados com os camundongos foram realizados no Biotério da FCFRP nas salas de experimentos com material previamente esterilizado ou que era lavado com etanol 70%. A higienização da sala de experimentos também era realizada previamente aos experimentos com solução aquosa de etanol a 70%.

5.2. Coleta de plasma

Cerca de 1,0 mL de sangue foi coletado de cada animal através do plexo ocular com o auxílio de um tubo capilar preenchido com 100 µL de solução de EDTA 2 mg/mL. O sangue foi transferido para tubo plástico com capacidade para 2,0 mL que continha mais 100 µL de solução de EDTA 2 mg/mL. Após a coleta, os tubos plásticos eram levados ao laboratório e centrifugados em centrífuga, marca Boeco® modelo M240R, a 4 °C e 1000 rpm durante 30 minutos. Caso necessário, esse procedimento de centrifugação era repetido. O sobrenadante era, então, separado e armazenado em freezer à -70 °C até o seu uso.

Para a obtenção de plasma branco pelo menos 6 animais sem nenhum tipo de tratamento com substâncias químicas foram utilizados. Após a coleta o plasma foi combinado para a formação de um *pool*. Para os animais tratados, o procedimento foi realizado e o plasma resultante foi armazenado separadamente para cada animal.

5.3. Preparo das amostras

Esse procedimento foi adaptado de metodologia previamente publicada para a lignana licarina A, que foi escolhida como padrão interno da análise (Li & Yang, 2008). Assim, 50 μL de uma solução de licarina A (10 $\mu\text{g/mL}$) foram pipetados para um microtubo plástico (capacidade 2 mL, Axigen[®]). O tubo foi colocado em uma centrífuga concentradora, *SpeedVaccum* da marca Christ modelo RVC2-18, para a completa evaporação do solvente o que geralmente ocorria em 30 minutos a 60 °C. Então, 100 μL de plasma em temperatura ambiente foram adicionados a esses microtubos após seu resfriamento. Os microtubos contendo a mistura de plasma e padrão interno foram agitados em agitador automático tipo vórtex durante 10 segundos. Essas amostras foram submetida à SPE em uma coluna de C_{18} com 500 mg de resina e capacidade para 3 mL, Agilent[®], previamente condicionada com 2 mL de acetonitrila (J T Baker[®]) e 5 mL de água deionizada. Após a aplicação, foi realizado o procedimento de lavagem com 5 mL de água deionizada e a eluição com 2 mL de acetonitrila. O procedimento de SPE foi realizado em equipamento de *Vaccum Manifold* da marca Supelco[®] que possui suporte para tubos de ensaio e microtubos plásticos. Em todas as etapas, as soluções obtidas foram coletadas em tubos de ensaio e descartadas, exceto na última etapa onde a coleta foi realizada diretamente em microtubos plásticos. O eluato foi concentrado até a evaporação de todo o solvente na *SpeedVaccum* durante aproximadamente 120 minutos a 60 °C. O eluato foi então ressuspendido em 0,5 mL de acetonitrila, filtrado em filtro com membrana de PTFE (13mm diâmetro, 0,22 μm diâmetro do poro) e analisado no UPLC-DAD.

5.4. Desenvolvimento de Metodologia Analítica

Para a análise do plasma de camundongos, foi escolhido o sistema de UPLC acoplado aos detectores de DAD e massas da marca Waters[®]. O espectrômetro de massas é composto pelo ionizador de *eletronspray* (ESI) e com analisador de triplo quadrupolos em sequência (QT). Inicialmente foram preparadas soluções estoques de grandisina, produto de oxidação da reação com catalisador de Jacobsen e licarina A (padrão interno) na concentração de 1 mg/mL em acetonitrila. Essas soluções foram então diluídas até a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ também em acetonitrila. Estas últimas foram usadas como solução mãe para a confecção posteriormente de todos os pontos da curva de calibração.

A fase móvel utilizada foi água com 0,1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico (B). O gradiente da fase móvel está descrito na tabela 3. O volume de injeção foi 2 µL no modo *partial loop*. O modo de detecção no espectrômetro de massas foi por MRM positivo. Após a definição das melhores condições de análise para o analito e o padrão interno, o *tune* apresentava capilar de 2,5 kV; cone 25 V; extrator 3 V; lentes de RF com 0,1 V, temperatura da fonte de ionização de 150 °C e de dessolvatação de 350 °C; fluxo do gás de dessolvatação, nitrogênio, 650 L/h e fluxo do gás no cone de 50 L/h. O fragmento m/z 247 foi utilizado para a quantificação da grandisina (m/z 433) e o m/z 265 para confirmação. O fragmento com m/z 203 foi utilizado para a quantificação da licarina A. A energia de colisão utilizada para a fragmentação da grandisina foi 20 V e da licarina 15 V.

Tabela 3 – Gradiente de fase móvel para análise no UPLC-DAD-MS/MS.

Tempo (minutos)	%B (acetonitrila acidificada)
0,00	30
1,00	30
3,00	50
5,00	50
5,50	60
6,25	60
6,50	100

5.5. Validação de metodologia analítica para determinação de grandisina em plasma

A validação da metodologia analítica foi baseada na RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da Anvisa e no guia de validação do FDA (ANVISA, 2012; FDA, 2001). Os parâmetros avaliados estão descritos a seguir.

5.5.1. Seletividade e Efeito Matriz

Inicialmente, foi desenvolvido um método em que fosse possível ter uma resolução satisfatória tanto no modo SCAN quanto no MRM para a grandisina, o padrão interno escolhido (licarina A) e o principal metabólito obtido nos ensaios *in vitro*, deidrograndisina. As amostras analisadas na seletividade estão descritas na tabela 3. Após a determinação da seletividade do método, o efeito matriz foi verificado. Para isso, o branco foi analisado no cromatógrafo enquanto ocorria uma infusão contínua de solução dos três padrões diretamente no espectrômetro de massas. As soluções utilizadas para infusão foram as mesmas utilizadas para a determinação da seletividade e estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 – Amostras analisadas na seletividade e suas respectivas composições.

Amostra	Composição
Solvente	Acetonitrila, solvente em que foram preparadas as soluções estoques de padrão interno e analitos
Branco	plasma de 6 animais submetidos ao processamento descrito no item 5.3
M1	Solução 3,2 µg/mL do principal metabólito obtido nos ensaios <i>in vitro</i>
GR	Solução 10,5 µg/mL de grandisina
LIC	Solução 10,1 µg/mL de licarina A
M1+GR	Solução 1 µg/mL da mistura dos dois analitos em plasma
M1+LIC	Solução 1 µg/mL da mistura do principal metabólito e do padrão interno diluídos em plasma
GR+LIC	Solução 1 µg/mL da mistura da grandisina e do padrão interno diluídos em plasma
M1+GR+LIC	Solução 1 µg/mL da mistura dos dois analitos e do padrão interno diluídos em plasma

5.5.2. Linearidade (Curva de calibração) e Limites de detecção e quantificação

Inicialmente foram preparadas soluções de grandisina e licarina A utilizando acetonitrila como solvente nas concentrações de 1,8 mg/mL e 0,99 mg/mL respectivamente. Essas soluções foram diluídas 100 vezes gerando soluções 18 µg/mL e 9,9 µg/mL. A solução de grandisina foi novamente diluída, porém dessa vez 20 vezes e utilizando como diluente plasma branco processado resultando em uma solução com a concentração de 590,4 ng/mL. As soluções de licarina A e grandisina 18 µg/mL ou 590,4 ng/mL foram misturadas para a confecção da curva de calibração e a composição de cada ponto está na tabela a seguir. Os limites de detecção e quantificação foram determinados experimentalmente. A solução com menor concentração que apresentou linearidade na curva foi considerada como o limite inferior de quantificação e a solução com concentração inferior que apresentou uma relação entre o sinal e o ruído superior a 3 foi considerada como o limite de detecção. Também foram preparadas amostras de controle de qualidade como, por exemplo, as amostras CQA e CDD. O CQD é preparado em concentrações superiores ao limite superior de quantificação para garantir precisão e exatidão caso seja necessária a diluição das amostras. Essa amostra foi posteriormente diluída na proporção 1:1 com plasma branco processado para possuir valor de concentração no intervalo de linearidade. As amostras de controle de qualidade apresentam os mesmos valores utilizados para a confecção da curva de calibração. A identificação das amostras presentes na linearidade, suas respectivas concentrações e a maneira como foram confeccionadas estão presentes na tabela 5.

Tabela 5 – Composição das soluções utilizadas para a confecção das curvas de calibração e dos controles de qualidade.

Identificação	Composição				
	Solução de grandisina 590,4 ng/mL (μL)	Solução de grandisina 18 μg/mL (μL)	Solução de licarina A 9,9 μg/mL (μL)	Plasma branco (μL)	Concentração final (ng/mL)
LSQ	400	-	50	50	472,3
CQA	-	24	100	376	432,0
CQD	-	20	100	380	360,0
CQM	225	-	50	225	265,7
CQB	100	-	50	350	118,1
LIQ	50	-	50		56,2

5.5.3. Precisão e Acurácia

A precisão foi calculada a partir dos dados obtidos nas três curvas de calibração confeccionadas através da fórmula de coeficiente de variação:

$$CV = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{concentração média experimental}} \times 100$$

Os valores deveriam ser inferiores a 15% para qualquer ponto da curva exceto o limite inferior de quantificação que poderia apresentar valor até 20%.

A exatidão foi determinada pelo erro padrão relativo (EPR) também a partir dos dados obtidos nas três curvas de calibração. O EPR também deveria apresentar valor máximo de 15% para qualquer ponto e 20% para o limite inferior de quantificação. A fórmula para o cálculo do EPR é a seguinte:

$$EPR = \frac{(\text{concentração média experimental} - \text{valor nominal})}{\text{valor nominal}} \times 100$$

5.5.4. Estabilidade

Durante a validação da metodologia foram avaliadas a estabilidade das soluções dos padrões (interno e grandisina), a estabilidade no autoamostrador, e a estabilidade durante o processamento.

5.6. Preparação da solução de grandisina para administração intravenosa

Para a administração intravenosa, foi determinado, independentemente do resultado do teste de veículo, que a dose de grandisina seria 50 mg/Kg e seriam administrados aproximadamente 200 µL da solução em cada animal de acordo com o peso médio. Contudo, a grandisina possui baixa polaridade e por essa razão foi testada a possibilidade de utilizar PEG 300 como veículo de administração uma vez que o mesmo foi utilizado no ensaio de Toxicidade Oral Aguda (item 3). Avaliou-se também o Phosal 50[®], produto composto de óleo de soja e fosfatidilcolina, e uma emulsão composta de 16,66% de Phosal 50[®], grandisina e água deionizada q.s.p. O preparo da emulsão consistiu na dissolução da grandisina no Phosal 50[®]; a água foi então vertida na fase oleosa ambas a 80 °C e a mistura foi submetida à agitação mecânica durante 2 minutos. A concentração final da formulação foi 6,75 mg/mL o que resultaria na administração de 200 µL em um animal com o peso de 27g.

5.7. Ensaio de Farmacocinética com administração intravenosa

Foram utilizados 45 animais os quais foram divididos em 8 grupos. Cada animal era pesado na hora da administração e a dose da emulsão foi corrigida para que a quantidade administrada em cada animal fosse a mesma. Na tabela 6, há a correlação entre o volume administrado e o peso do animal.

Tabela 6 – Volume administrado conforme peso dos animais.

Peso (g)	Volume administrado (μL)
25	185
26	193
27	200
28	207
29	215
30	221

A administração foi realizada com a emulsão, após esta ser esterilizada com radiação UV em fluxo laminar, e ocorreu na veia presente na cauda do camundongo. Após o período do ensaio determinado para o grupo, o sangue foi coletado, processado e analisado no UPLC-DAD-MS/MS conforme procedimento descrito nos itens 5.2, 5.3 e 5.4. Os tempos escolhidos para coleta de sangue foram os seguintes: 5, 20, e 40 minutos; 1, 2, 4, 8 e 16 horas. Para a análise das amostras uma curva de calibração era preparada e utilizada para o cálculo da concentração dos analitos. As amostras foram diluídas para permitirem o cálculo de sua concentração na faixa linear do método analítico. Para isso, conforme preparo da amostra de controle de qualidade CQD, o volume de padrão interno foi adicionado a mais o mesmo número de vezes que seria referente ao fator de diluição da amostra (exemplo: se a amostra precisasse ser diluída duas vezes, seria adicionado o dobro do volume de padrão interno).

Resultados e Discussão

1. Purificação de grandisina a partir de extratos de *P. solmsianum*

Os extratos utilizados para a obtenção da grandisina foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Massuo Jorge Kato do Instituto de Química da USP campus São Paulo, colaborador desse projeto. Os diferentes extratos (variação do solvente extrator) foram obtidos a partir da maceração de folhas trituradas de *Piper solmsianum*. O primeiro extrato analisado foi obtido em acetato de etila e o segundo em diclorometano. Nesse trabalho modificamos a proposta rotineira de obtenção direta por coluna clássica e/ou recristalização (Martins *et al.*, 2000) e adaptamos a técnica de *short column* em virtude de sua velocidade e eficiência. Como seria necessária uma grande quantidade da lignana foram realizadas 15 colunas conforme exemplificado na figura 3. As frações foram secas separadamente em evaporador rotativo, figura 4, e cada coluna apresentou um rendimento médio de 1,5 g, aproximadamente 18,75%, para a soma da massa de todas as frações contendo grandisina. Essas frações eram recristalizadas separadamente e seus sobrenadantes reunidos para novas recristalizações. Todas as frações e sobrenadantes após a recristalização resultaram em uma massa de aproximadamente 600 mg de grandisina pura, ou seja, 7,5% em relação ao extrato e 40% em relação à fração enriquecida. O sobrenadante final das recristalizações de uma coluna era reunido e seco para, caso necessário, ser utilizado com uma nova técnica de purificação para nova obtenção de grandisina.

Figura 3 – Foto de uma coluna realizada para isolamento de grandisina a partir do extrato de acetato de etila das folhas de *P. solmsianum*.

Figura 4 – Concentração de fração rica em grandisina realizada em evaporador rotativo. As manchas brancas presentes no balão são cristais de grandisina.

O diferente processo de extração, solvente utilizado, também resultou em diferença no rendimento de grandisina. A quantidade de alguns metabólitos secundários, os quais eram interferentes na purificação, era diferente e a quantidade de clorofila era muito maior no extrato obtido com solvente halogenado. Assim, o rendimento foi muito menor para as frações obtidas a partir desse tipo de extrato, aproximadamente 100 mg de grandisina ou 1,25% em relação ao extrato. Como fora realizada apenas uma coluna com esse tipo de extrato, o menor rendimento não interferiu no objetivo desta etapa. Foram obtidos quatro diferentes lotes de grandisina, sendo que para cada bloco de experimentos a grandisina utilizada sempre pertencia a um mesmo lote. Assim, erros referentes à diferença na potência da grandisina ou presença de contaminantes para um mesmo experimento eram eliminados. Na figura 5 é possível observar um dos cristais de grandisina obtido a partir da recristalização com metanol.

Figura 5 – Cristais de grandisina obtidos após recristalização. Em A, um dos maiores cristais obtidos com aproximadamente 1,2 cm; em B, frasco onde foi realizada uma das recristalizações com vários cristais no fundo do frasco.

1.1. Caracterização estrutural e determinação da pureza

A caracterização estrutural e a determinação da pureza sempre foram consideradas etapas essenciais deste trabalho, pois, além de garantir a identidade estrutural, a necessidade da alta pureza confirmada por essas técnicas era primordial principalmente, nos ensaios de metabolismo onde o número de variáveis e interferentes pode resultar em dúvidas durante a análise dos resultados.

Dessa forma, foram obtidos o espectro de massas em alta resolução em sistema de ionização por eletrospray (IES-EM, figura 6), o espectro de massas em baixa resolução com ionização por elétrons (IE-EM, figura 7), o espectro de RMN ^1H , figura 8, o espectro de RMN ^{13}C , figura 9, o espectro de dicroísmo circular, figura 10, o espectro na região do UV, figura 11, além de calcular o valor da rotação específica para caracterização estrutural. Para determinação da pureza cromatográfica foi utilizado o cromatograma de CG-EM. Na figura 12 é possível observar o cromatograma obtido em CG-EM pela metodologia descrita no item 1.3 demonstrando a pureza cromatográfica do lote 4 de grandisina utilizada no ensaio de farmacocinética. A grandisina também foi analisada no CLAE-DAD, figura 13, para verificar a presença de alguma impureza que não volatilizasse.

Figura 6 – Espectro de massas (IES-EM) obtido para a grandisina. É possível observar a molécula de grandisina protonada e cationizada com sódio.

Figura 7 – Espectro de massas (IE-EM) obtido para a grandisina.

Figura 8 – Espectro de RMN ^1H obtido para a grandisina.

Figura 9 – Espectro de RMN ^{13}C obtido para a grandisina.

Figura 10 - Espectro de dicroísmo circular CD obtidos para a grandisina ($0,7 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em acetonitrila.

Figura 11 - Espectro de UV-Vis obtido para grandisina ($0,7 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em acetonitrila.

Figura 12 – Cromatograma obtido em CG-EM para demonstrar a pureza cromatográfica da grandisina.

Figura 13 – Cromatograma obtido em CLAE-DAD para demonstrar a pureza cromatográfica da grandisina.

A análise em CLAE-DAD indicou a presença de um único composto no cromatograma, com absorção no UV máximo próximo a 270 nm. No cromatograma obtido na análise por CG-EM, também foi observado um sinal muito intenso e dois sinais muito próximos à linha de base. Esses sinais eram muito pouco intenso o que autentica a pureza da grandisina obtida. Nessa análise foi possível também verificar a massa molecular da grandisina pela presença do íon molecular em m/z 432. Alguns fragmentos característicos também foram observados no espectro de IE da grandisina. Lopes e colaboradores (Lopes *et al.*, 1996) propuseram uma sequência de íons para neolignanas tetraidrofurânicas e no espectro obtido observam-se os fragmentos característicos em m/z 236, 224 e 208.

Os dados obtidos por espectrometria de massas por ESI indicam uma substância com massa molecular de 432u através da presença de uma molécula protonada com m/z 433 e cationizada com m/z 455. Esse valor de massa pode ser relacionado, entre outras possibilidades, com a fórmula molecular $C_{24}H_{32}O_7$. A análise dos dados observados nos espectros de RMN e que foram transcritos para as tabelas 7 e 8 sugerem a presença, como esperado, de uma neolignana tetraidrofurânica (Lopes, 1996). As neolignanas tetraidrofurânicas (ou lignanas tetraidrofurânicas segundo a IUPAC) possuem como estrutura básica um anel tetraidrofurânico com substituição de grupos metílicos na posição 8 e 8' e aromáticos na posição 7 e 7' podendo ocorrer em diferentes orientações. A racionalização da estereoquímica relativa foi estudada por Birch e Crossley (Birch *et al.*, 1958; Crossley & Djerassi, 1962).

As substituições no anel tetraidrofurânico podem formar três tipos de isômero. As substâncias podem apresentar uma estereoquímica trans, trans, cis relativa às ligações nos carbonos C-8', C-8, C-7 e C-7', como por exemplo, a neolignana verguensina. Devido a essa

assimetria ocorrem sinais distintos para os hidrogênios oxibenzílicos H-7 e H-7', metínicos H-8 e H-8' e metílicos H-9 e H-9'. Os grupos arílicos em *cis* possuem rotação restrita acarretando uma proteção anisotrópica de H-9', que ressonam como um dublete em aproximadamente δ_H 0,6 ppm, enquanto que os hidrogênios em H-7' sofrem desproteção, ressonando por volta de δ_H 5,0 ppm. Por outro lado, substâncias como a galbegina, as quais possuem uma estereoquímica relativa *trans, trans, trans*, apresentam um eixo de simetria na molécula, o que torna os hidrogênios oxibenzílicos e metínicos equivalentes. Finalmente, as substâncias, como por exemplo, a galgravina, que apresentam uma estereoquímica relativa *trans, cis, trans*, portanto, possuem um plano de simetria na molécula que, além de impedir o diferenciamento dos hidrogênios oxibenzílicos e metínicos, torna, ainda, a molécula opticamente inativa (Lopes, 1996).

A grandisina possui estereoquímica *trans, trans, trans* (Saad *et al.*, 1991; Lopes, 1996). Assim, após a comparação dos dados de RMN da substância isolada com os deslocamentos discutidos para as 3 diferentes configurações relativas possíveis, como esperado, a substância apresentou uma grande identidade com os hidrogênios do esqueleto semelhante ao da galbegina. Assim, o sinal observado para os hidrogênios oxibenzílicos, metínicos e metílicos integrava para 2. A análise detalhada do RMN de 1H , figura 8 e tabela 7 revelou a presença de um singlete em δ_H 6,63 ppm, que foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H-2 e H-6 indicando a presença de um anel tri-substituído. No espectro de RMN de ^{13}C os sinais relativos a C-3 e C-5, tabela 8 e figura 9, confirmam a presença de dois anéis tri-substituídos. Também, foram observados traços de ácidos graxos na amostra. Além disso, foi obtido o espectro da grandisina na região do UV e para complementar a sua caracterização pela primeira vez o espectro de dicroísmo circular.

Tabela 7 - Comparação entre os dados de RMN de 1H previamente publicados (LOPES, 1996) e experimentais ($CDCl_3$, dados publicados obtidos em 200 MHz e experimentais em 300 MHz, δ em ppm e *J* em Hz).

Hidrogênio	Lopes, 1996	Dados experimentais
7/7'	4,63 (d, <i>J</i> = 9,1)	4,66 (d, <i>J</i> = 8,8)
8/8'	1,80 – 1,63 (m)	1,80 (m)
9/9'	1,07 (d, <i>J</i> = 5,7)	1,09 (d, <i>J</i> = 5,8)
ArH	6,60 (s)	6,63 (s)
OMe (m)	3,87 (s)	3,88 (s)
OMe (p)	3,82 (s)	3,84 (s)

Tabela 8. Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C previamente publicados (LOPES, 1996) e experimentais (CDCl_3 , dados publicados obtidos em 50 MHz e experimentais em 75 MHz, δ em ppm).

Carbonos	Lopes, 1996	Dados experimentais
1/1'	137,9	138,0
2/2'	102,8	103,0
3/3'	153,1	153,3
4/4'	137,9	137,4
5/5'	153,1	153,3
6/6'	102,8	103,0
7/7'	88,4	88,5
8/8'	50,9	51,0
9/9'	13,9	14,0
OMe (m)	56,0	56,2
OMe (p)	60,7	60,8

2. Determinação da estabilidade da grandisina

2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica e curva de calibração

A estabilidade da grandisina em pH ácido e em pH básico foi testada conforme o guia de estudo de estabilidade por degradação forçada preconizado pela ANVISA, para a verificação de degradação do ativo por algum dos diferentes pHs presentes no organismo. Para a análise dos resultados foi desenvolvida uma metodologia analítica em UFLC. Esse equipamento é diferente de um equipamento para CLAE convencional por possuir tubulações com menores diâmetros internos e um volume menor no misturador da fase móvel. Isso permite a utilização de colunas cromatográficas com menor diâmetro das partículas sem resultar em um elevado aumento da pressão. Assim, é possível reduzir o tempo de análise e o consumo de solventes na fase móvel.

O método desenvolvido apresentou as condições cromatográficas descritas no item 2.2. A seguir, na figura 14, estão os cromatogramas em 236 nm, para o branco (metanol) e grandisina 0,992 mg/mL.

Figura 14 – Cromatogramas em 236 nm para as amostras analisadas para demonstrar seletividade da metodologia analítica utilizada na análise das amostras de degradação forçada.

Para a quantificação da grandisina nas amostras dos testes de degradação forçada, foi obtida uma curva de calibração linear para a faixa de concentração entre 99,2 $\mu\text{g/mL}$ e 992 $\mu\text{g/mL}$. A figura 15 apresenta a curva obtida. A equação da curva é $f(x) = 12661,3 x + 298664$ e os valores de r e r^2 são 0,996 e 0,993 respectivamente.

Figura 15 – Curva de calibração linear obtida para grandisina na faixa de concentração entre 99,2 $\mu\text{g/mL}$ e 992 $\mu\text{g/mL}$.

2.2. Estudo de Estabilidade por Degradação Forçada

Após o desenvolvimento de metodologia analítica e obtenção da curva de calibração, a grandisina foi submetida à degradação forçada com os parâmetros descritos no informe técnico da ANVISA nº1 de 15 de julho de 2008. Todos os parâmetros foram analisados após 3 horas (considerado com 0 dias, porém com algum tempo para reação), 1, 3, 7 e 10 dias de exposição ao agente degradante. Os resultados podem ser observados na tabela 9 e apresentam a quantidade de grandisina em porcentagem, a qual é obtida a partir da relação entre a quantidade de grandisina obtida experimentalmente/quantidade de grandisina presente no início do teste. As figuras 16 e 17 ilustram, com um gráfico cada, a comparação entre a quantidade de grandisina ainda presente após a exposição aos diferentes agentes testados.

Os resultados demonstram a estabilidade da grandisina em condições que serão utilizadas nos ensaios de metabolismo e farmacocinética. Por exemplo, a estabilidade em pH ácido e básico indica que a grandisina pode ser administrada por diferentes vias e não é necessária uma preocupação com o pH caso seja necessário o preparo de uma formulação para administração da lignana em posteriores ensaios de farmacocinética. Esse resultado também permite a utilização de pH ácido ou básico para análise da grandisina em sistema cromatográfico ou no processo de preparo ou extração de alguma amostra. A estabilidade a metais ou agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio é importante para avaliar previamente a utilização de catalisadores nos ensaios biomiméticos de metabolismo e indicar a seletividade durante essas reações. A estabilidade aos outros agentes testados indica que não são necessários cuidados adicionais na armazenagem e na execução dos experimentos como, por exemplo, utilização de vidro âmbar ou utilização de baixas temperaturas.

Figura 16 – Comparação entre quantidade de grandisina remanescente no ensaio com grandisina após a exposição a base, ácido, peróxido de hidrogênio e metais.

Figura 17 – Comparação entre quantidade de grandisina remanescente no ensaio com grandisina após a exposição a luminosidade, temperatura elevada e alta umidade.

Tabela 9 – Quantidade de grandisina em % remanescente após diferentes períodos de exposição aos agentes degradantes conforme preconizado para o ensaio de estabilidade por degradação forçada (informe técnico da ANVISA nº1 de 15 de julho de 2008).

Agente degradante	Dias	Grandisina (%)
Ácido (HCl 0,01N)	0	105,2
	1	109,1
	3	101,2
	7	109,6
	10	112,4
Base (NaOH 0,01N)	0	104,3
	1	105,2
	3	102,7
	7	109,1
	10	112,9
Peróxido de hidrogênio (3%)	0	108,1
	1	105,5
	3	104,9
	7	111,4
	10	112,5
Fotólise	0	101,2
	1	103,8
	3	99,0
	7	110,1
	10	111,2
Metais (CuSO ₄ 0,05 mol/L)	0	104,6
	1	111,4
	3	102,6
	7	109,2
	10	111,5
Térmica (60°C)	0	100,7
	1	108,5
	3	100,2
	7	110,2
	10	108,5
Umidade (75%)	0	107,1
	1	107,6
	3	103,3
	7	108,7
	10	113,2

3. Investigação da toxicidade oral aguda e das alterações bioquímicas séricas em camundongos tratados com grandisina

Inicialmente realizou-se o teste de sinais para verificar a toxicidade da grandisina nos camundongos Balb/c. Para cada dose do ensaio foi utilizado um animal independente, sendo que entre cada administração houve um intervalo de 24 horas. Assim no caso de morte do animal durante este período a dose anterior de tratamento seria utilizada nos próximos estudos. As concentrações utilizadas no tratamento foram 5; 50; 300 e 2000mg/Kg.

Os resultados mostraram que em todos os tratamentos avaliados não houve qualquer evidência de sinais de toxicidade ou sofrimento nos animais, tais como contorção, enrijecimento dos membros, dificuldade na habilidade de andar e alteração no comportamento. Os animais foram observados por 14 dias, não apresentando qualquer alteração ou evidência de toxicidade.

Após este período, foi realizado o estudo para avaliar o efeito da grandisina nos parâmetros bioquímicos séricos relacionados ao perfil lipídico e a funções hepáticas e renais. A figura 18 mostra os resultados referentes ao perfil lipídico dos animais submetido ao tratamento com grandisina 300mg/Kg por 24 horas. Os resultados do perfil lipídico demonstraram que a grandisina não promoveu alterações relacionadas ao aumento do risco cardiovascular. Os níveis de LDL apresentaram uma redução no tratamento com o veículo (PEG) e grandisina, entretanto a redução do LDL pode ser considerada benéfica ao sistema cardiovascular. Entretanto, este efeito redutor nos valores de séricos de LDL pode ser exclusivamente dependente da ação do PEG e não da grandisina, pois nos soros de animais tratados com essas substâncias foram detectados níveis muito similares de LDL, figura 18.

A determinação dos níveis séricos das enzimas ALT, AST, fosfatase alcalina e das bilirrubinas (principais metabólitos do grupo heme da hemoglobina) podem ser usados com indicadores de processos lesivos e/ou patológicos do fígado. Geralmente, a elevação desses marcadores séricos estão associados à instalação desses processos. O tratamento dos animais com grandisina não provocou alterações significativas nas concentrações séricas das enzimas AST e fosfatase alcalina, indicando que essa neolignana não é hepatotóxica, figura 19. Entretanto, a ação combinada da grandisina e PEG causou uma drástica inibição os níveis séricos da γ -GT em relação ao PEG e as amostras controle, figura 19. Para a ALT, a ação combinada da grandisina e PEG ou apenas o do PEG provocaram uma inibição similar nos valores séricos desta enzima em relação às amostras controle, figura 19.

O tratamento dos animais com PEG e/ou grandisina provocou uma redução nos níveis séricos de bilirrubina total e indireta, figura 19. Pelos resultados podemos sugerir que o tratamento com grandisina não promoveu dano hepático grave. Entretanto, um maior aprofundamento dessas avaliações poderá definir com maior precisão o comportamento não-hepatotóxico da grandisina.

Figura 18 - O tratamento com grandisina não promoveu alterações nos parâmetros do perfil lipídico de camundongos Balb/c. Os animais (n=6) foram tratados com grandisina 300mg/Kg via oral por 24 horas. Após este período, o sangue foi retirado e o soro foi obtido. Para as análises, foi realizada a reunião do soro, sendo constituída de 100µL de soro de cada animal. NT: animais não tratados. PEG: polietilenoglicol 300. GR: Grandisina. HDL: Lipoproteína de alta densidade - High Density Lipoprotein. LDL: Lipoproteína de baixa densidade - Low Density Lipoprotein. VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade - Very Low Density Lipoprotein.

Figura 19 - O tratamento com grandisina promoveu redução das enzimas ALT, γ -GT e bilirrubina. Os animais (n=6) foram tratados com Grandisina 300mg/Kg via oral por 24 horas. Após este período, o sangue foi retirado e o soro foi obtido. Para as análises, foi realizada a reunião do soro, sendo constituída de 100 μ L de soro de cada animal. NT: animais não tratados. PEG: polietilenoglicol 300. GR: Grandisina. AST: aminotransferase do aspartato. ALT: aminotransferase da alanina. γ -GT: gamaglutamiltransferase.

Além destas análises outros parâmetros adicionais foram avaliados, como os níveis das enzimas amilase e creatinofosfoquinase e os níveis de uréia, ácido úrico, glicose e creatina. Os resultados estão ilustrados na figura 20 e mostraram que não houve alterações significativas do tratamento da grandisina em relação aos animais não tratados (NT) nestes parâmetros. Esses resultados sugerem que a grandisina não provocou alterações significativas nas funções renais e lesão muscular nos animais tratados com grandisina.

Figura 20 - O tratamento com grandisina não promoveu alteração em parâmetros bioquímicos avaliados. Os animais (n=6) foram tratados com grandisina 300mg/Kg via oral por 24 horas. Após este período, o sangue foi retirado e o soro foi obtido. Para as análises, foi realizada a reunião do soro, sendo constituída de 100µL de soro de cada animal. NT: animais não tratados. PEG: polietilenoglicol 300. GR: grandisina.

Assim, ao final do estudo foi possível concluir que o uso de altas doses de grandisina não provocou efeitos de toxicidade aguda em camundongos e parece também não ter induzido significativas alterações em parâmetros bioquímicos séricos desses animais. Estes resultados são importantes para viabilizarem o estudo de farmacocinética da grandisina, pois a via intravenosa é mais invasiva e imediata para a manifestação de efeitos adversos após a administração do ativo. Além disso, alterações nos parâmetros bioquímicos indicam alterações no metabolismo e funcionamento normal de diferentes órgãos do organismo e poderiam resultar em um resultado que não retrata a realidade do estudo *in vivo*.

4. Metabolismo *in vitro* de grandisina

4.1. Metabolização de grandisina através do modelo utilizando bactérias do ceco de porco

O estudo com bactérias da microbiota intestinal de porcos, que mais se assemelha ao humano, serviu para observar a metabolização por esses microrganismos, caracterização dos produtos formados e ajuste de dose quando for realizado o estudo *in vivo*. A curva de calibração e as recuperações obtidas em UPLC-DAD no comprimento de onda de 236 nm estão apresentadas na figura 21. Após o procedimento experimental de metabolização, as amostras foram analisadas no sistema de UPLC-DAD para verificação de metabolização ou não. O gráfico, presente na figura 22, mostra que com o passar do tempo não houve nenhuma metabolização desse composto.

O alto valor de recuperação do método elimina qualquer possibilidade do fator solubilidade da grandisina em metanol ser um interferente na análise. Assim, mesmo havendo alguns estudos que evidenciam a metabolização dessa lignana por microrganismos (Verza *et al.*, 2009) e larvas de insetos (Ramos *et al.*, 2008); as bactérias da microbiota intestinal de porcos não metabolizaram esse composto. Também é importante citar que alguns estudos sobre as atividades microbiológicas desse composto como, por exemplo, contra *Trypanosoma cruzi* (Lopes *et al.*, 1998). Esse resultado, então, pode indicar uma possível atividade antimicrobiana dessa substância e indica que em caso de administração por via oral esse composto pode ser totalmente absorvido o que resulta em um primeiro momento de nenhuma correção ou ajuste na dose a ser testada. Em caso de administração por outra via, esse resultado indica que a microbiota pode não interferir na reabsorção intestinal da grandisina caso ocorra este processo.

Figura 21 - Curvas de calibração (A) e de recuperação (B) obtidas para a lignana grandisina em UPLC-DAD no comprimento de onda de 236 nm em experimento de metabolização usando modelo do ceco de porco.

Figura 22 – Comparação entre a concentração média de grandisina utilizando as bactérias ativas e inativadas proveniente do ceco de porco nos diferentes tempos de incubação estudados.

4.2. Metabolização através de catálise química e por sistema microsomal hepático de ratos

No ensaio com metaloporfirinas, como os resultados das análises em CLAE-DAD e GC-MS foram semelhantes, optou-se por realizar todas as análises de ensaios *in vitro* em GC-MS. A oxidação utilizando o catalisador de Jacobsen, reagente que resultou na maior oxidação da grandisina, produziu um número reduzido de produtos de oxidação devido à presença de poucas posições passíveis de reação. O oxidante mais eficiente foi o PhIO, figura 23. O resultado para o teste de solventes apresentou resultados muito semelhantes. No final, a melhor condição experimental está descrita no item 4.2.3. e possui a proporção em mols de catalisador:oxidante:substrato de 1:30:30.

Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CG-EM: (A) para os diferentes agentes oxidantes testados PhIO (azul), MCPBA (preto) e THBP (vermelho) e em aproximação (B).

A cinética indicou que há um decréscimo na concentração de grandisina mais acentuado nas primeiras horas e posteriormente ocorrem equilíbrios intermitentes em algumas faixas de concentração mais baixas com uma taxa de diminuição na concentração menor como pode ser observado na figura 24. Dessa forma, 24 horas foi considerado como tempo ideal para a reação. Após a obtenção das melhores condições para os parâmetros variáveis da reação de oxidação, houve uma tentativa de escalonamento para facilitar o isolamento dos produtos, mas o rendimento diminuiu para 1%. Esse fenômeno tem sido observado e relatado para uma série de produtos naturais (Clemente-Tejeda, López-Moreno & Bermejo, 2012; Clemente-Tejeda, López-Moreno & Bermejo, 2013). Assim, apesar do baixo rendimento, foram realizadas novas reações sequenciais para isolar os produtos biomiméticos. Para isso foi desenvolvida uma técnica separação por CCD para promover um enriquecimento de uma fração com os produtos de interesse. Quando obtida uma massa satisfatória dos metabólitos (cerca de 100 mg da mistura) uma nova série de CCDP era realizada para a obtenção do principal metabólito de interesse. Esse metabólito foi caracterizado e identificado como uma molécula inédita denominada de deidrograndisina e os resultados foram publicados no periódico “Planta Medica” (Ferreira *et al.*, 2012). Além disso, o isolamento também serviu para fornecer parâmetros adicionais para a comparação com os metabólitos produzidos *in vivo* e, assim, facilitar a identificação dos mesmos.

Figura 24 - Cinética de oxidação da grandisina utilizando o modelo químico com catalisador de Jacobsen.

Na metabolização química, foi observada através da análise em CG-EM, a formação da *cis* e da *trans*-isoelemicina. Além desses dois produtos, também foi observada a formação de outro metabólito o qual correspondia ao aparecimento de uma ligação dupla na molécula da grandisina. Este produto foi denominado deidrograndisina, e teve a sua determinação estrutural definida posteriormente. A caracterização completa da deidrograndisina será discutida no item 4.3.

Ao se analisar, na mesma metodologia analítica, a reação de metabolização da grandisina através do microsossoma hepático de ratos, observou-se que o metabólito produzido por ambas as técnicas era o mesmo apresentando o mesmo tempo de retenção e o mesmo espectro de massas, figura 25.

Figura 25 - Comparação dos cromatogramas do controle (vermelho) e reação de metabolização por microsossoma (preto), ao lado encontra-se a figura ampliada (A); e B da metabolização por microsossoma hepático de ratos (preto) e oxidação com catalisador de Jacobsen (vermelho). Em ambos os casos o primeiro sinal é referente à grandisina e o segundo é referente ao metabólito. Espectro de massas do metabólito (C) e produto de oxidação respectivamente (D).

4.3. Caracterização da deidrograndisina e atividade tripanossomicida

Para o estudo de metabolização foi observada a necessidade de realização, previamente, de ensaios *in vitro* para observar as possíveis transformações na molécula da grandisina e facilitar a identificação destes compostos *in vivo*. Para isso foram utilizadas técnicas biomiméticas já descritas como oxidações com porfirinas e microsoma hepático de ratos. Também foram considerados dados da literatura que reportaram metabólitos de grandisina produzidos por fungos (Verza *et al.*, 2009, Vieira *et al.*, 2011) e por lagartas das famílias Coleoptera e Lepidoptera (Ramos *et al.*, 2008). Nos dois artigos observa-se que os metabólitos formados eram principalmente derivados demetilados no grupo metoxila da grandisina ou com uma cisão de uma porção aromática, tabela 10.

Tabela 10 – Principais metabólitos formados a partir da grandisina e sua respectiva técnica utilizada ou agente biotransformador.

Metabólito	Agente de biotransformação	Referência Bibliográfica
Lagartas da família Coleóptera e Lepidóptera <i>Cunninghamella echinulata</i>	Ramos <i>et al.</i> , 2008. Vieira <i>et al.</i> , 2011.
Lagartas da família Coleóptera e Lepidóptera	Ramos <i>et al.</i> , 2008.
<i>Phomopsis sp.</i>	Verza <i>et al.</i> , 2009.

A substância pura, produto de oxidação inédito obtido pelo método de Jacobsen e metabólito produzido pela metabolização com microsomas hepáticos de ratos, foi submetida às análises de RMN, EM, rotação específica e dicróismo circular para sua caracterização. A substância pura é um sólido branco amorfo e o ensaio de rotação específica em acetonitrila forneceu o valor de $-69,1$ para a concentração de $0,09$ g/100 mL na temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Conforme já demonstrado na figura 25, o espectro de massas por IE da deidrograndisina apresenta os seguintes íons de relação m/z característicos (%: intensidade relativa): 430 ($[M]^+$, 45), 348 (21), 347 (100), 247 (21), 235 (17), 219 (16), 204 (19), 195 (61). A análise em ESI-EM em alta resolução no modo positivo e o resultado, $[M+H]^+$ m/z 431,20620 presente na figura 26, confirmaram a fórmula do composto como sendo $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_7$ com um erro de $0,5$ ppm (valor teórico m/z 431,20640).

Figura 26 - Espectro de ESI-MS obtido para a deidrograndisina (valor teórico calculado como m/z 431,2064; erro experimental de $0,5$ ppm).

Para auxiliar na determinação estrutural da deidrograndisina também foi obtido o espectro de RMN ^1H , figura 27 e este foi comparado com o espectro de RMN ^1H da grandisina, substrato das reações. A grandisina possui stereoquímica relativa *trans, trans, trans*, o que indica que os hidrogênios metílicos e oxibenzílicos são equivalentes. Contudo, para a deidrograndisina foi observada a perda dessa simetria devido à presença de dois sinais com deslocamento químico similares em δ_{H} 6,67 e δ_{H} 6,58 ppm para os hidrogênios aromáticos H-2/H-6 e H-2'/H-6', respectivamente. O mesmo efeito foi observado para os singletos das metoxilas ($-\text{OCH}_3$), confirmando a perda da simetria e indicando que a reação de oxidação não havia ocorrido em nenhuma dos anéis aromáticos. A maior diferença foi observada nas posições H-7/H-7' e H-8/H-8'. A integração dos sinais bem definidos em δ_{H} 4,80 ppm (H-7'd, $J = 8,6$ Hz) e em δ_{H} 2,91 ppm (H-8', m) permitiu atribuir a ocorrência de apenas um hidrogênio por sinal e também um efeito desblindante em relação aos sinais da grandisina (Ramos *et al.*, 2008). O mesmo efeito de desblindamento foi observado para os hidrogênios metílicos do C-9 (δ_{H} 1,84 d, $J = 1,4$ Hz).

Figura 27 - Comparação entre os espectros de RMN ^1H obtidos para grandisina (espectro inferior) e deidrograndisina (espectro superior) em CDCl_3 .

Finalmente, para se confirmar a estereoquímica da deidrograndisina foram obtidos os espectros de dicroísmo circular para a grandisina e o produto de oxidação. O equipamento utilizado determinou durante a mesma análise o espectro de UV-Vis dos dois compostos. Os valores de comprimento de onda máximos (λ_{max}) obtidos para a deidrograndisina foram 239 e 270 nm. A comparação entre os espectros de UV-Vis da grandisina e da deidrograndisina, figura 28, indicaram um efeito batocrômico devido à presença de uma ligação dupla a mais no segundo composto.

Figura 28 - Comparação entre os espectros de UV-Vis obtidos para grandisina ($0,7 \cdot 10^{-4}$ mol/L) e deidrograndisina ($4,4 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em acetonitrila.

O espectro de dicroísmo circular obtido para a deidrograndisina apresentou os valores de θ 207 +4,8; θ 217 +5,2; θ 241 -4,4; θ 296 -1,1; e θ 318 -1,2 mdeg, o que indica valores positivos para comprimentos de onda até aproximadamente 233 nm e uma inversão no espectro com valores negativos entre 233 nm e 258 nm, seguidos por mais duas inversões com valores positivos e negativos próximos a 0 mdeg até o último comprimento de onda monitorado. Este espectro se assemelha muito ao obtido para a grandisina, figura 29, e, portanto confirma a manutenção da estereoquímica presente no anel furânico. Dessa forma, a estereoquímica da deidrograndisina foi determinada como sendo *R, R* uma vez que a da grandisina é *R, R, R, R* e foi determinada por cristalografia de raio-X (Saad *et al.*, 1991). Após todos esses resultados foi possível confirmar a estrutura da deidrograndisina e atribuir o nome químico segundo normas da IUPAC como 3,4*R*-dimethyl-2,5*R*-bis(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3-dihydrofuran. A sua estrutura química está representada na figura 30.

Após a sua determinação estrutural estar concluída, a deidrograndisina foi submetida ao mesmo ensaio em que a grandisina apresentou atividade tripanossomicida 50 vezes maior que o controle positivo, violeta de genciana. O resultado indicou ausência de atividade da deidrograndisina em todas as concentrações testadas. Esse resultado sugere que provavelmente a conformação do anel tetraidrofurânico da grandisina é importante para a atividade tripanossomicida e serve como complemento para um estudo posterior sobre o mecanismo de ação nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Figura 29 - Comparação entre os espectros de dicroísmo circular CD obtidos para a grandisina ($0,7 \cdot 10^{-4}$ mol/L) e deidrograndisina ($4,4 \cdot 10^{-4}$ mol/L) em acetonitrila.

Figura 30 - Deidrograndisina, o metabólito formado a partir da grandisina pela técnica de metabolização *in vitro* que utiliza microsossoma hepático de ratos e o produto de oxidação obtido através da reação com o catalisador de Jacobsen (catálise química).

5. Farmacocinética da Grandisina

5.1. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de grandisina em plasma

Nesta etapa foi desenvolvida a metodologia analítica para análise do material biológico e consequentemente quantificação da grandisina e seus metabólitos. A opção pelo UPLC-DAD-MS/MS para este tipo de estudo foi baseada na alta sensibilidade deste equipamento. A validação da metodologia analítica foi baseada nos parâmetros exigidos pela ANVISA, RE nº 27 de 2012, e FDA para métodos bioanalíticos. A equação da curva de calibração da linearidade foi $6,93956x - 2,90844$, com $r = 0,995957$ ($r^2 = 0,991931$); para uma faixa linear entre as concentrações de 56,23 ng/mL e 472,32 ng/mL, figura 31. O limite de detecção foi 1,18 ng/mL e o de quantificação 56,23 ng/mL sendo que ambos foram determinados experimentalmente. Os valores de exatidão e precisão estão expressos na tabela 11 e 12.

As amostras foram consideradas estáveis durante 3 dias após os ensaios de estabilidade de curta duração e de pós-processamento. As soluções do padrão interno e analito armazenadas a -20°C foram consideradas estáveis durante 48 dias. Assim, os parâmetros estão de acordo com as especificações de ambos os órgãos reguladores. As figuras 32, 33 e 34 contêm os cromatogramas para as amostras obtidas para demonstrar a seletividade do método e a figura 35 contém o cromatograma do teste para demonstrar a ausência do “efeito matriz” da amostra, ou seja, no cromatograma nos tempos de retenção para o analito (grandisina), padrão interno (licarina) e principal metabólito (deidrograndisina), não é possível observar a supressão de íons causada pela matriz na ionização dos analitos (licarina, grandisina e deidrograndisina) ou por um dos analitos na ionização de outro.

Figura 31 - Curvas obtidas para a linearidade (A) e precisão intermediária (B, C e D) no processo de validação da metodologia analítica para determinação de grandisina em plasma de camundongos da linhagem Balb/c.

Figura 32 - Cromatogramas obtidos na metodologia analítica desenvolvida que demonstram a seletividade do método. Em A, solvente no modo SCAN; em B, branco (plasma) no modo SCAN; em C, licarina no modo SCAN; em D, deidrograndisina (M1) no modo SCAN; em E, grandisina no modo SCAN.

Figura 33 - Cromatogramas obtidos na metodologia analítica desenvolvida que demonstram a seletividade do método. Em A, solução de licarina e grandisina no modo SCAN; em B, solução de licarina e deidrograndisina no modo SCAN; em C, solução de deidrograndisina e grandisina no modo SCAN.

Figura 34 - Cromatogramas obtidos na metodologia analítica desenvolvida que demonstram a seletividade do método. Em A, solução de licarina, deidrograndisina e grandisina no modo SCAN; e finalmente em B, C e D análise no modo MRM de solução contendo licarina, grandisina e deidrograndisina com seus respectivos sinais.

Figura 35 – Cromatograma no modo SCAN para demonstrar a ausência de efeito da matriz na supressão de íons dos analitos (“efeito matriz”).

Tabela 11 - Resultados para exatidão intracorrida e intercorrida.

Concentração (ng/mL)	EPR intracorrida (%)			EPR intercorrida (%)
	1	2	3	
56,2	0,3	-0,7	4,0	1,2
118,1	-1,6	-2,4	-2,1	-2,1
265,7	4,6	6,5	7,3	6,2
360,0	-5,5	-0,2	3,1	-0,9
432,0	2,9	3,5	12,7	6,4
472,3	-0,7	1,4	7,6	2,8

Tabela 12 - Resultados para precisão intracorrida e intercorrida.

Concentração (ng/mL)	CV intracorrida (%)			CV intercorrida (%)
	1	2	3	
56,2	3,3	1,0	5,1	2,5
118,1	2,8	1,6	1,5	0,4
265,7	2,6	1,0	1,1	1,3
360,0	1,0	0,8	1,6	4,4
432,0	1,0	1,1	1,5	5,2
472,3	1,9	0,4	2,6	4,2

5.2. Farmacocinética e metabolismo *in vivo*

O desenvolvimento e validação de metodologia analítica, o estudo de metabolismo *in vitro* e o ensaio de toxicidade realizados previamente permitiram iniciar o estudo do metabolismo *in vivo* e farmacocinética da grandisina. Essas etapas iniciais geraram informações que facilitaram o desenvolvimento desta etapa além de demonstrar a ausência de efeitos nocivos na utilização deste composto natural.

No estudo *in vivo*, para a administração da grandisina, molécula com característica de média polaridade, foi testada a solubilização em PEG e Phosal 50[®]. Contudo, a administração dessas soluções causou embolia nos animais, provavelmente devido à formação de um gel com alta viscosidade, depois da incorporação do ativo. Assim, foi necessário o desenvolvimento de uma nova formulação (adição de água a 80°C à solução de grandisina dissolvida em Phosal 50[®] a 80°C).

A formulação foi então administrada em diferentes intervalos de tempo e sendo monitoradas a degradação da grandisina e a formação da deidrograndisina. A deidrograndisina foi formada e observada no ensaio *in vivo* entre 5 minutos após a administração até 4 horas. A figura 36 apresenta os cromatogramas para a deidrograndisina nos tempos de 5 minutos, 40 minutos e 4 horas após a administração da formulação.

A quantificação deste metabólito não foi realizada, pois além da metodologia analítica não ter sido validada para a deidrograndisina, os valores de área obtidos para as replicatas de um mesmo ponto apresentavam grande variação, sendo observada uma grande variação no valor de área de deidrograndisina para um dado animal. Essa variação também resultou em uma incerteza sobre o valor médio obtido para o tempo após a administração. Esse problema é comum para compostos em baixa concentração, às vezes próximo ao valor do limite de detecção, o que é comum na análise de metabólitos. O equipamento utilizado neste estudo, UPLC-MS/MS, possui grande sensibilidade e para a grandisina, muito semelhante estruturalmente ao metabólito, o limite inferior de detecção possuía valor de concentração baixa, 1,18 ng/mL e a variação foi muito pequena para o limite de quantificação. Dessa forma, é possível apenas assegurar que o metabólito produzido *in vitro* por diferentes técnicas também foi produzido *in vivo* ainda que em baixas concentrações.

Figura 36 – Cromatogramas da análise do plasma pertencente ao animal 5 no tempo de 5 minutos (A); animal 3 no tempo de 40 minutos (B); e animal 5 no tempo de 4 horas (C) após a administração de formulação contendo grandisina. O cromatograma está com ênfase na região de monitoramento da deidrograndisina (431,1 → 195) tempo de retenção entre 3,0 e 3,75 minutos.

Para o estudo de farmacocinética da grandisina, foi obtido um gráfico, figura 37, que mostra a concentração da grandisina nos diferentes intervalos de tempo após a administração da formulação, e um com os mesmos valores, porém na escala logarítmica, figura 38. Como não foram analisadas todas as amostras em um único dia, uma curva de calibração foi analisada junto com as amostras presentes em uma sequência de análises para minimizar erros analíticos. O perfil observado apresenta uma inclinação acentuada entre 5 e 20 minutos seguido por uma inflexão acentuada em 40 minutos e retornando ao decréscimo linear em 1 hora após a administração da formulação. Esse perfil é característico de nanoemulsões e foi

relatado para diferentes tipos de ativos, pois existe a fase de liberação gradual do ativo para a corrente sanguínea (Margout *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2010).

Após esse período, ocorre a fase de distribuição da lignana concomitantemente com a sua metabolização e eliminação. Após duas horas, apenas a fase de eliminação ocorre de maneira muito lenta com um valor de β de $0,019 \text{ h}^{-1}$. Ainda observando a fase de eliminação, no tempo de 8 horas ocorre uma variação no decréscimo da concentração de grandisina em relação à curva de eliminação, apesar do valor estar dentro do desvio estimado. Ainda assim, alguns processos podem estar ocorrendo isoladamente ou concomitantemente como, por exemplo, reabsorção intestinal do composto ou liberação de algum compartimento que havia sido distribuído (Mao *et al.*, 2011; Oberle & Amidon, 1987). Esses processos já foram relatados para outras lignanas, como por exemplo, a sauchinona e deoxischisandrina, e que apresentam o perfil semelhante após as primeiras horas de administração (Xu *et al.*, 2012; Mao *et al.*, 2011). Dessa forma, os últimos valores de concentração que estão na fase de eliminação (2, 4, 8 e 16 horas) foram utilizados para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos. Assim, os valores obtidos foram os seguintes C_{p0} $728,16 \text{ ng mL}^{-1}$, K_e $0,023 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2}$ $29,8 \text{ h}$, V_d $53,0 \text{ L Kg}^{-1}$, $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ $40510,65 \text{ ng mL}^{-1} \text{ h}$ e Clearance $1,2 \text{ L h}^{-1} \text{ Kg}^{-1}$.

Figura 37 – Gráfico da concentração plasmática de grandisina após a administração de formulação por via intravenosa.

Figura 38 – Gráfico em escala logarítmica da concentração plasmática de grandisina após a administração de formulação por via intravenosa.

Conclusões

A grandisina foi obtida a partir do processo de isolamento utilizado com alto rendimento e alta pureza o que permitiu sua utilização nas diferentes etapas do estudo. Assim, foi possível garantir que os resultados obtidos seriam referentes ao próprio composto estudado. Antes do estudo de metabolismo e farmacocinética, a grandisina foi submetida a um estudo de degradação forçada para verificar a estabilidade da lignana em relação a diversos parâmetros a qual seria submetida nos ensaios de metabolismo *in vitro*.

A lignana foi considerada estável para todos os parâmetros testados, assegurando assim que nenhum produto de degradação lateral seria obtido nos ensaios de metabolismo *in vitro*.

Como esperado, no ensaio de metabolismo biomimético *in vitro* utilizando catalisadores organometálicos foi obtido um número maior de produtos quando comparado com o sistema microssomal. O fato relevante foi a obtenção em modelos biomiméticos do mesmo produto de oxidação gerado pelos microssomas hepáticos de ratos e nos estudos *in vivo*. Este metabólito, denominado de deidrograndisina, inédito na literatura, foi caracterizado por diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas e permitiu avançar na compreensão da farmacocinética da grandisina.

Foi desenvolvida uma emulsão para administração da lignana, que pode ser utilizada no ensaio de eficácia da grandisina *in vivo*. Esta formulação foi eficiente para a resolução do problema de administração da grandisina por via intravenosa. No estudo da farmacocinética desta lignana, os parâmetros calculados foram Cp_0 728,16 ng mL⁻¹, K_e 0,023 h⁻¹, V_d 53,0 L Kg⁻¹, $t_{1/2}$ 29,8 h, $ASC_{0 \rightarrow \infty}$ 40510,65 ng mL⁻¹ h e Clearance 1,2 L h⁻¹ Kg⁻¹. O perfil cinético é semelhante ao de outras lignanas e possui uma variação na curva de eliminação que pode ser referente à liberação da grandisina acumulada em algum tecido ou à reabsorção. Assim, foi possível caracterizar o metabolismo da grandisina em diferentes modelos e fases que compreendem o estudo pré-clínico da molécula. Portanto, os resultados obtidos neste projeto estão alinhados e contribuirão para os futuros estudos clínicos do medicamento para doença de Chagas e abre uma perspectiva para auxiliar no tratamento dessa doença negligenciada.

Referências Bibliográficas

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “**Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do guia para Realização do Estudo de Estabilidade**”, informe técnico nº1, de 15 de julho de 2008.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, “**Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.**”, Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012.

Asha, S.; Vidyavathi, M. Role of human liver microsomes in *in vitro* metabolism of drugs-a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, nº 6, p.1699-1722, 2010.

Bachorik, P.S.; Rifkind, B.M. Kwiterovich, P.O. Lipídeos e Dislipoproteinemias. In. Henry, J.B. **Diagnóstico clínico e tratamento por métodos laboratoriais**. 19ª ed., São Paulo: Manole, cap. 10, p. 208-236, 1999.

Baranczewski, P.; Stańczak, A.; Sundberg, K.; Svensson, R.; Wallin, A.; Jansson, J.; Garberg, P.; Postlind, H. Introduction to *in vitro* estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. **Pharmacological Reports**, v. 58, nº 4, p. 453-472, 2006.

Bárbosa-Filho, J. M.; Da Silva, M. S.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R. Neolignans from *Licaria aurea*. **Phytochemistry**, v. 28, nº 8, p. 2209–2211, 1989.

Bernadou, J.; Meunier, B. Biomimetic Chemical Catalysts in the Oxidative Activation of Drugs. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 346, p. 171–184, 2004.

Birch, A. J.; Milligan, B.; Smith E.; Speake, R. N. Some stereochemical studies of lignans. **Journal Organic Chemistry**, 4471, 1958.

Brandon, E. F. A.; Raap, C. D.; Meijerman, I.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 189, p. 233-246, 2003.

Buckner, F. S.; Verlinde, C. L.; La Flamme, A. C.; van Voorhis, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2592-2597, 1996.

Cabral, M. M. O.; Alencar, J. A.; Guimaraes, A. E.; Kato, M. J. Larvicidal Activity of Grandisin Against *Aedes Aegypti*, **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 25, p. 103-105, 2009.

Cain, K.; Skilleter, D. N. **Biochemical Toxicology – a practical approach**. Oxford, IRL PRESS, cap. 9, p. 217-253, 1987.

Carvalho, A. A. V.; Galdino, P. M.; Nascimento, M. V. M.; Kato, M. J.; Valadares, M. C.; Cunha, L. C.; Costa, E. A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 113-118, 2010.

Chai, P. P. K. **A check-list of flora, fauna, food and medicinal plants**. Percetakan Nasional Malaysia Berhad, PRESS, cap. 2, p. 5-60, 2000.

Clemente-Tejeda, D.; Lopez-Moreno, A.; Bermejo, F. A. Oxidation of unsaturated steroid ketones with hydrogen peroxide catalyzed by Fe(bpmen)(OTf)₂. New methodology to access biologically active steroids by chemo-, and stereoselective processes. **Tetrahedron**, v. 68, p. 9249-9255, 2012.

Clemente-Tejeda, D.; Lopez-Moreno, A.; Bermejo, F. A. Non-heme iron catalysis in C=C, C-H, and CH₂ oxidation reactions. Oxidative transformations on terpenoids catalyzed by Fe(bpmen)(OTf)₂. **Tetrahedron**, v. 69, p. 2977-2986, 2013.

Crossley, N. S.; Djerassi, C. Naturally occurring oxygen heterocyclics. Part XI. Veraguensin **Journal Organic Chemistry**, 1459, 1962.

Ekins, 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**, v. 44, p. 313–324, 2000.

FDA, Food and Drug Administration, “**Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation**”, maio de 2001.

Ferreira, L. S.; Callejon, D. R.; Engemann, A.; Cramer, B.; Humpf, HU.; Barros, V.; Assis, M.; Da Silva, D. B.; Albuquerque, S.; Okano, L. T.; Kato, M. J.; Lopes, N. P. *In vitro* Metabolism of Grandisin, a Lignan with Anti-chagasic Activity. **Planta Medica**, v. 78, p. 1939-1941, 2012.

Greger, H.; Pacher, T.; Vajrodaya, S.; Bacher, M.; Hofer, O. Intraspecific Variation of Sulfur-Containing Bisamides from *Aglaia leptantha*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n° 5, p. 616–620, 2000.

Groves, J. T.; Nemo, T. E.; Myers, R. S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes. oxygen transfer from iodosylbenzene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n° 4, p. 1032–1033, 1979.

Guimarães, E. F.; Monteiro, D. Piperaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 57, n° 3, p. 567-587, 2006.

Gunaratna, C. Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Drug Discovery: A Primer for Bioanalytical Chemists, Part II. **Current Separations**, v. 19, n° 3, p.87-92, 2001.

Holloway, D.; Scheinmann, F. Two lignans from *Litsea grandis* and *L. gracilipes*. **Phytochemistry**, v. 13, n° 7, p. 1233–1236, 1974.

Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **REFLORA - Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Acessado em Abril de 2013. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ResultadoDaConsultaNovaConsulta.do>.

Jardim Botânico da Universidade do Mississippi. Acessado em abril de 2013.
www.tropicos.org.

Jia, L.; Zhang, D.; Li, Z.; Duan, C.; Wang, Y.; Feng, F.; Wang, F.; Liu, Y.; Zhang, Q. Nanostructure lipid carriers for parenteral delivery of silybin: Biodistribution and pharmacokinetics studies. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 80, p. 213-218, 2010.

Kola, I.; Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Review Drug Discovery**, v. 3, p. 711–715, 2004.

Lahoz, A.; Donata, M. T.; Montero, S.; Castell, J. V.; Gomez-Lechon, M. J. A new *in vitro* approach for the simultaneous determination of phase I and phase II enzymatic activities of human hepatocyte preparations. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, nº 2, p. 240-244, 2008.

Laine, R. Metabolic Stability: Main Enzymes Involved and Best Tools To Assess It. **Current Drug Metabolism**, v. 9, nº 9, p. 921-927, 2008.

Li, A. P. *In Vitro* Approaches to Evaluate ADMET Drug Properties. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 701-706, 2004.

Li, F.; Yang, XW. Simultaneous Determination of Diastereomers (+)-Licarin A and Isolicarin A from *Myristica fragrans* in Rat Plasma by HPLC and its Application to their Pharmacokinetics. **Planta Medica**, v. 74, p. 880–884, 2008.

Lopes, N. P. **Metabólitos Secundários de *Virola Surinamensis* (Rol.) Warb, (Myristicaceae).** Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP, São Paulo, 135 p., 1996.

Lopes, N. P.; Blumenthal, E. E. A.; Cavalheiro, A. J.; Kato, M. J.; Yoshida, M. Lignans, γ -lactones and propiophenones of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, v. 43, nº 5, p. 1089–1092, 1996.

Lopes, N. P.; Chicaro, P.; Kato, M. J.; Albuquerque, S.; Yoshida, M. Flavonoids and lignans from *Virola surinamensis* twigs and their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, v. 64, p. 667-669, 1998.

Ma, Y.; Han, G. Q.; Li, C. L.; Cheng, J. R.; Arison, B. H.; Hwang, S. B. Neolignans from *Piper polysiphorum* C.DC. **Yao Xue Xue Bao**, v. 26, n° 5, p. 345-350, 1991.

Mao, S.; Zhang, H.; Lv, L.; Zhu, Z.; Zhao, L.; Zhang G.; Chai, Y. Rapid determination and pharmacokinetics study of lignans in rat plasma after oral administration of *Schisandra chinensis* extract and pure deoxyschisandrin. **Biomedical Chromatography**, v. 25, p. 808–815, 2011.

Margout, D.; Gattacceca, F.; Moarbess, G.; Wein, S.; van Ba, C. T.; Le Pape, S.; Berger, O.; Escale, R.; Vial, H. J.; Bressolle, F. M. M. Pharmacokinetic properties and metabolism of a new potent antimalarial *N*-alkylamidine compound, M64, and its corresponding bioprecursors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 81–90, 2011.

Martins, R. C. C.; Latorre, L. R.; Sartorelli, P.; Kato, M. J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 55, n° 7, p. 843-846, 2000.

Martins, R. C. C.; Lago, J. H. G.; Albuquerque S.; Kato, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.

Melo, A. J. B.; Iamamoto, Y.; Maestrin, A. P. J.; Smith, J. R. L.; Santos, M. D.; Lopes, N. P.; Bonato, P. S. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphyrins. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 226, p. 23–31, 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 lignan (-)-grandisin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 240-244, 2013.

Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, 2010**. Acessado em Abril de 2013. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS_2010.pdf.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 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**, v. 54, p. 804-812, 2012.

Oberle, R. L.; Amidon, G. L. The influence of variable gastric emptying and intestinal transit rates on the plasma level curve of cimetidine; an explanation for the double peak phenomenon. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 15, nº 5, p. 529-44, 1987.

OECD, OECD Guideline for Testing of Chemicals. **Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure**. nº420, 2001.

Oliveira, R. B.; Vaz, A. B. M.; Alves, R. O.; Liarte, D. B.; Donnici, C. L.; Romanha, A. J.; Zani, C. L. Arylfurans as potencial *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 169-173, 2006.

Omura, T.; Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. solubilization, purification, and properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, p. 2370-2378, 1964.

Paul, S. M.; Mytelka, D. S.; Dunwiddie, C. T.; Persinger, C. C.; Munos, B. H.; Lindborg, S. R.; Schacht, A. L. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 203-214, 2010.

Pu, JX.; Gao, XM.; Lei, C.; Xiao, WL.; Wang, RR.; Yang, LB.; Zhao, Y.; Li, LM.; Huang, SX.; Zheng, YT.; Sun, HD. Three new compounds from *Kadsura longipedunculata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, nº 8, p. 1143-1146, 2008.

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

Rates, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, nº 2, p. 57-69, 2001.

Reedijk, J.; Bouwman, E. **Bioinorganic Catalysis**. [S.l.]: Marcel Dekker, Incorporated, 1999.

Saad, J. M.; Soepadamo, E.; Fang, X. P.; McLaughlin, J. L.; Fanwick, P. E. (-)-Grandisin from *Cryptocarya crassinervia*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1681-1683, 1991.

Santos, M. D.; Lopes, N. P.; Iamamoto, Y. HPLC-ESI-MS/MS analysis of oxidized di-caffeoylquinic acids generated by metalloporphyrin-catalyzed reactions. **Química Nova**, v. 31, nº 4, p. 767-770, 2008.

Universidade de São Paulo - USP. "**Processo de obtenção das ligninas tetraidrofurânicas veraguensina (1) e grandisina (2), atividade antichagásica e seu uso como antichagásico**" PI9903472-7, 1999.

Valadares, M. C.; Carvalho, I. C. T.; Oliveira-Junior, L.; Vieira, M. S.; Benfica, P. L.; Carvalho, F. S.; Andrade, L. V. S.; Lima, E. M.; Kato, M. J. Cytotoxicity and antiangiogenic activity of grandisin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 1709-1714, 2009.

Valadares, M. C.; Oliveira-Junior, L. M.; Carvalho, F. S.; Andrade, L. V. S.; Dos Santos, A. P.; Oliveira, V.; Gil, E. S.; Kato, M. J. Chemoprotective effect of the tetrahydrofuran lignan grandisin in the in-vivo rodent micronucleus assay. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 447-451, 2011.

Verza, M.; Arakawa, N. S.; Lopes, N. P.; Kato, M. J.; Pupo, M. T.; Said, S.; Carvalho, I. Biotransformation of a Tetrahydrofuran Lignan by the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 195-243, 2009.

Vieira, M. S.; Oliveira, V.; Lima, E. M.; Kato, M. J.; Valadares, M. C. *In vitro* basal cytotoxicity assay applied to estimate acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, p. 505-510, 2011.

World Health Organization, WHO. **Traditional medicine**. Fact sheet nº 134, 2008. Acessado em Abril de 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>.

Xu, CL.; Chen, JW.; Ju, WZ.; Liu, SJ.; Chen, Y.; Chen, ZP.; Xue, P.; Chen, HJ.; Li, X. Quantitative determination of sauchinone in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 26, nº 10, p. 1210-1214, 2012.

Zhang, HJ.; Tamez, P A.; Hoang, V. D.; Tan, G. T.; Van Hung, N.; Xuan, L. T.; Huong, L. M.; Cuong, N. M.; Thao, D. T.; Soejarto, D. D.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M. Antimalarial Compounds from *Rhaphidophora decursiva*. **Journal of Natural Products**, v. 64, nº 6, p. 772-777, 2001.

Zhou, JJ.; Xie, GR.; Yang, XJ. **Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines. Molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications. Vol. 5. Isolated compounds T-Z. References, TCM plants and congeners**. Springer, PRESS, TCM plants and congeners, p. 478 e 528, 2011.