

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

Metabolismo e parâmetros farmacocinéticos da lignana grandisina

Leandro De Santis Ferreira

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

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.

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.

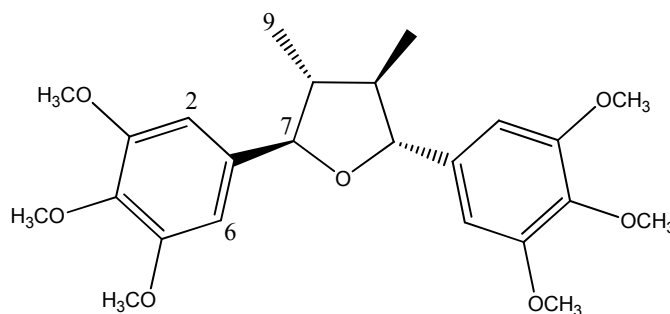


Figura 1 – Estrutura química da lignana grandisina.

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 | | | Ma <i>et al.</i> , 1991; |
| <i>Piper polysyphorum</i> | Jiao (Camphortreeleaf Pepper) | Piperaceae | China | 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 diminuam 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 glutatona (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 hemeoproteínas 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 difosfoglucuronosil transferase (UGT), glutatona 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 microsomas hepáticos e enzimas recombinantes (superssomas) (Li, 2004; Lahoz *et al.*, 2008).

O sistema microsomal 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 microsomas isolados são utilizados na avaliação das reações de fase I do metabolismo e pela adição de um cofator como NADPH. Entretanto, os microsomas também podem ser usados em estudos de glicuronidação pela adição de ácido uridina difosfato glicurônico (UDPGA).

As principais vantagens do uso dos microsomas 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 microsomas 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 microsomal 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 microsomas hepáticos. Logo também fica clara a maior facilidade de isolamento dos produtos do meio reacional em comparação aos produtos gerados pelos microsomas hepáticos (Bernadou & Meunier, 2004; Santos, Lopes & Yamamoto, 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.

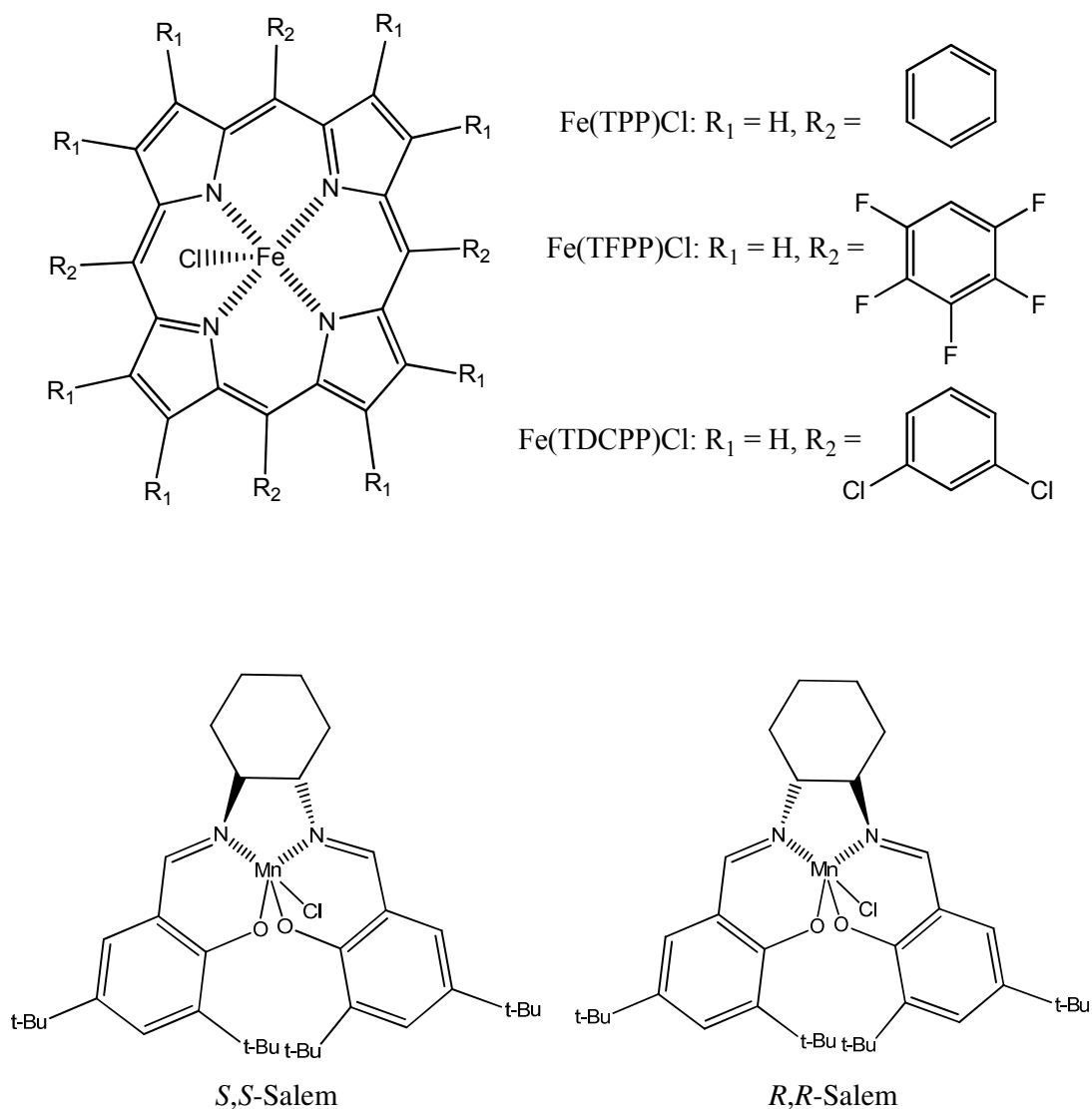


Figura 2 – Algumas metaloporfirinas utilizadas em ensaio biomiméticos.

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.

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 microsomal. O fato relevante foi a obtenção em modelos biomiméticos do mesmo produto de oxidação gerado pelos microsomas 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 C_{p0} 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.; Stańczyk, 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, n° 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, n° 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, n° 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 n° 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, n° 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, n° 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.