

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

EFEITO DE PRODUTOS NATURAIS AMAZÔNICOS NA
FARMACOCINÉTICA DE MARCADORES DA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DO CITOCROMO P450

NAYANA YARED BATISTA

MANAUS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

NAYANA YARED BATISTA

EFEITO DE PRODUTOS NATURAIS AMAZÔNICOS NA
FARMACOCINÉTICA DE MARCADORES DA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DO CITOCROMO P450

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães

Co-Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza

MANAUS
2014

NAYANA YARED BATISTA

EFEITO DE PRODUTOS NATURAIS AMAZÔNICOS NA
FARMACOCINÉTICA DE MARCADORES DA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DO CITOCROMO P450

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Bioanálises e Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães
Orientador

Profa. Dra. Ana Cyra dos Santos Lucas
Membro

Profa. Dra. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho
Membro

Aos meus pais, Fanny e Bianor;

A minha irmã, Tayana;

E aos meus sobrinhos, Ângelo e Vitor.

Por serem meu suporte e a minha fonte de amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos que tem me proporcionado nessa caminhada! A Ele, todo o meu amor e minha fé!!

Aos meus pais, Fanny e Bianor, pelo amor dedicado, por acreditarem e por me apoiarem sempre! A minha irmã e aos meus sobrinhos, lindos, por fazerem eu me sentir tão especial!! Minha família, minha base, meu amor! É tudo por vocês e para vocês!

A pessoa que Deus colocou em meu caminho, Marias das Graças Menezes, e que cuidou de mim como uma mãe cuida dos seus. Muito obrigada por tudo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igor Magalhães, por todos os ensinamentos, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho;

A minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Tatiane Souza, por ceder toda a estrutura para a realização dos ensaios de controle de qualidade;

Ao Prof. Dr. José Wilson, pela paciência ao me ensinar o procedimento com os animais;

Ao Prof. Dr. Ádley Antonini, por toda a ajuda e por conseguir o material vegetal;

Ao Dr. Francisco Célio pelo fornecimento das amostras de *E. puniceifolia*;

Ao Prof. Dr. Émerson Lima, pela disponibilidade do laboratório e dos reagentes;

Aos técnicos, Newton e Dorotéia, por toda ajuda. Muito obrigada pela dedicação e amizade de vocês!!

Aos membros do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, especialmente a Carolina Pacheco pela ajuda fundamental nos ensaios de controle de qualidade e por sua amizade!

As minhas lindinhas e colegas de laboratório, Édna, Mariana e Amanda, pela ajuda e companhia nos experimentos. Tudo ficou muito melhor com vocês!

Aos colegas de turma do mestrado, especialmente a Socorro, Neila e Chanderlei.

As minhas amigas lindas de Santarém, que sempre estiveram muito presente em todos os momentos, especialmente a que veio de Santarém e enfrentou todas as adversidades junto comigo. Elenn, muito obrigada por tudo! Teria sido muito mais difícil sem a tua amizade;

Aos vigilantes que sempre me ajudaram como podiam, Seu. Vitor e Heuton, sempre dando um jeitinho de um dia cheio, ficar um pouco melhor;

A CAPES, pela bolsa de mestrado;

Ao CNPq pelo auxílio financeiro para a execução do trabalho;

A todos, e sei que foram muitos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!!!!

“A motivação é como uma pequena semente que quando plantada em nosso interior, terá seu tempo de germinar e produzir frutos fartos e doces.”

Luis Alves

RESUMO

O uso de produtos naturais no tratamento de doenças é cada vez mais frequente pela população e, ao longo dos anos, tem sido mostrado que determinadas plantas podem apresentar substâncias potencialmente tóxicas, principalmente quando associadas com outros fármacos. Falhas terapêuticas ou surgimento de intoxicações decorrentes dessas associações são possíveis de ocorrer e despertam, atualmente, grande interesse na comunidade científica devido aos sérios problemas relacionados a este processo. A grande maioria das interações é baseada em interferências na etapa de metabolismo através da indução ou inibição de enzimas-chave na farmacocinética. Neste projeto, foram selecionadas duas espécies vegetais, *Paullinia cupana* (guaraná) e *Eugenia punicifolia* (pedra-ume-caá), largamente utilizadas pela população Amazônica e com grande potencial biotecnológico, para avaliação de seus efeitos na farmacocinética de marcadores da atividade enzimática do citocromo P450 em ratos. Para assegurar a qualidade da Matéria Prima Vegetal (MPV), foram realizados ensaios de controle de qualidade, previamente descrito pela Farmacopéia Brasileira, como teor de umidade e extrativos, presença de impurezas, entre outras. Com relação à experimentação *in vivo*, os animais foram pré-tratados com o extrato das sementes de guaraná (14 dias) ou extrato das folhas de pedra-ume-caá (dose única) e, logo após o tratamento, receberam teofilina e midazolam, respectivamente. As amostras sanguíneas foram coletadas em tempos pré-determinados através de uma cânula introduzida na artéria carótida esquerda. Os níveis de teofilina e midazolam no plasma foram quantificados através de métodos previamente validados empregando a técnica de HPLC-DAD, a partir dos quais foram determinados os parâmetros farmacocinéticos, tais como, meia vida plasmática, clearance, área sob a curva, entre outros. A análise de variância foi aplicada para verificação de diferenças entre os grupos, obtidas a partir dos parâmetros farmacocinéticos, com nível de significância fixado em 5% ($p < 0,05$). Os resultados encontrados para essas espécies quanto a controle de qualidade estão em acordo com os parâmetros descritos na Farmacopéia Brasileira, garantindo assim a qualidade dos constituintes presentes nos extratos e segurança na manipulação dos mesmos. Na análise farmacocinética, a administração única do extrato *E. punicifolia* apresentou significativa alteração na cinética do midazolam, indicando uma provável inibição enzimática, podendo interferir na resposta farmacológica de medicamentos metabolizados pela CYP3A. A administração subcrônica da solução aquosa de *P. cupana* provocou significativa alteração na cinética da teofilina, indicando uma provável indução enzimática, podendo interferir na resposta farmacológica de medicamentos metabolizados pela CYP1A. Assim, este estudo verificou alterações na cinética de fármacos em ratos causadas pelo uso de produtos de origem vegetal e, portanto, estudos adicionais devem ser realizados para a elucidação dos fenômenos observados.

Palavras chave: Guaraná; Pedra-ume-caá; Interação Medicamentosa; Controle de Qualidade.

ABSTRACT

The use of natural products for the treatment of diseases is increasing among people and, over the years, it has been shown that certain plants may present dangerous substances, particularly when associated with other drugs. Therapeutic failure or intoxication of these associations are likely to occur and currently caught great interest from the scientific community due to serious problems related to this process. The majority of the interactions are based on interference in the metabolism step through induction or inhibition of key enzymes. In this study, two species, *Paullinia cupana* (guarana) and *Eugenia punicifolia* (pedra-ume-caá) were selected, for the evaluation of its effects on the pharmacokinetics of markers of enzyme activity of cytochrome P450 in rats since they are widely used by the Amazonian population and with great biotechnological potential. To ensure the quality of Raw Material Plant (RMP), quality control tests previously described by the Brazilian Pharmacopoeia were performed, such as water and extractives content, presence of impurities, among others. In relation to in-vivo experiments, animals were pretreated with the extract of guarana seeds (14 days) or extract of pedra-ume-caá (single dose), and immediately after treatment, received theophylline and midazolam, respectively. Blood samples were collected at pre-determined times through a cannula inserted into the left carotid artery. Theophylline and midazolam plasma levels were quantified using previously validated methods employing HPLC-DAD technique, for determination of pharmacokinetic parameters such as plasma half-life, clearance, area under the curve, among others. Analysis of variance was applied to check for differences between groups by analysis of pharmacokinetic parameters obtained and the level of significance was set at 5% ($p < 0.05$). The results for these species as quality control are in accordance with the parameters described in the Brazilian Pharmacopoeia, ensuring the quality of the constituents present in the extracts and safety in handling them. In pharmacokinetic analysis, a single dose of the extract *E. punicifolia* showed significant change in the kinetics of midazolam, indicating a probable enzyme inhibition, and may interfere in the pharmacological response of drugs metabolized by CYP3A. The subchronic treatment with the solution of *P. cupana* showed a significant change in the kinetics of theophylline, indicating a probable enzyme induction, and may interfere with the pharmacological response of drugs metabolized by CYP1A2. Thus, this study demonstrated changes in the pharmacokinetics of drugs in rats caused by the use of natural products and, therefore, additional studies should be conducted to elucidate the phenomenon observed.

Keywords: Guarana; Pedra-ume-caá; Drug interaction; Quality Control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espécie vegetal, <i>Eugenia punicifolia</i> , coletada no final do período reprodutivo, evidenciado pela presença de frutos verdes e maduros.	24
Figura 2- Espécie vegetal, <i>Paullinia cupana</i> , coletada no final do período reprodutivo, evidenciado pela presença de frutos maduros.	28
Figura 3- Ciclo catalítico do citocromo P450.....	31
Figura 4- Esquema representando as principais famílias do citocromo P450 no metabolismo de fármacos.....	32
Figura 5- Esquema representando a classificação das enzimas do citocromo P450 ..	32

CAPÍTULO I

Figura 6- Histograma de distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal de <i>Eugenia punicifolia</i>	53
Figura 7- Histograma de distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal de <i>Paullinia cupana</i>	53
Figura 8- Cromatogramas representativos das análises empregando a coluna octadecilsilano, em modo isocrático e com fase móvel constituída de Metanol:Ácido fórmico a 1% (28:72, v/v); vazão: 0,8mL.min ⁻¹ ; Detecção UV em 275nm. A- Cromatograma das soluções dos padrões. B- Cromatograma do extrato de <i>P. cupana</i>	54

CAPÍTULO II

Figura 9- Estrutura molecular dos benzodiazepínicos utilizados.....	62
Figura 10- Procedimento experimental para inserção da cânula na artéria carótida esquerda dos animais para posterior coleta sanguínea.....	64
Figura 11- Esquema representativo do processo de extração do midazolam e diazepam do plasma.....	65
Figura 12- Cromatogramas representativos das análises empregando a coluna octadecilsilano em modo isocrático e fase móvel constituída de solução-tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ pH:4,5, Acetonitrila e Metanol (50:40:10, v/v/v); vazão: 1mL.min ⁻¹ ; Detecção UV em 245nm. A – Cromatograma das soluções dos padrões. B - Cromatograma do plasma de animais sem	

tratamento C - Cromatograma do plasma de animais após tratamento com <i>E. puniceifolia</i> e dose oral de 20mg/kg de midazolam no tempo de coleta 30min.....	68
Figura 13- Disposição cinética do midazolam obtido nas amostras de plasma de ratos submetidos ao tratamento de dose única com o extrato aquoso de <i>E. puniceifolia</i> (55 ou 550 mg/kg/dia, vo) ou veículo. Os valores estão representados como médias \pm erro padrão da média de seis determinações por ponto de tempo (n=6)....	69
Figura 14- Relação dos principais parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e CI) estimada pelo concentração de midazolam em ratos tratados simultaneamente com dose única do extrato de <i>E. puniceifolia</i> (55mg/kg, vo) ou veículo (água deslilada).....	70

CAPÍTULO III

Figura 15- Estrutura molecular das metilxantinas utilizadas..	78
Figura 16- Esquema representativo do processo de extração da teofilina e cafeína do plasma, seguido de análise cromatográfica.....	81
Figura 17- Cromatogramas representativos das análises realizadas empregando a coluna octadecilsilano em modo isocrático e fase móvel constituída de Ácido Fórmico e Metanol (72:28, v/v); vazão: 0.8 mL.min ⁻¹ ; Detecção UV em 275nm. A – Cromatograma das soluções dos padrões. B - Cromatograma do plasma de animais sem tratamento C - Cromatograma do plasma de animais após tratamento com <i>P. cupana</i> e dose oral de 20mg/kg de teofilina no tempo de coleta 2h.....	84
Figura 18- Disposição cinética da teofilina obtida nas amostras de plasma de ratos submetidos ao tratamento subcrônico com solução aquosa de <i>P. cupana</i> (82,1 ou 821 mg/kg/dia, vo) ou veículo. Os valores estão representados como médias \pm erro padrão da média de seis determinações por ponto de tempo (n = 6)..	84
Figura 19- Relação dos principais parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e CI) estimada pela concentração de teofilina em ratos tratados simultaneamente com dose única do extrato de <i>P. cupana</i> (82,1mg/kg, vo) ou veículo (água deslilada).....	86
Figura 20- Relação dos principais parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$ e CI) estimada pela concentração de teofilina em ratos tratados simultaneamente com dose única do extrato de <i>P. cupana</i> (821mg/kg, vo) ou veículo (água deslilada)..	86
Figura 21- Médias de ganho de massa corporal durante o período de tratamento (14 dias) com a solução aquosa <i>P. cupana</i> , monitorado semanalmente.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classes de medicamentos metabolizados pela citocromo P450 1A226

Tabela 2- Classes de medicamentos metabolizados pela citocromo P450 3A4.....29

CAPÍTULO I

Tabela 3- Caracterização da matéria prima vegetal, conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira.....52

Tabela 4- Caracterização da solução extrativa preparada a partir da MPV, conforme preconiza a Farmacopeia Brasileira..... 54

CAPÍTULO II

Tabela 5- Principais parâmetros farmacocinéticos para avaliar a disposição cinética de um fármaco (EVANS, 2004). Onde, ASC_{0-4h} é a área sob a curva de concentração plasmática do tempo 0 até o tempo de 4 h; $ASC_{0-\infty}$ é área sob a curva de concentração plasmática do tempo 0 extrapolado ao infinito; $t_{1/2}$ é a meia vida plasmática; V_d é o volume de distribuição; Cl é o clearance; K_{el} é a constante de eliminação; C_{max} é a concentração plasmática máxima e o T_{max} é tempo necessário para o fármaco alcançar a concentração plasmática máxima..... 66

Tabela 6- Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir dos gráficos de concentração plasmática *versus* tempo..... 69

CAPÍTULO III

Tabela 7- Principais parâmetros farmacocinéticos para avaliar a disposição cinética de um fármaco (EVANS, 2004). Onde, ASC_{0-24h} é a área sob a curva de concentração plasmática do tempo 0 até o tempo de 24 h; $ASC_{0-\infty}$ é área sob a curva de concentração plasmática do tempo 0 extrapolado ao infinito; $t_{1/2}$ é a meia vida plasmática; V_d é o volume de distribuição; Cl é o clearance; K_{el} é a constante de eliminação; C_{max} é a concentração plasmática máxima e o T_{max} é tempo necessário para o fármaco alcançar a concentração plasmática máxima..... 82

Tabela 8- Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir dos gráficos de concentração plasmática *versus* tempo 85

ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área Sob a Curva
Cl	Clearance
CYP	Citocromo P450
DAD	Detector por Arranjos de Diodo
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	Food and Drug Administration
FNT	Fração-não-tanante
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia Estatística
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Kel	Constante da velocidade de eliminação
MPV	Matéria Prima Vegetal
MDZ	Midazolam
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFT	Polifenóis totais
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TE	Teor de extrativos
T ½	Meia vida
Vd	Volume de distribuição

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Plantas Medicinais	19
2.2	Controle de Qualidade	20
2.3	Família Myrtaceae	22
2.3.1	<i>Eugenia punicifolia</i>	23
2.3.2	Propriedades químicas e medicinais de <i>Eugenia punicifolia</i>	24
2.4	Família Sapindaceae	26
2.4.1	<i>Paullinia cupana</i>	27
2.4.2	Propriedades químicas e medicinais de <i>Paullinia cupana</i>	28
2.5	Sistema Citocromo P450	30
2.6	Estudos Farmacocinéticos	33
2.7	Interação Medicamentosa	36
2.8	Interação Fármaco-produto natural	37
2.8.1	Indução Enzimática	38
2.8.2	Inibição Enzimática	39
3	OBJETIVOS	41
3.1	Geral	41
3.2	Específico	41
ARTIGO I		
1.	INTRODUÇÃO	43
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	45

3. RESULTADOS	52
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÃO	59
ARTIGO II	
1. INTRODUÇÃO	61
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
3. RESULTADOS	68
4. DISCUSSÃO	72
5. CONCLUSÃO	76
ARTIGO III	
1. INTRODUÇÃO	78
2. MATERIAL E MÉTODOS	80
3. RESULTADOS	85
4. DISCUSSÃO	90
5. CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	109

1. INTRODUÇÃO

Interações medicamentosas são respostas farmacológicas em que os efeitos de um ou mais medicamentos são alterados pela administração simultânea ou anterior de outros, ou também através da administração simultânea de produtos de origem natural, como alimentos, ervas medicinais, entre outros. Essas interações podem causar alterações nas concentrações plasmáticas dos fármacos e, conseqüentemente, mudanças em seus perfis de eficácia ou segurança (OGA 2008). Nesse contexto, efeitos adversos causados pelo uso de plantas medicinais constitui, hoje, um problema sério de saúde pública, sendo um motivo de preocupação crescente nos meios científicos que envolvem estudos de fitoterápicos.

Atualmente poucas substâncias derivadas de plantas apresentam aprovação científica para o uso clínico. Isso se deve, principalmente, às complexas misturas de componentes químicos presentes na maioria das plantas medicinais, as quais são responsáveis pelas ações biológicas e farmacológicas (SOUSA et al., 2008). Entre os componentes químicos encontrados nas plantas (princípios ativos) que podem apresentar tanto atividade farmacológica como atividade tóxica estão os alcaloides, glicosídeos cardioativos ou cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos, taninos, saponinas, oxalato de cálcio e toxialbuminas. Essa ação é geralmente proporcional à concentração do princípio ativo em relação ao sítio de ação (VEIGA JR, 2005).

Durante longo tempo, a literatura convencional preocupou-se em estudar as interações envolvendo somente fármacos comerciais, no entanto com a popularidade de tratamentos à base de produtos naturais, tornou-se importante compreender as potenciais interações farmacocinéticas que podem ocorrer entre drogas vegetais e os fármacos prescritos rotineiramente. A interação de ocorrência mais comum relatada na literatura consiste na alteração do metabolismo do fármaco, decorrente da indução ou inibição de certas enzimas, provocada pelos compostos presentes nas plantas (GUENGERICH, 2006).

O complexo enzimático do citocromo P450 (CYP) é constituído pelas principais enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo de fármacos e outros xenobióticos, além de diversas substâncias endógenas em tecidos de mamíferos. O metabolismo do fármaco tem um papel crítico no término da ação farmacológica e influencia o tempo de permanência de

produtos químicos no organismo. Assim, interferência na oxidação por CYPs pode ser manifestada na biodisponibilidade de fármacos, tornando-os ineficazes ou tóxicos (GUENGERICH, 2001).

Devido à significância clínica das interações de fármacos com produtos naturais, a identificação preliminar de candidatos a fitoterápicos capazes de interagir com fármacos utilizados rotineiramente é altamente necessária durante o desenvolvimento destes novos produtos (ZHOU et al., 2007). Assim, trabalhos que busquem ampliar e aprofundar o conhecimento do potencial de plantas medicinais podem elucidar importantes aspectos farmacológicos e toxicológicos de seus princípios naturais, permitindo uma utilização mais segura e eficaz destes produtos.

O estudo pré-clínico permite a determinação dos parâmetros farmacocinéticos, como volume de distribuição, clearance, meia vida plasmática, entre outros, os quais são utilizados para direcionar os estudos envolvendo seres humanos. Desta forma, as informações obtidas neste trabalho, utilizando animais de experimentação, podem direcionar novas pesquisas para uso destas substâncias em seres humanos. Estes resultados são reconhecidamente necessários, uma vez que, existe por parte das indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticos, grande interesse regional, nacional e internacional no desenvolvimento de produtos contendo estas espécies vegetais.

Os resultados promissores obtidos em estudos farmacológicos prévios com os extratos padronizados destas espécies motivaram a realização de ensaios farmacocinéticos pré-clínicos utilizando animais de experimentação (CAMPOS et al., 2003; FUKUMASU et al., 2008; BASTOS, 2011). Assim, este estudo objetivou obter informações inéditas e fundamentais para o uso seguro dos extratos vegetais de guaraná e pedra-ume-caá, visto que verificou-se uso crescente no emprego destas preparações em nossa população, a fim de constituir um ponto de partida para determinação de uma possível interação medicamentosa importante.

A apresentação deste trabalho foi realizada conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A dissertação foi dividida em: **REVISÃO DA LITERATURA**, a qual explana sobre as diferentes formas de interação medicamentosa, relacionadas ao metabolismo, com ênfase nas interações fármaco-produto natural; controle de qualidade de insumos vegetais e uma revisão

sobre plantas medicinais utilizadas na medicina popular. Literatura mais detalhada sobre as espécies utilizadas neste estudo: *Eugenia punicifolia* e *Paullinia cupana*, seguida de **OBJETIVOS** geral e específicos.

A METODOLOGIA e RESULTADOS foram divididos em três artigos:

Artigo I - Caracterização físico-química do material vegetal e extrato fluido das espécies *Eugenia punicifolia* – Myrtaceae e *Paullinia cupana* – Sapindaceae.

Artigo II - Efeitos do extrato aquoso das folhas de *Eugenia punicifolia* (pedra-ume-caá) na farmacocinética do midazolam em ratos.

Artigo III - Efeitos da solução aquosa das sementes de *Paullinia cupana* (guaraná) na farmacocinética da teofilina em ratos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

É comum, entre as pessoas que fazem uso da fitoterapia, o pensamento de que por se tratar de um produto de origem natural, seu uso seja seguro, sendo atribuído a esta prática pouco ou nenhum risco. No entanto, a planta medicinal utilizada pela população é um xenobiótico, composto químico, que ao ser introduzido no organismo, pode ter efeitos terapêuticos, mas podem produzir efeitos tóxicos, e assim devem ser encarados até que seja provado o contrário (SIMÕES, 2007).

Com o aumento no número de usuários e escassez de evidências científicas sobre a segurança de plantas medicinais tem aumentado a preocupação dos possíveis efeitos tóxicos e danos causados por esses fitomedicamentos (SAAD, 2006). Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias potencialmente tóxicas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos (VEIGA JUNIOR, 2005).

O risco de efeitos adversos aumenta quando produtos naturais são utilizados simultaneamente com medicamentos, uma vez que, essa associação pode alterar a resposta farmacológica do fármaco presente no medicamento utilizado, levando à ampliação ou redução do efeito esperado. A interação entre fármaco-produto natural de ocorrência mais comum relatada na literatura consiste na alteração do metabolismo do fármaco (COTT, 2001).

Essa interação pode ocorrer entre os compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas com as enzimas responsáveis pelo metabolismo do fármaco, e conseqüentemente, levando a uma modificação na eliminação do fármaco no organismo. Como resultado dessa interação, a síntese e/ou atividade de enzimas pode ser inibida ou induzida (IZZO e ERNST, 2001). Considerando que a grande maioria dos fármacos é metabolizada pelas enzimas do CYP, o conhecimento sobre a farmacocinética destes produtos naturais é indispensável para evitar as conseqüências de uma interação fármaco-produto natural.

2.1. Plantas Medicinais

O uso de plantas no tratamento, na cura e prevenção de enfermidades é uma das mais antigas formas de prática medicinal. Segundo Veiga Júnior e colaboradores (2005), ao longo do tempo, têm sido registrados vários procedimentos tradicionais utilizando as plantas medicinais. No entanto, os produtos naturais foram utilizados inicialmente para a sobrevivência humana, por meio de experiências na degustação. E, empiricamente, deu-se a avaliação de toxicidade e o uso no tratamento de doenças (CUNHA, 2008).

Aproximadamente, quatro milhões de pessoas no mundo fazem uso de plantas medicinais. O uso da fitoterapia nos países desenvolvidos e nos países pobres obedece a duas razões um tanto quanto contrapostas. Nos primeiros ressurge como resposta da população a uma medicina agressiva e iatrogênica; em contrapartida, nos segundos, constitui um recurso ancestral fortemente enraizado em seus costumes culturais (ALONSO, 1998). No Brasil, assim como em outros países latino-americanos, a fitoterapia tornou-se uma alternativa terapêutica econômica em relação aos medicamentos alopáticos, caracterizando-se inicialmente pela utilização direta da planta no tratamento de doenças (LEHIR, 1985; DI STASI et al., 1994).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo e, conseqüentemente, uma rica fonte para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos. De acordo com Calixto (2000), nos últimos anos, o interesse por terapias consideradas alternativas e o uso de produtos naturais derivados de plantas têm aumentado. Este interesse justifica-se por se acreditar que os fitoterápicos apresentam menor número de efeitos colaterais que os medicamentos sintéticos. Entretanto, em sua maioria, os produtos naturais não apresentam estudos que confirmem sua eficácia, segurança e garantia da qualidade durante o processo de produção (RATES, 2001).

Uma planta é uma verdadeira usina química que pode produzir milhares de substâncias diferentes, onde apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica ou tóxica. A falta de respaldo científico para a utilização clínica pode significar uma séria ameaça à saúde, principalmente quando há uso contínuo do medicamento, contribuindo para efeitos adversos e tóxicos (ALEXANDRE, BAGATINI, e SIMÕES, 2008).

Outro problema atribuído aos fitoterápicos está relacionado ao controle de qualidade da matéria-prima vegetal. As plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas, sendo que algumas são produzidas em maior quantidade do que outras, e podem variar de acordo com as condições climáticas e edáficas. Assim, a qualidade da matéria-prima vegetal pode variar dependendo da sua procedência e período de coleta (SIMÕES, 2007).

Dessa forma, além de isolamento, purificação e elucidação estrutural dos metabólitos secundários, os ensaios biológicos com objetivo de avaliar a atividade de substâncias bioativas e suas possíveis interações com outros princípios ativos no organismo são relevantes para os usuários, uma vez que há vários relatos de casos de intoxicação (*Maytenus ilicifolia* - NOSSAK et al., 2004; hepatotoxicidade por *Centella asiática* - JORGE e JORGE 2005; *Aesculus hippocastanum* - TESKE e TRENTINI, 1997); hepato e nefrotoxicidade por *Cymbopogon* - GUERRA et al., 2000, entre outras) pelo uso indiscriminado de extratos de plantas medicinais utilizadas pela população.

2.2. Controle de qualidade de insumos vegetais

O mercado de medicamentos exige produtos com segurança e eficácia estabelecidas. Tais exigências partem das normas que regulamentam a produção e registros de itens de uso terapêutico no país. A RDC nº 10, publicada em 09 de Março de 2010, a qual dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), foi estabelecida considerando-se a necessidade de garantir e promover a segurança, eficácia e qualidade no uso de produtos naturais.

A qualidade dos fitoterápicos está relacionada de forma direta à qualidade da matéria prima vegetal. Diversos fatores como cultivo, coleta e secagem são fundamentais para se determinar a presença e a estabilidade dos constituintes químicos, bem como a eficácia dos produtos derivados. De acordo com Farias (2007), um rígido controle de qualidade químico, físico-químico e microbiológico deve ser aplicado ao material vegetal, à solução extrativa, ao extrato seco e, por fim, a forma farmacêutica final, para o estabelecimento de padrões de referência dos resultados encontrados com os ensaios aplicados.

Esses ensaios estão descritos no documento da Organização Mundial de Saúde (OMS) como relevantes e imprescindíveis na análise da qualidade das plantas medicinais, e, portanto, são exigidos para a certificação de matérias-primas vegetais e registro de produtos derivados (BRASIL, 2010a). Assim, no processo de comprovação da qualidade dos produtos naturais está envolvida uma série de ensaios e testes que englobam desde a identificação botânica da planta até o doseamento dos compostos ativos.

Dentre as análises aplicadas ao material vegetal destacam-se os aspectos botânicos e características organolépticas. Quanto ao controle de qualidade físico-químico destacam-se os seguintes ensaios:

- Teor de umidade: a Farmacopeia estabelece que o teor de umidade esteja entre 8 e 14%. A secagem tem por finalidade reduzir a ação enzimática por meio da redução do teor de umidade, permitindo a conservação das plantas medicinais e aromáticas por um período mais longo e impedindo o desenvolvimento de microrganismos (CORRÊA JUNIOR et al., 1994).

- Granulometria: de acordo com Pértile (2007), o tamanho das partículas da droga vegetal representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo, uma vez que partículas muito finas impedem a absorção do líquido extrator, enquanto que partículas de alta granulometria não apresentam grande superfície de contato, também diminuindo a eficiência. Segundo a Farmacopeia dos Estados Unidos (2004), um tamanho médio de partícula de 0,840 mm é definido como sendo a granulometria adequada em uma extração.

- Determinação de cinzas totais: Um alto teor de cinzas pode indicar a presença de elementos estranhos à droga como metais pesados, areia ou pedra, sendo importante à realização deste ensaio de pureza para avaliar a qualidade de drogas vegetais. O conteúdo de cinzas totais é um índice individual de identificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes (BRASIL, 2010b).

- Teor de extrativos: este ensaio emprega um sistema solvente - extrator e estabelece o teor de constituintes extraíveis da droga vegetal (WHO, 1998).

- Determinação de perda por dessecação: O valor da perda por dessecação é indicativo do teor de material volátil presente na droga vegetal, sob o ponto de vista tecnológico e de produção, é importante conhecer quantitativamente o conteúdo de água

presente na matéria-prima vegetal, para que este valor seja considerado nos cálculos de rendimento (OLIVEIRA et al., 2001). Este teste pode fornecer dados relacionados com o rendimento da extração, já que a secagem influencia no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com solventes.

- Doseamento de constituintes químicos das amostras vegetais: A espectrometria de absorção no ultravioleta tem sido empregado com sucesso na determinação de fenóis em extratos de plantas medicinais. Por outro lado, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) tem sido utilizado para a determinação de fenóis totais e metilxantinas em soluções extrativas (CARLSON e THOMPSON, 1998; SOMBRA et al., 2005; PEREZ, 2009). Recentemente, Souza e colaboradores (2010) atestaram a utilização de HPLC na separação, identificação e quantificação dos compostos presentes em extratos vegetais, sendo mais eficiente que os outros métodos largamente utilizados como a espectrofotometria.

2.3. Família Myrtaceae

Myrtaceae constitui uma das mais importantes famílias de Angiospermas no Brasil (LANDRUM e KAWASAKI, 1997). No mundo todo, a família Myrtaceae compreende aproximadamente 130 gêneros com cerca de 4.000 espécies e configura-se como a maior família da ordem Myrtales (SOUZA, 2005). Entre árvores e arbustos apresenta uma ampla distribuição, predominando em regiões tropicais e subtropicais (MARCHIORI e SOBRAL, 1997). Estima-se que somente no Brasil ocorram mais de 1.000 espécies (WILSON, 2005).

As mirtáceas são plantas lenhosas, com folhas inteiras de disposição alterna ou oposta e, às vezes, oposta cruzada com estípulas muito pequenas ou ausentes (JOLY, 1975). Possuem folhas penínérveas, geralmente apresentando nervura marginal. Cavidades oleíferas aparecem nas folhas e flores. Frutos e sementes, na forma de pequenos pontos translúcidos (DONATINI, 2003). O perfil químico da família Myrtaceae caracteriza-se pela presença de taninos, flavonoides, monoterpenos e sesquiterpenos, triterpenoides, derivados do floroglucinol, cromenos, estilbenóides e outros (MAGINA, 2008).

Plantas pertencentes a essa família são comumente utilizadas na medicina popular como agentes antimicrobianos, anti-inflamatórios, em distúrbios gastrointestinais, estados

hemorrágicos, doenças infecciosas. Como exemplo, dentre uma diversidade de espécies medicinais, o chá de *Psidium guajava* L, cujos frutos e principalmente as folhas são ricos em taninos, é muito difundido no meio popular como antidiarréico (CRUZ, 1982). A espécie *Eucalyptus globosus* é utilizada no combate de estados infecciosos e inflamatórios, principalmente em inflamações das vias respiratórias. De acordo com Cruz e Kaplan (2004), os farmacógenos mais utilizados para essa família são as folhas e cascas.

No Brasil, todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, a qual é constituída de apenas uma tribo, Myrtae, formando um grupo filogeneticamente coeso (WILSON et al., 2001). A subfamília Myrtoideae reúne cerca de 70 gêneros, de dispersão na América tropical e subtropical (DONATINI, 2003). Dentre os gêneros pertencentes a essa subfamília, os gêneros *Eugenia*, *Myrcia*, *Psidium* e *Syzygium* são amplamente conhecidos por suas propriedades medicinais e/ou alimentícias.

O gênero *Eugenia* encontra-se bem representado nas diversas formações vegetacionais do Brasil, não apenas quanto à riqueza específica, mas também quanto à abundância e frequência de suas espécies (RODRIGUES e NAVE 2000; ARANTES e MONTEIRO 2002). Muitas dessas espécies são ricas em óleos essenciais e taninos, e são frequentemente utilizadas pela população (NEVES e DONATO 1989; LUNARDI et al., 2001). São fornecedoras de frutos comestíveis, como os exemplares *E. involucrata* DC., *E. pyriformis* Cambess, *E. neosilvestres* Sobral, *E. uniflora* L., entre outras (LORENZI 1998; MARCHIORI e SOBRAL, 1997). Apresentam também propriedades medicinais, como *E. jambolana*, com efeito hipoglicêmico relatado em ensaios por infusão e decocção (RAVI et al., 2004a) e *Eugenia uniflora* L. rica em compostos fenólicos com ações antioxidante e antirreumática (AURICCHIO e BACCHI, 2003).

2.3.1. *Eugenia puniceifolia*

A espécie em estudo apresenta características marcantes da família Myrtaceae (Figura 1), como as estruturas laminares da folha, flores e frutos, que são densamente pontuados com glândulas taníferas, contendo óleos essenciais voláteis, e visíveis contra a luz (BARROSO, 1984). *E. puniceifolia* é uma planta heliófila de ambiente aberto, presente em solo arenoso de terra firme, com boa drenagem. É tolerante à sombra, ocorrendo nas margens de matas secundárias. Assim como outras mirtáceas, *E. puniceifolia* é conhecida pelo nome

popular pedra-ume-caá, cujas folhas são muito utilizadas no tratamento da diabetes e inflamações (SARRAZIN, 2005).

Distribui-se por quase todo o Brasil, Paraguai e Venezuela e encontra-se em abundância em regiões de savanas e ambientes abertos, com solos arenosos e bem drenados. Apresenta crescimento clonal com a presença de 10 a 50 ramos saindo de uma mesma ligação vegetativa (SILVA et al., 2007). Sua floração ocorre de junho a março e frutificação durante quase todo ano (SOUZA e MORIM, 2008).

As flores são hermafroditas e encontram-se dispostas em inflorescências paniculadas axilares. Os frutos são bagas, pequenas, globosas irregulares e carnosas, e coloração roxo-enegrecido quando está maduro (SOUZA e LORENZI, 2008). As folhas são elípticas ou obovadas, com ápice curto obtuso-acuminado, base cuneada ou aguda, e pontuações não visíveis a olho nu (JORGE et al., 2000). Ocorre a presença de nervura primária única, mediana, fina para o ápice e espessa na base, sulcada na face adaxial e saliente na abaxial, e nervuras secundárias alternas e opostas (ALVAREZ et al., 2006).



Figura 1: Espécie vegetal, *Eugenia puniceifolia*, coletada no final do período reprodutivo, evidenciado pela presença de frutos verdes e maduros (Fonte: Nayana Yared, 2013).

2.3.2. Propriedades químicas e medicinais de *Eugenia puniceifolia*

Na região Norte do Brasil, a espécie vegetal *E. puniceifolia* é amplamente empregada, ainda que de forma empírica, para o tratamento de distúrbios hiperglicêmicos, como o diabetes mellitus, inflamações, febre, resfriado, males do fígado (VIEIRA e MARTINS, 2000). É um arbusto largamente distribuído em toda a Amazônia e sua aplicação

popular menciona o uso de suas folhas frescas em decocção ou infusões (GRANGEIRO et al., 2006).

Em trabalho realizado, com animais, por Grangeiro e colaboradores (2006), o tratamento com extrato aquoso de *E. puniceifolia* resultou na recuperação da ação de antagonistas nicotínicos na placa terminal motora. Brunetti e colaboradores (2006) confirmaram o potencial do extrato metanólico da planta no tratamento de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. Em outro estudo, os extratos dessa espécie promoveram a diminuição da produção de mediadores inflamatórios e contribuíram para a regeneração muscular em um modelo animal de distrofia (LEITE et al., 2010).

Em trabalho mais recente realizado por Galeno e colaboradores (2013), foi comprovado que o extrato aquoso das folhas de *E. puniceifolia* foi ativo, em modelo *in vitro*, na inibição da atividade de enzimas envolvidas no desenvolvimento da síndrome metabólica, além de atuar como potente antioxidante no sequestro de radicais livres e citotoxicidade em linhagens celulares neoplásicas e baixa citotoxicidade em células normais. Os autores associam os resultados encontrados à elevada presença de compostos fenólicos como os flavonoides e taninos encontrados no extrato.

Maia e colaboradores (1997) identificaram o sesquiterpeno β -cariofileno como constituinte principal dos óleos essenciais de *E. puniceifolia* em amostra coletada de duas regiões próximas à Manaus. Em outro estudo realizado com a mesma espécie, porém em duas localidades diferentes de Pernambuco, a composição química mostrou-se similar, no entanto, o monoterpeno linalol foi o constituinte predominante (OLIVEIRA et al., 2005). De acordo com Veiga Júnior e Pinto (2000) a presença do β -Cariofileno, fitoconstituinte majoritário nas amostras de *E. puniceifolia* coletadas na Amazônia, está relacionada a atividades farmacológicas importantes, como atividades anti-inflamatória e anticâncer.

Rocha e colaboradores (2011), ao avaliarem o extrato de *E. puniceifolia*, identificaram a presença de elevadas concentrações de compostos fenólicos totais (entre eles, flavonoides e monoterpenos) e baixos teores de taninos condensados, atribuindo à presença do constituinte majoritário (flavonoides), as atividades farmacológicas para as quais a infusão da planta é aplicada.

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. O emprego terapêutico de plantas

contendo flavonoides é vasto e, em muitos casos, ainda empírico (SIMÕES, et al., 2007). Atividade antiviral (PERRY e FOSTER, 1994), antitumoral (FORMICA e REGELSO, 1995), antioxidante (OKAMURA et al., 1994) e anti-inflamatória (HEIM et al., 2002) são algumas das atividades farmacológicas atribuídas aos flavonoides.

Em relação à disposição cinética dos flavonoides, estudos realizados por Oliveira, Dias e Câmara (2005) e Saito e colaboradores (2011) confirmaram que flavonoides e monoterpênicos, além de outros compostos fenólicos derivados de plantas são reconhecidamente inibidores ou indutores da atividade enzimática de CYP3A4, enzima responsável pelo metabolismo de diversos fármacos (Tabela 1). Assim, a elucidação do metabolismo de flavonoides é ponto primordial para assegurar que seu uso com fármacos seja feito com segurança e eficácia.

CYP3A4	
Antiarrítmicos	Quinidina, lidocaína, propafenona
Anti-histamínicos	Clorfeniramina, loratadina, terfenadina
Antirretrovirais	Indinavir, ritonavir, nelfinavir, saquinavir
Inibidores de cálcio	Nifedipina, amlodipina, felodipina, diltiazem, verapamil
Benzodiazepínicos	Diazepam, alprazolam, midazolam, buspirona, zolpidem
Substratos	
Estatinas	Atorvastatina, lovastatina
Esteroides endógenos	Hidrocortisona, progesterona, testosterona
Imunossupressores	Ciclosporina, tacrolimo, sirolimo
Macrolídeos	Eritromicina, claritromicina
Outros psicofármacos	Haloperidol, pimizida, trazodona, nefazodona
Opiáceos	Codeína, dextrometorfano, metadona, alfentanilo, fentanilo
Outros	Cafeína, ergotamina, dapsona, finasterida, pioglitazona, repaglinida, sildenafil, ondansetrona, irinotecano, vincristina, cisaprida

Tabela 1: Classes de medicamentos metabolizados pela citocromo P450 3A4 (Adaptado de Serra, 2006).

2.4. Família Sapindaceae

A Família Sapindaceae possui aproximadamente 1.800 espécies, divididas em 136 gêneros, que se distribuem predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais, com alguns gêneros nas regiões temperadas (BUERKI et al. 2009). Essa família possui disposição

variável que abrange árvores, arbustos e trepadeiras com gavinhas. Um folíolo distal rudimentar, geralmente presente nas árvores e arbustos, e um disco nectarífero, em geral extra estaminal, facilitam o reconhecimento dos membros da família.

De acordo com a classificação de Radlkofer (1892-1900, 1931-1934), as sapindáceas subdividem-se em duas subfamílias, Sapindoideae e Dodonaeoideae, e 14 tribos, entre elas a tribo Paullineae (HARRIGTON et al., 2005). No Brasil são registrados 25 gêneros e 411 espécies, das quais 218 ocorrem na Floresta Amazônica e 188 na Floresta Atlântica (SOMNER et al., 2012). Entre os gêneros que compõem a tribo Paullineae, destacam-se os gêneros *Cadiospermum*, *Houssayanthus*, *Lophostigma*, *Serjania*, *Urvillea* e *Paullinia*. Sendo *Serjania* e *Paullinia* os maiores gêneros da família, os quais apresentam 226 e 200 espécies, respectivamente (BUERKI et al., 2009).

As espécies de *Paullinia* são trepadeiras lenhosas com látex e com gavinhas na base da inflorescência ou estão ausentes quando há cauliflora. As folhas são alternas, trifolioladas, pinadas, bipinadas e biternadas, com estípulas geralmente estão presentes. As inflorescências são em tirso axilar e as flores são zigomorfas e unissexuais. As espécies possuem frutos do tipo cápsula septicápsula e pólen isopolares e triplicados. As sementes são globosas, oblongas ou elipsoides com arilo branco (ACEVEDO-RODRIGUEZ, 1998).

No Brasil, ocorrem 97 espécies do gênero *Paullinia*, as quais se distribuem principalmente em ambientes florestais. Os dois domínios brasileiros com maior diversidade de espécies são a Amazônia, com 72, e a Floresta Atlântica, com 26 (ACEVEDO-RODRIGUEZ, 1993; SOMNER et al., 2012). As espécies pertencentes a este gênero, além de serem um importante componente ecológico para a Amazônia, possuem grande valor econômico, devido sua grande utilização na fabricação de bebidas, como a espécie *P. cupana*.

2.4.1. *Paullinia cupana*

Paullinia cupana (Figura 2), conhecida popularmente por guaraná, é uma espécie monóica, alógama e sua polinização é realizada por abelhas, principalmente, as do gênero *Melipona* e *Apis* (FUJII et al., 2009). Entretanto, como característica da espécie, as inflorescências terminais são compostas de flores masculinas e femininas, assim, numa mesma planta, pode ocorrer também a autofecundação (ESCOBAR et al., 1984). As inflorescências começam a se expandir no período menos chuvoso, sinalizando a época de

floração. Os frutos do guaraná apresentam coloração vermelha, com características capsulares, contendo de uma a três sementes (ERICKSON et al., 1984).

Trata-se de uma espécie perene, de crescimento inicial lento. Em seu estado natural, cresce como uma liana até atingir o extrato superior da floresta, porém quando cultivada em campo aberto, tem a forma de arbusto subereto com aproximadamente 3,0 metros de altura (CAVALCANTE, 1976). É cultivada principalmente no município de Maués – Amazonas e na Bahia, com produção anual de 3.510 toneladas de semente (IBGE, 2012).



Figura 2: Espécie vegetal, *Paullinia cupana*, coletada no final do período reprodutivo, evidenciado pela presença de frutos maduros (Fonte: Nayana Yared, 2013).

É uma espécie nativa da Amazônia brasileira e venezuelana e das Guianas (SIMÕES, 2007). Possui sementes ricas em constituintes como a cafeína, responsáveis pelas propriedades refrescante, estimulante e medicinal, atribuídas a esta planta (BECK, 1991). Devido à presença desses estimulantes naturais em sua composição, as sementes do guaraná são de grande interesse para a indústria de bebidas carbonatadas (KURI, 2008).

2.4.2. Propriedades químicas e medicinais de *Paullinia cupana*

O pó do guaraná é amplamente utilizado em todo o território nacional, fator que impulsiona o desenvolvimento de diversas pesquisas quanto às propriedades medicinais desta espécie. Nas últimas três décadas, muitas pesquisas foram desenvolvidas nessa linha e, dentre as atividades comprovadas, destacam-se a inibição da agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo* (BYDLOWSKI et al., 1988), reversão parcial dos efeitos amnésicos e aumento da capacidade

física *in vivo* (ESPINOLA et al., 1997), além da ação protetora contra lesão gástrica induzida *in vivo* por etanol e indometacina (CAMPOS et al., 2003).

Muito já se conhece sobre os constituintes fitoquímicos da *P. cupana*, a atividade antioxidante, por exemplo, está associada às elevadas concentrações de compostos fenólicos como os taninos, e a atividade anti-inflamatória à presença de saponinas. A teobromina e a teofilina, presente nas sementes do guaraná, podem estar relacionadas às atividades imunomodulatória e anti-inflamatória, efeito broncoprotetor, melhora da circulação sanguínea e retardo no envelhecimento precoce (KUSKOSKI et al., 2005).

Fukumasu e colaboradores (2008) testaram o pó do guaraná no tratamento de animais com células de melanoma, o qual reduziu de 68,6% da área tumoral e aumentou de 4,85 vezes o índice apoptótico. O pó do guaraná apresentou potencial efeito na atividade antígeno-tóxica *in vivo* (FUKUMASU et al., 2006) antibacteriana e antioxidante *in vitro* (BASILE et al., 2005). De acordo com Yamaguti-Sasaki e colaboradores (2007) as propriedades farmacológicas encontradas estão relacionadas principalmente às metilxantinas presentes nas sementes do guaraná.

Metilxantinas são constituintes químicos importantes de várias bebidas alimentícias ou estimulantes não alcoólicas como café, chocolate e guaraná. As mais abundantes são a cafeína, a teofilina e a teobromina. O percentual de cafeína, substância psicoativa presente nas sementes do guaraná, varia de 3,2 a 7%, sendo cerca de 6 vezes superior ao encontrado nas sementes do café (PAGLIARUSSI et al., 2002). Em ratos, mostrou-se um potente indutor da atividade do CYP1A (SOHN et al., 1994).

Tendo em vista ampla utilização da espécie *Paullinia cupana* e sua relação com a atividade enzimática o CYP1A2, é de grande relevância o conhecimento de possíveis interações com essa importante enzima envolvida no metabolismo de diversos fármacos (Tabela 2).

	CYP 1A2
Antidepressivos	Amitriptilina, clomipramina, imipramina, desipramina, fluvoxamina
Metilxantinas	Teofilina, cafeína
Substratos	
Antipsicóticos	Clozapina, olanzapina, haloperidol
Neurofármacos	Ondasterona, riluzol, tacrina, zolmitriptana
Cardiovasculares	Mexiletina, verapamil, propanolol, R-varfarina
Analgésicos	Naproxeno, paracetamol
Outros	Ciclobenzaprina, estradiol, ropivacaina

Tabela 2: Classes de medicamentos metabolizados pela citocromo P450 1A2 (Adaptado de Serra, 2006).

2.5. Sistema Citocromo P450

O sistema citocromo P450 é um complexo enzimático constituído por uma superfamília de hemoproteínas (os citocromos P450), por uma flavoproteína dependente de NADPH (a NADPH-oxidorecutase do citocromo P450) e ainda pelo citocromo b₅ e sua respectiva redutase dependente de NADH (NADH-redutase do citocromo b₅), e responsáveis pelo metabolismo de um grande número de substratos endógenos (esteróides, ácidos biliares, ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos, retinóides e outros) e exógenos (drogas, toxinas, produtos naturais de plantas e outros) em animais e humanos (NELSON et al., 1996; PARKINSON, 2008).

Os CYP's foram identificadas em 1954, por Williams e Klingenberg, em microsomas de ratos e porcos, como um pigmento com características espectrofotométricas específicas (NEBERT et al., 1987). Posteriormente, foram denominadas de citocromo P450, por Omura e Sato (1964), devido ao complexo formado com o monóxido de carbono e por apresentarem um pico de absorção espectrofotométrica no comprimento de onda 450 nm.

Os CYPs são hemoproteínas cujo grupo heme encontra-se primeiramente no estado férrico (Fe³⁺), sendo reduzido ao estado ferroso (Fe²⁺) após início de seu ciclo catalítico (Figura 3). A redução ocorre após a ligação com um substrato (xenobiótico), pela doação de um elétron do NADPH por meio da NADPH-redutase. A redução grupo heme para íon ferroso permite a fixação do oxigênio molecular facilitando a transferência de um segundo elétron. O recebimento deste segundo elétron, proveniente do NADPH ou citocromo b₅, leva a ativação do oxigênio molecular, o qual se cliva permitindo assim que um átomo de oxigênio seja inserido no substrato, e o outro se combine com prótons e dois elétrons para formar água (RANG et al., 2004).

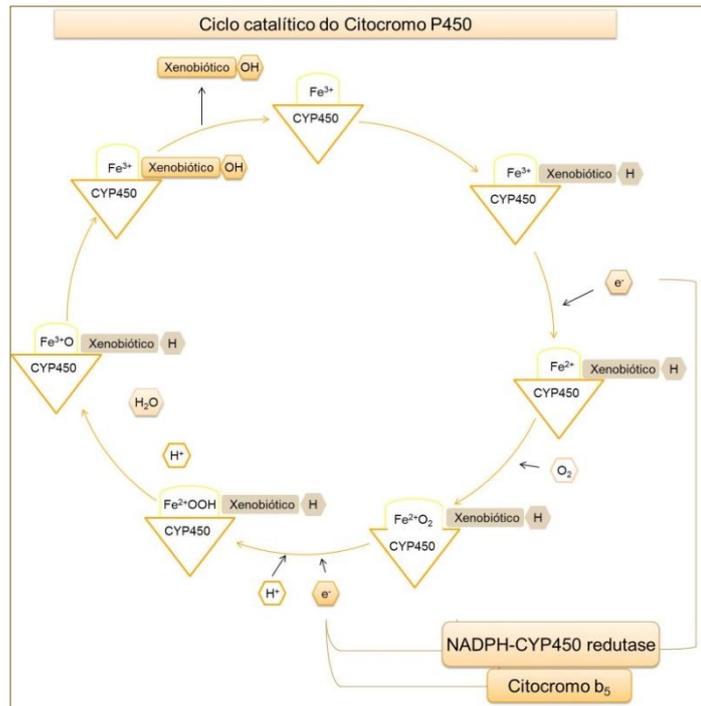


Figura 3: Ciclo catalítico do Citocromo P450. (Adaptado de Rang et al., 2004).

Com a liberação do xenobiótico oxidado, o CYP retorna ao seu estado inicial (Fe^{3+}), e a inserção do átomo, proveniente do oxigênio molecular (monoxigenação) na molécula do xenobiótico, permite que o composto se torne mais hidrossolúvel e, assim, facilite sua excreção. O processo de transferência de elétrons só pode ocorrer caso haja a ligação com o substrato, uma vez que o potencial de redução é termodinamicamente desfavorável em outras condições (PARKINSON, 2008).

As pesquisas permitiram a identificação de pelo menos, 2.400 formas de enzimas CYP que se encontram distribuídas por cerca de 781 famílias, incluindo animais (110 famílias), plantas (95 famílias), fungos (310 famílias), protistas (61 famílias) e bactérias (205 famílias). Em humanos, atualmente, são conhecidas 10 famílias do CYP, sendo restritas as famílias CYP1, CYP2 e CYP3 o envolvimento no processo de metabolismo de fármacos (Figura 4), sendo as isoenzimas 1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, e 3A4/5 reconhecidas como as mais importantes, correspondendo a, aproximadamente, 75% de toda a fase I do metabolismo de fármacos (JOHANSSON e INGELMAN-SUNDBERG, 2011).

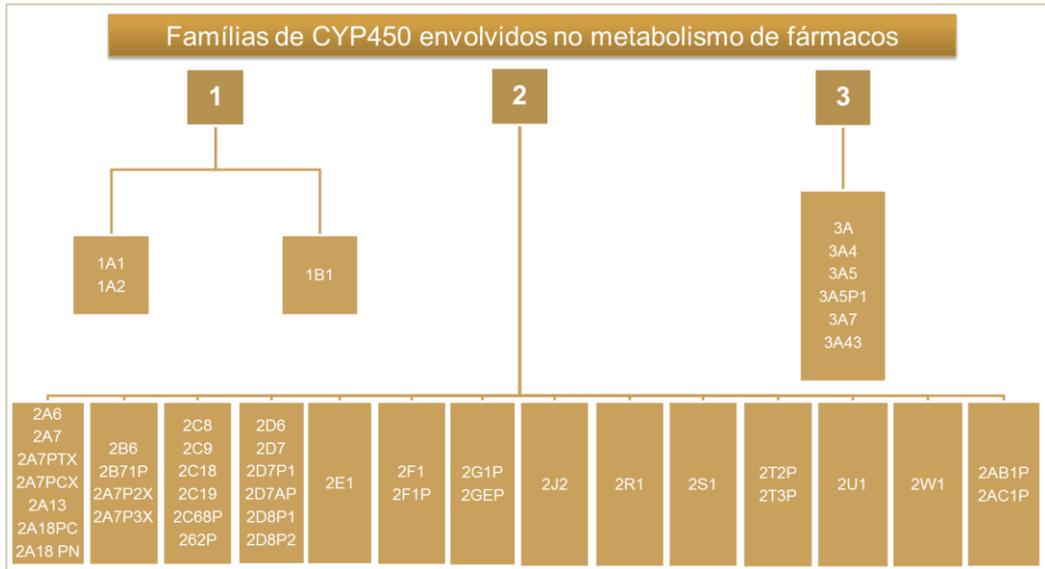


Figura 4: Esquema representando as principais famílias do citocromo P450 no metabolismo de fármacos (Adaptado de Donato, 2004).

Devido a grande variedade de isoformas destas enzimas, um sistema de nomenclatura foi desenvolvido para CYP, onde suas isoenzimas são reunidas em subgrupos tendo em vista as semelhanças nas sequências de aminoácidos (Figura 5). Assim, para indicar um gene citocromo P450 é primeiramente incluído prefixo “CYP”, o qual designa o citocromo 450. Em seguida, as isoenzimas CYP dentro da mesma família, partilhando entre si mais de 40% de identidade na sequência de aminoácidos, são designadas por um numeral arábico. As famílias são depois divididas em subfamílias, as quais partilham mais de 55% de identidade na sua sequência de aminoácidos e são representadas por uma mesma letra. Finalmente, um número após a letra denota cada isoenzima individual (GUENGERICH, 2008).

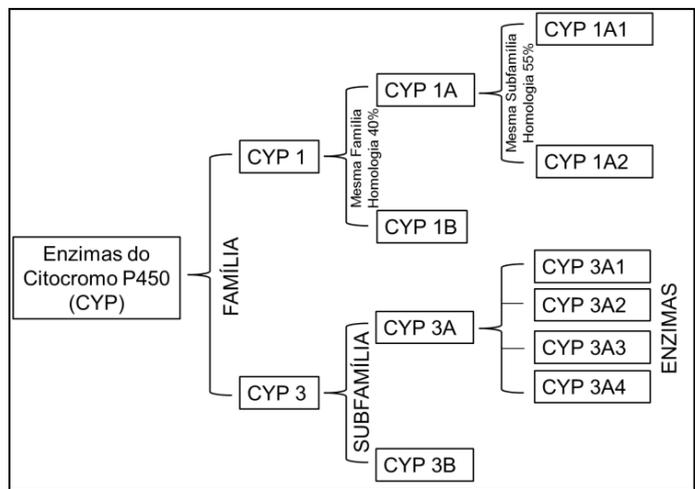


Figura 5: Esquema representando a classificação das enzimas do citocromo P450.

Foi somente em 1965, que Cooper e colaboradores demonstraram a função enzimática dos CYPs e a sua importância no metabolismo de xenobióticos, principalmente na fase I, a qual é caracterizada pela modificação conformacional do composto, de forma a introduzir um grupo funcional nas moléculas do mesmo e transformar os componentes químicos hidrofóbicos em intermediários mais hidrofílicos e mais adaptados para sofrerem modificações na fase II e, finalmente, serem eliminados do organismo.

Os CYP's são as enzimas mais frequentemente envolvidas no metabolismo de xenobióticos. Portanto, devido a essa ampla variedade de fármacos submetidos ao metabolismo oxidativo mediado por CYP, é relatado na literatura um grande número de interações medicamentosas com significância clínica durante terapia com múltiplos fármacos (ESTABROOK, COOPER, e ROSENTHAL, 1993).

2.6. Estudos Farmacocinéticos

A farmacocinética pode ser compreendida como o estudo da variação da concentração de um fármaco no organismo em função do tempo, envolvendo os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, os quais determinam o destino desse fármaco no organismo (SCHELLACK, 2005). Os parâmetros farmacocinéticos podem ser definidos como constantes biológicas ou relações de proporcionalidade obtidas por meio da aplicação de um modelo farmacocinético na interpretação da trajetória de uma substância no organismo (AMORE, 2010).

Assim, por meio de modelos matemáticos, os quais simulam a disposição cinética do fármaco em um organismo vivo, é possível determinar os parâmetros farmacocinéticos e a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes envolvidos nestes processos (TOZER e ROWLAND, 2009). Os principais parâmetros analisados em um estudo farmacocinético são a área sob a curva de concentração plasmática versus tempo, volume aparente de distribuição, *clearance* e meia-vida de eliminação (STORPIRTS et al., 2011).

A área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (ASC) representa a quantidade total do fármaco absorvido. É considerado o mais importante parâmetro para avaliar a quantidade de fármaco biodisponível, sendo expresso em quantidade/volume *versus*

tempo (mg/mL *versus* h) (ANVISA, 2002). Matematicamente, é obtida através da regra dos trapézoides, onde os valores da base correspondem aos intervalos de tempo e os valores das alturas correspondem às respectivas concentrações obtidas, conforme verificado abaixo (CHOW e LIU, 2000):

$$ASC = \frac{\text{base} \times (\text{altura menor} + \text{altura maior})}{2}$$

Na prática, a ASC é calculada pelo método dos trapézoides, do tempo zero ao tempo t (ASC_{0-t}), onde t é o tempo relativo à última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação). No entanto, é necessário também calcular a área sob a curva extrapolada ao tempo infinito ($ASC_{0-\infty}$) a qual é obtida conforme a equação abaixo (EVANS, 2004):

$$ASC_{0-\infty} = ASC_{0-t} + \frac{C_t}{K_{el}}$$

Onde, C_t é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente (acima do limite de quantificação) e K_{el} é a constante de velocidade de eliminação da fase terminal.

A Constante de Eliminação (K_{el}) representa a fração de fármaco eliminada por unidade de tempo, sendo esta, uma grandeza inversamente proporcional à meia vida plasmática de um fármaco (HARDMAN, LIMBIRD e GILMAN, 2003). Onde,

$$K_{el} = \frac{0,693}{t^{1/2}}$$

Na prática, K_{el} é a constante de velocidade de eliminação do fármaco, sendo calculada para cada indivíduo como o coeficiente de inclinação da reta de regressão ajustada nos últimos valores de concentração transformados em log10, multiplicado por -2,303 (EVANS, 2004).

O *Clearance* (Cl) é um termo usado universalmente para indicar a remoção completa de determinada substância de um volume específico de sangue na unidade de tempo. É obtida pelo produto do volume aparente de distribuição da taxa de eliminação (ANVISA, 2002). Onde,

$$Cl = V_d \times K_{el}$$

Na prática, o valor de Cl será calculado com a seguinte fórmula (EVANS, 2004):

$$Cl = \frac{\text{dose}}{ASC_{0-\infty}}$$

O Volume de Distribuição (Vd) é um volume hipotético de líquido necessário para conter a quantidade total de fármaco no organismo na mesma concentração presente no plasma. Apesar do volume de distribuição não ter sentido fisiológico ou físico, é útil para descrever a relação entre a quantidade do fármaco no organismo inteiro e a quantidade existente no plasma (ANVISA, 2002). Onde,

$$Vd = \frac{\text{Quantidade do fármaco no organismo}}{\text{Concentração plasmática}}$$

Na prática, o valor do Vd é obtido de acordo com a equação abaixo (EVANS, 2004):

$$Vd = \frac{Cl}{Kel}$$

A Meia-vida ($T_{1/2}$) indica o tempo em que uma grandeza considerada reduz à metade de seu valor, ou seja, o tempo gasto para que a concentração plasmática ou a quantidade original de um fármaco se reduza à metade. Este parâmetro farmacocinético possibilita uma estimativa da rapidez com que o processo ocorre, originando dados importantes para a interpretação dos efeitos terapêuticos ou tóxicos dos fármacos e duração do efeito farmacológico (EVANS, 2004). É obtido de acordo com a equação:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{Kel}$$

O metabolismo, etapa farmacocinética avaliada neste estudo, é definido como um processo de transformações biológicas desencadeadas principalmente por enzimas, os quais resultam na alteração do composto, tornando-o benéfico, prejudicial ou simplesmente ineficiente ao organismo. É nessa etapa que ocorre mais, frequentemente, as interações farmacocinéticas e, que por sua vez promovem, muitas vezes, influência significativa sobre a terapêutica medicamentosa (GUENGERICH, 2008).

2.7. Interações Medicamentosas

Uma interação medicamentosa pode ser definida como a influência de um fármaco, pela administração simultânea ou anterior, sobre outra substância, entre elas, outro fármaco, drogas de abuso ou até mesmo alimentos. Ou seja, quando um medicamento é administrado isoladamente, produz uma resposta farmacológica esperada, porém, quando associado a outras substâncias ocorre um efeito diferente do esperado, com potencialização de seu efeito ou sua ineficácia (STOCKLEY, 2004).

Essas interações podem, então, apresentar efeitos benéficos para o organismo, quando utilizadas para aumentar os efeitos terapêuticos, como a associação de diuréticos a anti-hipertensivos, ou reduzir a toxicidade, como quando um fármaco poupador de potássio corrige a hipopotassemia induzida por tiazidas. Podem, também, apresentar efeitos nocivos, quando ocorre a potencialização de um medicamento que apresente baixo índice terapêutico, como a varfarina, bem como quando o medicamento tem seus efeitos diminuídos ou eliminados (SUCAR, 2007).

Nem sempre o efeito de uma interação medicamentosa pode ser detectado facilmente e cada paciente pode reagir diferentemente. Também é preciso considerar os fatores que podem interferir na farmacocinética dos medicamentos, considerando o estado nutricional do paciente, patologias associadas e as características genéticas do indivíduo. Alguns estão mais propensos a evidenciar interações, como os idosos, os insuficientes renais, hepáticos, cardíacos e respiratórios, com hipotireoidismo, diabetes e outros. Adicionalmente, a politerapia é um dos principais fatores relacionados às interações medicamentosas atualmente, sendo a auto-medicação, também, um fator importante (BRASIL, 2012).

As interações farmacológicas podem ocorrer durante o preparo do medicamento; no momento da absorção, distribuição, metabolismo, excreção ou na ligação ao receptor farmacológico, alterando o efeito esperado, qualitativa ou quantitativamente. Dessa forma, os mecanismos envolvidos no processo interativo podem ser classificados em: Interações físico-químicas e as Interações terapêuticas, enquanto que as terapêuticas podem ser farmacocinéticas ou farmacodinâmicas (RANG et al., 2004).

As interações físico-químicas ocorrem pela incompatibilidade de medicamentos, fora do organismo. Antes de ser administradas ao paciente, em situações que precisam ser

misturadas em infusão intravenosa, frascos ou seringas. Por se tratar de fármacos diferentes, é possível a ocorrência de numerosas incompatibilidades, resultado de reações que podem ocasionar a inativação dos fármacos em questão. Um exemplo é a precipitação da anfotericina B quando colocada em solução fisiológica (BRASIL, 2012).

As interações terapêuticas ocorrem dentro do organismo, após a administração do medicamento. As farmacocinéticas produzem alterações nos processos de absorção e disposição do fármaco no organismo, gerando perfis de concentração plasmática do fármaco alterados e resultando efeitos farmacológicos ampliados ou reduzidos. Por outro lado, as farmacodinâmicas causam modificação do efeito bioquímico ou fisiológico do medicamento, levando à ampliação ou redução do efeito esperado do fármaco devido ao sinergismo (como ocorre com a ação analgésica de ácido acetilsalicílico e codeína) ou antagonismo (antitussígeno com um xarope expectorante) (SUCAR, 2007).

2.8. Interação fármaco-produto natural

As interações entre fármacos e produtos naturais, responsáveis por induzir alterações na resposta farmacológica ou toxicológica do fármaco, podem ser classificadas em dois grupos: interações farmacodinâmicas, as quais levam à ampliação ou redução do efeito esperado do fármaco devido ao sinergismo ou antagonismo, respectivamente; e interações farmacocinéticas, as quais produzem alterações nos processos de absorção e disposição do fármaco no organismo, gerando perfis de concentração plasmática do fármaco alterados e resultando efeitos farmacológicos ampliados ou reduzidos (IZZO e ERNST, 2001).

Clinicamente, interações medicamentosas associadas com indução ou inibição enzimática, principalmente enzimas do CYP, têm sido um dos fatores mais importantes na causa de reações adversas em humanos (GUENGERICH, 2006). O risco de causar alterações na resposta farmacológica de uma associação de produtos de origem vegetal com fármacos pode ocorrer desde uma simples utilização de um chá até a administração de medicamentos fitoterápicos.

2.8.1. Indução Enzimática

A indução enzimática ocorre devido ao aumento da expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de substâncias químicas, levando a uma maior eliminação e, conseqüentemente, uma menor atividade farmacológica de uma gama de fármacos tende diminuir, uma vez que estes substratos passam a ser eliminados mais rapidamente do organismo (MARTIGNONI, GROOTHUIS e KANTER, 2006).

Existem casos em que a indução enzimática causada por um determinado fármaco pode também causar a toxicidade de um segundo fármaco, isso ocorre quando os seus efeitos tóxicos são mediados por um metabólito ativo, como é o caso do paracetamol, que pode causar maior risco de lesão hepática em paciente cujo CYP tenha sido induzido, por exemplo, por uso crônico de álcool (RANG et al., 2004).

O principal mecanismo de indução das enzimas CYP consiste em aumento da expressão da enzima por meio do aumento da transcrição e tradução ou diminuição de sua degradação. Os receptores de xenobióticos funcionam de modo semelhante aos receptores de hormônios nucleares: a ligação de um composto xenobiótico ativa o receptor, permitindo sua translocação para o núcleo e ligação aos promotores de várias enzimas de metabolismo (WILKINSON, 2005).

A indução de CYP tem múltiplas conseqüências. Entre elas, o fármaco pode aumentar o seu próprio metabolismo, como no caso da carbamazepina, um agente antiepiléptico, o qual além de induzir CYP 3A4, também é metabolizado por essa enzima, resultando em um fármaco que acelera o próprio metabolismo. Um fármaco pode, também, aumentar o metabolismo de outro fármaco quando coadministrado, como é o caso de um fármaco metabolizado pelo CYP 3A4 ao ser coadministrado com a carbamazepina. Essa associação pode ser problemática, visto que o aumento da atividade de CYP pode reduzir as concentrações de um dos fármacos, resultando em doses abaixo do nível terapêutico, mesmo quando forem administradas doses convencionais desses agentes (GUENGERICH, 2003).

2.8.2. Inibição Enzimática

Uma inibição enzimática consiste na redução do metabolismo de um determinado fármaco metabolizado pela enzima inibida. Como resultado, os níveis do fármaco podem alcançar concentrações tóxicas, e prolongar a presença do fármaco ativo no organismo. O mecanismo de inibição do CYP pode ser dividido em três categorias: inibição reversível ou competitiva, inibição não-competitiva e inibição irreversível (RANG et al., 2004).

De acordo com Halpert (1995), inibição reversível é provavelmente o mecanismo mais comum responsável pelas interações medicamentosas e resulta da competição pelo sítio ativo da enzima, promovendo a diminuição da atividade enzimática por meio de interações reversíveis. O cetoconazol e a cimetidina, compostos cujo princípio ativo é o alcaloide aromático heterocíclico imidazol, inibem o CYP. No entanto, devido à baixa solubilidade e menor afinidade pelo CYP microsômico da cimetidina, a inibição é reversível. No entanto, o cetoconazol por ter alta solubilidade é um potente inibidor do CYP (LIN e LU, 1998).

As quinolinas consistem em outra classe de heterocíclicos que também apresentam uma potente inibição do CYP. As elipticinas são exemplos desta classe - um grupo de agentes antileucêmicos (inibem a síntese do DNA e RNA) com propriedades imunossupressoras, isolados primariamente da *Ochrosia elliptica*, a qual apresenta o grupo quinolina em sua estrutura, responsável pela interação com do CYP. A elipticina e seu derivado 9-hidroxi-elipticina têm sido usados com sucesso como inibidores da CYP1A1 e CYP1A2 (LESCA et al., 1995).

Segundo Nelson e Cox (2010) o inibidor não-competitivo se liga diretamente ao complexo enzima-substrato, mas não à enzima livre. Dessa forma, o inibidor não precisa se assemelhar ao substrato, mas pode provocar uma distorção do sítio ativo da enzima, fazendo com que a mesma seja inativa na forma catalítica. Um grande número de fármacos, incluindo metilenedioxibenzenos, alquilaminas, antibióticos macrolídeos e hidrazinas, sofre ativação metabólica pelo CYP para formar metabólitos inibitórios. Estes metabólitos podem formar complexos estáveis com o CYP, chamado complexo metabólico intermediário, de forma que o CYP fique em um estado inativo funcionalmente (estas substâncias são chamadas de substratos suicidas). Nesse caso, a formação do complexo pode ser revertida e a função catalítica do CYP pode ser restaurada.

Um exemplo de inibição não competitiva compreende os derivados de troleandomicina e a eritromicina, antibióticos macrolídeos bastante estudados na inibição seletiva de CYP. Estes agentes possuem em sua estrutura uma amina terciária que, depois de passar por várias etapas de biotransformação mediadas pelo CYP, produz um metabólito nitroso que ao se ligar com o CYP leva a formação de um complexo metabólico intermediário, caracterizando, assim, uma inibição não competitiva (LIN e LU, 1998).

Os inibidores irreversíveis se ligam a enzima de maneira tão forte que bloqueiam permanentemente a atividade enzimática. Algumas substâncias químicas contêm certos grupos funcionais que se oxidados pelo CYP a intermediários reativos causam a inativação irreversível da enzima antes da sua liberação do sítio ativo. Assim, é necessária primeiramente a ativação metabólica para uma posterior inativação da enzima (VOET e VOET, 2004).

Um exemplo de inibição irreversível ocorre com o barbitúrico secobarbital, que ao interagir com o CYP, alquila e inativa permanentemente algumas isoenzimas do CYP (MATTEIS et al., 1982). Outros compostos como enxofre, podem inativar de forma permanente o CYP por meio de ligação covalente a cadeia protéica. Isso ocorre depois que são ativados por oxidação pela enzima, como é o caso do ácido tienílico, o qual é oxidado pela CYP2C9 para um metabólito reativo, possivelmente um sulfóxido tiofeno que se liga covalentemente ao CYP (LOPEZ-GARCIA et al., 1993).

Diante do exposto e devido à relevância destas vias metabólicas para a eliminação dos fármacos, é de extrema importância a investigação das possíveis alterações causadas no metabolismo de fármacos pela interação das enzimas do citocromo P450 com produtos naturais, no intuito de verificar precocemente ocorrências de interações medicamentosas no metabolismo de novos candidatos a fitoterápicos e de uso tradicional pela população.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito dos extratos aquosos de *Eugenia punicifolia* e de *Paullinia cupana* na farmacocinética de marcadores da atividade enzimática do citocromo P450 em ratos.

3.2. Específicos

Obter e caracterizar a matéria-prima vegetal de *Eugenia punicifolia* (folhas) e *Paullinia cupana* (sementes) visando garantir os parâmetros para o controle de qualidade da droga vegetal;

Preparar e caracterizar a solução extrativa aquosa das folhas de *Eugenia punicifolia* e das sementes de e *Paullinia cupana*;

Avaliar o efeito do extrato de guaraná na farmacocinética da teofilina, marcador do CYP1A, em um estudo de indução enzimática em ratos;

Avaliar o efeito do extrato de pedra-ume-caá na farmacocinética do midazolam, marcador do CYP3A, em um estudo de inibição enzimática em ratos.



Universidade Federal do Amazonas

Biblioteca Digital de Teses e Dissertações



**CONTEÚDO INDISPONÍVEL
PARTE DA PUBLICAÇÃO NÃO AUTORIZADA PELO AUTOR**