

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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

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

### CAPÍTULO I

<b>Figura 6-</b> Histograma de distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal de <i>Eugenia punicifolia</i> .....	53
<b>Figura 7-</b> Histograma de distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal de <i>Paullinia cupana</i> .....	53
<b>Figura 8-</b> 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 <sup>-1</sup> ; Detecção UV em 275nm. A- Cromatograma das soluções dos padrões. B- Cromatograma do extrato de <i>P. cupana</i> .....	54

### CAPÍTULO II

<b>Figura 9-</b> Estrutura molecular dos benzodiazepínicos utilizados.....	62
<b>Figura 10-</b> Procedimento experimental para inserção da cânula na artéria carótida esquerda dos animais para posterior coleta sanguínea.....	64
<b>Figura 11-</b> Esquema representativo do processo de extração do midazolam e diazepam do plasma.....	65
<b>Figura 12-</b> Cromatogramas representativos das análises empregando a coluna octadecilsilano em modo isocrático e fase móvel constituída de solução-tampão fosfato 10 mmol.L <sup>-1</sup> pH:4,5, Acetonitrila e Metanol (50:40:10, v/v/v); vazão: 1mL.min <sup>-1</sup> ; Detecção UV em 245nm. <b>A</b> – Cromatograma das soluções dos padrões. <b>B</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
<b>Figura 13-</b> 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
<b>Figura 14-</b> 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

<b>Figura 15-</b> Estrutura molecular das metilxantinas utilizadas..	78
<b>Figura 16-</b> Esquema representativo do processo de extração da teofilina e cafeína do plasma, seguido de análise cromatográfica.....	81
<b>Figura 17-</b> 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 <sup>-1</sup> ; Detecção UV em 275nm. <b>A</b> – Cromatograma das soluções dos padrões. <b>B</b> - Cromatograma do plasma de animais sem tratamento <b>C</b> - 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
<b>Figura 18-</b> 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
<b>Figura 19-</b> 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
<b>Figura 20-</b> 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
<b>Figura 21-</b> 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 1A2 .....26

**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

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

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
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
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1	Geral	41
3.2	Específico	41
<b>ARTIGO I</b>		
1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>43</b>
2.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>45</b>

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

## 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 punicifolia*

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. punicifolia* 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. punicifolia* 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

<b>CYP3A4</b>	
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
<b>Substratos</b>	
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 (HARRINGTON 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).

	<b>CYP 1A2</b>
Antidepressivos	Amitriptilina, clomipramina, imipramina, desipramina, fluvoxamina
Metilxantinas	Teofilina, cafeína
<b>Substratos</b>	
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 b<sub>5</sub> e sua respectiva redutase dependente de NADH (NADH-redutase do citocromo b<sub>5</sub>), 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 (Fe<sup>3+</sup>), sendo reduzido ao estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>) 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 b<sub>5</sub>, 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).

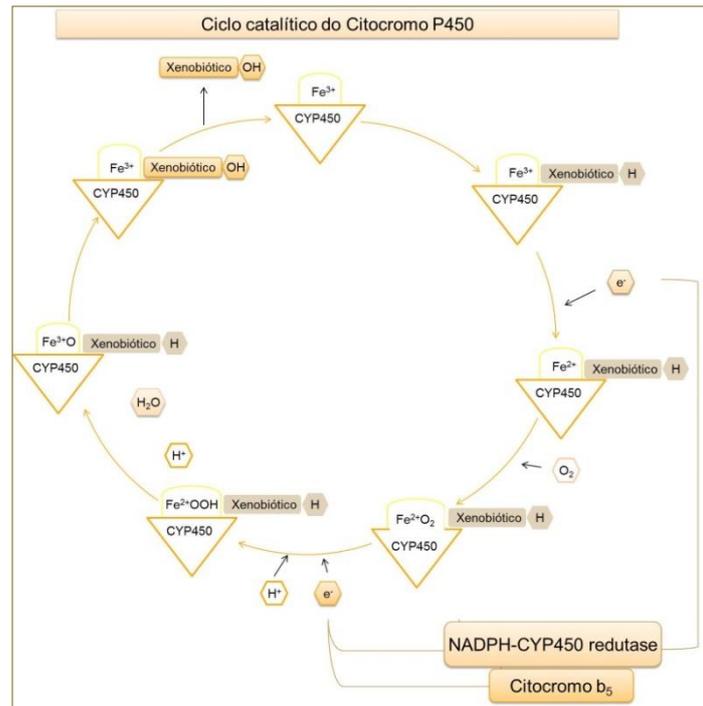


Figura 3: Ciclo catalítico do Citocromo P450. (Adaptado de Rang et al., 2004).

Com a liberação do xenobiótico oxidado, o CYP retorna ao seu estado inicial ( $\text{Fe}^{3+}$ ), 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).

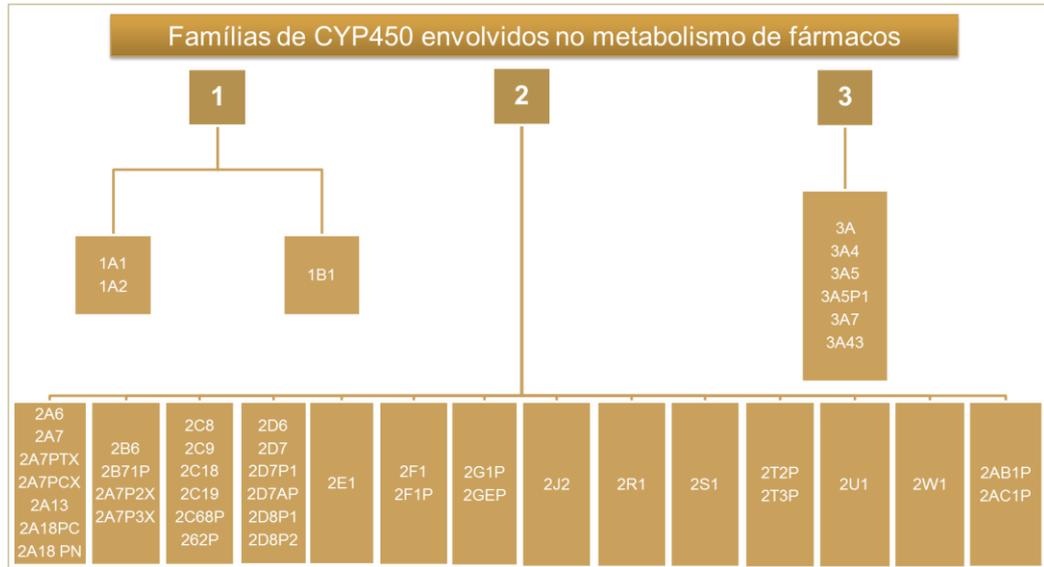


Figura 4: Esquema representando as principais famílias do citocromo P450 no metabolismo de fármacos (Adaptado de Donato, 2004).

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).

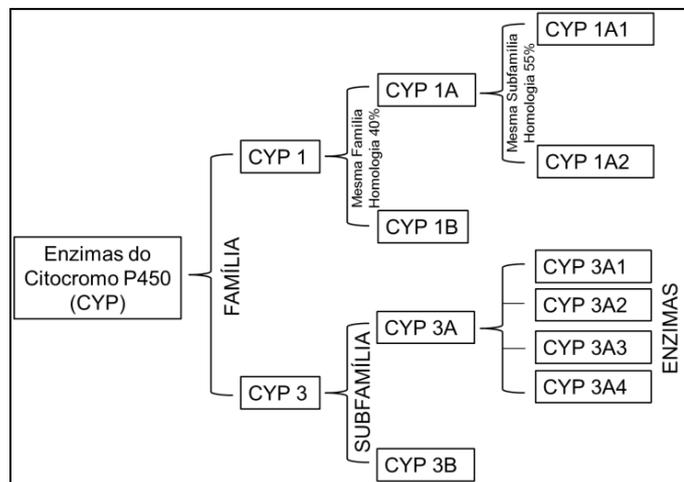


Figura 5: Esquema representando a classificação das enzimas do citocromo P450.

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  $\log_{10}$ , 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.

## **ARTIGO I**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MATERIAL VEGETAL E EXTRATO FLUIDO DAS ESPÉCIES *Eugenia punicifolia* - MYRTACEAE E *Paullinia cupana* - SAPINDACEAE**

## 1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia, definida etimologicamente, por Vanaclocha e Folcará (2003), como “terapêutica com plantas”, é a ciência que estuda a utilização dos produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica preventiva, atenuante ou curativa de um estado patológico. Esses produtos podem apresentar-se sob diversas formas, e entre as mais simples estão os chás, preparados de plantas frescas ou secas, ou através de formas mais elaboradas como os elixires e as cápsulas. O estado (sólido, líquido ou gasoso) varia em decorrência de como o medicamento fitoterápico é preparado (FERRO, 2006).

As plantas medicinais e seus derivados estão entre os principais recursos terapêuticos utilizados atualmente. Cerca de 82% da população brasileira usa produtos a base de plantas nos cuidados com a saúde (BRASIL, 2012). O crescente avanço em busca da utilização desses recursos naturais não tem sido acompanhado, na mesma proporção, do emprego de técnicas criteriosas que garantam sua segurança na transformação da Matéria Prima Vegetal (MPV). É muito comum a utilização de espécies vegetais comercializadas sem qualquer garantia de sua procedência (YUNES, PEDROSA e CECHINEL, 2001).

A qualidade da droga vegetal e seus derivados é essencial quando utilizados como matéria-prima para o desenvolvimento de fitoterápicos. Atualmente, há um consenso mundial da necessidade de se estabelecer métodos e parâmetros que permitam avaliar a qualidade de matérias-primas vegetais e os fitoterápicos. A garantia de qualidade de um produto fitoterápico inicia com a padronização dos procedimentos ligados ao cultivo do vegetal, desde o plantio e coleta até os passos posteriores como, secagem, estabilização, armazenamento e transporte (SIMÕES, 2007).

No Brasil há uma rigorosa legislação fundamentada em critérios que estabelecem o controle da qualidade e normas para produção e comercialização de produtos de origem vegetal, contudo, em sua maioria, esses produtos têm sido comercializados fora dos padrões estabelecidos, sem nenhuma comprovação pré-clínica e/ou clínica de sua eficácia e segurança, além da ausência de um sistema de farmacovigilância (BRANDÃO et al., 2002).

Nesse contexto, órgãos como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) têm como objetivo difundir conceitos

fundamentais no processo de adequação do controle de qualidade de produtos de origem vegetal. Entre os quais estão:

***Droga vegetal:*** a planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada;

***Derivado de droga vegetal:*** os produtos de extração da matéria prima vegetal: extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros;

***Matéria prima vegetal:*** planta medicinal fresca, droga vegetal ou derivado de droga vegetal;

***Fitoterápico:*** medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos de fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.

Deste modo, considerando a ampla utilização das drogas vegetais e seus derivados, é exigência da ANVISA, de acordo com a RDC Nº 14, de 31 de Março de 2010, a definição de requisitos como, levantamento etnofarmacológico, padronização da forma dos compostos vegetais e a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos, com a finalidade de garantir a qualidade, segurança e a eficácia em uma preparação farmacêutica. Diante do exposto, o presente artigo objetivou avaliar a qualidade da matéria prima vegetal das espécies *Eugenia punicifolia* e *Paullinia cupana*, por meio de ensaios preconizados pela ANVISA e Farmacopéias, a fim de garantir a segurança nos resultados de ensaios posteriores, em modelo animal, para os quais essas drogas foram utilizadas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

A espécie vegetal *Eugenia punicifolia* foi coletada no mês de setembro de 2013, período em que a planta apresentava frutos verdes e maduros, na reserva da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizada a Rodovia AM-10, Km-29, município de Manaus - Amazonas. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário do referido Instituto.

A espécie vegetal *Paullinia cupana* foi coletada no mês de novembro de 2012, período em que a planta apresentava frutos maduros, no Igarapé do Palhau (planta nativa), localizada no município de Maués - Amazonas. Com a finalidade de contribuir para o estabelecimento de critérios de qualidade da matéria-prima vegetal das duas espécies em estudo, o material foi processado e caracterizado de acordo com os ensaios descritos na Farmacopeia Brasileira e em códigos oficiais.

### 2.2. Tratamento do Material Vegetal

Após a coleta, as folhas da espécie *E. punicifolia* foram selecionadas manualmente, sendo retiradas e desprezadas as sementes e os galhos. Posterior à seleção, o material vegetal foi deixado à temperatura ambiente por 48 horas e, em seguida, levado à estufa com circulação forçada de ar a temperatura de  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 dias, período de estabilização da umidade residual. Após secagem, as folhas de *E. punicifolia* foram submetidas à moagem em moinhos de facas, com abertura de malha de 1 mm, para a obtenção de um pó de fina granulação.

Após a coleta, as sementes da espécie *Paullinia cupana* foram levadas ao forno de barro, por 3 dias. As sementes torradas foram descascadas de forma manual e submetidas à moagem em moinhos de facas, com abertura de malha de 1 mm, para a obtenção de um pó de fina granulação. Constituindo assim, a matéria-prima vegetal (MPV) ou droga vegetal utilizada neste estudo.

## 2.3. Caracterização da matéria-prima vegetal

### 2.3.1. Determinação de perda por dessecação

Para a obtenção da perda por dessecação, foi utilizada a metodologia da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b), onde, cerca de 1g de matéria-prima vegetal, exatamente pesadas, foram colocadas em pesa-filtro previamente tarado, e submetidos à dessecação em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Após esse período, os pesa-filtros foram retirados da estufa e colocados em dessecador para resfriamento por 20 minutos, pesando-se em seguida. Esse procedimento foi repetido de uma em uma hora até atingir peso constante. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em porcentagem através da média de três determinações.

### 2.3.2. Determinação do teor de extrativos

O teor de extrativos foi calculado conforme metodologia de Bundesvereinigung (1986), onde, cerca de 1,5 g de matéria-prima vegetal, exatamente pesado, foi submetido à extração com 150 mL de água destilada por decocção num período de 10 minutos. Após resfriamento, o volume de água perdido foi reconstituído e a solução filtrada, desprezou-se os primeiros 20 mL do filtrado.

Cerca de 20 g do filtrado, exatamente pesados, foram colocados em pesa-filtros previamente tarados e evaporados a secura em banho-maria com agitação ocasional. Posteriormente, os pesa-filtros foram colocados em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas, após esse tempo, os pesa-filtros foram retirados da estufa e colocados em dessecador para resfriamento por 20 minutos, pesando em seguida. Esse procedimento foi repetido de uma em uma hora até atingir peso constante. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo do teor extrativo determinado de acordo com a equação 1.

$$TE = \frac{g \times FD}{m - (m \cdot pd / 100)} \times 100 \quad \text{equação 1}$$

Onde: TE = teor extrativo solúveis em água (% m/m); g = massa do resíduo seco (g); FD = fator de diluição, o qual corresponde a 5; m = massa da planta seca e moída (g); pd = perda por dessecação da planta seca e moída (%m/m).

### 2.3.3. Determinação da granulometria dos pós por tamisação

A metodologia foi realizada conforme a metodologia da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b), onde cerca de 50 g da matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foram submetidos à passagem através de tamises, com abertura de malha de 1,00; 0,800; 0,710; 0,600; 0,500; 0,400; 0,330 e 0,250 mm. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 min. As frações retidas, nos tamises e coletor, foram pesadas e os dados analisados por método gráfico, construindo-se curvas de retenção e passagem, e histograma de distribuição, a fim de se obter o diâmetro médio de partículas e a amplitude granulométrica do pó. A retenção do pó nos tamises foi calculada conforme a equação 2

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \text{ equação 2}$$

Onde:

$P_1$  = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

$P_2$  = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas);

100 = Fator de porcentagem.

### 2.3.4. Determinação de cinzas totais

As cinzas obtidas foram determinadas de acordo com as normas da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b), a qual consistiu em acondicionar 3 g da MPV, exatamente pesados, em cadinhos de porcelana previamente calcinados. Em seguida o conjunto foi incinerado em mufla a 500°C até eliminação total do carvão, obtendo-se as cinzas brancas. O conjunto foi, então, resfriado em dessecador por 20 minutos e em seguida pesado. O ensaio foi realizado em triplicata e a porcentagem de cinzas em relação à droga seca foi calculada.

## 1.4. Obtenção da solução extrativa

A partir da droga vegetal obtida das folhas de *E. puniceifolia* foi preparada uma solução extrativa aquosa a 7,5:100 (m/v), pelo método de infusão, na qual a droga entra em contato com o solvente (água destilada), imediatamente após ser fervido, por um período de tempo de 15 minutos. A solução foi submetida à filtração comum e, em seguida, filtração à vácuo (BASTOS, 2011).

A partir da droga vegetal obtida das sementes de *P. cupana* foi preparada uma solução extrativa aquosa a 20%, conforme método utilizado pela população e em acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b), o qual consiste em adicionar o solvente (água destilada) diretamente ao pó triturado.

### 2.4.1 Caracterização da solução extrativa

#### 2.4.1.1. Determinação do pH

O pH foi determinado em potenciômetro, previamente calibrado, utilizando-se cerca de 50 mL da solução extrativa, seguindo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b). Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

#### 2.4.1.2. Determinação da densidade relativa

A densidade foi expressa conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b), utilizando-se picnômetro de 25 mL, previamente calibrado, através da aferição do mesmo vazio e contendo água. Em seguida foi determinada a massa do picnômetro contendo a solução extrativa. A densidade foi expressa pela média e desvio padrão de três determinações e calculada segundo a equação 3:

$$d_{25}^{25} = \frac{m_{se}}{m_{H_2O}} \quad \text{equação 3}$$

Onde:  $d_{25}^{25}$  = densidade relativa;  $m_{se}$  = massa da solução extrativa;  $m_{H_2O}$  = massa da água.

### **2.4.1.3. Determinação de resíduo seco**

A metodologia gravimétrica foi realizada de acordo com Bundesvereinigung (1986), onde uma alíquota de 20 ml da solução extrativa foi exatamente pesada, diretamente em pesa-filtro, previamente tarado, e evaporada até *secura* em banho-maria, sob agitação ocasional. Após evaporação do solvente, o pesa-filtro contendo o resíduo foi levado à estufa  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Após esse período, os pesa-filtros foram retirados da estufa e colocados em dessecador para resfriamento por 20 minutos, pesando em seguida. O procedimento foi repetido até atingir peso constante. Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão de três determinações.

### **2.5. Obtenção do extrato seco pelo método de Secagem por Aspersão**

A solução extrativa foi seca em aparelho *Spray-dryer* (MSD 1,0 - Labmaq), provido de atomizador do tipo pneumático (diâmetro de 0,7 mm), fluxo de alimentação de 8 ml/min, com temperatura de secagem de  $120^{\circ}\text{C}$  e câmara de secagem em sistema co-corrente. A alimentação foi realizada por uma bomba peristáltica. O extrato seco por aspersão obtido foi armazenado em frascos âmbar, fechados e mantido em geladeira.

### **2.6. Doseamento espectrofotométrico de Polifenóis Totais e Fração não-tanante através de leitura direta para a determinação do teor de Taninos Totais**

O doseamento de polifenóis totais foi determinado pela absorbância no comprimento de onda de 270 nm da solução extrativa de *E. punicifolia* na concentração de 80  $\mu\text{g/mL}$ . Essa solução foi obtida a partir de uma solução mãe a 7,5%, por meio de diluições até a obtenção de uma solução que apresentasse absorbância próxima a 0,900 nm. O equipamento utilizado foi o Espectrofotômetro Shimadzu, tipo UV-1700 PharmaSpec Shimadzu e detector de ultravioleta visível, controlado pelo programa UVProbe 2.31 (Kyoto, Japão).

Para a doseamento da fração não-tanante, foi utilizado agente complexante polivinilpirolidona, o qual foi acrescentado (150mg) a solução extrativa na concentração de 80  $\mu\text{g/mL}$  sob agitação constante, em agitador magnético, durante 1 hora. Em seguida, filtrou-se a mistura em papel filtro e determinada a absorbância da fração não-tanante (filtrado) no comprimento de onde de 270nm.

O teor de taninos totais foi calculado através da diferença entre o teor de polifenóis totais e fração não-tanante das três repetições, por meio das equações 4, 5 e 6. A validação deste método foi realizada previamente.

$$PFT = \frac{A_1 \cdot FD}{A_{1cm}^{\%} \cdot (m - p)} \quad (\text{Equação 4})$$

$$FNT = \frac{A_2 \cdot FD}{A_{1cm}^{\%} \cdot (m - p)} \quad (\text{Equação 5})$$

$$TT = PFT - FNT \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

PFT = polifenóis totais (g%); FNT = fração não-tanante (g%); TT = taninos totais;  $A_1$  = absorvância de polifenóis totais;  $A_2$  = absorvância da fração não-tanante; FD = fator de diluição; m = massa de matéria-prima vegetal (g); p = perda por dessecação de matéria-prima vegetal (g);  $A_1^{1\%}$  = coeficiente de absorção específica.

## 2.7. Teor de flavonoides

A quantificação de flavonoides totais foi mediante o método descrito por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) adaptado. Inicialmente adicionou-se 30 $\mu$ L do extrato (1mg/mL), 90 $\mu$ L de etanol, 6 $\mu$ L de cloreto de alumínio 10% e 6 $\mu$ L de acetato de potássio nas microplaca. Em seguida as amostra adicionadas foram incubadas por 30 minutos. Em seguida fez-se a leitura no comprimento de onda 510 nm em aparelho ELISA reader (DTX 800, Beckman Counter Inc, Fullerton, EUA). A quercetina foi utilizada como padrão neste ensaio e o teor de flavonoides foi calculado conforme equação abaixo:

$$\text{Flavonoides Totais} = \frac{ABS \text{ amostra} \times 100}{ABS \text{ padrão}}$$

## 2.8. Teor de metilxantinas

O doseamento de metilxantinas foi realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada com detector por Arranjos de Diodo (DAD), seguindo a metodologia de Tang e colaboradores (2007). O sistema cromatográfico compreendeu uma coluna octadecilsilano 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150mm (Phenomenex) em modo isocrático e fase móvel constituída por mistura de metanol-ácido fórmico a 1% (28-72%, v/v), com fluxo de 0,8  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  no equipamento Shimadzu tipo LC-20A, constituído por bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A e detector DAD SPD-M20A controlado pelo programa LC-Solution MultiPDA (Kyoto, Japão). O efluente da coluna foi monitorado a 275nm.

O teor de metilxantinas foi calculado por meio da construção de curvas de calibração, as quais foram submetidas à regressão linear, utilizando diferentes concentrações dos padrões utilizados, cafeína e teofilina, onde o intervalo das curvas de calibração para Cafeína: 0,1 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e para Teofilina: 0,1 a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As análises foram realizadas em triplicata.

## 2.9. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados da caracterização tecnológica dos extratos foram analisados através de teste “t” de Student utilizando o programa estatístico Graphpad Prism 5.0. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

Os dados para a determinação do controle de qualidade, preconizado pela Farmacopéia Brasileira, sobre a caracterização da matéria prima vegetal, com as amostras de *E. punicifolia* e *P. cupana*, estão descritos na Tabela 3. De acordo com os resultados obtidos, as MPVs de ambas as amostras vegetais estão em conformidade com os parâmetros exigidos neste documento.

Caracterização da MPV	<i>Eugenia punicifolia</i>	<i>Paullinia cupana</i>
Perda por dessecação (%)	5,5 ± 0,169	9,4 ± 0,23
Teor de extrativos (%)	25,16 ± 0,12	NR
Granulometria (faixa com maior concentração de partículas - µm)	< 600 >500	< 255
Cinzas totais (%)	5,64 ± 0,13	1,3 ± 0,05

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

Resultados expressos pela média ± desvio padrão de três determinações.

NR= não realizado

Nas Figuras 1 e 2 estão representados os histogramas de distribuição do tamanho de partículas da MPV das espécies em estudo. A MPV da espécie *E. punicifolia*, apresentou maior concentração de partículas nas faixas de 500-600 µm e menor que 255 µm, e com menor retenção de partículas no tamis com diâmetro maior 1000 µm e nas faixas de 850-1000 µm, caracterizando assim, segundo a Farmacopeia Brasileira, um pó grosso (Figura 6).

A MPV da espécie *P. cupana*, apresentou maior concentração de partículas no tamis com diâmetro maior que 1000 µm e menor que 255 µm, com menor retenção de partículas nas faixas de 355-425 µm e 425-500 µm. No entanto, para o estudo farmacocinético realizado posteriormente, no qual os animais receberam essa droga vegetal diluída em água por via oral, foi utilizada apenas a fração da MPV retida no fundo do tamis, a qual corresponde ao pó com tamanho de partícula inferior a 255 µm, caracterizando assim, um pó semifino (Figura 7). O pó semifino é mais facilmente administrado aos animais, além de reproduzir a forma como é utilizado pela população.

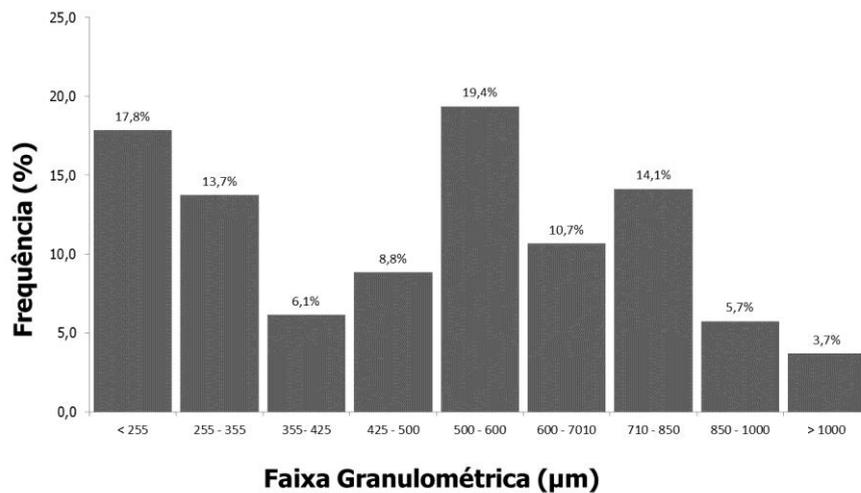


Figura 6 - Histograma de distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal de *Eugenia punicifolia*

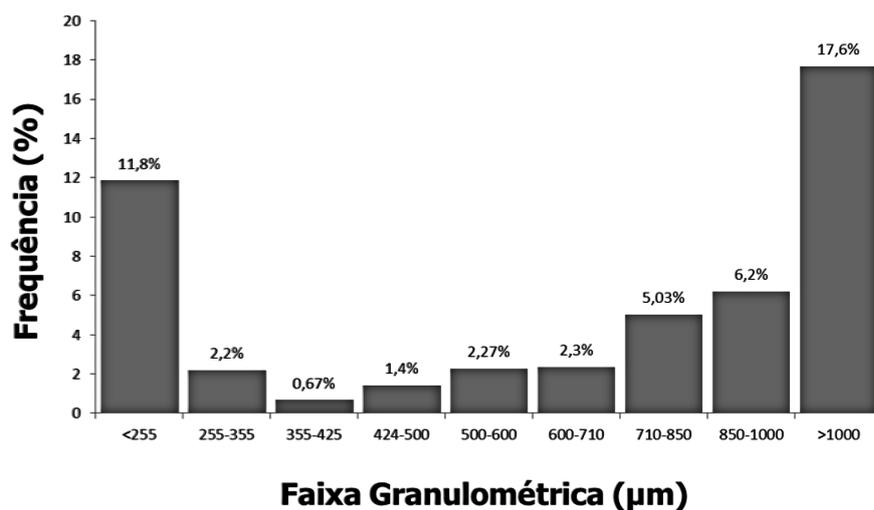


Figura 7 - Histograma de distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal de *Paulinia cupana*

A análise de dados realizada para a determinação do controle de qualidade correspondente a caracterização do extrato fluido, preparado a partir da MPV das espécies vegetais *E. punicifolia* e *P. cupana*, estão descritos na Tabela 4. Todos os ensaios foram realizados conforme metodologia estabelecida pela Farmacopéia Brasileira, e assim como para a MPV, os resultados obtidos de ambas as espécies vegetais estão dentro dos limites exigidos. Os cromatogramas relativos à análise das amostras de guaraná são mostrados na Figura 8.

Caracterização da Solução Extrativa	<i>Eugenia punicifolia</i>	<i>Paullinia cupana</i>
Resíduo seco (%)	2,73 ± 0,002	NR
Rendimento de secagem por nebulização (%)	10	NR
pH	5,04	5,86
Densidade relativa	1,01 ± 0,001	1,02 ± 0,0006
Polifenóis totais (ugeq.Q/mL)	165,863 ± 10,55	NR
Teor de Taninos totais (g%)	18,25 ± 0,03	NR
Teor de flavonoides (ugeq.Q/mL)	15,559 ± 0,631	NR
Teor de Metilxantinas (%)	NR	22,91±0,005

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

Resultados expressos pela média ± desvio padrão de três determinações.

NR= não realizado

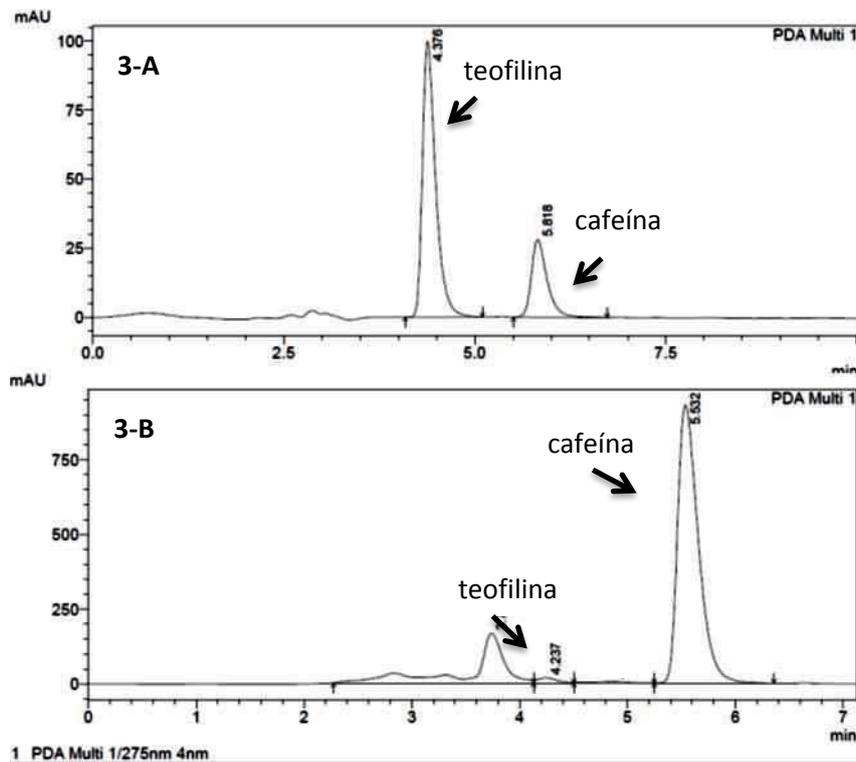


Figura 8 – Cromatogramas representativos das análises empregando a coluna octadecilsilano, em modo isocrático e com fase móvel constituída de Metanol:Ácido fórmico a 1% (28:72, v/v); vazão: 0,8mL.min<sup>-1</sup>; Detecção UV em 275nm. A- Cromatograma das soluções dos padrões. B- Cromatograma do extrato de *P. cupana*.

#### 4. DISCUSSÃO

A avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal e seus derivados, por meio do estabelecimento de parâmetros de qualidade juntamente com técnicas de conservação e armazenamento destes produtos, são suportes que apresentam grande importância dentro a avaliação farmacognóstica para assegurar a qualidade de uso a que se destina, uma vez que a qualidade da droga vegetal pode interferir diretamente na ação farmacológica da espécie (CARVALHO et al., 2009).

Dentre os parâmetros analisados, o teor de umidade merece elevada importância, já que, umidade da MPV acima do limite estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (faixa de 8 a 14%), pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos, como bactérias e fungos e, permitir a ocorrência de reações enzimáticas, como hidrólise, as quais promovem alterações e/ou degradação dos seus constituintes ativos (COSTA, 2001). Essa faixa é variável para espécies que se encontram nas monografias da Farmacopeia Brasileira.

O teor de umidade encontrado para MPV de *E. puniceifolia* foi de 5,5%, abaixo do estabelecido pela Farmacopeia Brasileira. Não foram encontrados na literatura limites específicos para a espécie, porém, nas monografias da Farmacopeia Brasileira, o teor de umidade de *Eugenia uniflora*, espécie pertencente ao mesmo gênero, é de no máximo 10%, qualificando assim o valor encontrado neste estudo. O teor de umidade encontrado para *P. cupana* foi de 9,4%, esta espécie apresenta monografia específica, onde o teor de umidade aceito é até 9,5%.

O teor de extrativos fornece informações quanto ao rendimento de sólidos hidrossolúveis presentes na amostra, bem como a eficiência da água em extrair as substâncias presentes nas células vegetais (LIST e SCHMIDT, 1989). O TE de *E. puniceifolia* neste estudo foi 25,16 m/m. Bastos (2011) analisou diferentes lotes da MPV de *E. puniceifolia*, sendo o lote 3 e 4 (TE= 36,26 e 25,45 m/m) os que apresentaram melhores resultados, com maior proporção de substâncias extraíveis pela água, classificados como boa extração. Assim, o método utilizado no presente trabalho foi eficiente ao extrair as substâncias presentes na MPV de *E. puniceifolia*.

Ao determinar a granulometria do pó resultante da moagem pode-se estimar a eficiência e reprodutibilidade do processo extrativo, correlacionando-os ao grau de divisão da droga vegetal obtido e ao seu enquadramento as características granulométricas expressas em farmacopeias e códigos oficiais, apresentando uma influência direta sobre a eficiência da extração (MIGLIATO, 2007).

Os resultados obtidos demonstraram que as classes granulométricas predominantes na MPV de *E. puniceifolia* foi o intervalo 500-600  $\mu\text{m}$  e o de *P. cupana* foi < 255  $\mu\text{m}$ , definidos como moderadamente grosso e semifino, respectivamente, e ambas com granulometria homogênea (BRASIL, 2010b). Grânulos homogêneos geram uma maior superfície de contato para a interação com o solvente na obtenção do derivado vegetal, facilitando a penetração do solvente extrator (LIST e SCHMIDT, 1989).

Os percentuais de cinzas encontrados nas amostras da MPV de *E. puniceifolia* e *P. cupana* foram 5,64 e 1,3%, respectivamente. Alto teor de cinzas totais em drogas vegetais é indicativo de presença de substâncias inorgânicas não voláteis presentes em contaminantes. Nas monografias da Farmacopeia Brasileira, o teor de cinzas totais aceitos para *E. uniflora* é de no máximo 11%, enquanto que para *P. cupana*, o máximo aceito é de 3%. Os resultados obtidos sugerem a pureza das amostras com percentuais de cinzas não significativos.

O resíduo seco é um parâmetro importante para a determinação do teor de sólidos solúveis presentes numa solução extrativa, bem como a secagem por aspersão. A quantificação destes constituintes é fundamental para o cálculo do rendimento da operação de secagem. O rendimento de secagem do extrato aquoso preparado a partir da MPV de *E. puniceifolia* (1L a 7,5%), pelo resíduo seco foi de 2,73% e secos por nebulização em equipamento *spray dryer*, foi de 10%.

Não foram realizados os ensaios de teor de extrativo, resíduo seco e secagem por nebulização para *P. cupana*, pois não foi necessária a realização de nenhum método de extração com sua MPV, uma vez que o material foi destinado a um teste posterior, onde a solução de *P. cupana* consistiu em adicionar água à dose requerida aos animais e imediatamente tratá-los com a solução aquosa recém-preparada, reproduzindo o uso pela população.

Para a caracterização físico-química da solução extrativa, informações quanto ao pH e densidade relativa são de grande relevância. Não há na Farmacopeia Brasileira ou

qualquer outro compêndio oficial nacional, especificações de densidade relativa para estas preparações. Assim, por se tratar de um extrato, cujo solvente extrator é a água destilada, as densidades relativas encontradas para *E. punicifolia* e *P. cupana* (1,01 e 1,02, respectivamente) ficaram muito próximas a densidade relativa encontrada para a água (0,99).

O pH possui elevada influência na estabilidade de uma solução extrativa e constituintes químicos (SOARES et al., 2001), podendo sinalizar prováveis alterações químicas que possam estar ocorrendo na solução extrativa (LONGHINI, 2007). A natureza ácida do extrato de *P. cupana* (pH 5,86), mesmo sendo rico em substâncias alcalinas (metilxantinas), pode estar relacionada ao solvente, pois apresenta densidade próxima a da água destilada. Soares e colaboradores (2001), também relataram meio ácido para um extrato aquoso de *P. cupana* (pH 5,63), pelo motivo citado. Para *E. punicifolia* (pH 5,04), além da densidade semelhante à da água destilada, soma-se a presença de polifenóis.

A literatura aponta que espécies do gênero *Eugenia* são ricas em compostos fenólicos (AMORIM et al., 2009). A determinação dos teores destes compostos, tais como taninos e flavonoides, na droga vegetal é indispensável, uma vez que, a atividade farmacológica de muitas espécies pode estar relacionada a presenças destes metabólitos. Adicionalmente, o teor destes compostos pode ser empregado na padronização da droga vegetal. Neste estudo, foram encontradas concentrações relevantes de flavonoides e taninos, totalizando cerca de 15,55  $\mu\text{eq.Q/mL}$  e 18,25 g%, respectivamente, dos compostos fenólicos totais presentes na espécie *E. punicifolia*.

Os teores de compostos fenólicos encontrados neste são superiores aos encontrados por Galeno e colaboradores (2013), onde o teor de flavonoides foi de 2,62  $\mu\text{eq.Q/mL}$  e taninos de 18,25 g%. Entre os fatores que podem ter levado a essa variação, pode-se relacionar a influência do período de coleta, diferença sazonal e fase reprodutiva da planta, além das condições na padronização da droga vegetal. De acordo com os valores encontrados, é possível sugerir que a droga vegetal utilizada neste estudo, tende apresentar maior potencial farmacológico, uma vez que, estes compostos fenólicos são, em sua grande maioria, responsáveis pela propriedade medicinal de muitas espécies (BELIGA et al., 2011, MUCHUWETI et al., 2007).

O teor de metilxantinas da espécie *P. cupana*, conforme consta nas monografias da Farmacopéia Brasileira, é de, no mínimo, 5% de metilxantinas. Os valores encontrados

para as metilxantinas cafeína e teofilina foi de 21 e 1,91%, respectivamente. Vale ressaltar que *P. cupana*, além de cafeína e teofilina, apresenta relevante teor de teobromina, porém não foi possível sua quantificação devido à ausência de padrões disponíveis. Assim, os resultados estão em acordo com os órgãos oficiais, evidenciando que a padronização dos ensaios de qualidade, realizados neste estudo, garantiu a integridade dos constituintes presentes na droga vegetal.

Assim, tendo em vista as exigências atuais por parte da ANVISA (BRASIL, 2010b) em estabelecer parâmetros referentes ao controle da qualidade de drogas vegetais, além da ausência de estudos farmacognósticos para a espécie *E. puniceifolia*, os dados encontrados neste estudo são importantes como conhecimentos básicos e podem ser aplicados na padronização e controle de qualidade das matérias-primas vegetais obtidas a partir das folhas de *E. puniceifolia* e sementes de *P. cupana*, garantindo a autenticidade, a estabilidade e a segurança destas espécies em estudos posteriores.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na caracterização físico-química das espécies vegetais *Eugenia punicifolia* e *Paullinia cupana* permitiram comprovar que todos os parâmetros analisados, como umidade, pureza e granulometria, encontram-se dentro das normas preconizadas pela Farmacopéia Brasileira;

A solução extrativa a 7,5% obtida a partir das folhas de *Eugenia punicifolia* apresentou bom rendimento de sólidos hidrossolúveis, a partir dos quais obteve-se altos teores de compostos fenólicos para flavonoides e taninos. A solução aquosa obtida a partir das sementes de *Paullinia cupana* apresentou teor de metilxantinas aceitável em conformidade com a monografia específica para esta espécie da Farmacopeia Brasileira;

Considerando os dados obtidos, pode-se concluir que as metodologias empregadas neste estudo foram adequadas para assegurar a qualidade da matéria prima vegetal das espécies *Eugenia punicifolia* e *Paullinia cupana*. Todas as etapas realizadas no presente trabalho são importantes e devem ser reproduzidas para garantir parâmetros seguros para a utilização de drogas vegetais com fins terapêuticos.

## **ARTIGO II**

# **EFEITOS DO EXTRATO AQUOSO DA ESPÉCIE VEGETAL *Eugenia punicifolia* (MYRTACEAE) NA FARMACOCINÉTICA DO MIDAZOLAM**

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de produzir uma diversidade de compostos a partir de seu metabolismo secundário, os quais, em sua maioria, são considerados moléculas biologicamente ativas para a proteção da própria planta, que podem também influenciar nos processos metabólicos e/ou a taxa de crescimento de microrganismos, e ainda possuir atividade biológica em outros organismos vivos (KAUR et al., 2011).

Por essa razão, é crescente o interesse de indústrias farmacêuticas a fim de obter novos produtos a partir de compostos bioativos obtidos de plantas (BODAS et al., 2012). Contudo, somado aos testes que comprovem a atividade farmacológica de produtos de origem vegetal, é de grande importância estudos quanto à farmacocinética e suas possíveis interações quando coadministrados com medicamentos, uma vez que, na literatura há relatos de plantas que influenciam a atividade de sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo de diversos fármacos (OLIVEIRA e COSTA, 2004).

O sistema enzimático de maior expressão no metabolismo oxidativo dos principais fármacos de rotina é CYP (GUENGERICH, 2001). As interações medicamentosas mais importantes na causa de reações adversas em humanos estão associadas à indução ou inibição dessas enzimas (GUENGERICH, 2006). Essas alterações, pela associação de fármacos com produtos de origem vegetal, podem ocorrer desde a utilização de um chá até a administração de medicamentos fitoterápicos, podendo causar uma resposta farmacológica ampliada ou reduzida (IZZO e ERNST, 2001).

O gênero *Eugenia* é caracterizado pela presença de diversas substâncias produzidas por metabólitos secundários das plantas. Suas espécies, ricas em flavonoides, são amplamente utilizadas na medicina tradicional para diversos males (ZAKI, et al., 2013). A espécie *Eugenia punicifolia* é bastante difundida na região amazônica por suas propriedades farmacológicas analgésicas, antidiabéticas e anti-inflamatória, porém são poucos os estudos que comprovem tanto as atividades atribuídas a esta planta, quanto à segurança em seu uso (SARRAZIN, 2005).

É reconhecido na literatura que alguns flavonoides possuem significativa expressão no metabolismo de fármacos, principalmente, pela inibição da subfamília CYP3A

(GUENGERICH, 2008), a qual atua no metabolismo de mais de 55% dos fármacos utilizados atualmente e, quando inibida, os riscos de intoxicação com medicamentos metabolizados pela CYP3A, são maiores devido à alta concentração de fármaco livre circulando na corrente sanguínea (LIN e LU, 2001).

Assim, modelos animais que avaliem as possíveis alterações que a utilização de produtos de origem vegetal pode provocar na disposição cinética de fármacos que utilizam essas vias metabólicas para sua eliminação, tornam-se cada vez mais necessários. Nesse contexto, o presente trabalho tem a finalidade de verificar se uma única dose do extrato aquoso de *E. puniceifolia* em ratos normais promove a inibição da CYP3A, utilizando o midazolam como marcador farmacocinético.

O midazolam é um derivado benzodiazepínico pertencente ao grupo dos psicotrópicos mais utilizados, devido ao rápido início de ação, breve permanência no organismo, eficácia constante e facilidade posológica (FANTONI et al., 2002). É indicado como um agente indutor do sono, mas também possui propriedades anticonvulsivante, ansiolítica e miorrelaxante. Apresenta rápido metabolismo e velocidade de eliminação, com a meia vida de aproximadamente 1,7 a 2,6 horas em pessoas saudáveis (ALLOMEN, ZIEGLER e KLOTZ, 1981).

A utilização do midazolam como marcador farmacocinético tem sido bastante empregada em estudos de potenciais interações fármacos-produtos naturais com modelos animais (NISHIKAWA et al., 2004; FARKAS et al., 2007, WANG et al., 2010). Assim, este estudo objetivou, por meio da determinação de parâmetros farmacocinéticos, identificar se a utilização de *Eugenia puniceifolia* interfere na via metabólica responsável pela eliminação do midazolam em ratos. Alterando essa via metabólica, não somente o midazolam, mas outros fármacos metabolizados pela CYP3A poderão ter a disposição cinética comprometida e, consequentemente, possível alteração na resposta farmacológica.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material Botânico e Soluções Padrões

O extrato aquoso preparado a 7,5% a partir das folhas secas *E. puniceifolia* apresentou constituição de (15,55  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de flavonoides 18,25 g% de taninos). O Midazolam e Diazepam (analito e padrão interno - Figura 9) utilizadas neste estudo foram obtidos da Roche (Rio de Janeiro, Brasil).

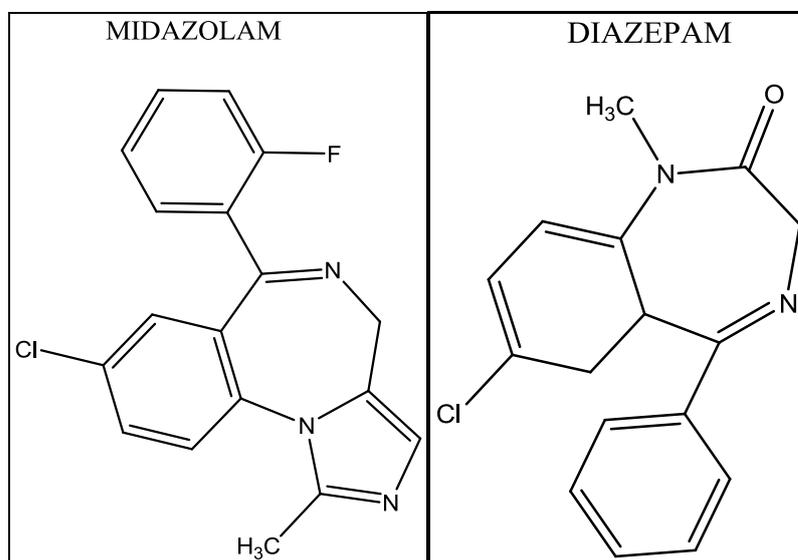


Figura 9: Estrutura molecular dos benzodiazepínicos utilizados.

### 2.2. Reagentes, Solventes e Soluções

Os solventes utilizados como constituintes da fase móvel (metanol e acetonitrila), grau cromatográfico, foram obtidos da Tedia (Fairfield, EUA). Para a extração do midazolam presente no plasma, o solvente empregado (Acetato de etila), grau cromatográfico, foi obtido da Tedia (Fairfield, EUA). O hidróxido de sódio, utilizado para o ajuste do pH das amostras, foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os reagentes empregados no preparo das soluções-tampão utilizadas (Fosfato monossódico monohidratado e Fosfato dissódico dihidratado), grau p.a., foram obtidos da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Os medicamentos para preparar a solução constituída de cetamina e xilazina aplicada para anestésiar os animais foram obtidos da Agner União (São Paulo, Brasil) e Laboratório Calier (Barcelona, Espanha).

A água empregada na preparação das soluções foi purificada no sistema Milli-Q-Plus® (Millipore Corporation, Bedford, EUA).

### **2.3. Animais**

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) adultos da linhagem Wistar (270-300g), com idade de 6-8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas. Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas de polietileno com água e ração *ad libitum*, a temperatura de 22 °C, obedecendo ao foto período artificial de 12/12 horas claro-escuro, com livre acesso à água e a ração. Dezoito horas antes da execução do procedimento experimental, os animais foram privados de ração para evitar qualquer interferência dos alimentos na absorção das substâncias administradas.

### **2.4. Sistema Cromatográfico**

A análise do midazolam em amostras de plasma de ratos foi realizada conforme o método desenvolvido e validado por Nishikawa et al. (2004). O equipamento utilizado foi o Cromatografo à Líquido de Alta Eficiência Shimadzu tipo LC-20A, equipado com bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A, acoplado com detector por arranjos de diodos, SPD-M20A controlado pelo programa LC-Solution MultiPDA (Kyoto, Japão). O sistema cromatográfico compreendeu uma coluna octadesilsilano 5 µm 4,6 x 150 mm (Luna, Supelco), em modo isocrático e fase móvel constituída por mistura de solução-tampão Fosfato de sódio 10mmol/L<sup>-1</sup> pH 4,5, Acetonitrila e metanol, na proporção de 50:40:10 (v/v/v), com fluxo de 1mL.min<sup>-1</sup>. O efluente da coluna foi monitorado em 245nm.

### **2.5. Protocolo do Experimento Animal**

Este projeto foi submetido para apreciação, julgado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (Protocolo nº073/2012 - CEEA). A dose de 55 mg/kg administrada aos animais foi selecionada com base em resultados prévios que apontaram essa dose para a obtenção do efeito farmacológico (BRUNETI et al., 2006). A dose foi extrapolada a 550 mg/kg no tratamento de um segundo

grupo para a obtenção de resultados que garantam a segurança dos resultados encontrados (FDA, 2005).

### 2.5.1. Efeito do extrato de *E. puniceifolia* na farmacocinética do midazolam

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, os quais receberam por via oral, dose única, os seguintes tratamentos:

**Grupo I** (n=6): tratados com extrato de *E. puniceifolia*, dose de 55 mg/Kg;

**Grupo II** (n=6): tratados com extrato de *E. puniceifolia*, dose de 550 mg/Kg;

**Grupo controle** (n=6): tratados com o veículo (água);

Uma hora após o tratamento com o extrato, os animais foram anestesiados (0,15mL/100g de peso animal) com uma solução de cetamina mais xilazina, na proporção de 2:1, via intraperitoneal (ip). Em seguida foi realizado procedimento cirúrgico para a inserção de uma cânula de polietileno (P-10 nacional) na artéria carótida esquerda de todos os animais para a coleta das amostras sanguíneas (Figura 10).



Figura 10: Procedimento experimental para inserção da cânula na artéria carótida esquerda dos animais para posterior coleta sanguínea.

A dose de 20 mg/kg de midazolam, foi administrada aos animais (vo) dezoito horas após procedimento cirúrgico. As amostras sanguíneas (300  $\mu$ L) foram coletadas imediatamente antes da administração do midazolam e nos tempos seguintes de 0,25; 0,5;

0,75; 1; 2; 3 e 4 h. A cada coleta realizada, o volume retirado foi repostado com soro fisiológico para evitar a ocorrência de hipovolemia nos indivíduos estudados (Morton et al., 1993). As amostras sanguíneas foram transferidas para tubos heparinizados e em seguida o plasma foi obtido, por centrifugação a 2000 g durante 10 min, e armazenado em -70 °C até a análise.

### 2.5.2. Determinação da concentração plasmática do Midazolam

Foram construídas curvas de calibração fortificadas em plasma, na faixa de concentração de 0,1 a 10 µg/mL, para cada dia de análise utilizando plasma de animais sem tratamento. Foi empregada a padronização interna para a determinação das concentrações plasmáticas de midazolam.

O procedimento experimental consistiu em adicionar alíquotas de 25 µL de diazepam (PI), na concentração de 8 µg/mL, em todas as amostras de plasma (100 µL). Cada amostra foi alcalinizada com 500 µL de NaOH 0,1 mol/L e agitada em vórtice por 30 s. Em seguida, 4 mL de acetato de etila foi adicionado ao plasma. O produto resultante foi agitado em vórtice (2 min) e centrifugado a 3000 g por 10 min. A fase orgânica foi separada e evaporada à secura sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi reconstituído em 100 µL de fase móvel. Finalmente, uma alíquota de 70 µL foi submetida à análise cromatográfica (Figura 11).

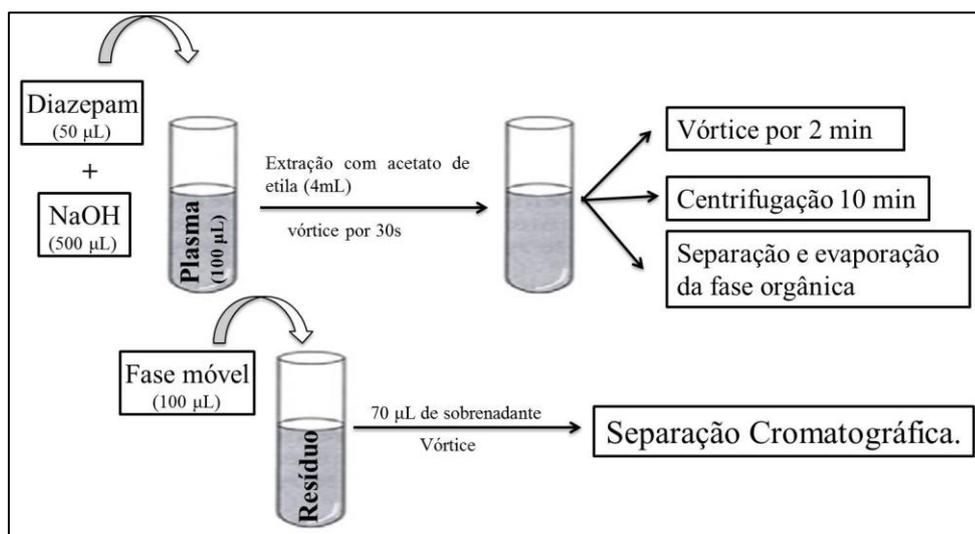


Figura 11: Esquema representativo do processo de extração do midazolam e diazepam do plasma.

### 2.5.3. Análise Farmacocinética

A disposição cinética do midazolam foi avaliada através de análise não-compartimental com base na construção de curvas de concentração plasmática *versus* tempo. Posteriormente, os parâmetros farmacocinéticos foram calculados, tais como  $AUC_{0-4}$ , meia-vida, volume de distribuição, clearance, constante de eliminação, concentração plasmática máxima do midazolam e o tempo em que o midazolam atingiu a concentração plasmática máxima (Tabela 5).

Parâmetro	Método de obtenção
$ASC_{0-4h}$	$\frac{\text{base} \times (\text{altura menor} + \text{altura maior})}{2}$
$ASC_{0-\infty}$	$ASC_{0-t_4} + \frac{C_t}{K_{el}}$
$t_{1/2}$	$\frac{0,693}{K_{el}}$
Vd	$\frac{Cl}{K_{el}}$
Cl	$\frac{\text{dose}}{ASC_{0-\infty}}$
$K_{el}$	$\frac{0,693}{t_{1/2}}$
$C_{max}$	Obtidos no gráfico
$T_{max}$	Obtidos no gráfico

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; Vd 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.

### 2.6. Análise Estatística

Para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, foi utilizado o programa PKSolver, ferramenta do Excel desenvolvida por Zhang e colaboradores (2010). O estudo estatístico foi realizado através de análise de variância com o auxílio do programa MINITAB para verificação de diferenças entre os grupos testes e controle a partir dos parâmetros farmacocinéticos obtidos. O nível de significância foi fixado em 95% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

O emprego de métodos bioanalíticos validados para a determinação das concentrações de um fármaco em fluidos biológicos é essencial para a obtenção de informações confiáveis quanto à disposição cinética de um fármaco no organismo. O método bioanalítico para a quantificação do midazolam foi utilizado com sucesso em estudos posteriores para esta mesma finalidade (Nishikawa et al., 2004). Os cromatogramas representativos da análise do midazolam e diazepam no plasma de ratos são mostrados na Figura 12, onde se pode verificar a ausência de interferentes no tempo de eluição dos analitos, confirmando a seletividade do método. O tempo de retenção foi de 8,7 para o midazolam e 12 minutos para o diazepam, com picos simétricos e com boa resolução da linha de base. O desvio-padrão relativo das curvas analíticas não foi superior a 15% e o coeficiente de determinação obtido foi  $\geq 0,98$ .

Os perfis farmacocinéticos das médias de concentração plasma *versus* tempo de midazolam (n= 6) foram obtidos a partir da construção de curvas de concentração plasmática *versus* tempo, após a administração de 20mg/kg de midazolam (vo) em animais previamente tratados com dose única, de 55 ou 550 mg/kg, do extrato aquoso de *E. punicifolia* ou animais tratados apenas como veículo (Figura 13). Analisando o gráfico, é possível observar o maior concentração plasmática do midazolam do grupo tratado com a menor dose do extrato aquoso de *E. punicifolia* frente ao grupo controle ( $P \leq 0,05$ ). O  $C_{max}$  encontrado para o grupo tratado com *E. punicifolia* na dose de 55 mg/kg foi de 3645,672 ng/ml, duas vezes maior que o valor encontrado para o grupo controle ( $C_{max}$ : 1583,066 ng/ml, onde  $P < 0,05$ ).

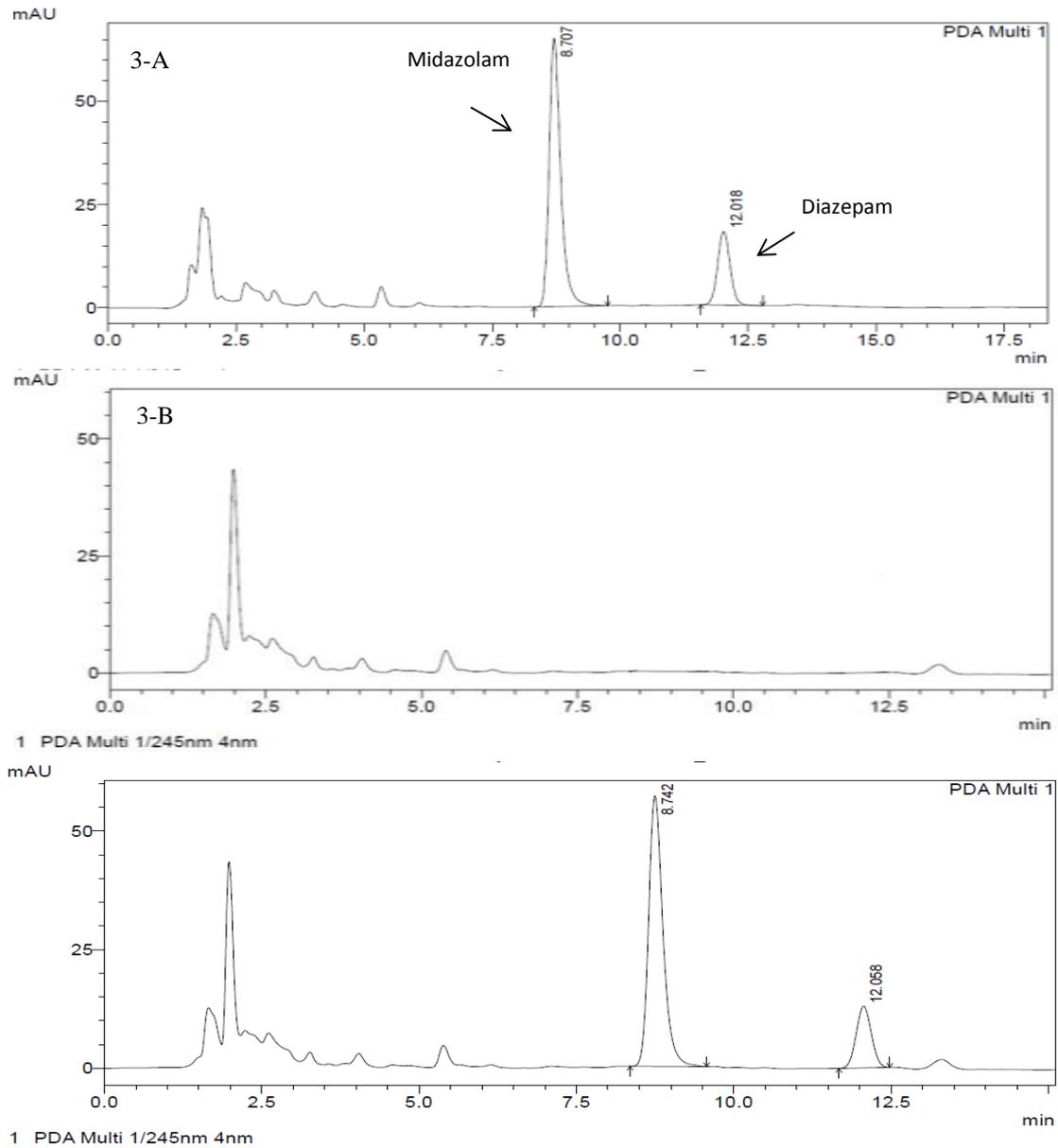


Figura 12: Cromatogramas representativos das análises empregando a coluna octadecilsilano em modo isocrático e fase móvel constituída de solução-tampão fosfato 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH:4,5, Acetonitrila e Metanol (50:40:10, v/v/v); vazão: 1mL.min<sup>-1</sup>; Detecção UV em 245nm. **A** – Cromatograma das soluções dos padrões. **B** - Cromatograma do plasma de animais sem tratamento **C** - Cromatograma do plasma de animais após tratamento com *E. puniceifolia* e dose oral de 20mg/kg de midazolam no tempo de coleta 30min.

Os cálculos dos parâmetros farmacocinéticos, expostos através de média e intervalo de confiança 95% (IC95) são apresentados na Tabela 6. Os animais tratados com a dose de 55 mg/kg apresentaram aumento significativo, da ASC<sub>0-4h</sub> e ASC<sub>0-∞</sub>, com valores aproximadamente, 1,5 vezes maior quando comparados ao grupo controle. A análise dos demais parâmetros resultou na redução significativa do volume de distribuição de 41,89% e

redução do *clearance* de 62,5% (Figura 14). Os valores encontrados indicam maior concentração de droga livre e lenta eliminação do organismo, respectivamente.

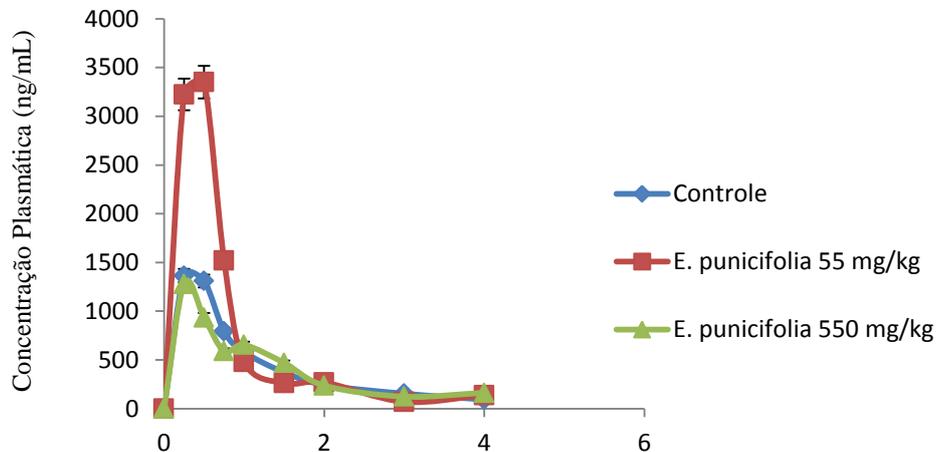


Figura 13: Disposição cinética do midazolam obtido nas amostras de plasma de ratos submetidos ao tratamento de dose única com o extrato aquoso de *E. punicifolia* (55 ou 550 mg/kg/dia, vo) ou veículo. Os valores estão representados como médias  $\pm$  erro padrão da média de seis determinações por ponto de tempo (n=6).

Em relação ao do grupo de animais tratados com a maior dose do extrato aquoso de *E. punicifolia* (550 mg/kg), os valores encontrados não apresentaram nenhuma diferença estatística, quando comparados ao grupo controle (tabela 6).

Parâmetro	Grupo controle	<i>Eugenia punicifolia</i> (55 mg/kg)	<i>Eugenia punicifolia</i> (550 mg/kg)
ASC <sub>0-t</sub> (ng.h/mL)	1653,448 $\pm$ 892,29	2394,405 $\pm$ 403,87*	1143,619 $\pm$ 994,07
ASC <sub>0-∞</sub> (ng.h/mL)	1807,147 $\pm$ 854,12	2545,402 $\pm$ 372,4*	1682,905 $\pm$ 1252,86
t <sub>1/2</sub> (h)	1,11 $\pm$ 0,2	0,76 $\pm$ 0,1	1,04 $\pm$ 0,07
Vd (L)	0,00549 $\pm$ 0,002	0,0023 $\pm$ 0,0005*	0,00543 $\pm$ 0,002
Cl (L/h/kg)	0,0032 $\pm$ 0,001	0,002 $\pm$ 0,0002*	0,0035 $\pm$ 0,001
Kel (h <sup>-1</sup> )	0,658 $\pm$ 0,2	0,926 $\pm$ 0,14*	0,68 $\pm$ 0,04
C <sub>max</sub> (ng/mL)	1583,066 $\pm$ 532,62	3645,672 $\pm$ 1005,16*	1140,659 $\pm$ 918,35
T <sub>max</sub> (h)	0,375 $\pm$ 0,1	0,45 $\pm$ 0,1*	0,35 $\pm$ 0,14

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

\* P $\leq$ 0,05

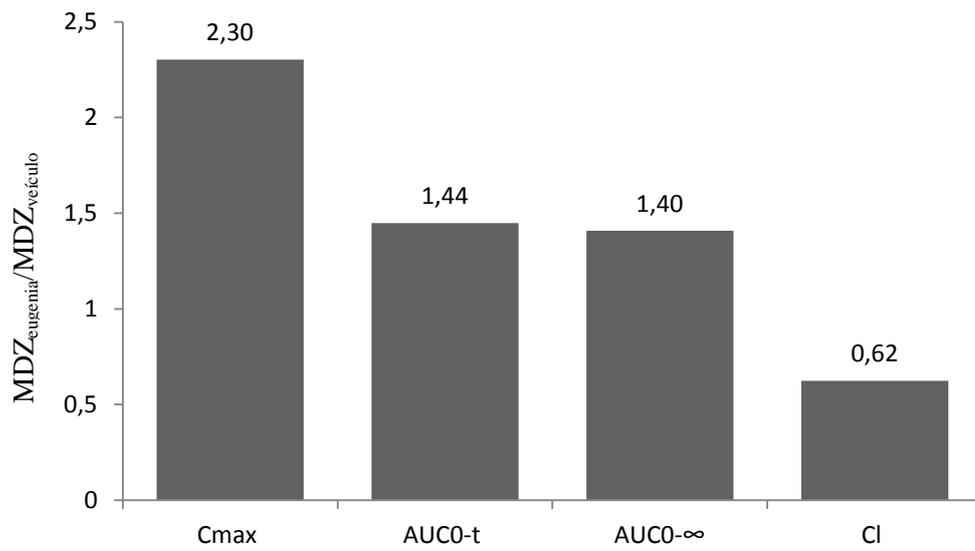


Figura 14: Relação dos principais parâmetros farmacocinéticos (C<sub>max</sub>, AUC<sub>0-4</sub>, AUC<sub>0-∞</sub> e Cl) estimada pelo concentração de midazolam em ratos tratados simultaneamente com dose única do extrato de *E. punicifolia* (55mg/kg, vo) ou veículo (água deslilada).

## 4. DISCUSSÃO

O emprego de terapias complementares e alternativas, principalmente aquelas a base de produtos de origem vegetal, estão entre as mais crescentes em todo o mundo, mesmo com a escassez de evidências científicas sobre sua eficácia e segurança. Nos últimos anos, tem se intensificado os estudos que avaliem os possíveis efeitos da associação, comumente realizada pela população, de plantas medicinais e medicamentos no tratamento de doenças. Na literatura atual, vários relatos confirmam a acentuação dos efeitos e/ou resposta tóxica de medicamentos metabolizados pela CYP3A em associação com plantas medicinais (FITZSIMMONS e COLLINS, 1997; BAILEY et al., 2012; RAMASAMY, KIEW e CHUNG, L.Y., 2014)

Ensaio pré-clínicos adequados são necessários para avaliar a segurança e eficácia de produtos à base de plantas. Nesse intuito, muitos estudos envolvendo animais de experimentação são realizados a fim de avaliar as possíveis alterações na atividade metabólica do CYP decorrentes da utilização de produtos fitoterápicos (HO et al., 2009, YUAN et., al, 2012). As experiências em animais não podem ser diretamente extrapoladas para seres humanos, porém, de acordo com Meng e colaboradores (2001) e Shayeganpour e colaboradores (2005), no ensaio experimental proposto, o rato pode ser considerado um modelo animal apropriado para reproduzir o que pode ocorrer em seres humanos.

Deste modo, o presente estudo foi delineado para investigar a potencial alteração na farmacocinética do midazolam em animais previamente tratados com dose única (55 ou 550 mg/kg) do extrato aquoso de *E. puniceifolia*, utilizando ratos Wistar machos adultos. *E. puniceifolia* é uma espécie vegetal amplamente utilizada na medicina popular, porém com poucos trabalhos que comprovem sua eficácia e até o momento, não existe nenhum estudo que avalie a influência de seu uso na atividade metabólica dos citocromos, principais enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos.

Farkas e colaboradores (2007), ao utilizarem o midazolam como marcador farmacocinético para CYP3A, comprovaram que o tratamento com o suco da toranja foi responsável pelo aumento de 1,3 vezes o valor de Cmax e 1,5 vezes de ASC em relação aos controles. Wang e colaboradores (2010), utilizando o mesmo marcador, confirmaram a interação farmacocinética da espécie *Salvia miltiorrhiza* com o aumento dos mesmos

parâmetros, sugerindo inibição da CYP3A pelos elevados níveis plasmáticos de midazolam. Vale ressaltar que o midazolam sofre extensivo metabolismo mediado por CYP3A e não é substrato de proteínas transportadoras. Considerando a alteração significativa na disposição cinética do midazolam encontrada neste estudo, é possível inferir que a espécie *E. puniceifolia* pode ser um potencial inibidor da CYP3A no modelo proposto.

De acordo com Guengerich (2001), o processo de inibição de enzimas responsáveis pelo metabolismo de medicamentos envolve principalmente o aumento da concentração plasmática do fármaco e redução dos seus metabólitos. Como resultado final, uma resposta tóxica pode ocorrer devido às maiores concentrações plasmáticas alcançadas. Com base nos dados encontrados, o extrato aquoso de *E. puniceifolia*, na dose de 55mg/kg, inibe a CYP3A2 destes roedores, aumentando, significativamente, a concentração plasmática do midazolam ( $C_{max}$ -3645,672 ng/mL). Vale ressaltar que a enzima CYP3A2 é análoga à CYP3A4 de humanos (GEHLHAUS, 2007).

O volume de distribuição é um fator dependente das propriedades físico-químicas, solubilidade e capacidade do fármaco de se ligar às proteínas plasmáticas e teciduais, baixos valores de deste parâmetro indicam maior permanência do princípio ativo no plasma (OGA e BASILE, 1994). O midazolam é um fármaco altamente ligado às proteínas plasmáticas em humanos (~96%) e leves alterações nesta taxa resultam em grandes mudanças na fração livre deste agente (SCHÜTTLER e SCHWILDEN, 2008). Os resultados encontrados no presente estudo indicam que o uso de extrato de *E. puniceifolia* na dose única de 55 mg/kg promoveu o menor volume de distribuição do midazolam em relação ao controle. No entanto, não se sabe os fatores responsáveis pelo resultado observado. Desta forma, estudos adicionais devem ser realizados para avaliar o efeito desta administração na ligação fármaco-proteína plasmática, por exemplo.

A enzima CYP3A é expressa principalmente no fígado e, em menor quantidade, no intestino delgado (WATKINS et al., 1987). Para a definição do efeito da administração de *E. puniceifolia* sobre a atividade enzimática desta isoforma, é necessária a administração do marcador midazolam por via oral e intravenosa. No entanto, devido às dificuldades enfrentadas pelo Biotério Central da Universidade na época da realização deste estudo, o experimento envolvendo a administração intravenosa não foi realizado.

Rezende (2003) define janela terapêutica como os limites de concentração de um fármaco no organismo, no qual ação desejável e segurança de uso sejam proporcionais ao tamanho desse intervalo. Assim, valores acima da margem superior aumentariam a probabilidade de ocorrência ou intensificariam os efeitos adversos, e abaixo do limite inferior não seriam suficientes para a obtenção da resposta pretendida. Nesse contexto, o extrato de aquoso de *E. puniceifolia*, na dose de 55 mg/kg, ao alterar expressivamente as concentrações plasmáticas do midazolam quando usados simultaneamente, pode alterar resposta farmacológica deste fármaco, exacerbando seus efeitos e, por vezes, tornando-o tóxico.

Na literatura, há muitos relatos de espécies vegetais que interagem com a atividade metabólica da CYP3A. Entre os casos mais conhecidos e estudados, destaca-se a espécie *Citrus paradisi* (toranja), a qual é responsável por alterar a farmacocinética de vários fármacos, inclusive do midazolam (KUPFERSCHMIDT et al., 1995), devido a potente inibição da CYP3A (ZHANG e BENET, 2001). De acordo Moon, Wang e Morris (2006), essa alteração deve estar relacionada à presença de algumas classes de flavonoides, cuja atividade pode inibir a CYP3A. Considerando os valores encontrados para o teor de flavonoides presentes no extrato de *E. puniceifolia*, essa hipótese torna-se aceitável para o presente estudo.

Os resultados encontrados neste estudo apresentam grande relevância, uma vez que, a dose de 55 mg/kg do extrato aquoso de *E. puniceifolia*, foi capaz de promover significativa alteração na atividade metabólica de CYP3A no modelo proposto neste estudo. Outros trabalhos também utilizam uma única dose para avaliar a interação medicamentosa que pode ocorrer da associação de plantas de medicamentos (RODRIGUES et al., 2013, RODRIGUES, ALVES e FALCÃO, 2013). Diante do exposto e baseado nos dados obtidos como o aumento da concentração plasmática e de ASC, diminuição do volume de distribuição e do clearance do marcador nos animais estudados, afirma-se que a droga vegetal teve impacto significativo sobre a farmacocinética do midazolam.

Não houve diferenças significativas entre os dados obtidos para a dose de 550 mg/kg do extrato aquoso de *E. puniceifolia* e o grupo controle. No entanto, um resultado similar foi encontrado por Choi e Han (2005), que ao avaliar diferentes doses do flavonoide morina na farmacocinética do marcador diltiazem, a maior dose testada não teve efeito sobre o metabolismo de CYP3A, enquanto que as menores doses inibiram esta enzima. De acordo

com Hodek, Trefil e Stiborova (2002), os flavonoides podem inibir ou estimular CYP dependendo da concentração utilizada.

Assim, o presente estudo ressaltou a importância da avaliação do efeito do uso concomitante de medicamentos e plantas medicinais através de um modelo experimental in vivo. No entanto, estudos mais aprofundados que busquem determinar os mecanismos subjacentes à ocorrência destas alterações e possível relevância clínica devem ser executados no futuro.

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram apresentados e discutidos os resultados referentes ao efeito de produtos naturais amazônicos na farmacocinética de marcadores da atividade enzimática do citocromo P450 em ratos. A administração da dose única do extrato aquoso de *E. punicifolia* na dose de 55 mg/kg promoveu o aumento significativo de C<sub>max</sub> e da ASC do marcador midazolam no grupo tratado quando comparado ao grupo controle, resultante da diminuição da depuração plasmática, provavelmente através da inibição enzimática de CYP3A. Assim, o presente estudo demonstrou o extrato aquoso de *Eugenia punicifolia* pode ser um potencial inibidor de CYP3A.

## **ARTIGO III**

# **EFEITOS DA SOLUÇÃO AQUOSA DE ESPÉCIE VEGETAL *Paullinia cupana* (SAPINCACEAE) NA FARMACOCINÉTICA DA TEOFILINA**

## 1. INTRODUÇÃO

A associação de medicamentos é uma prática amplamente utilizada na terapêutica, porém pode resultar em interações de tal forma que os efeitos farmacológicos esperados ocorram de maneira diferenciada, acentuando ou atenuando estes efeitos. Da mesma maneira, essas interações podem ser resultantes do uso concomitante de fármacos e produtos de origem vegetal utilizados na medicina popular. Essas interações nem sempre são satisfatoriamente elucidadas, de maneira a garantir a segurança dessa utilização (HARDMAN e LIMBIRD, 2004).

As plantas representam as maiores fontes de substâncias biologicamente ativas que podem ser empregadas para fins terapêuticos, devido à diversidade estrutural de metabólitos produzidos (BRANDÃO, et al., 2010). A importância do uso de plantas no tratamento de doenças é indiscutível em um país, cuja população, ao longo dos anos, vem adquirindo os conhecimentos de diversas culturas, além da rica flora nativa. Entretanto, além de propriedades medicinais, essas substâncias são capazes influenciar processos metabólicos organismos vivos, que podem apresentar riscos à saúde (KAUR, et al., 2011).

A espécie vegetal *Paullinia cupana* é uma planta nativa do Brasil e, amplamente, difundida por suas propriedades medicinais, sendo a presença de metilxantinas, presente nas sementes, a principal responsável pelas atividades farmacológicas atribuídas a esta planta (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). A semente seca e levemente torrada é o farmacógeno utilizado desta planta, principalmente, em bebidas caseiras e industriais, como tônico e estimulante (SIMÕES, 2007).

Esta espécie se destaca entre os vegetais que apresentam maior quantidade de trabalhos publicados e maior número de registros junto a ANVISA (CARVALHO et al., 2008). Entretanto, de acordo com a Resolução 251/97 do Conselho Nacional de Saúde, para garantir a segurança no uso de produtos de origem natural em humanos, é necessário que haja um rigoroso estudo que avalie, em modelos animais, a farmacocinética e possíveis influências desses produtos quando utilizados simultaneamente com outros fármacos (STORPIRTS, 2011).

Apesar da ampla utilização e de todos os estudos realizados com o guaraná comprovando as propriedades farmacológicas deste produto, os trabalhos que avaliem a associação deste produto com outros fármacos são escassos na literatura. Nesse contexto, o presente trabalho tem a finalidade de verificar se o tratamento subcrônico com guaraná em ratos normais promove a indução da CYP1A2, utilizando a teofilina como marcador farmacocinético.

A teofilina é um alcaloide pertencente à família das metilxantinas e encontra-se entre os broncodilatadores orais mais utilizados na prevenção e tratamento da asma brônquica e outras doenças associadas ao pulmão (COOLING, 1993). Aproximadamente 90% da teofilina é metabolizada pela CYP 1A2. Apresenta uma absorção rápida e completa por via oral ( $T_{max}$  de 0,5-2h), com meia-vida plasmática de cerca de 8h, em indivíduos saudáveis (SOARES et al., 2012).

A utilização da teofilina como marcador farmacocinético tem sido bastante empregada em estudos de potenciais interações fármacos-produtos naturais com o emprego de modelos animais (JAN et al., 2005; TANG et al., 2007; CHIEN et al., 2010). Assim, este estudo objetivou, por meio da determinação de parâmetros farmacocinéticos, identificar a ocorrência de alteração na disposição cinética da teofilina pelo uso do guaraná em ratos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Material Botânico e Soluções Padrões

O extrato aquoso preparado a 7,5% a partir das sementes de *P. cupana* apresentou constituição de (22,9% de metilxantinas). A Teofilina e Cafeína (analito e padrão interno – Figura 15) utilizadas neste estudo foram obtidas de Sigma Aldrich (St Louis, EUA).

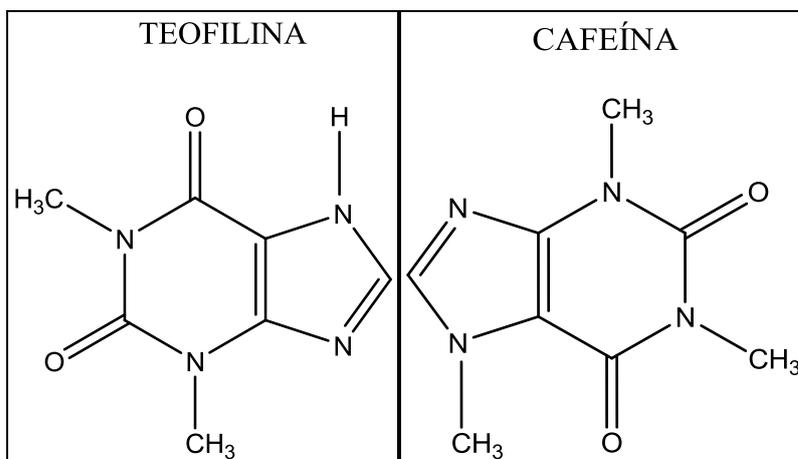


Figura 15: Estrutura molecular das metilxantinas utilizadas.

### 2.2. Solventes e Soluções

Os solventes utilizados como constituintes da fase móvel (metanol), grau cromatográfico, foram obtidos da Tedia (Fairfield, EUA) e Ácido Fórmico (85%), grau p.a., foi obtido da Sal-R (São Paulo, Brasil). Para a extração da teofilina presente no plasma, os solventes utilizados (diclorometano e éter-etílico), grau cromatográfico, foram obtidos da Tedia (Fairfield, EUA). Os medicamentos para preparar a solução constituída de cetamina e xilazina aplicada nos animais foram obtidos da Agner União (São Paulo, Brasil) e Laboratório Calier (Barcelona, Espanha). A água empregada na preparação das soluções foi purificada no sistema Milli-Q-Plus® (Millipore Corporation, Bedford, EUA).

### **1.3. Animais**

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) adultos da linhagem Wistar (270-300g), com idade de 6-8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas. Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas de polietileno com água e ração *ad libitum*, a temperatura de 22 °C, obedecendo ao foto período artificial de 12/12 horas claro-escuro, com livre acesso à água e a ração. Dezoito horas antes da execução do procedimento experimental, os animais foram privados de ração para evitar qualquer interferência dos alimentos na absorção das substâncias administradas.

### **2.4. Sistema Cromatográfico**

A análise da teofilina em amostras de plasma foi realizada conforme o método desenvolvido e validado por Tang e colaboradores (2007). O equipamento utilizado foi o Cromatografo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu tipo LC-20A, constituído por bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20A, acoplado com detector por arranjos de diodos SPD-M20A controlado pelo programa LC-Solution MultiPDA (Kyoto, Japão). O sistema cromatográfico compreendeu uma coluna octadecilsilano 5 µm, 4,6 x 150mm (Phenomenex), em modo isocrático e fase móvel constituída por mistura de metanol-ácido fórmico a 1% (28-72%, v/v) com fluxo de 0,8 ml/min. O efluente da coluna foi monitorado em 275nm.

### **2.5. Protocolo do Experimento Animal**

Este projeto foi submetido para apreciação, julgado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (Protocolo nº073/2012 - CEEA). A dose de 821 mg/kg de guaraná administrada aos animais foi selecionada com base no guia para a conversão de doses de humanos para animais conforme preconiza a Food and Drug Administration (FDA). Uma dose intermediária de 82,1 mg/kg, relatada na literatura por apresentar atividade farmacológica, foi administrada a um segundo grupo para a obtenção de resultados que garantam a segurança dos resultados encontrados para esta planta (FDA, 2005).

### 2.5.1. Efeito do extrato de *P. cupana* na farmacocinética da teofilina

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos, os quais receberam por via oral, durante 14 dias, os seguintes tratamentos:

**Grupo I** (n=6): tratados com extrato de *P. cupana*, dose de 82,1 mg/Kg;

**Grupo II** (n=6): tratados com extrato de *P. cupana*, dose de 821 mg/Kg;

**Grupo controle** (n=6): tratados com o veículo (água potável);

Decorrido 30 horas após o último tratamento com o extrato, os animais foram anestesiados (0,15ml/100g de peso animal) com uma solução de cetamina mais xilazina (2:1) via intraperitoneal (ip). Em seguida foi realizado procedimento cirúrgico para a inserção de uma cânula de polietileno (P-10 nacional) na artéria carótida esquerda de todos os animais para a coleta das amostras sanguíneas. Como o analito e o padrão interno do sistema foram a teofilina e cafeína, respectivamente, a coleta das amostras sanguíneas só foi realizada após 48h do último dia de tratamento, respeitando o período de *wash-out*, correspondente ao tempo necessário para a eliminação de cinco meias-vidas da teofilina e cafeína presentes na solução aquosa de *P. cupana*.

A dose de 10 mg/kg de teofilina, foi administrada aos animais (vo) dezoito horas após a canulação. As amostras sanguíneas (300 µL) foram coletadas imediatamente antes da administração da teofilina e nos tempos seguintes de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h (oral). A cada coleta realizada, o volume retirado foi repostado com soro fisiológico, conforme sugerido por Morton e colaboradores (1993). As amostras sanguíneas foram transferidas para tubos heparinizados e em seguida o plasma foi obtido, por centrifugação a 2000 g durante 10 min, e armazenado em -70 °C até a análise.

### 2.5.2. Determinação da concentração plasmática da Teofilina

Foram construídas curvas de calibração fortificadas, na faixa de concentração de 0,1 a 25 µg/mL, para cada dia de análise utilizando plasma de animais não tratados. Foi empregada a padronização interna para a determinação das concentrações plasmáticas de teofilina.

O procedimento experimental consistiu em adicionar alíquotas de 25 µL de cafeína (PI), na concentração de 20 µg/mL, em todas as amostras de plasma (100 µL). As

amostras foram agitadas em vórtice por 30 segundos. Em seguida, 3 mL de éter etílico-diclorometano, na proporção de 3:2 (v/v), foram adicionados ao plasma e posteriormente agitado em vórtice (2 min) e centrifugado a 3000 g por 10 min. A fase orgânica foi separada e evaporada à secura sob fluxo de ar comprimido e o resíduo foi reconstituído em 100  $\mu$ L de fase móvel. Finalmente, uma alíquota de 70  $\mu$ L foi submetida à análise cromatográfica (Figura 16).

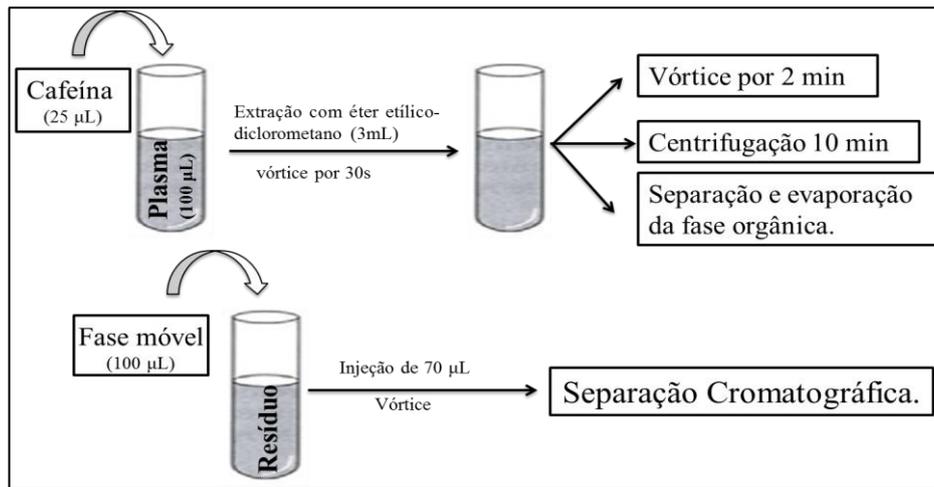


Figura 16: Esquema representativo do processo de extração da teofilina e cafeína do plasma, seguido de análise cromatográfica.

### 2.5.3. Análise Farmacocinética

A disposição cinética de teofilina foi avaliada através de análise não-compartimental com base na construção de curvas de concentração plasmática *versus* tempo. Posteriormente, os parâmetros farmacocinéticos foram calculados, tais como  $AUC_{0-4}$ , meia-vida, volume de distribuição, clearance, constante de eliminação, concentração plasmática máxima do midazolam e o tempo em que a teofilina atingiu a concentração plasmática máxima.

Parâmetro	Método de obtenção
$ASC_{0-24h}$	$\frac{\text{base} \times (\text{altura menor} + \text{altura maior})}{2}$
$ASC_{0-\infty}$	$ASC_{0-t_{24}} + \frac{C_t}{K_{el}}$
$t_{1/2}$	$\frac{0,693}{K_{el}}$
Vd	$\frac{Cl}{K_{el}}$
Cl	$\frac{\text{dose}}{ASC_{0-\infty}}$
$K_{el}$	$\frac{0,693}{t_{1/2}}$
$C_{max}$	Obtidos no gráfico
$T_{max}$	Obtidos no gráfico

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; Vd 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.

#### 2.5.4. Efeito do tratamento subcrônico com *P. cupana* no peso dos animais

Foi realizada a pesagem semanal para avaliar se a espécie *P. cupana* interferiu na massa corporal dos animais submetidos ao tratamento de 14 dias com o extrato nas doses de 821 mg/kg e 82,1 mg/kg quando comparados aos animais que receberam apenas o veículo durante o mesmo período.

#### 2.6. Análise Estatística

Para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, foi utilizado o programa PKSolver, ferramenta do Excel desenvolvida por Zhang e colaboradores (2010). O estudo estatístico foi realizado através de análise de variância com o auxílio do programa MINITAB para verificação de diferenças entre os grupos testes e controle a partir dos parâmetros farmacocinéticos obtidos. O nível de significância foi fixado em 95% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS

O método bioanalítico utilizado para a quantificação da teofilina nas amostras de plasma de rato foi desenvolvido e validado por Tang e colaboradores (2007). Os cromatogramas representativos das análises efetuadas são mostrados na Figura 17, onde se pode verificar a ausência de interferentes no tempo de eluição dos analitos. O estudo da disposição cinética da teofilina foi realizado a partir da construção de curvas de concentração plasmática *versus* tempo, obtidos após a administração de 10mg/Kg de teofilina (vo) aos animais tratados por 14 dias com as doses de solução aquosa de *P. cupana* ou animais tratados apenas com o veículo. O desvio padrão das curvas analíticas não foi superior a 15% e o coeficiente de determinação obtido foi  $\geq 0,98$ .

Na Figura 18, pode-se observar a redução significativa das concentrações plasmáticas da teofilina dos grupos tratados com a solução aquosa de *P. cupana* quando comparados ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). O  $C_{max}$  encontrado para os grupos tratados com a *P. cupana* (82,1mg/kg -  $C_{max} = 14,74\mu\text{g}$  e 821mg/kg -  $C_{max} = 12,798\mu\text{g}$ ) foi, significativamente, menor quando comparado ao grupo controle ( $C_{max} = 29,36\mu\text{g}$ ) ( $P < 0,05$ ). Os resultados indicam que o tratamento subcrônico com a solução aquosa de *P. cupana*, em ambas as doses, resultou em menores concentrações deste marcador, provavelmente através da indução enzimática da CYP1A2.

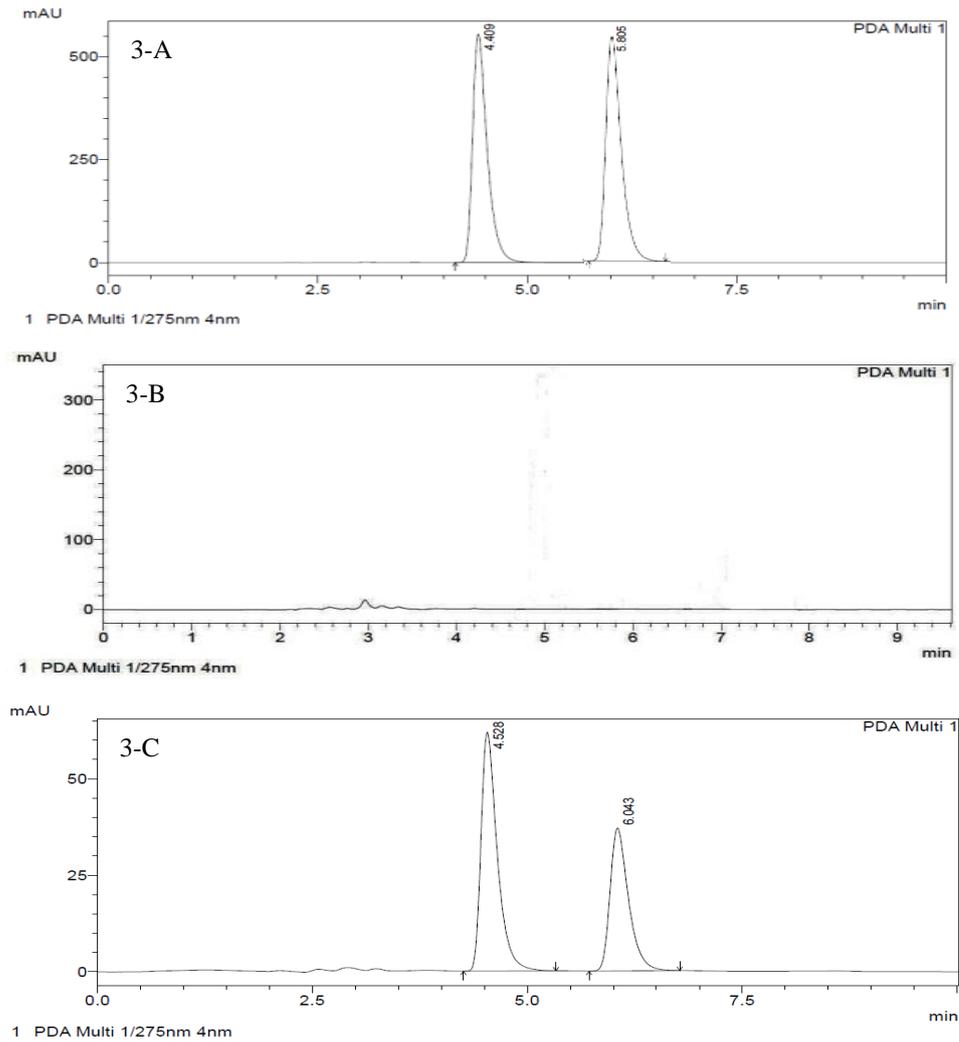


Figura 17: Cromatogramas representativos das análises realizadas empregando a coluna octadecilsilano em modo isocrático e fase móvel constituída de Ácido Fórmico a 1% e Metanol (72:28, v/v); vazão:  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Detecção UV em 275nm. **A** – Cromatograma das soluções dos padrões. **B** - Cromatograma do plasma de animais sem tratamento **C** - Cromatograma do plasma de animais após tratamento com *P. cupana* e dose oral de 20mg/kg de teofilina no tempo de coleta 2h.

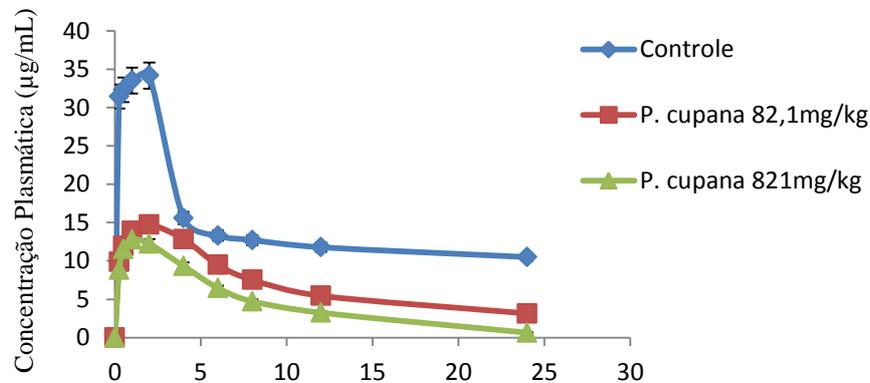


Figura 18: Disposição cinética da teofilina obtida nas amostras de plasma de ratos submetidos ao tratamento subcrônico com solução aquosa de *P. cupana* (82,1 ou 821 mg/kg/dia, vo) ou veículo. Os valores estão representados como médias  $\pm$  erro padrão da média de seis determinações por ponto de tempo (n = 6).

Os demais parâmetros farmacocinéticos são expostos como média e intervalo de confiança 95% (IC99) na Tabela 8. A dose de 82,1 mg/kg resultou na redução significativa de 61% da  $ASC_{0-24h}$  e 66% da  $ASC_{0-\infty}$ , quando comparado ao grupo controle. Os demais parâmetros apresentaram aumento significativo, o volume de distribuição aumentou em mais de 3 vezes o valor encontrado para o grupo controle, e o *clearance* em 3 vezes (Figura 19).

Os valores encontrados para o grupo tratado com a solução aquosa de *P. cupana*, na dose de 821 mg/Kg, foram ainda mais expressivos (Tabela 8). A  $ASC_{0-24h}$  reduziu em 74% e a  $ASC_{0-\infty}$  em 90% quando comparado ao grupo controle. Os demais parâmetros apresentaram aumento significativo quando comparados ao grupo controle. O volume de distribuição aumentou em mais de 5 vezes, o *clearance* em mais de 10 vezes e a constante de eliminação em, aproximadamente, 2 vezes (Figura 20).

Parâmetro	Grupo controle	<i>Paullinia cupana</i> (82,1 mg/kg)	<i>Paullinia cupana</i> (821 mg/kg)
$ASC_{0-24h}$ (µg.h/mL)	439,03±36,6	169,9±30*	110,34±12,09*
$ASC_{0-\infty}$ (µg.h/mL)	3539,48±278,4	1197,2±284,4*	346,69±37,04*
$t_{1/2}$ (h)	12,85±0,58	14±2,4	7,014±0,93*
Vd (L)	13,13±0,74	43,54±10,55*	73,11±8,07*
Cl (L/h/kg)	0,71±0,05	2,44±0,47*	7,27±0,75*
Kel (h <sup>-1</sup> )	0,054±0,002	0,05±0,09	0,1±0,01*
$C_{max}$ (µg/mL)	29,36±5,37	14,79±1,6*	12,79±1,5*
$T_{max}$ (h)	2	2	1*

Tabela 8: Parâmetros farmacocinéticos obtidos a partir dos gráficos de concentração plasmática *versus* tempo. \* P<0,05

A meia-vida plasmática da teofilina do grupo tratado com a dose de 821 mg/kg de *P. cupana* apresentou redução de 45%. Já o grupo tratado com a dose de 82,1 mg/kg de *P. cupana* manteve valores de meia-vida próximos aos encontrados para o grupo controle e o mesmo aconteceu com a constante de eliminação, uma vez que são parâmetros estritamente relacionados. Portanto, esta dose não apresentou impacto significativo na meia-vida de eliminação da teofilina devido este parâmetro ser dependente tanto dos valores de clearance quanto dos valores do volume de distribuição (EVANS, 2004).

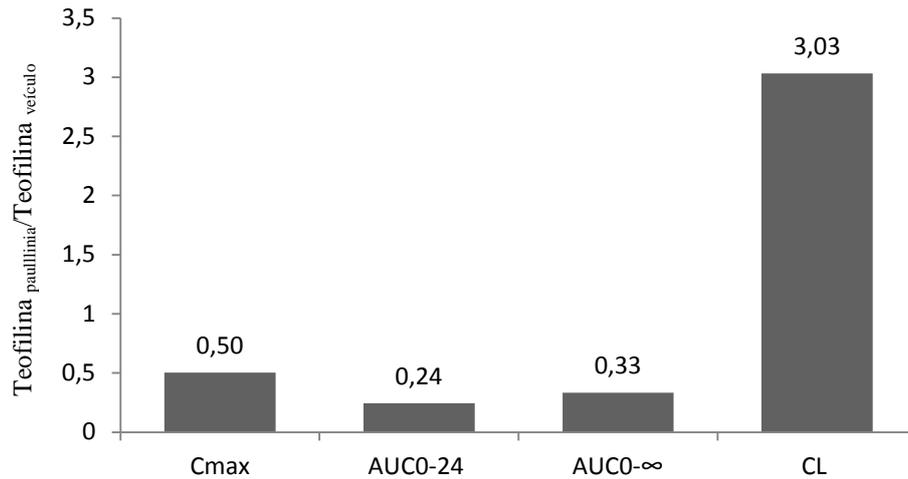


Figura 19: Relação dos principais parâmetros farmacocinéticos (Cmax,  $ASC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  e CL) estimada pela concentração de teofilina em ratos tratados simultaneamente com doses múltiplas da solução de *P. cupana* (82,1mg/kg, vo) ou veículo (água potável).

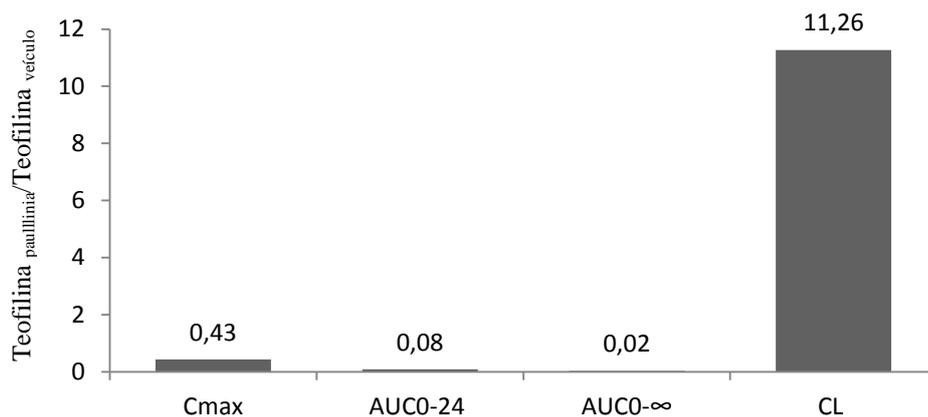


Figura 20: Relação dos principais parâmetros farmacocinéticos (Cmax,  $ASC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  e CL) estimada pela concentração de teofilina em ratos tratados simultaneamente com doses múltiplas da solução aquosa de *P. cupana* (821mg/kg, vo) ou veículo (água potável).

Durante o período experimental (14 dias), os animais submetidos ao tratamento com a solução aquosa de *P. cupana*, nas doses de 82,1 e 821 mg/kg, e veículo tiveram a massa corporal monitorada, com a finalidade de verificar se o tratamento influenciou na dieta dos animais. A partir da análise dos dados, foi possível perceber um aumento na massa corporal dos ratos do grupo controle no decorrer da 1ª semana, no entanto, esse ganho de massa não estatisticamente significativo quando comparado aos grupos tratados com *P. cupana* ( $P > 0,05$ ). O ganho de massa corporal se estabilizou na segunda semana, demonstrando que o tratamento subcrônico com a solução aquosa de *P. cupana* não interferiu nos ganhos de massa corporal de ratos (Figura 21).

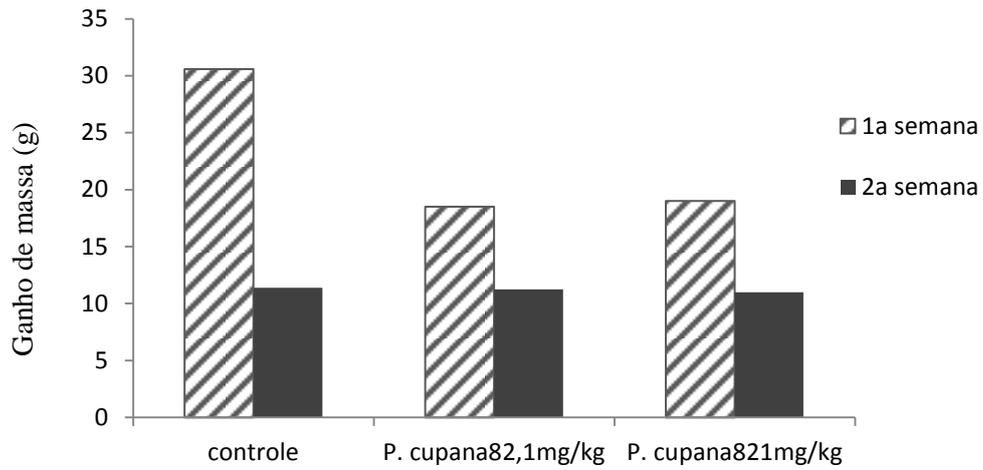


Figura 21: Médias de ganho de massa corporal durante o período de tratamento (14 dias) com a solução aquosa *P. cupana*, monitorado semanalmente.

\* $p < 0,05$

#### 4. DISCUSSÃO

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo e, conseqüentemente, uma rica flora como recurso para o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos. Nesse contexto, as plantas estão inseridas como uma das principais fontes de estruturas e metabólitos ativos com potencial biotecnológico, onde apenas uma ou alguns desses metabólitos são responsáveis por apresentar atividades, que tanto podem ser terapêuticas ou tóxicas (SALVADOR, et al., 2013).

Atualmente, são encontrados muitos relatos de casos relacionando uso simultâneo de produtos naturais com a perda da eficácia terapêutica de alguns dos medicamentos (WANG et al., 2009; LEE et al., 2013). *P. cupana* é uma espécie vegetal amplamente utilizada na medicina tradicional e, ao longo dos anos, muitos trabalhos científicos comprovaram as atividades terapêuticas conferidas a esta planta (CAMPOS et al., 2003; FUKUMASU et al., 2008). Entretanto, pouco se conhece sobre a influência do uso desta espécie na atividade metabólica dos citocromos, principais enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos.

Em estudo recente, Rodrigues e colaboradores (2012) avaliaram o perfil farmacocinético da amiodarona, medicamento majoritariamente metabolizado pela CYP3A4, em animais tratados com dose única e múltiplas doses do extrato aquoso de *P. cupana*. Foi demonstrado, que a dose única promoveu diminuição da ASC, sugerindo possível interação do guaraná na farmacocinética da amiodarona, pelo mecanismo de indução da CYP3A4. No entanto, este efeito não foi observado no estudo empregando doses múltiplas do material vegetal, ou seja, a hipótese de indução é prejudicada.

Mais estudos são necessários, uma vez que outras CYPs apresentam relevante importância no metabolismo de fármacos, como é o caso de CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19, CYP2E1 e CYP2D6 (DONATO e O'CONNOR, 2004). No modelo experimental utilizado neste estudo, a solução aquosa de *P. cupana*, em duas doses diferentes, foi avaliada quanto a sua influência no metabolismo de medicamentos metabolizados pela CYP1A2, utilizando a teofilina como marcador farmacocinético.

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que a solução aquosa de *P. cupana* induz a isoforma CYP1A2 do rato, enzima de grande importância em humanos por atuar no metabolismo de vários antidepressivos e psicoativos. Os menores valores de Cmax e, principalmente de ASC, ou seja, de exposição sistêmica a teofilina nos grupos tratados, é resultante da maior depuração do fármaco, conforme os valores de Cl obtidos. Desta forma, a eficácia da teofilina quando usada simultaneamente com este extrato vegetal pode ser diminuída devido a redução significativa da ASC (74%) (SERRA, 2006).

Em estudos anteriores, Jan e colaboradores (2005), demonstraram o efeito do extrato de *Evodia rutaecarpa* na disposição cinética da teofilina com a redução de 72,8% da AUC deste fármaco nos animais tratados. O extrato de *Andrographis paniculata* (CHIEN et al., 2010) também alterou a farmacocinética deste marcador (redução de 25% da ASC). De acordo com esses resultados, estes autores sugerem interação por meio da indução do metabolismo da teofilina no modelo proposto.

Os valores de Vd encontrados para os animais tratados com as duas doses de *P. cupana* foram estatisticamente maiores que os valores encontrados para o grupo sem tratamento. O Vd elevado é indicativo de que o princípio ativo sofre distribuição para várias partes do organismo, com a permanência de pequena fração no sangue (OGA e BASILE, 1994). A administração única do extrato de guaraná promoveu a diminuição das concentrações de amiodarona no coração, pulmão, fígado e rins dos ratos tratados com este material vegetal (RODRIGUES et al., 2012). No entanto, não foram verificadas diferenças entre os grupos com relação às concentrações deste fármaco nestes tecidos após a administração subcrônica de *P. cupana*.

Os eritrócitos e as proteínas plasmáticas, incluindo albumina,  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida, lipoproteínas e globulinas, são os principais componentes responsáveis pela ligação dos fármacos no plasma. A teofilina é um fármaco com moderada ligação às proteínas plasmáticas em humanos (~40%). Recentemente, Gao e colaboradores (2013) relataram que a administração intravenosa da flavona baicalina promoveu o aumento da fração plasmática livre de teofilina em ratos Sprague-Dawley e, conseqüentemente, resultou em maiores valores de Vd. Adicionalmente, Oliveira e colaboradores (2002) reportaram que o extrato de guaraná promoveu a diminuição da ligação do radiofármaco Tc-99m aos eritrócitos e proteínas plasmáticas de ratos Wistar in vitro. Desta forma, os efeitos dos constituintes deste material

vegetal sobre a ligação proteica de teofilina merecem avaliação cuidadosa na tentativa de esclarecer o aumento dos valores de Vd observados neste estudo.

De acordo com Kennedy e Seely (2010), a significativa alteração causada na disposição cinética da teofilina pode estar relacionada à grande diversidade de componentes presentes no extrato de *P. cupana*, especialmente metilxantinas (cafeína) e grande quantidade de taninos. Na literatura, já foi comprovado que a cafeína e teofilina são responsáveis pela indução da expressão de CYPs (FUKUMASU, 2008). Adicionalmente, alguns taninos também promovem este efeito (WILLIAMSON, 2001). Assim, essa hipótese torna-se aceitável para o presente estudo, onde a elevada concentração da cafeína e outras substâncias, presentes no guaraná, podem estar influenciando a expressão da CYP1A2 dos animais.

Diversos autores tem estudado o efeito das metilxantinas sobre a indução de CYP1A2 em seres humanos e resultados contraditórios foram relatados. Djordjevic e colaboradores (2008) comprovaram que o consumo diário de pelo menos três xícaras de café é responsável pelo aumento da atividade da CYP1A2, porém por mecanismos desconhecidos. No entanto, Vaynshteyn e Jeong (2012) verificaram que o emprego usual de cafeína não induz a expressão de CYP1A2 em hepatócitos humanos in vitro. Estes autores sugeriram que este fenômeno não acontece devido ao fator de transcrição envolvido na regulação de CYP1A2 (receptor aromático de hidrocarboneto) não ser ativado nestas condições. Porém, a ocorrência de tolerância no uso regular de cafeína em humanos foi relatada.

Apesar de o guaraná apresentar altas concentrações de cafeína, e a mesma estar diretamente envolvida na atividade da atividade metabólica da CYP1A2, por mecanismos ainda desconhecidos, é possível que a presença de outras metilxantinas, como teofilina e teobromina, e taninos, presentes na solução aquosa do guaraná, esteja relacionada à significativa alteração no metabolismo da teofilina encontrada neste estudo, e, conseqüentemente, na ativação dos receptores de regulação da expressão da CYP1A2. Porém, ensaios sobre o efeito da expressão proteica empregando hepatócitos humanos e de roedores são necessários para confirmar esta hipótese.

A presença das metilxantinas em extratos também é relatada por influenciar a perda de massa corporal de animais submetidos a um tratamento subcrônico com *P. cupana* (RODRIGUES et al., 2012). No presente estudo, não houve diferença significativa na massa corporal dos animais quando comparados ao grupo controle. Boozer e colaboradores (2001)

ao avaliarem suplementos a base de guaraná, verificaram a perda de massa corporal somente após oito semanas de tratamento. Provavelmente, o tempo de exposição à solução aquosa de *P. cupana* não foi suficiente para promover a redução da massa corporal dos animais utilizados neste estudo.

Diante do exposto e baseado nos dados obtidos, com diminuição do C<sub>max</sub> e ASC, e aumento do volume de distribuição e clearance, caracterizando a rápida eliminação do fármaco presente no organismo dos animais, sugere-se que a droga vegetal tenha impacto significativo sobre a farmacocinética da teofilina, uma vez que, as doses experimentais utilizadas neste bioensaio foram inferiores e/ou similares à dose, tipicamente, utilizada na dieta dos seres humanos.

Além de perda da eficácia do fármaco, a indução enzimática pode gerar outras desvantagens, como é caso do paracetamol que ao ser metabolizado produz o N-acetilbenzoquinoneimina, um intermediário altamente reativo, que pode causar grave hepatotoxicidade. Com a atividade metabólica da CYP1A aumentada, há uma produção maior desse metabólito e, assim, aumento do risco de uma resposta tóxica (KLAASSEN , 2013). O mesmo pode ocorrer com outros medicamentos também metabolizados pela CYP1A2.

Estudos adicionais para a elucidação do fenômeno observado devem ser realizados, incluindo a avaliação do conteúdo protéico e de expressão do RNA mensageiro de CYP1A2 hepática após o tratamento subcrônico através de técnicas de biologia molecular e avaliação do efeito sobre a O-dealquilação da 7-etoxiresorufina, o qual representa a atividade enzimática desta isoforma in vitro (UENG et al., 2005).

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram apresentados e discutidos os resultados referentes ao efeito de produtos naturais amazônicos na farmacocinética de marcadores da atividade enzimática do citocromo P450 em ratos. O tratamento subcrônico com a solução aquosa de *P. cupana* nas duas doses empregadas (82,1 e 812 mg/kg), promoveu a redução significativa de C<sub>max</sub> e ASC do marcador teofilina nos grupos tratados, em comparação ao grupo controle, decorrente do aumento da depuração plasmática, provavelmente através da indução enzimática de CYP1A2. Portanto, foi verificada a alteração da farmacocinética destes marcadores da atividade de CYP em ratos nas condições empregadas e, portanto, estudos adicionais experimentais e clínicos devem ser realizados para a elucidação dos efeitos verificados para garantir o uso seguro destes materiais vegetais nos seres humanos.

## REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. Systematics of *Serjania* (Sapindaceae). A revision of *Serjania* sect. *Platycoccus* Bronx, New York, Mem. **New York Botanical Garden**, v.67, p.1-93, 1993.
- ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. *Paullinia lingulata* (Sapindaceae), a new species from French Guiana. **Brittonia**, v.50(4), p.514-516, 1998.
- ALEXANDRE, R.F., BAGATINI, F., SIMÕES, C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18(1), p.117-126, 2008.
- ALLOMEN, H., ZIEGLER, G., KLOTZ, U. Midazolam kinetics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.30, p.653-661, 1981.
- ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS Ediciones, 1998.
- ALVAREZ, A. da S., POTIGUARA, R.C. de V., DOS SANTOS, J.U.M. Arquitetura foliar de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae), da restinga de Algodual. Maiandeuá, Pará. **Boletim do Museu de Ciências Naturais**, v. 1 (2), p.29-36, 2006.
- AMORE, B.M., GIBBS, J. P., EMERY, M. G. Application of *in vivo* animal models to characterize the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drug candidates in discovery settings. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.13 p. 207-218, 2010.
- AMORIM, A.C.L., LIMA, C.K.F., HOVELL, A.M.C., MIRANDA, A.L.P., REZENDE, C.M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v.16, p. 923-928, 2009.
- ANVISA. Diretoria colegiada. Guia para provas de bioequivalência de medicamentos genéricos, **Resolução número 478**, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2002/47802re.htm>.
- ARANTES, A.A., MONTEIRO, R. A. família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v.3, p.111-127, 2002.
- AURICCHIO, M.T., BACCHI, E.M. *Eugenia uniflora* L. “Brazilian cherry” leaves: pharmabotanical, chemical and pharmacological properties. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, p. 55-61, 2003.
- BAILEY, D.G., DRESSER, G., MALCOLM, J., ARNOLD, O. Grapefruit–medication interactions: Forbidden fruit or avoidable consequences? **Canadian Medical Association Journal**, v.185, p.309-316, 2012.
- BALIGA, M.S, BHAT, H.P., BALIGA, B.R.V., WILSONC, R., PALATY, P.L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v.44, p. 1776–1789, 2011.

- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2<sup>a</sup> ed. Viçosa: UFV, 1984.
- BASILE, A., FERRARA, L., PEZZO, M. D., MELE, G., SORBO, S., BASSI, P., MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102 (1), p. 32-36, 2005.
- BASTOS, L. M. **Avaliação da viabilidade tecnológica de obtenção de forma farmacêutica sólida contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Eugenia punicifolia***. 90 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2011.
- BECK, H. A Survey of the Useful Species of *Paullinia* L. (Sapindaceae). **Botany Advances in Economic Botany**, v.8, p.41-56, 1991.
- BODAS, R., PRIETO, N., GARCIA-GONZALEZ, R., ANDRES, S., GIRALDEZ, F.J., LOPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p.78- 93, 2012.
- BOOZER, C.N., NASSER, J.A., HEYMSFIELD, S.B., WANG, V., CHEN, G., SOLOMON, J.L. An herbal supplement containing MA Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double-blind trial. **International Journal of Obesity**, v.25, p.316-324, 2001.
- BRANDÃO, M.G.L., ALVES, R.M.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, P., VIEIRA, M.T., MOREIRA-CAMPOS, L.M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 5(1), p.56-59, 2002.
- BRANDÃO, H.N., DAVID J.P., COUTO, R.D., NASCIMENTO, J.A.P., DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 14, de 31 de março de 2010**. Brasília, 2010a.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 5<sup>a</sup> ed. Volume 1 e 2. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2010b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Brasília, 2012.
- BRUNETTI, I.L., VENDRAMINI, R. C., JANUÁRIO, A.H., FRANÇA, S.C., PEPATO, M. T. Effects and toxicity of *Eugenia punicifolia* extracts in Streptozotocin-Diabetic Rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 1, 35-43, 2006.
- BUERKI, S., FOREST, F., ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P., CALLMANDER, M.W., NYLANDER, J.A.A., HARRINGTON, M., SANMARTÍN, I., KÜPFER P., ALVAREZ, N. Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.51, p.238–258, 2009.
- BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE (Hrsg.). **Deutscher Arzneimittel – Codex**. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986.

BYDLOWSKI, S. P., YUNKER, R. L., SUBBIAH, M. T. R. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): Inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, p.535–538, 1988.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33 (2), p. 179-189, 2000.

CAMPOS, A.R., BARROS, A.I.S., SANTOS, F.A., RAO, V.S.N. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, (10), p. 1199-1202, 2003.

CARLSON, M, THOMPSON, R.D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **Journal of AOAC International**, v.81, p.691-701, 1998.

CARVALHO, A.C.B., BALBINO, E.E., MACIEL, A., PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.314-19, 2008.

CARVALHO, M.G., FREIRE, F.D.; RAFFIN, F.N., ARAGAÃO, C.F.S., MOURA, T.F.A.L. LC determination of gallic acid in preparations derived from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Chromatographia**, v. 69, p. 249-253, 2009.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**, Manaus: INPA, 1976.

CHIEN, C.F., WU, Y.T., LEE, W.C., LIN, L.C., TSAI, T.H. Herb–drug interaction of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide on the pharmacokinetics of theophylline in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.184, p. 458–465, 2010.

CHOW, S.C., LIU, J.P. **Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Marcel Dekker, 2000.

COOPER, D.Y., LEVIN, S., ROSENTHAL, O. Photochemical action spectrum of terminal oxidase of mixed function systems. **Science**, v.147, p. 400-402, 1965.

COOLING, D.S. Theophylline toxicity. **Journal of Emergency Medicine**, v.11, p.415-25, 1993.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. v. 3. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

CORRÊA JÚNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2<sup>a</sup> ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

COTT, J. M. Herb-drug interactions: focus on pharmacokinetics. **CNS spectrums**, v.6 (10), p.827-32, 2001.

CRUZ, G.L. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. 2<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982.

CRUZ, A.V.M, KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Revista Floresta e ambiente**, v.11(1), p.47-52, 2004.

CUNHA, A.P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. 2008. Disponível em: <<http://www.antoniopcunha.com.sapo.pt>>. Acesso em: 20 oct. 2009.

DI STASI, L.C., HIRUMA, C.A., GUIMARÃES, E.M., SANTOS, C.M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, p. 529–540, 1994.

DJORDJEVIC, N. GHOTBI, R., BERTILSSON, L. JANKOVIC, S., AKLILLU, E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.64, p.381–385, 2008.

DONATINI, R. **Estudo farmacognóstico e farmacológico de Syzygium jambos (L.) Alston**. 2003.107 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

DONATO, M.T: **¿Qué es el citocromo P-450, y cómo funciona?** Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. P 32-43, 2004.

DONATO, M.M.T., O'CONNOR B.J.E. **Métodos de evaluación del citocromo P-450 y su papel en el metabolismo de fármacos**. Espanha: Real Academia de Farmacia, 2004.

ERICKSON, H.T., CORRÊA, M.P.F., ESCOBAR, J.R. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a commercial crop in Brazilian Amazonia. **Economic Botany**, v. 38, n. 3, p. 273-286, 1984.

ESPINOLA, E.B., DIAS, R.F., MATTEI, R., CARLINI, E.A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacol**, v.55, p.223–239, 1997.

ESCOBAR, J.R., CORRÊA, M.P.F., AGUILERA, F. P. Estruturas florais, floração e técnicas para a polinização controlada do guaranazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29 (5), p. 615-622, 1984.

ESTABROOK, R.W., COOPER, D.Y., ROSENTHAL, O. The lighth reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. **Biochemische Zeitschrift**, v.338, p.741-755, 1993.

EVANS, G. **A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism**. Boca Raton: CRC Press, 2004.

FANTONI, D.T., CORTOPASSI, S.R. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6ª ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

FARKAS, D., OLESON, L. E., ZHAO, Y., HARMATZ, J. S., ZINNY, M. A., COURT, M. H. Pomegranate juice does not impair clearance of oral or intravenous midazolam, a probe for cytochrome P450-3A activity: comparison with grapefruit juice. **Journal of Clinical Pharmacology** v.47, p.286-294, 2007.

FDA, US DHHS, CDER, Guidance for Industry - Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. US Department of Health

and Human Services, Food and Drug Administration, **Center for Drug Evaluation and Research**, 2005.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

FITZSIMMONS, M.E., COLLINS, J.M. Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P4503A4. Potential contribution to high first-pass metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, v.25, p.256–66, 1997.

FORMICA, J.V., REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p.1061–1080, 1995.

FUJII, I.A, RODRIGUES, P.R.M, FERREIRA, M.N. Caracterização físico-química do mel de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) em Alta Floresta, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10 (3), p.45-653, 2009.

FUKUMASU, H., AVANZO, J. L., HEIDOR, R., SILVA, T. C., ATROCH, A., MORENO, F.S., DAGLI, M. L. Z. Protective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 862-867, 2006.

FUKUMASU, H., AVANZO, J. L., NAGAMINE, M. K., BARBUTO, J. A., RAO, K.V., DAGLI, M.L.Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.41, p.305-310, 2008.

GALENO, D.M.L., CARVALHO, R.P., BOLETI, A.P.A., LIMA, A.S., ALMEIDA, P.D.O., PACHECO, C.C., SOUZA, T.P., LIMA, E.S. Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.1, p.12010-028, 2013.

GAO, N., FANG, Y., QI, B., JIA, L. J., JIN, H., QIAO, H. L. Pharmacokinetic changes of unbound theophylline are due to plasma protein binding displacement and CYP1A2 activity inhibition by baicalin in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 477-484, 2013.

GEHLHAUS M., SCHMITT N, V.B., MEYER, R.P. Antiepileptic drugs affect neuronal androgen signaling via a cytochrome P450-dependent pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.322(2), p.550-559, 2007.

GRANGEIRO, M.S., CALHEIROS-LIMA, A.P., MARTINS, M.F., ARRUDA, L.F., GARCEZ-DO-CARMO, L., SANTOS, W.C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 26–30, 2006.

GUENGERICH, F.P. Uncommon P450-catalyzed reactions. **Current Drug Metabolism**, v.2, p.93-115, 2001.

GUENGERICH F.P. Cytochrome P450s, drugs, and diseases. **Molecular interventions** , v.3, p.194-204, 2003.

GUENGERICH, F.P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. **Association of Applied Paleontological Sciences**, v.8(1), p.101-11, 2006.

GUENGERICH, F.P. Cytochrome p450 and chemical toxicology. **Chemical research in toxicology**, v.21(1), p.70-83, 2008.

GUERRA, M.J.M., BADELL, J.B., ALBAJES, A.R.R., PÉREZ, H.B., VALENCIA, R.M., AZCUY, A.L. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (caña santa). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.5(3), p.97-101, 2000.

HALPERT, J.R. Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.35, p.29-53, 1995.

HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, p.38-64, 1991.

HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. **GOODMAN & GILMAN: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: McGRAW-Hill, 2004.

HARRIGTON, M.G., EDWARDS, K.J., JOHNSON, S.A., CHASE, M.W., GADEK, P.A. Phylogenetic inference in Sapindaceae sensu lato using plastid matk and rbcL DNA sequences. **Systematic Botany**, v.30 (2), p.366-382, 2005.

HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p. 572-584, 2002.

HO, Y.F., HUANG, D.K.G., HSUEH, W.C., LAI, M.Y., YU, H.G., TSAI, T.H. Effects of St. John's wort extract on indinavir pharmacokinetics in rats: Differentiation of intestinal and hepatic impacts. **Life Sciences**, v.85, p.296-302, 2009.

**IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**, 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 13 jan, 2014.

IZZO, A.A., ERNST, E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. **Drugs**, v.61, p.2163-75, 2001.

JAN, W.C., LIN, L.C., CHENC, C.F., TSAI, T.H. Herb-drug interaction of *Evodia rutaecarpa* extract on the pharmacokinetics of theophylline in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 440-445, 2005.

JOHANSSON I, INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic Polymorphism and Toxicology-With Emphasis on Cytochrome P450. **Toxicological Sciences**, v.120, p.1-13, 2011.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Nacional, 1975.

JORGE, L.I.F., AGUIAR, J.P.L., SILVA, M.L.P. Anatomia foliar de pedra-ume-caá *Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* – Myrtaceae. **Acta Amazônica**, v. 30, n.1, p. 49-57, 2000.

JORGE, O.A., JORGE, A.D. Hepatotoxicity associated with the ingestion of *Centella asiatica*. **Revista Espanhola de Enfermidades Digestivas**, v.97(2), p.115-124. 2005.

KAUR, R., KAPOOR, K., KAUR H. Plants as a source of anticancer agents. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 1, p. 119-124, 2011.

KENNEDY, D.A., SEELY, D. Clinically based evidence of drug-herb interactions: a systematic review. **Expert Opinion on Drug Safety**, v.9, p.79-124, 2010.

KLAASSEN, C.D. **Casarett and Doull's: Toxicology, the basic science of poisons**. 8<sup>a</sup> ed. Kansas: Mc-Graw Hill, 2013.

KURI, C. M. B. The Guaraná Industry in Brazil. **International Business & Economics Research Journal**, v.7(5), p.87-98, 2008.

KUPFERSCHMIDT, H.H., HA, H.R., ZIEGLER, W.H., MEIER, P.J., KRAHENBUHL, S., Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.58, p.20-28, 1995.

KUSKOSKI, E.M., ROSEANE, F., GARCÍA, A.A., TRONCOSO, G.A.M. Chemical and pharmacological properties of the fruit Guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae**, v.12(2), p.45-52, 2005.

LANDRUM, L. R., KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identifications keys. **Brittonia**, v. 49(4), p. 508-536, 1997.

LEE, S.Y., LEE, J.Y., KANG, W., KWON, K.I., PARK, S.K., OH, S.J., MA, J.Y., KIM, S.K. Cytocromo P450-mediated herb-drug interaction potential of Galgeun-tang. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 343-349, 2013.

LEHIR, A. **Farmácia Galenica, Manuales da Farmácia**. São Paulo: Masson, 1985.

LEITE, P.E., ALMEIDA, K.B. De, LAGROTA-CANDIDO, J, TRINDADE, P., SILVA, R.F. Da, RIBEIRO, M.G., LIMA-ARAÚJO, K.G., SANTOS, W.C., QUIRICO-SANTOS, T. Anti-inflammatory activity of *Eugenia punicifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. **Journal of cellular biochemistry**, v.111, p.1652-1660, 2010.

LESCA, P., PERYT, B., LARRIEU, G., ALVINERIE, M., GALTIER, P., DAUJAT, M., MAUREL, P., HOOGENBOOM, L. Evidence for the ligand-independent activation of the Ah receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.209, p.474-482, 1995.

LIN, J.H., LU, A.Y.H. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v.35, p.361-90, 1998.

LIN, J.H., LU, A.Y.H. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.41, p.535-67, 2001.

LIST, P.H., SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. Florida: Boca Raton, 1989.

LONGHINI, R., RAKSA, S.M., OLIVEIRA, A.C.P., SVIDZINSKI, T.I.E., FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17(3), p.388-395, 2007.

LOPEZ-GARCIA, M.P., DANSETTE, P.M., VALADON, P., AMAR, P., BEAUNE, P.H., GUENGERICH, F.P., MANSUY, D. Human-liver cytochromes P-450 expressed in yeast as tools for reactive-metabolite formation studies. Oxidative activation of tienilic acid by cytochromes P-450 2C9 and 2C10. **European Journal of Biochemistry**, v.213, p.223-232, 1993.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2ª ed. Editora Plantarum: Nova Odessa, SP, 1998.

LUNARDI, I., PEIXOTO, J.L.B., SILVA, C.C., SHUQUEL, I.T.A., BASSO, E.A., VIDOTTI, G. J. Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 180-183, 2001.

MAGINA, M.B.A. **Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero *Eugenia***. 184f. Dissertação (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

MAIA, J. G. S., ZOGHBI, M. G. B., LUZ, A. I. R. Essential oil of *Eugenia puniceifolia* (H. B. K.) DC. **Journal of Essential Oil Research**, v.9, p.337-338, 1997.

MARCHIORI, J.N.C., SOBRAL, M. **Dendrologia das Angiospermas-Myrtales**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997.

MARTIGNONI, M., KANTER, R. DE, GROSSI, P., SATURNO, G., BARBARIA, E., MONSHOUWER, M. An *in vivo* and *in vitro* comparison of CYP gene induction in mice using liver slices and quantitative RT-PCR. **Adapted from Toxicology in Vitro**, v.20, p.125-131, 2006.

MATTEIS, F. DE, HOLLANDS, C., GIBBS, A.H., SA, N. DE, RINARDINI, M. Inactivation of cytochrome P450 and production of N-alkylated porphyrins caused in isolated hepatocytes by substituted dihydropyridines. Structural requirements for loss of heme and alkylation of the pyrrole nitrogen atom. **FEBS Letters Journal**, v.145, p.87-92, 1982.

MENG, X., MOJAVERIAN, P., DOEDÉE, M., LIN, E., WEINRYB, I., CHIANG, S.T., KOWEY, P.R. Bioavailability of amiodarone tablets administered with and without food in healthy subjects. **American Journal of Cardiology**, v.87, p.432-435, 2001.

MIGLIATO, K.F., MOREIRA, R.R.D., MELLO, J.C.P., SACRAMENTO, L.V.S., CORREA, M.A., SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.94-101, 2007.

MOON, Y.J., WANG, X., MORRIS, M.E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.187-210, 2006.

MORTON, D. B., ABBOT, D., BARCLAY, R., CLOSE, B. S., EWBANK, R., GASK, D., HEATH, M. MATTIC, S.; POOLE, T.; SEAMER, J.; SOUTHEE, J.; THOMPSON, A.; TRUSSELL, B., WEST, C., JENNINGS, M. Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFPAW Joint Working Group on Refinement. **Laboratory Animals**, v. 27, n. 1, p. 1-22, 1993.

MUCHUWETI, M., MUPURE, L., NDHLALA, A., MURENJE, T., BENHURA, M.A.N. Screening of antioxidant and radical activity of *Vigna unguiculata*, *Bidens pilosa* and *Cleome gynandra*. **American Journal of Food Technology**, v.2, p. 161-168, 2007.

NEBERT, D.W., JAISWAL, A. K., MEYER, U. A., GONZALEZ, F. J. Human P-450 genes: evolution, regulation and possible role in carcinogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v.15 (4), p.586-9, 1987.

NELSON, D.V., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. São Paulo: Editora Grupo A, 5ª ed. 1304p, 2010.

NELSON, D.R., KOYMANS, L., KAMATAKI, T., STEGEMAN, J.J., FEYEREISEN, R., WAXMAN, D.J., WATERMAN, M.R., GOTOH, O., COON, M.J., ESTABROOK, R.W., GUNSALUS, I.C., NEBERT, D.W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. **Pharmacogenetics**, v.6(1), p. 1-42, 1996.

NEVES, L.J., DONATO, A.M. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Bradea**, v.5, n.25, p.275-84, 1989.

NISHIKAWA, M., ARIYOSHI, N., KOTANI, A., ISHII, I., NAKAMURA, H., NAKASA, H., IDA, M., NAKAMURA, H., KIMURA, N., KIMURA, M., HASEGAWA, A., KUSU, F., OHMORI, S., NAKAZAWA, K., KITABA, M. Effects of continuous ingestion of green tea or grape seed extracts on the pharmacokinetics of midazolam. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 19, n. 4, p. 280-9, 2004.

NOSSAK, A.C., YARIWAKE, J.H., BACCHI, E.M., CAMPANA FILHO, S.P., FERNANDES, J.B., GUIMARÃES, L.F.L. HPLC-UV and LC-MS Analysis of Quinonemethides Triterpenes in Hydroalcoholic Extracts of “espíneira-santa” (*Maytenus ilicifolia* Martius, Celastraceae) leaves. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.15, n.4, p.582-586, 2004.

OGA, S., BASILE, A.C. **Medicamentos e suas interações**. São Paulo: Atheneu, 1994.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª edição, São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, A. L., PADILHA, C.D., ORTEGA, G.G., PETROVICK, P. R. *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc. (marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração. **Caderno de Farmácia**, v. 17(1), p.33-38, 2001.

OLIVEIRA, J. F., ÁVILA, A. S., BRAGA, A. C. S., OLIVEIRA, M. B. N., BOASQUEVISQUE, E. M., JALES, R. L., CARDOSO, V. N., BERNARDO-FILHO, M. Effect of extract of medicinal plants on the labeling of blood elements with Technetium-99m and on the morphology of red blood cells: I – a study with *Paullinia cupana*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 305-312, 2002.

OLIVEIRA, A.E., COSTA, T.D. Interações Farmacocinéticas entre as Plantas Medicinais *Hypericum perforatum*, *Gingko biloba* e *Panax ginseng* e Fármacos Tradicionais. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.23 (4), p.567-78, 2004.

OLIVEIRA, R.N de., DIAS, I.J.M., CÂMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.

OMURA, T., SATO, R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. **Journal of Biological Chemistry**, v.239, p. 2370-8, 1964.

OKAMURA, N., HARAGUCHI, H., HASHIMOTO, K., YAGI, A. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. **Phytochemistry**, v.37, p.1463–1466, 1994.

PAGLIARUSSI, R. S., FREITAS, L. A. P., BASTOS, J. K. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 371-374, 2002.

PARKINSON, A. **Biotransformation os xenobiotics**. Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. Kansas: Curtis D. Klaassen., p.161-304, 2008.

PEREZ, E. **Obtenção de extrato padronizado de *Mucuna pruriens* (L.) Dc. e controle de qualidade de matéria-prima e produto contendo *Boswellia serrata* roxb.: desenvolvimento e validação de metodologias analíticas por CLAE.132f**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós graduação em Química/Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PERRY, N.B., FOSTER, L. M. Antiviral and Antifungal flavonoids, plus a triterpene, from *Hebe cupressoides*. **Planta Medica**, v. 60, p. 491-492, 1994.

PÉRTILE, R. **Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils**. Dissertação de mestrado. Programa de pós Graduação em Farmácia. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina: PGFAR, 2007.

RAMASAMY, S., KIEW, L.V., CHUNG, L.Y. Inhibition of Human Cytochrome P450 Enzymes by *Bacopa monnieri* Standardized Extract and Constituents. **Molecules**, v.19, p. 2588-2601, 2014

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K. **Farmacologia**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs – Review. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RAVI, K., SEKAR, D.S., SUBRAMANIAN, S. Hipoglycemic activity of inorganic constituents in *Eugenia jambolana* seed on streptozotocin-induced diabetes in rat. **Biological Trace Element Research**, v. 99, p. 145-155, 2004a.

RAVI, K., SIVAGNANAM, K., SUBRAMANIAN, S. Anti-diabetic activity of *Eugenia jambolana* seed kernels on streptozotocin- induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v.7, p.187–191, 2004b.

REZENDE, J. M. Apnéia na sala de recuperação pós-anestésica. Relato de caso, **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53(3), p. 377-381, 2003.

ROCHA, W.S., LOPES, R.M., SILVA, D.B. Da, VIEIRA, R.F.; SILVA, J.P. Da; AGOSTINI-COSTA, T.S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33(4), p.1215-1221, 2011.

RODRIGUES, R.R., NAVE, A.G. Heterogeneidade florística das matas ciliares. p.45-71. In: R.R. Rodrigues & H.F. Leitão-Filho (eds.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 2000.

RODRIGUES, M., ALVES, G., LOURENÇO, N., FALCÃO, A. Herb-Drug Interaction of *Paullinia cupana* (Guarana) Seed Extract on the Pharmacokinetics of Amiodarone in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p. 1-10, 2012.

RODRIGUES, M., ALVES, ABRANTES, J., G., FALCÃO, A Herb–drug interaction of *Fucus vesiculosus* extract and amiodarone in rats: A potential risk for reduced bioavailability of amiodarone in clinical practice. **Food and Chemical Toxicology**, v.52, p.121-128, 2013.

RODRIGUES, M., ALVES, G., FALCÃO, A. Investigating herb–drug interactions: The effect of *Citrus aurantium* fruit extract on the pharmacokinetics of amiodarone in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.153-159, 2013.

SAAD, B., AZAIZEH, H., ABU-HIJLEH, G., SAID, S. Safety of traditional Arab herbal medicine. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 433-439, 2006.

SAITO, Y., NISHIMURA, Y., KURATA, N., IWASE, M., AOKI, K., YASUHARA, H. In vivo inhibition of CYP3A-mediated midazolam metabolism by anichuan in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.115, p.399-407, 2011.

SALVADOR, J.A.R., CARVALHO, J.F.S., NEVES, M.A.C., SILVESTRE, S.M., LEITÃO, A. SILVA, M.M.C., MELO, M.L.S. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 324 – 374, 2013.

SARRAZIN, A.J.F. **Estudo Taxonômico de Plantas da Família Myrtaceae no município de Santarém – Pará**. 55f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará, Santarém, 2005.

SCHELLACK, G. **Farmacologia. Uma abordagem didática**. São Paulo: Fundamento Educacional, 2005.

SCHÜTTLER, J.; SCHWILDEN, H. **Handbook of experimental pharmacology – modern anesthetics**. Berlin: Springer-Verlag, 2008.

SERRA, H.A. Interacciones medicamentosas metabólicas. Implicancias sobre los psicofármacos y la medicación cardiovascular. **Psicofarmacología**, v.5(32), p.10-19, 2006.

SHAYEGANPOUR, A., JUN, A.S., BROCKS, D.R. Pharmacokinetics of amiodarone in hyperlipidemic and simulated high fat-meal rat models. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v.26, 249-257, 2005.

SILVA, A. L. G. Da, PINHEIRO, M. C. B. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, n.1, 2007.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SOARES, L.C., OLIVEIRA, G.S.F., MAIA, G.A., MONTEIRO, J.C.S., SILVA JUNIOR, A. Obtenção de bebida a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale*, L.) e extrato de guaraná (*Paullinia cupana sorbilis* Mart. Ducke). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23(2), p.387-390, 2001.

SOARES, J.L.M. F., ROSA, D.D., LEITE, V.R.S., PASQUALOTTO, A.C. **Métodos Diagnósticos: Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2ª ed., 2012.

SOHN, O.S., SURACE, A., FIALA, E.S., RICHIE JÚNIOR, J.P., COLOSIMO, S., ZANG, E., WEISBURGER, J.H. Effects of green and black tea on hepatic xenobiotic metabolizing systems in the male F344 rat. **Xenobiotica**, v.24(2), p.119–27, 1994.

SOMBRA, L.L., GÓMEZ, M.R., OLSINA, R., MARTÍNEZ, L.D., SILVA, M.F. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid

chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p.989-994, 2005.

SOMNER, G.V., FERRUCCI, M.S., ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. Paullinia in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2012.

SOUZA, M.C. **Myrtaceae Juss. da Restinga da Marambaia, RJ – Brasil**. 140f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Escola Nacional de Botânica Tropical. Rio de Janeiro, 2005.

SOUSA, F.C.F., MELO, C.T.V., CITÓ, M.C.O., FÉLIX, F.H.C., VASCONCELOS, S.M.M., FONTELES, M.M.F., BARBOSA FILHO, J.M., VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18 (4), p.642-654, 2008.

SOUZA, M.C., MORIM, M.P. Subtribos Eugeniinae O. Berg e Myrtinae O. Berg (Myrtaceae) na restinga da Marambaia, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.22, p.652-683, 2008.

SOUZA, V.C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2ª ed. Nova Odessa, 2008.

SOUSA, S.A., ALVES, S.F., PAULA, J.A.M. de, FIUZA, T.S., PAULA, J.R., BARA, M.T.F. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20(6), p.866-870, 2010.

STOCKLEY, I.H. **Interacciones farmacológicas**. Barcelona: Pharma, 2004.

STORPIRTS, S., GAI, M.N., CAMPOS, D.R., GONÇALVES, J.E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUCAR, D.D. **Fundamentos de interações medicamentosas dos psicofármacos com outros medicamentos da clínica médica**. 2ª ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2007.

TANG, J., SUN, J., ZHANG, Y., LI, L., CUI, F., HE, Z. Herb–drug interactions: Effect of *Ginkgo biloba* extract on the pharmacokinetics of theophylline in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2441–2445, 2007.

TACHJIAN, A., MARIA, V., JAHANGIR, A., Use of herbal products and potential interactions in patients with cardiovascular diseases. **Journal of the American College of Cardiology**, v.55, p.515-525, 2010.

TESKE, M., TRENTINI, A.M.M. **Herbarium: Compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Herbarium. 1997.

THE UNITED STATES Pharmacopeia. **Rev. ed Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack**, 2004.

TOZER, T. N., ROWLAND, M. **Introdução a Farmacocinética e a Farmacodinâmica: as bases quantitativas da terapia farmacológica**. São Paulo: Artmed; 2009.

- UENG, Y. F., TSAI, T. H., DON, M. J., CHEN, R. M., CHEN, T. L. Alteration of the pharmacokinetics of theophylline by rutaecarpine, an alkaloid of the medicinal herb *Evodia rutaecarpa*, in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 227-232, 2005.
- VAYNSHTEYN, D., JEONG, H. Caffeine induces CYP1A2 expression in rat hepatocytes but not in human hepatocytes. **Drug Metabolism Letters**, v.6(2), p.116–119, 2012.
- VANACLOCHA, B.V., FOLCARA, S.C. **Fitoterapia - vademecum de prescricion**. Elsevier Masson, 4<sup>a</sup> ed. Barcelona, 2003.
- VEIGA JR., F.V., PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, p. 273-286, 2000.
- VEIGA JÚNIOR, F. V., PINTO, A.C., MACIEL, M.A. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.
- VIEIRA, R.F., MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3 (1), p.13-36, 2000.
- VOET, D., VOET, J.G. **Biochemistry**. 3<sup>a</sup> ed. USA: J. Wiley & Sons, 2004.
- WANG, X., LEE, W.Y.W., OR, P.M.Y., YEUNG, J.H.K. Effects of the major tanshinones from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on rat CYP1A2 expression and metabolism of model CYP1A2 probe substrates. **Phytomedicine**, v.16, p.712–725, 2009.
- WANG, X., LEE, W.Y.W., ZHOU, X., OR, P.M.Y., YEUNG, J.H.K. A pharmacodynamic–pharmacokinetic (PD–PK) study on the effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on midazolam, a model CYP3A probe substrate, in the rat. **Phytomedicine**, v.17, p.876-883, 2010.
- WATKINS, P.B., WRIGHTON, S.A., SCHUETZ, E.G., MOLOWA, D.T., GUZELIAN, P.S. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. **The Journal of Clinical Investigation**, v.80(4), p.1029–1036, 1987.
- WILKINSON, G.R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. **New England Journal of Medicine**, v.352, p.2211–2221, 2005.
- WILLIAMSON, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v.8, p.401-9, 2001.
- WILSON, G.W., O'BRIEN, M.M., GADEK, P.A., QUINN, C.J. Myrtaceae revisited: A reassessment of intrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v.11, p.2013-2025, 2001.
- WILSON, P.G., O'BRIEN, M.M., HESLEWOOD, M.M., QUINN, C.J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Bulletin of the World Health Organization (1998). **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review**. Geneva, p.1-43, 1998.
- YAMAGUTI-SASAKI, E., ITO, L.A., CANTELI, V.C., USHIROBIRA, T.M., UEDA-NAKAMURA, T., FILHO, B.P., NAKAMURA, C.V., PALAZZO DE MELLO, J.C. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12(8), p. 1950-1963, 2007.

YUAN, Y.M., GAO, J.W., SHI, Z., HUANG, P., LU, Y.S., YAO, M.C., HUANG, M. Herb–drug pharmacokinetic interaction between radix astragali and pioglitazone in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, p.300-304, 2012.

YUNES, R.A., PEDROSA, R.C., CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, p.147-152, 2001.

ZAKI, M.A., BALACHANDRAN, P., KHAN, S., WANG, M., MOHAMMED, R., HETTA, M.H., PASCO, D.S., MUHAMMAD, I. Cytotoxicity and modulation of cancer-related signaling by (Z)- and (E)-3,4,3',5'-Tetramethoxystilbene isolated from *Eugenia rigida*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 679–684, 2013.

ZHANG, Y., BENET, L.Z. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. **Clinical Pharmacokinetics**, v.40, p.159-168, 2001.

ZHANG, Y., HUO, M., ZHOU, J., XIE, S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel.

ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and the scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p.555-559, 1999.

ZHOU, S.F., ZHOU, Z.W., LI, C.G., CHEN, X., YU, X., XUE, C.C., HERINGTON, A. Identification of drugs that interact with herbs in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 15-6, p. 664-73, 2007.

## ANEXO I

Certificado de aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 073/2012- CEEA, sobre “Efeito de produtos naturais amazônicos na farmacocinética de marcadores da atividade enzimática do citocromo P450 em ratos.” sob responsabilidade de **Igor Rafael dos Santos Magalhães**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de 18/05/2012.

Manaus, 12 de junho de 2012

*Fábio Tonissi Moroni*  
Prof. Fábio Tonissi Moroni  
Presidente da CEEA-UFAM