

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

**EFEITO DE SUCOS DE FRUTAS AMAZÔNICAS NA  
ATIVIDADE IN VITRO DA GLICOPROTEÍNA-P E DO  
CITOCROMO P450 HUMANOS**

**EDNA MÁRCIA ALMEIDA COSTA**

**MANAUS  
2016**

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

**EFEITO DE SUCOS DE FRUTAS AMAZÔNICAS NA  
ATIVIDADE IN VITRO DA GLICOPROTEÍNA-P E DO  
CITOCROMO P450 HUMANOS**

**EDNA MÁRCIA ALMEIDA COSTA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães

**MANAUS  
2016**

**EDNA MÁRCIA ALMEIDA COSTA**

**EFEITO DE SUCOS DE FRUTAS AMAZÔNICAS NA  
ATIVIDADE IN VITRO DA GLICOPROTEÍNA-P E DO  
CITOCROMO P450 HUMANOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 16 de junho de 2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof. Dra. Kilmara Higia Gomes Carvalho, Membro  
Universidade do Estado do Amazonas

*Dedico este trabalho a Deus e  
à minha família, especialmente aos meus pais,  
Olinda e José: anjos presentes em todos  
os momentos da minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu maior mestre, pelo dom da vida, pelas bênçãos diárias e pela força que sempre me acompanha e guia meus passos.

Aos **meus pais Olinda Almeida e José Francisco**, pelo amor, auxílio, compreensão, incentivo, apoio e exemplos de perseverança, força e caráter.

Meus sinceros agradecimentos ao meu **orientador Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães** por compartilhar seus saberes, pela dedicação, competência, confiança, respeito e amizade empregada ao longo deste trabalho.

Aos **familiares** que se fizeram presentes, que me apoiaram e que acreditaram nesta conquista, em especial, **meu irmãos Edson Almeida e Márcio Almeida**, e minhas cunhadas **Chyntia Lima e Nívea Coelho**.

Ao **Fabrizio Rolim**, meu namorado, pelo amor, dedicação, carinho, apoio e incentivo.

Às **minhas companheiras do Núcleo de Estudos em Farmacocinética (NePK)**, **Mariana Brasil e Nayara Yared** pela amizade e pelos momentos de descontração e auxílio na realização de alguns ensaios; e **Amanda Mamed e Ana Jacqueline** pela amizade que me deram.

Ao professor **Dr. Emerson Silva Lima** e professora **Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos** por gentilmente cederem seus laboratórios para realização de alguns ensaios.

Ao **Leonard Rosales** pela disponibilidade e auxílio no ensaio de fenóis e flavonoides, e ao **Caio Ferreira** pela disponibilidade e auxílio nos experimentos em células.

Ao professor **Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira** pela oportunidade de estágio no Laboratório de Metabolismo in vitro e Técnicas de Separação (LABMETS) da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

Aos **amigos do LABMETS**, **Maísa Habenschus e Daniel Serrão**, pela disponibilidade e auxílio nos experimentos com microssomas; e às amigas **Nayara Albuquerque, Simone Fortes e Júlia Martins** pela ajuda e apoio.

Ao **Felipe Miguel** e a **empresa ApisFlora** por realizar a liofilização dos sucos utilizados no estudo.

A **Universidade Federal do Amazonas** e a **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade e suporte para realização do trabalho.

Às **agências de fomento**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo suporte financeiro.

Aos **meus amigos, Maria José, Glória, Liviane Pinheiro, Adélia Valares, Jackeline Marinho**, que sempre se fizeram presentes com lembranças e palavras de encorajamento.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

*Deleita-se no Senhor e  
Ele concederá os desejos do teu coração.  
Entrega teu caminho ao Senhor,  
confia n'Ele e Ele o fará.  
(Sl 37, 4-5)*

## RESUMO

O metabolismo e o transporte intracelular através das membranas celulares estão entre os principais processos que regem a cinética de fármacos em compartimentos fisiológicos. A enzima CYP3A4, pertencente ao complexo enzimático citocromo P450, é responsável pelo metabolismo da maioria dos medicamentos atualmente comercializados e é determinante em muitas interações medicamentosas. Além dela, o transportador de membrana glicoproteína-P, da família ABC, representa outro fator responsável pela interferência na cinética de fármacos. A interação dessas proteínas com sucos de algumas frutas de outros países, como a toranja, pode afetar a farmacocinética de vários medicamentos. No entanto, frutas nativas da região amazônica ainda não foram alvo desse tipo de investigação. Para este estudo, primeiramente, foram determinados os constituintes fitoquímicos, como polifenóis totais e flavonóides dos sucos das frutas amazônicas açai, buriti, camu-camu, cubiu, cupuaçu, jenipapo e taperebá. Foi avaliado, também, o efeito desses sucos sobre a atividade da P-gP e CYP3A4 utilizando proteínas humanas recombinantes, bem como a linhagem celular MES-SA/DX e microsomas hepáticos. O suco de açai apresentou o maior teor de polifenóis totais ( $102,56 \pm 7,2 \mu\text{g EAG/mL}$ ) e flavonoides ( $7,16 \pm 0,58 \mu\text{g EQ/mL}$ ). Com relação à capacidade inibitória da P-gP recombinante, o suco de cupuaçu teve a maior taxa. A CYP3A4 foi inibida pelo suco de açai, buriti, camu-camu, cubiu e taperebá, apresentando atividade residual de 0%, enquanto o padrão suco de carambola teve atividade residual de 20%. Sendo assim, nas concentrações testadas, os sucos das frutas amazônicas tiveram a capacidade de interagir, principalmente, com a CYP3A4 in vitro. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para confirmar estes resultados e esclarecer os mecanismos envolvidos nesse fenômeno.

**Palavras-chave:** P-gP, CYP3A4, açai, buriti, camu-camu, cubiu, taperebá

## ABSTRACT

The metabolism and the intracellular transport through cell membranes are among the main procedures governing the kinetics of drugs in physiological compartments. The enzyme CYP3A4, which belongs to the cytochrome P450 enzymatic complex, is responsible for the metabolism of the majority of drugs currently used and is crucial in many drug-drug interactions. In addition to it, the transporter P-glycoprotein membrane, ABC Family, is another factor responsible for interference in the kinetics of drugs. The interaction of these proteins with juices of some fruits from other countries, for example grapefruit, may affect the pharmacokinetics of many drugs. However, to the best of our knowledge, no investigation has been made evolving fruits from the Amazon region. For this study, first, we determined the phytochemical constituents such as total polyphenols and flavonoids juices of Amazon fruits açai, buriti, camu-camu, cubiu, cupuaçu, jenipapo and taperebá. Has been reported, too, the effect of these juices on activity of P-gP and CYP3A4 which employs human recombinant protein and the cell line MES-SA/DX and liver microsomes. The acai juice showed the highest content of total polyphenols ( $102.56 \pm 7.2 \mu\text{g EAG/mL}$ ) and flavonoids ( $7.16 \pm 0.58 \mu\text{g EQ/mL}$ ). Regarding the inhibitory capacity of recombinant P-gP, cupuaçu juice had the highest rate. CYP3A4 was strongly inhibited by acai juice, buriti, camu-camu, cubiu and tapereba, with residual activity of 0%, while the positive control carambola juice had residual activity of 20%. According, the concentrations tested, the juices of Amazon fruits had the ability to interact mainly with CYP3A4 in vitro. However, further studies should be done to confirm these findings and to clarify the mechanisms involved in this phenomenon.

Keywords: P-gP, CYP3A4, acai, buriti, camu-camu, cubiu, tapereba

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo catalítico do citocromo P450.....	25
Figura 2: Isoenzimas CYP responsáveis pelo metabolismo de fármacos nos seres humanos. 26	
Figura 3: Efeito da P-gP na absorção de drogas através de parede intestinal. Na presença de indutores, a P-gP bombeia o substrato para fora da célula. Já na presença de inibidores, a P-gP reduz o efluxo de substrato, permitindo maior absorção do mesmo. ....	28
Figura 4: Fruta inteira de açai ( <i>E. precatória</i> ).....	34
Figura 5: Fruta inteira de buriti ( <i>M. flexuosa</i> ) .....	35
Figura 6: Fruta inteira e incisada na forma longitudinal de camu-camu ( <i>M. dubia</i> ).....	35
Figura 7: Fruta inteira e incisada na forma longitudinal e transversal de cubiu ( <i>S. sessiliflorum</i> ) .....	36
Figura 8: Fruta inteira e incisada na forma longitudinal de cupuaçu ( <i>T. grandiflorum</i> ) .....	36
Figura 9: Fruta inteira e incisada na forma transversal e longitudinal de jenipapo ( <i>G. americana</i> ).....	37
Figura 10: Fruta inteira e semente de taperebá ( <i>S. mombin</i> ) .....	37
Figura 11: Delineamento experimental .....	45
Figura 12: Esquema com o preparo do meio microsomal para o ensaio de inibição da CYP3A4 .....	54
Figura 13: Atividade da P-gP basal, e na presença do verapamil (p=0,002), do suco de cubiu (p=0,126) e de cupuaçu (p=0,001) .....	62
Figura 14: Viabilidade celular da linhagem MES-SA/DX após 72 horas de exposição ao suco de açai (A), buriti (B), camu-camu (C), cubiu (D), cupuaçu (E), jenipapo (F), e taperebá (G) .....	65
Figura 15: Efeito dos sucos sobre a P-gP expressa nas células MES-SA/DX: imunofluorescência (20x). Controle MES-SA sensível (A), controle MES-SA/DX (B), açai (C), buriti (D), camu-camu (E), cubiu (F), cupuaçu (G), jenipapo (H), e taperebá (I).....	67
Figura 16: Atividade inibitória dos sucos de frutas amazônicas sobre a CYP3A4.....	69
Figura 17: Cromatograma da análise do HMDZ por HPLC-DAD em (A) 260 nm e em (B) 239 nm. 1-hidroximidazolam (HMDZ), midazolam (MDZ), diazepam (PI) .....	71

Figura 18: Cinética enzimática michaeliana do metabolismo do midazolam pela enzima CYP3A4 empregando microsomas hepáticos humanos .....73

Figura 19: Atividade remanescente da CYP3A4 na presença do padrão suco de carambola e dos sucos de frutas amazônicas .....75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Partes da fruta utilizadas no preparo de cada suco.....	47
Tabela 2: Condições cromatográficas estabelecidas.....	53
Tabela 3: Teor de polifenóis totais equivalentes ao ácido gálico ( $\mu\text{g}$ EAG/mL) e de flavonóides totais equivalentes à quercetina ( $\mu\text{g}$ EQ/mL) nos sucos de frutas amazônicas.....	58
Tabela 4: Avaliação do percentual de depleção do MDZ na concentração proteica de 0,1mg/mL e no tempo de incubação de 10 minutos, empregando microssomas hepáticos humanos.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABC</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>AT</b>	Atividade da proteína P-gP
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CI50</b>	Concentração inibitória média
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EAG</b>	Equivalentes ao ácido gálico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EQ</b>	Equivalentes à quercetina
<b>HMDZ</b>	1 - hidroximidazolam
<b>MDR1</b>	Gene de resistência a múltiplas drogas
<b>MDZ</b>	Midazolam
<b>MES-SA</b>	Linhagem de sarcoma uterino
<b>MES-SA/DX</b>	Linhagem de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina
<b>NADP</b>	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma oxidada
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida
<b>kD</b>	Kilo Dalton
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>P-gP</b>	Glicoproteína P
<b>PI</b>	Padrão interno
<b>PPXE</b>	Substrato de CYP3A4 com tolerância ao DMSO
<b>RLU</b>	Unidade relativa de luz
<b>t ½</b>	Meia vida
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>Rh123</b>	Rodamina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
<b>2.1 Interação medicamentosa</b>	21
<b>2.2 Sistema enzimático citocromo P450</b>	23
<b>2.3 Glicoproteína P</b>	27
<b>2.4 Estudos de inibição da CYP3A4 e da P-gP</b>	29
<b>2.5 Compostos polifenólicos</b>	32
<b>2.6 Frutas amazônicas</b>	33
<b>3. OBJETIVOS</b>	40
<b>3.1 Geral</b>	40
<b>3.2 Específicos</b>	40
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	41
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	42
<b>4.1 Materiais</b>	42
4.1.1 Reagentes e solventes	42
4.1.2 Material vegetal: amostras de frutas	43
4.1.3 Microsomas hepáticos	43
4.1.4 Cultura de células	44
4.1.5 Equipamentos	44
<b>4.2 Métodos</b>	45
4.2.1 Tratamento das amostras de frutas	45
4.2.2 Preparação dos sucos	46
4.2.3 Determinação de polifenóis totais	47
4.2.4 Determinação de flavonóides totais	48
4.2.5 Ensaio de avaliação da interação do suco com a glicoproteína-P humana recombinante	49
4.2.6 Viabilidade celular pelo método de Alamar Blue	50
4.2.7 Inibição do efluxo de rodamina pela P-gP	50
4.2.8 Ensaio da atividade inibitória do suco sobre a CYP3A4 humana recombinante	51
4.2.9 Protocolo de experimentação da atividade inibitória do suco sobre a CYP3A4 utilizando microsomas de fígado humano	52
4.2.10 Análise estatística	56
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	58
<b>5.1 Determinação de polifenóis totais e flavonóides totais</b>	58

<b>5.2</b>	<b>Avaliação da interação dos sucos com a glicoproteína-P humana recombinante.....</b>	<b>61</b>
<b>5.3</b>	<b>Viabilidade celular pelo método de Alamar Blue .....</b>	<b>64</b>
<b>5.4</b>	<b>Inibição do efluxo de rodamina pela P-gP .....</b>	<b>66</b>
<b>5.5</b>	<b>Atividade inibitória dos sucos sobre a CYP3A4 humana recombinante .....</b>	<b>68</b>
<b>5.6</b>	<b>Atividade inibitória dos sucos sobre a CYP3A4 utilizando microsomas de fígado humano .....</b>	<b>71</b>
5.6.1	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	71
5.6.2	Otimização das condições do metabolismo.....	72
5.6.3	Cinética enzimática.....	72
5.6.4	Inibição enzimática.....	74
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

Durante o tratamento de pacientes crônicos, idosos e em unidades de terapia intensiva, a politerapia, ou seja, a utilização de mais de um medicamento simultaneamente, é frequente. Essa prática pode ocasionar graves efeitos adversos pela influência de um medicamento na ação do outro, além de falha terapêutica, intoxicação, ou ainda melhora da eficácia terapêutica (SPINA *et al*, 2016). Esse efeito, chamado de interação medicamentosa, também pode ser ocasionado pela utilização de alimentos, bebidas, ou agentes químicos ambientais (DAHAN & ALTMAN, 2004).

Dentre as interações medicamentosas, a interação fármaco-alimento é a consequência da relação entre o fármaco e o alimento ou nutriente presente no alimento, podendo comprometer a farmacocinética do agente terapêutico, como alterações na absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Os alimentos consumidos na forma de sucos de frutas são responsáveis pela ingestão de compostos bioativos com funções benéficas para o organismo, contribuindo para a prevenção de doenças. No entanto, os sucos de algumas frutas também apresentam uma elevada influência sobre a biodisponibilidade de numerosos medicamentos (ANDERLE *et al*, 2004).

A interação de medicamentos com sucos de frutas tem sido descrito na literatura, principalmente, pela atuação deles sobre as enzimas do metabolismo de fase I. Essas enzimas catalisam reações de oxidação, redução ou hidrólise, a fim de que os produtos dessas reações atuem como substratos para as enzimas de fase II, que são responsáveis pela conjugação desses substratos com uma segunda molécula, facilitando a eliminação dos fármacos e inativando metabólitos tóxicos produzidos pela oxidação. Além disso, os sucos também podem atuar sobre as proteínas transportadoras de fármacos, responsáveis por vários eventos farmacocinéticos, incluindo a absorção. Os estudos demonstram que determinados sucos

exercem efeito inibitório nessas proteínas, promovendo aumento da biodisponibilidade e, conseqüentemente, maior exposição sistêmica dos fármacos administrados por via oral (BRUNTON *et al*, 2010; HIDAHA *et al*, 2006; MARCO *et al*, 2002; YIN *et al*, 2010).

O metabolismo de fase I é realizado, principalmente, pelo sistema citocromo P450 (CYP), uma grande família multigênica de hemoproteínas responsáveis pelo metabolismo oxidativo de numerosas substâncias (IWATA *et al*, 2015; KORHONEN *et al*, 2007). Essas proteínas são encontradas no retículo endoplasmático de células do organismo e apresentam várias isoformas, tendo a CYP3A4 como a forma mais abundante no fígado e no intestino, e responsável pelo metabolismo da maioria dos fármacos disponíveis no mercado (KANE *et al*, 2000).

Além dos fármacos que atuam no metabolismo, o transporte celular através de membranas pela glicoproteína P (P-gP) constitui outro mecanismo responsável pelas interações medicamentosas. Muitos fármacos lipofílicos são metabolizados pela CYP3A4 ou bombeadas de volta para o lúmen intestinal pelo transportador P-gP. Além disso, essa proteína está envolvida, também, nos processos de distribuição e excreção (GAO *et al*, 2014; GARRIGUES *et al*, 2002; KANE *et al*, 2000).

A CYP3A4 e a P-gP podem agir em conjunto afetando a eficácia do tratamento de muitos fármacos pela interferência dos sucos de frutas (KANE *et al*, 2000). Algumas espécies tropicais já demonstraram efeito *in vitro* e *in vivo* na farmacocinética de agentes terapêuticos, como a toranja, a carambola, a romã, entre outras, pois aumentaram a biodisponibilidade dos fármacos pela inibição dessas duas proteínas (HIDAHA *et al*, 2004; HIDAHA *et al*, 2005; KIM *et al*, 2006; MARCO *et al*, 2002; YIN *et al*, 2010). No entanto, nenhum estudo disponível na literatura científica avaliou os sucos de frutas amazônicas em relação a esse efeito, apesar do grande número de espécies frequentemente utilizadas pela população local,

como o buriti, o camu-camu, o cubiu, o cupuaçu, o jenipapo; e também pela população de outras regiões do Brasil, como o açaí e o taperebá.

A inibição da P-gP e da CYP3A4 pelos sucos de frutas amazônicas pode favorecer a utilização desses sucos como adjuvantes da terapia anticâncer, em virtude do papel destas proteínas na resistência aos fármacos antitumorais e na ativação de inúmeros pró-carcinógenos, respectivamente, melhorando assim a eficácia do tratamento.

Além disso, essa descoberta pode advertir a população, bem como a comunidade científica e os prescritores, que a utilização desses sucos de frutas com medicamentos pode ser desfavorável, pois pode haver o aumento da biodisponibilidade do fármaco, que pode potencializar o seu efeito, promover a ampliação de efeitos adversos, e oferecer risco de intoxicação. Sendo assim, o estudo visa conhecer e prevenir interações medicamentosas com bebidas rotineiramente utilizadas – os sucos de frutas – a fim de promover maior segurança na utilização de fármacos.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Interação medicamentosa

Os medicamentos podem agir de forma independente, produzindo a resposta farmacológica esperada, ou podem interagir entre si, ocasionando adição, sinergismo, antagonismo, potencialização ou redução de efeito terapêutico. Esse evento, conhecido por interação medicamentosa, produz respostas farmacológicas decorrentes da interferência de alimentos, bebidas, drogas de abuso ou fármacos na ação de outro fármaco (CORRIE & HARDMAN, 2014; DAHAN & ALTMAN, 2004). A interação entre medicamentos pode ser benéfica, desfavorável ou apresentar pequeno significado clínico (SPINA *et al*, 2016).

As interações benéficas melhoram a eficácia dos fármacos associados, como por exemplo, a associação de sulfas e trimetoprima (RANG *et al*, 2007), ou atuam sobre a reação adversa apresentada por um deles, como o uso de diurético retentor de potássio para corrigir a hipopotassemia induzida por tiazidas (BRASIL, 2012).

As interações podem ter um desfecho perigoso quando promovem aumento da toxicidade de um fármaco, como na utilização de diuréticos e digoxina, ou quando reduzem a eficácia de um fármaco, como no caso da diminuição da absorção da varfarina pela colestiramina (BRASIL, 2012; RANG *et al*, 2007). Outros exemplos são a associação de aminoglicosídeos e bloqueadores neuromusculares, que pode levar à paralisia respiratória, e de álcool e barbitúricos, que pode conduzir o paciente ao estado de coma (SECOLI, 2001).

Os mecanismos envolvidos no processo de interação farmacológica podem ser classificados em três grupos: interações farmacocinéticas, quando um fármaco altera a velocidade ou a extensão de absorção, distribuição, metabolismo ou excreção de outro fármaco; interações farmacodinâmicas, quando ocorrem nos sítios de ação dos fármacos,

envolvendo os mecanismos pelos quais os efeitos desejados se processam; ou interações farmacêuticas também chamadas de incompatibilidade medicamentosa, quando ocorrem *in vitro*, isto é, antes da administração dos fármacos no organismo (BRASIL, 2012; CORRIE & HARDMAN, 2014).

As interações farmacocinéticas estão associadas com uma modificação na concentração plasmática do fármaco utilizado e são mensuradas por alteração em um ou mais parâmetros cinéticos, tais como concentração sérica máxima, área sob a curva, meia-vida, quantidade total do fármaco excretado na urina, entre outros (BRASIL, 2012; SPINA *et al*, 2016). Podem ocorrer pelos mecanismos de alteração no pH gastrintestinal, esvaziamento gástrico, mecanismos de complexação, alteração na motilidade gastrintestinal, competição na ligação a proteínas plasmáticas, indução enzimática, inibição enzimática, alteração no pH urinário, alteração na excreção tubular renal, no fluxo sanguíneo renal e na excreção biliar, entre outros (BRASIL, 2012; CORRIE & HARDMAN, 2014).

Além das interações fármaco-fármaco, os alimentos também são capazes de interagir com fármacos, sendo um problema de grande relevância na prática clínica, pois os nutrientes podem causar alterações nos efeitos farmacológicos do agente terapêutico, gerando implicações na eficácia medicamentosa; assim como o fármaco pode modificar a utilização do nutriente, influenciando a manutenção do estado nutricional do indivíduo (BOULLATA & HUDSON, 2012; WON *et al*, 2012).

O trato gastrintestinal representa o principal sítio de interação fármaco nutriente, uma vez que o processo de absorção de ambos ocorre por mecanismos semelhantes e podem ser competitivos (WERLE & HOFFER, 2006). Alguns alimentos podem atrasar o esvaziamento gástrico e reduzir o tempo de absorção de muitos fármacos, podendo reduzir ou não a quantidade total de fármaco absorvida (SANTOS & BOULLATA, 2005). Contudo, alguns fármacos são preferencialmente administrados com alimento, seja para aumentar a absorção

ou para diminuir o efeito irritante sobre o estômago, como, por exemplo, o ácido acetilsalicílico (BRASIL, 2012).

Vários componentes da dieta comumente consumidos, incluindo bebidas derivadas de plantas, como chás e sucos, podem alterar a farmacocinética de medicamentos por mecanismos que modulam tanto as enzimas metabolizadoras do citocromo P450 e de conjugação de fase II, como a absorção e o transporte de xenobióticos por proteínas de transporte de efluxo (BOULLATA & HUDSON, 2012; RODRÍGUEZ-FRAGOSO *et al*, 2011; WON *et al*, 2012). Dessa forma, pode haver um aumento ou redução das concentrações plasmáticas dos medicamentos administrados, podendo melhorar a resposta terapêutica, produzir toxicidade ou aumentar o risco de falha terapêutica (BRASIL, 2012; HAN *et al*, 2011; SANTOS & BOULLATA, 2005).

## **2.2 Sistema enzimático citocromo P450**

Um dos mecanismos de interação envolvido no metabolismo de fase I dos medicamentos ocorre por intermédio do citocromo P450, que é o principal responsável pelo metabolismo oxidativo de numerosas substâncias endógenas e xenobióticos, bem como a catálise de algumas reações de redução (DAHAN & ALTMAN, 2004; KANE *et al*, 2000; MARTINY & MITEVA, 2013). Esse sistema é constituído por uma grande família multigênica de hemoproteínas, os citocromos P450, que possuem afinidade por diversos substratos (KANE *et al*, 2000); pelo NADPH citocromo P450 redutase, que é responsável pela transferência de elétrons para o citocromo P450 (TARANTINO *et al*, 2009); e pelo citocromo b5 redutase, que também é responsável pela transferência de elétrons (OGA *et al*, 2008).

Essas enzimas são encontradas na superfície do retículo endoplasmático de células de todo o trato gastrointestinal, principalmente no fígado e na parede do intestino (DAHAN & ALTMAN, 2004; KANE *et al*, 2000; SPROUSE & BREEMEN, 2016), podendo ser encontradas, também, em menores quantidades, nos pulmões, rins e sistema nervoso central (BRUNTON *et al*, 2010; HAN *et al*, 2011). A atividade dos CYP's referente aos xenobióticos tem por objetivo facilitar a excreção destes compostos pela inserção de um átomo do oxigênio molecular (CRESPI & STRESSER, 2000; GIRENNAVAR *et al*, 2007; SILVADO, 2008).

O ciclo catalítico se dá, inicialmente, pela complexação do fármaco com a forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) do citocromo. A flavoproteína NADPH-citocromo P450 redutase, então, fornece um elétron proveniente do NADPH (doador de elétrons). Esse elétron faz a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , e o complexo reduzido liga-se a uma molécula de oxigênio molecular. A seguir, este capta mais um elétron do NADPH, procedente do citocromo b5 ou da NADPH-citocromo P450 redutase, e um próton. Um segundo próton é adicionado e ocorre a clivagem do complexo, produzindo água. O outro átomo de oxigênio liga-se a uma molécula do fármaco, resultando em um fármaco oxidado, que se desliga do complexo, enquanto a enzima se regenera e volta ao seu estado inicial (Figura 1) (COSTA, 2004).

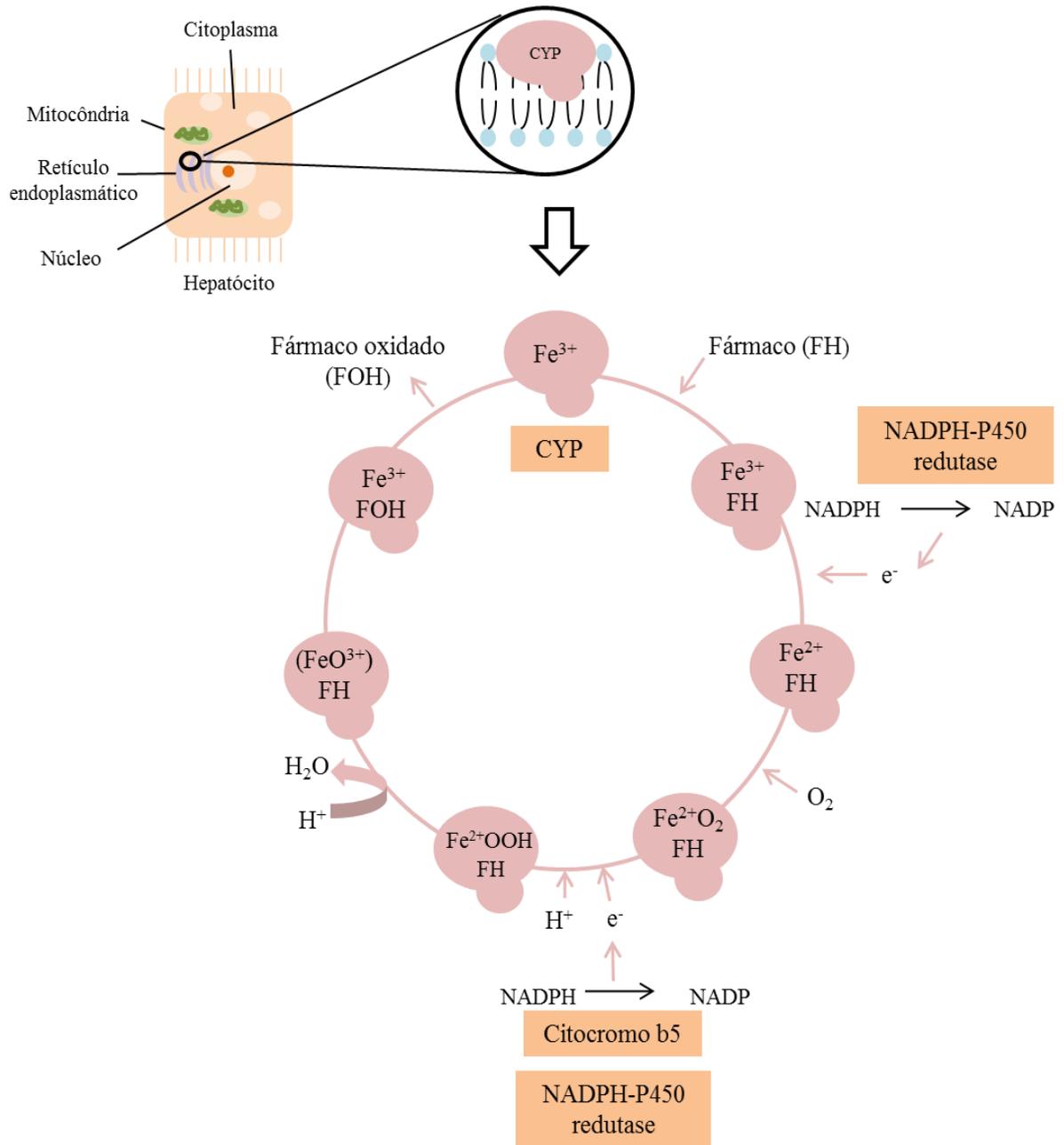


Figura 1: Ciclo catalítico do citocromo P450.  
ADAPTADO DE: Rang *et al*, 2007

Esse complexo enzimático apresenta várias isoformas com base na estrutura, especificidade de substrato, ou sensibilidade a agentes inibidores e indutores, sendo denominadas pela sigla CYP, seguida de um número que indica a família, uma letra que indica a subfamília e outro número que indica o gene (NELSON *et al*, 1993). Estudos permitiram a identificação de cerca de 70 genes ativos que codificam vários tipos de CYP, contudo apenas 12 CYP's das famílias 1 a 3 (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9,

2C19, 2D6, 2E1, 3A4 e 3A5) são responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos nos seres humanos (BRUNTON *et al*, 2010; CRESPI & STRESSER, 2000; MARKOWITZ & ZHU, 2012).

Os CYP's mais importantes relacionadas ao metabolismo de fármacos pertencem às subfamílias CYP1A, CYP1B, CYP2C, CYP2D, CYP2E e CYP3A, sendo que esta última representa o grupo mais abundante no fígado e no intestino delgado (Figura 2) (MADGULA *et al*, 2009; SPROUSE & BREEMEN, 2016). A enzima CYP3A4 é responsável pelo metabolismo da maioria dos fármacos, constituindo assim, um mecanismo de interações de grande relevância (CHOUGNET *et al*, 2003; DAHAN & ALTMAN, 2004; LAU *et al*, 2013; KANE *et al*, 2000; MOOIMAN *et al*, 2014). Entre os fármacos metabolizados por ela estão os sedativos, tais como midazolam, triazolam, diazepam, antidepressivos amitriptilina e imipramina, antiarrítmicos amiodarona e quinidina, anti-histamínicos terfenadina e loratadina, antagonistas dos canais de cálcio, tais como nifedipina e diltiazem, e vários agentes antimicrobianos e inibidores de protease (GALLI & FEIJOO, 2002).

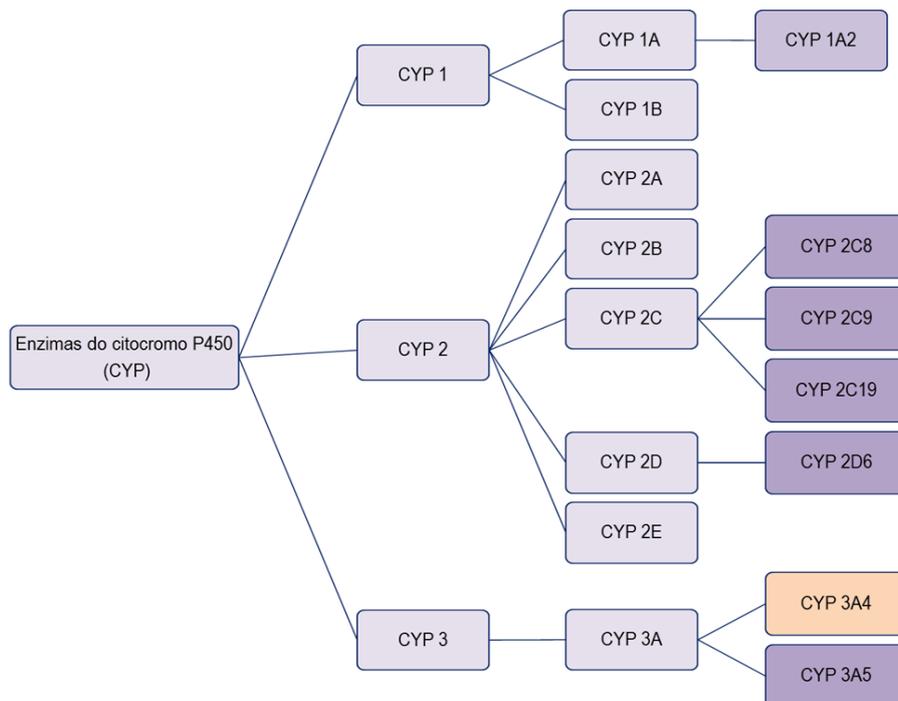


Figura 2: Isoenzimas CYP responsáveis pelo metabolismo de fármacos nos seres humanos. ADAPTADO DE: Yared, 2014

A inibição da CYP3A4 pode levar ao aumento dos níveis plasmáticos de fármacos que são seus substratos, podendo melhorar o efeito terapêutico ou causar toxicidade (WON *et al*, 2012), ou pode resultar em menor eficácia clínica se o substrato for um pró-fármaco (MARKOWITZ & ZHU, 2012). Em contrapartida, a indução dessa enzima pode resultar na diminuição do nível plasmático desses fármacos e, conseqüentemente, reduzir a sua eficácia (LAU *et al*, 2013; MARKOWITZ & ZHU, 2012). Desta forma, é de grande importância conhecer a afinidade de alimentos e bebidas, como os sucos, à CYP3A4, a fim de determinar seu potencial como inibidores, e avaliar sua influência sobre o metabolismo de fármacos coadministrados (CHOUGNET *et al*, 2003).

### **2.3 Glicoproteína-P**

Os transportadores de membrana são responsáveis por controlar a absorção, distribuição e eliminação dos fármacos, podendo, assim, constituir outro mecanismo de interações medicamentosas (GARRIGUES *et al*, 2002; KANE *et al*, 2000). Já foram descritas várias superfamílias de transportadores do genoma humano, uma delas é a família *ATP-binding cassette* (ABC), que possui, no seu gene, uma região ABC que se liga ao ATP e o hidrolisa, utilizando a energia para o transporte de substrato através da membrana (KATAOKA *et al*, 2011; OGA *et al*, 2003). O componente mais estudado dessa família é a glicoproteína-P (P-gP), codificada pelo gene MDR1, o mesmo da resistência a múltiplas drogas (FILIPSKI *et al*, 2014; KATAOKA *et al*, 2011; OGA *et al*, 2003).

A P-gP tem peso molecular de 170kD e está localizada na membrana de células do rim, fígado, barreira hematoencefálica, placenta e, principalmente, no epitélio intestinal (FOGER *et al*, 2006; GARRIGUES *et al*, 2002; WERLE & HOFFER, 2006; LI *et al*, 2014). É responsável por transportar as moléculas lipofílicas do enterócito de volta para o lúmen

intestinal, funcionando, assim, como uma bomba de efluxo dependente de ATP (Figura 3) (DAHAN & ALTMAN, 2004; FOGER *et al*, 2006; GARRIGUES *et al*, 2002; KANE *et al*, 2000). Alguns agentes antineoplásicos, como doxorrubicina e vincristina, bem como fármacos de outras classes, como indinavir, cetoconazol, ciclosporina e digoxina, constituem alguns dos substratos da P-gP descritos na literatura (OGA *et al*, 2003).

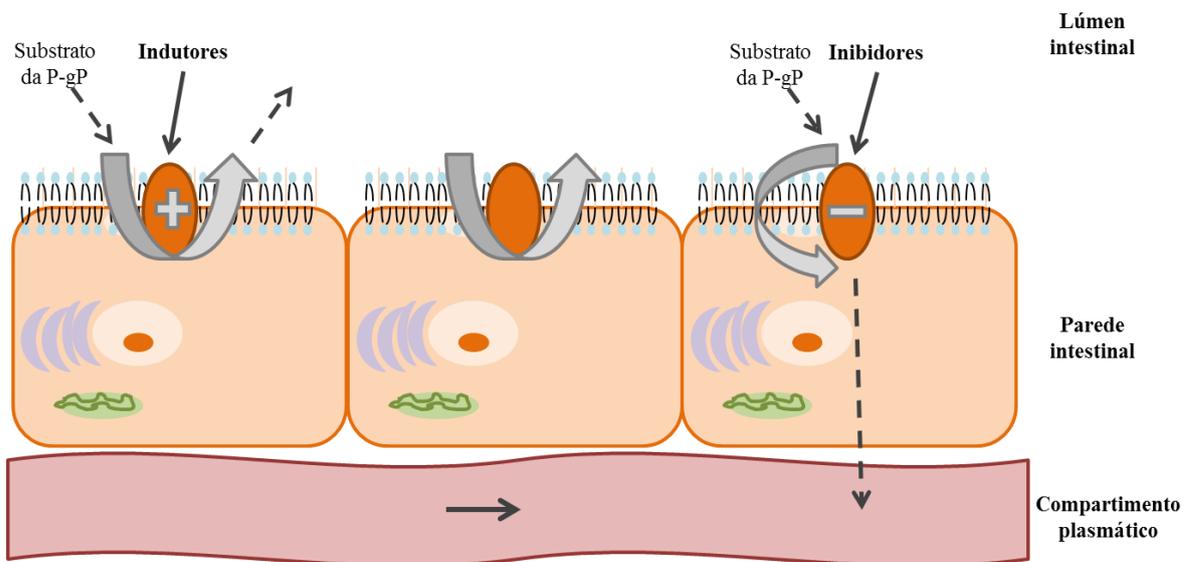


Figura 3: Efeito da P-gP na absorção de drogas através de parede intestinal. Na presença de indutores, a P-gP bombeia o substrato para fora da célula. Já na presença de inibidores, a P-gP reduz o efluxo de substrato, permitindo maior absorção do mesmo.

ADAPTADO DE: Oga *et al*, 2003

O transportador P-gP, também, é um dos responsáveis pelo fenótipo de resistência a múltiplas drogas nas células tumorais, pois estas têm uma elevada expressão da proteína, acarretando em falhas de tratamentos por quimioterapia pela diminuição da concentração intracelular das drogas (DAHAN & ALTMAN, 2004; GARRIGUES *et al*, 2002).

Assim como ocorre com a CYP3A4, os fármacos que induzem ou que inibem a P-gP podem afetar a farmacocinética e a biodisponibilidade de drogas que são seus substratos (HAN *et al*, 2011; KATAOKA *et al*, 2011; MARCO *et al*, 2002). A inibição dos transportadores de efluxo de fármacos aumenta a absorção de agentes terapêuticos, possivelmente melhorando a sua eficácia, enquanto que a indução desses transportadores pode

acarretar falha terapêutica (SPROUSE & BREEMEN, 2016). Dessa forma, é de grande interesse avaliar o efeito de fármacos, bem como alimentos e sucos de frutas, sobre a atividade da P-gP.

#### **2.4 Estudos de inibição da CYP3A4 e da P-gP**

Nas interações farmacocinéticas, um fármaco ou composto pode alterar a concentração plasmática de outro fármaco (SPINA *et al*, 2016). Um fenômeno frequente desse tipo de interação é a inibição da enzima CYP3A4 e da P-gP. Como consequência, há uma diminuição do clearance e, conseqüente, prolongamento da meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e aumento dos níveis plasmáticos do fármaco, podendo melhorar a resposta terapêutica, ou causar efeitos adversos graves (BRUNTON *et al*, 2010). Os mecanismos de inibição enzimática podem ser divididos em: inibição reversível, quando é competitiva, incompetitiva ou mista, ou inibição irreversível (NELSON & COX, 2014).

Na inibição competitiva, o inibidor compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, pois possuem características semelhantes. Outro tipo de inibição reversível é a inibição incompetitiva, que ocorre com enzimas que catalisam reações com mais de dois substratos estruturalmente diferentes. O inibidor desse tipo de reação liga-se somente ao complexo enzima/substrato já formado. Um inibidor misto pode tanto ligar-se diretamente com a enzima, bem como ao complexo enzima/substrato (NELSON & COX, 2014).

Na inibição irreversível, o inibidor liga-se ao sítio de ação da enzima de forma covalente, ou destroem grupos funcionais da enzima, ou formam uma associação não covalente estável (NELSON & COX, 2014). Vários fármacos existentes no mercado utilizam um desses mecanismos de inibição para a CYP3A4 e para a P-gP. Agentes como cetoconazol, claritromicina, eritromicina, fluoxetina, fluvoxamina, setralina, são alguns dos inibidores de

CYP3A4 (FRANCO & FRANCO, 2003). Já os inibidores de protease do HIV, eritromicina, verapamil, espironolactona, ciclosporina, quinidina, entre outros, constituem os inibidores de P-gP (OGA *et al*, 2003).

Tendo em vista o consumo popular de chás e sucos de frutas no mundo, em especial no Brasil, principalmente pelo sabor, valor nutritivo, e também, pelos conhecimentos acerca dos efeitos dessas bebidas sobre algumas doenças, esta prática pode alterar a atividade farmacológica de diversos medicamentos. Dessa forma, um número crescente de estudos realizados em interações medicamentosas, tanto *in vitro* como *in vivo*, tem demonstrado atividade inibitória dessas bebidas sobre a CYP3A4 e a P-gP, que são geralmente co-expressas nas mesmas células e compartilham de um grande número de substratos e moduladores (TARANTINO *et al*, 2009).

Um desses estudos foi relatado há quase duas décadas, quando se descobriu que o suco da toranja (*grapefruit*) interage com fármacos pela inibição dessas duas proteínas do enterócito (GIRENNAVAR *et al*, 2006). Essa descoberta desencadeou uma extensa investigação com a avaliação do efeito dos sucos sobre a farmacocinética de vários fármacos. Tanto o suco de toranja como o de laranja sevilha aumentaram a biodisponibilidade do dextrometorfano em humanos, podendo ter inibido a CYP3A4 e a P-gP entéricas de modo irreversível (MARCO *et al*, 2002).

Yin e colaboradores (2010) demonstraram que o suco de toranja promoveu um aumento moderado da exposição sistêmica ao nilotinibe, fármaco utilizado no tratamento da leucemia mielóide crônica e substrato de CYP3A4 e de P-gP. Os compostos polifenólicos furanocumarínicos bergamotina, 6,7-diidroxibergamotina e paradisina presentes na toranja já foram identificados como os principais bioativos responsáveis por esse efeito em humanos (GIRENNAVAR *et al*, 2006; GIRENNAVAR *et al*, 2007). Além desses, os flavonóides naringina e naringenina também são considerados causadores de interação medicamentosa por

afetar a absorção de fármacos pela inibição do transporte de efluxo (OFER *et al*, 2005; SHIRASAKA *et al*, 2009; NGUYEN *et al*, 2015; WON *et al*, 2012).

Além da toranja, várias frutas, incluindo espécies tropicais, têm sido avaliadas quanto ao potencial de afetar a farmacocinética de agentes terapêuticos. Entre as frutas estudadas estão a romã, a carambola, a uva selvagem, entre outras, que demonstram ter a capacidade de interagir com fármacos administrados pela via oral, pela inibição da atividade enzimática de CYP3A4 e P-gP (ZHANG *et al*, 2007).

O estudo do efeito do suco de romã sobre o metabolismo da carbamazepina, utilizando microsomas hepáticos humanos *in vitro* e ratos *in vivo*, sugere que o suco de romã inibe a CYP3A intestinal, pois há aumento da biodisponibilidade do fármaco (HIDAKA *et al*, 2005). A carambola é outra fruta que apresenta capacidade de interagir com fármacos, afetando a farmacocinética dos mesmos. Hidaka e colaboradores (2004) avaliaram o efeito do suco da carambola sobre o metabolismo do midazolam *in vitro*, e observaram potente inibição da atividade de CYP3A4, com índices superiores ao da toranja.

Além da CYP3A4, o suco da carambola também inibe outras seis isoformas do citocromo P450, incluindo CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 e CYP2E1 *in vitro* (ZHANG *et al*, 2007). O suco da carambola também altera a farmacocinética da carbamazepina em ratos, pelo prejuízo causado à CYP3A4 entérica. Contudo, esse efeito é reversível e transitório no prazo de 24 horas (HIDAKA *et al*, 2006). Os estereoisômeros de procianidina B1 e B2 e/ou os compostos polifenólicos catequina/epicatequina são sugeridos como os responsáveis pela potente atividade inibitória da carambola (HOSOI *et al*, 2008).

A uva selvagem constitui outro inibidor da atividade de CYP3A4 *in vitro*, com a potência inibidora superior à observada no suco de romã. Dessa forma, é possível prever que elevadas quantidades do suco dessa fruta podem interagir com medicamentos metabolizados pela CYP3A4 (KIM *et al*, 2006).

Ofer e colaboradores (2005) demonstraram que os flavonóides foram responsáveis pela inibição da P-gP e, também, de polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP), pela detecção de uma significativa inibição da secreção de talinolol pelos enterócitos, utilizando modelo de monocamadas de células Caco-2. Dessa forma, como já exposto na literatura, os compostos polifenólicos presentes nas frutas são sugeridos como os principais responsáveis pela atividade inibitória da CYP3A4 e da P-gP.

## **2.5 Compostos polifenólicos**

Os compostos polifenólicos constituem um dos grupos de compostos mais abundantes nos vegetais. São considerados como uma das principais classes de metabólitos secundários com funções nas plantas que vão desde a pigmentação ao crescimento, passando pela defesa contra ataques microbiológicos e predadores. Eles, também, estão disponíveis em uma ampla variedade de frutas, legumes, verduras, e em alimentos processados destes, como chás, sucos, vinho e outros (ARCHELA & DALL'ANTONIA, 2013).

Os compostos fenólicos são substâncias que contêm, pelo menos, um grupo hidroxila ligado ao anel benzênico (fenol) e que podem conter outros substituintes na sua estrutura, tais como açúcares ou ácidos orgânicos (ANGELO & JORGE, 2007; CARVALHO, 2007). São conhecidos milhares de compostos fenólicos nas plantas, que podem ser divididos em diversas classes de acordo com a sua estrutura química, como os flavonóides, tocoferóis, ácidos fenólicos, cumarinas, ligninas e taninos (ANGELO & JORGE, 2007; ARCHELA & DALL'ANTONIA 2013; SOUSA *et al*, 2007).

A natureza polifenólica destes compostos tem caráter antioxidante, ou seja, podem neutralizar as espécies reativas de oxigênio em grande parte resultantes da peroxidação lipídica. Esta propriedade confere aos compostos fenólicos uma vasta atividade biológica,

destacando-se a diminuição do risco de doença cardiovascular, a redução do risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer, a prevenção da ocorrência de alguns tipos de cancro e o retardamento do envelhecimento celular (ANGELO & JORGE, 2007; CARVALHO, 2007).

O grupo dos flavonóides é o mais diversificado em termos estruturais e subdivide-se em diversas classes tais como as antocianidinas, flavonas, flavanonas, flavonóis (ou catequinas), entre outros (ANGELO & JORGE, 2007; CARVALHO, 2007; OLIVEIRA, 2010). Esses compostos, bem representados pela quercetina, geralmente causam inibição competitiva de algumas enzimas e também atuam quelando o cofator enzimático (OLIVEIRA, 2010).

## **2.6 Frutas amazônicas**

O Brasil apresenta uma extensa flora, com ampla diversidade de espécies frutíferas tropicais nativas e aclimatadas de grande potencial fitofarmacológico, sendo o grande centro de diversificação a Amazônia Brasileira, onde são encontradas cerca de 250 plantas produtoras de frutos comestíveis (RABELO, 2012).

As frutas nativas da região amazônica, grande detentora de recursos naturais, vêm se tornando cada vez mais populares no Brasil e têm despertado o interesse internacional, pois possuem qualidades e sabores variados, apreciados pela população, sendo geralmente consumidas in natura, mas com muitas espécies com grande potencial para utilização na culinária, principalmente na forma de sucos (RABELO, 2012). Não obstante, a literatura científica acerca de algumas delas é escassa e demanda de mais estudos a respeito de suas características químicas, assim como a avaliação em relação ao efeito sobre a farmacocinética

de agentes terapêuticos pela inibição de enzimas do citocromo P-450 e de proteínas de transporte.

Algumas dessas espécies rotineiramente utilizadas pela população na forma de sucos são: Açaí (*Euterpe precatoria* Mart.), Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVough), Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Will ex Spreng)), Jenipapo (*Genipa americana* L.) e Taperebá (*Spondias mombin* L.).

O açaí (*E. precatoria*) é, atualmente, uma das frutas nativas de maior consumo na Amazônia e muito conhecida em vários estados no Brasil (Figura 4). Além do valor nutricional como fonte de energia, o suco de açaí apresenta expressivo teor de fibra alimentar, lipídeos, vitamina E, antocianinas (PALENCIA *et al*, 2009), minerais, particularmente, cálcio e potássio, ácidos graxos oleico e linoleico (RABELO, 2012; YUYAMA *et al*, 2011B) e carotenóides (KANG *et al*, 2012). O açaizeiro pertence à Família Arecaceae e é uma palmeira tipicamente tropical, encontrada fazendo parte da vegetação das matas (COSTA & MITJA, 2010).



Figura 4: Fruta inteira de açaí (*E. precatoria*)  
FONTE: Edna Costa, 2015

O buritizeiro (*M. flexuosa*) é uma palmeira pertencente à Família Arecaceae (COSTA & MITJA, 2010), e seus frutos, vulgarmente conhecidos como buriti, são castanho-avermelhados, possuindo uma superfície revestida por escamas brilhantes (Figura 5). A polpa amarela cobre é rica em compostos fenólicos (CÂNDIDO *et al*, 2015), ácidos graxos,

tocoferóis, carotenóides, carboidratos, proteínas e minerais, como potássio, magnésio, cálcio, zinco, cobre e ferro (ALBUQUERQUE *et al*, 2005; MANHÃES & SABAA-SRUR, 2011; YUYAMA *et al*, 1998).



Figura 5: Fruta inteira de buriti (*M. flexuosa*)  
 FONTE: <http://www.amazonoil.com.br/produtos/oleos/buriti.htm>

O camu-camu (*M. dubia*) é uma fruta que cresce em pequenos arbustos ou pequenas árvores (Figura 6). No Brasil, também ocorre nas margens de todos os rios que deságuam no rio Amazonas, passando pelos estados de Rondônia, Mato Grosso e Tocantins (YUYAMA *et al*, 2010), pertence à Família Myrtaceae (RABELO, 2012). Tem sido bastante divulgada pelo elevado teor de vitamina C, superior ao da acerola, além de carotenóides (NEVES *et al*, 2015), flavonóides, antocianinas, fósforo, cálcio e potássio (PINTO, 2011; YUYAMA, 2011A).



Figura 6: Fruta inteira e incisada na forma longitudinal de camu-camu (*M. dubia*)  
 FONTE: Edna Costa, 2015

O cubiuzeiro (*S. sessiliflorum*) é um arbusto nativo da Amazônia Ocidental, presente em toda a Amazônia Brasileira, Peruana e Colombiana, e pertence à Família Solanaceae

(RABELO, 2012). O fruto cubiu (Figura 7) apresenta baixo teor energético, contudo alta concentração de fibra alimentar, que pode ser a explicação pela redução da concentração sérica de glicose em ratos (YUYAMA *et al*, 2005). Além disso, é rico em ácido ascórbico, cálcio, fósforo, vitaminas B1, B3, C, pectina (RABELO, 2012) e carotenóides (HERNANDES *et al*, 2014).



Figura 7: Fruta inteira e incisada na forma longitudinal e transversal de cubiu (*S. sessiliflorum*)  
FONTE: Edna Costa, 2015

O cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) é uma das fruteiras tipicamente amazônicas, pertence à Família Malvaceae e é uma árvore de porte médio (RABELO, 2012). O fruto tem a casca marrom, lenhosa e enrugada, e encerra numerosas sementes envoltas por uma polpa branca (Figura 8), possuem quantidades significativas de proteínas, lipídios, cálcio, fósforo, pectina (RABELO, 2012; SOUSA *et al*, 2011), vitamina C (VIEIRA *et al*, 2000) e compostos voláteis (QUIJANO & PINO, 2007).



Figura 8: Fruta inteira e incisada na forma longitudinal de cupuaçu (*T. grandiflorum*)  
FONTE: Edna Costa, 2015

O jenipapo (*G. americana*), fruto de uma árvore de porte médio membro da Família Rubiaceae (COSTA & MITJA, 2010), é bastante nutritivo, pois é rico em carboidratos, vitaminas, fósforo, cálcio e fibras (Figura 9) (RABELO, 2012), além disso apresenta alto teor de fitosteróis totais (COSTA *et al*, 2010).

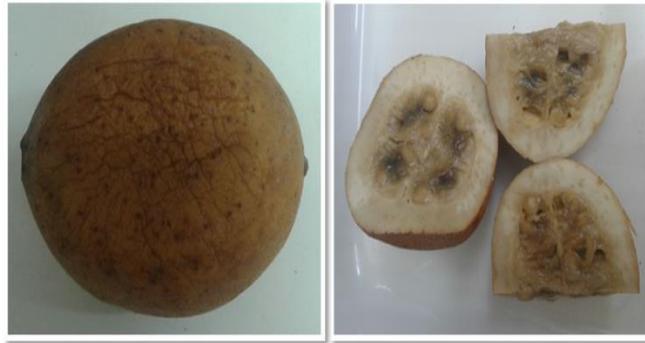


Figura 9: Fruta inteira e incisada na forma transversal e longitudinal de jenipapo (*G. americana*)  
FONTE: Edna Costa, 2015

O fruto taperebá (*S. mombin*), da Família Anacardiaceae, é proveniente de uma árvore de porte alto (Figura 10). Ele apresenta quantidades consideráveis de compostos voláteis (BICAS *et al*, 2011), potássio, magnésio, fósforo, cobre e carotenóides (TIBURSKI *et al*, 2011).



Figura 10: Fruta inteira e semente de taperebá (*S. mombin*)  
FONTE: Edna Costa, 2015

Assim, diante da variedade de frutas frequentemente consumidas pela população, é de extrema importância o desenvolvimento de pesquisas voltadas para o estudo da interação dos sucos de frutas com as enzimas CYP3A4 e P-gP, no intuito de verificar precocemente a

influência desses sucos sobre a farmacocinética de agentes terapêuticos. Apesar do grande número de espécies frutíferas amazônicas, em virtude da sazonalidade e disponibilidade, somente as frutas açaí, buriti, camu-camu, cubiu, jenipapo e taperebá foram selecionados para este estudo.

## **OBJETIVOS**

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito de sucos de frutas amazônicas na atividade in vitro da glicoproteína-P e do citocromo P450 humanos.

#### **3.2 Específicos**

Quantificar e avaliar os teores de polifenóis totais e flavonóides totais nos sucos das frutas amazônicas açaí, buriti, camu-camu, cubiu, cupuaçu, jenipapo e taperebá;

Analisar o efeito dos sucos de frutas sobre a atividade enzimática da P-gP em modelo molecular e celular;

Analisar o efeito dos sucos de frutas sobre a atividade da CYP3A4 em modelo molecular e subcelular.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes, empregados nos ensaios de composição química dos sucos de frutas, ácido gálico, Folin-Ciocalteu, quercetina, e acetato de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Carbonato de sódio anidro, etanol e cloreto de alumínio foram obtidos da Dinâmica (Diadema, Brasil), da Merck (Darmstadt, Alemanha) e da Fluka (St. Louis, EUA), respectivamente.

Os kits utilizados nos ensaios de inibição enzimática *in vitro*, empregando membranas contendo P-gP (PgP-Glo™ Assay System with P-glycoprotein), e supersomas com CYP3A4 (P450-Glo™ Screening Systems) foram obtidos da Promega Corporation (Madison, EUA). No ensaio biológico com células, o meio Mc Coy, a resazurina, a doxorubicina e a rodamina (Rh123) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os componentes do tampão fosfato-salino (PBS) cloreto de sódio, cloreto de potássio e fosfato de potássio foram provenientes da Proquimios (Rio de Janeiro, Brasil), e fosfato de sódio anidro foi obtido da Nuclear (São Paulo, Brasil). Soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Gibco (Waltham, EUA).

Nos ensaios empregando microssomas hepáticos, os solventes metanol e acetonitrila, grau cromatográfico, foram adquiridos da Panreac (Barcelona, Espanha). A dietilamina e o ácido clorídrico foram da empresa Synth (Diadema, Brasil). Os componentes do sistema de geração de NADPH, fosfato de dinucleotídeo de  $\beta$ -nicotinamida e adenina, glicose-6-fosfato e a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, bem como fosfato de sódio monobásico, fosfato de

sódio dibásico diidratado, midazolam e diazepam foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O padrão 1-hidroximidazolam foi obtido da Cayman Chemical Company (Ann Arbor, EUA).

#### 4.1.2 Material vegetal: amostras de frutas

Os frutos da região amazônica açai (*E. precatória*), buriti (*M. flexuosa*), camu-camu (*M. dubia*), cubiu (*S. sessiliflorum*), cupuaçu (*T. grandiflorum*), jenipapo (*G. americana*), taperebá (*S. mombin*), bem como a carambola (*Averrhoa carambola*), fruta utilizada como padrão do ensaio de inibição da CYP3A4 empregando microsomas, foram utilizados para processamento em sucos de frutas.

As amostras frescas de frutas, maduras e em boas condições organolépticas e de consumo, foram adquiridas nos mercados e feiras livres localizados na cidade de Manaus – AM (Brasil), como Feira da Sepror e Feira da Manaus Moderna, nos períodos de maio a junho e setembro a outubro do ano de 2015. A carambola foi obtida no mercado Pão de Açúcar, localizado em Ribeirão Preto – SP (Brasil), em setembro de 2015.

#### 4.1.3 Microsomas hepáticos

Os microsomas hepáticos humanos foram adquiridos da empresa Corning Life Science (Arizona, EUA), na concentração proteica de 20 mg/mL e foram armazenados a -80°C até o uso.

#### 4.1.4 Cultura de células

As células MES-SA/DX (linhagem de sarcoma uterino resistentes a doxorubicina), utilizadas por apresentarem elevada expressão de P-gP em sua membrana, e as células MES-SA (linhagem de sarcoma uterino sensíveis a doxorubicina) foram obtidas do banco de células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM. Elas foram cultivadas em meio Mc Coy, suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) em placas de cultura de tecidos, e incubadas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> (ROOMI *et al*, 2011).

#### 4.1.5 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas foram leitor de microplacas Beckman Coulter, modelo DTX800 (Brea, EUA), centrífuga Eppendorf, modelo mini spin AG 22331 (Hamburgo, Alemanha), incubador de microplacas Novainstruments, modelo agimaxx thermo-shaker (Piracicaba, Brasil), estufa de CO<sub>2</sub> Nuair, modelo 5510G (Plymouth, EUA) e microscópio invertido de fluorescência com câmera para captura de imagens Leica, modelo DFC310FX (Wetzlar, Alemanha).

Os equipamentos empregados no Laboratório de Metabolismo *in vitro* e Técnicas de Separação (LABMETS) da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto incluíram Sistema Direct-Q 3 MilliQ da Millipore (Massachusetts, EUA), liquidificador Philips Walita RI2054 (Barueri, Brasil), potenciômetro Lucadema (São José do Rio Preto, Brasil), agitador de tubos tipo mixer Phoenix, modelo AP56 (Araraquara, Brasil), centrífuga Hitachi, modelo HIMAC CF 15D2 (Tóquio, Japão), banho-maria com agitação da marca Marconi, modelo MA093 (São Paulo, Brasil), balança analítica Sartorius, modelo CPA225D (Goettingen, Alemanha),

liofilizador Liobras, modelo L101 (São Carlos, Brasil). Além disso, foi utilizado sistema para cromatografia líquida de alta eficiência da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba unitária de solvente LC-20AT, forno CTO-20A, degaseificador online DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A, injetor automático SIL-10AF e detector de arranjo de diodo (190-800 nm) SPD-M20A.

## 4.2 Métodos

O efeito dos sucos de frutas amazônicas sobre a atividade da P-gP e da CYP3A4 humanas foi realizado conforme o fluxograma abaixo (Figura 11):

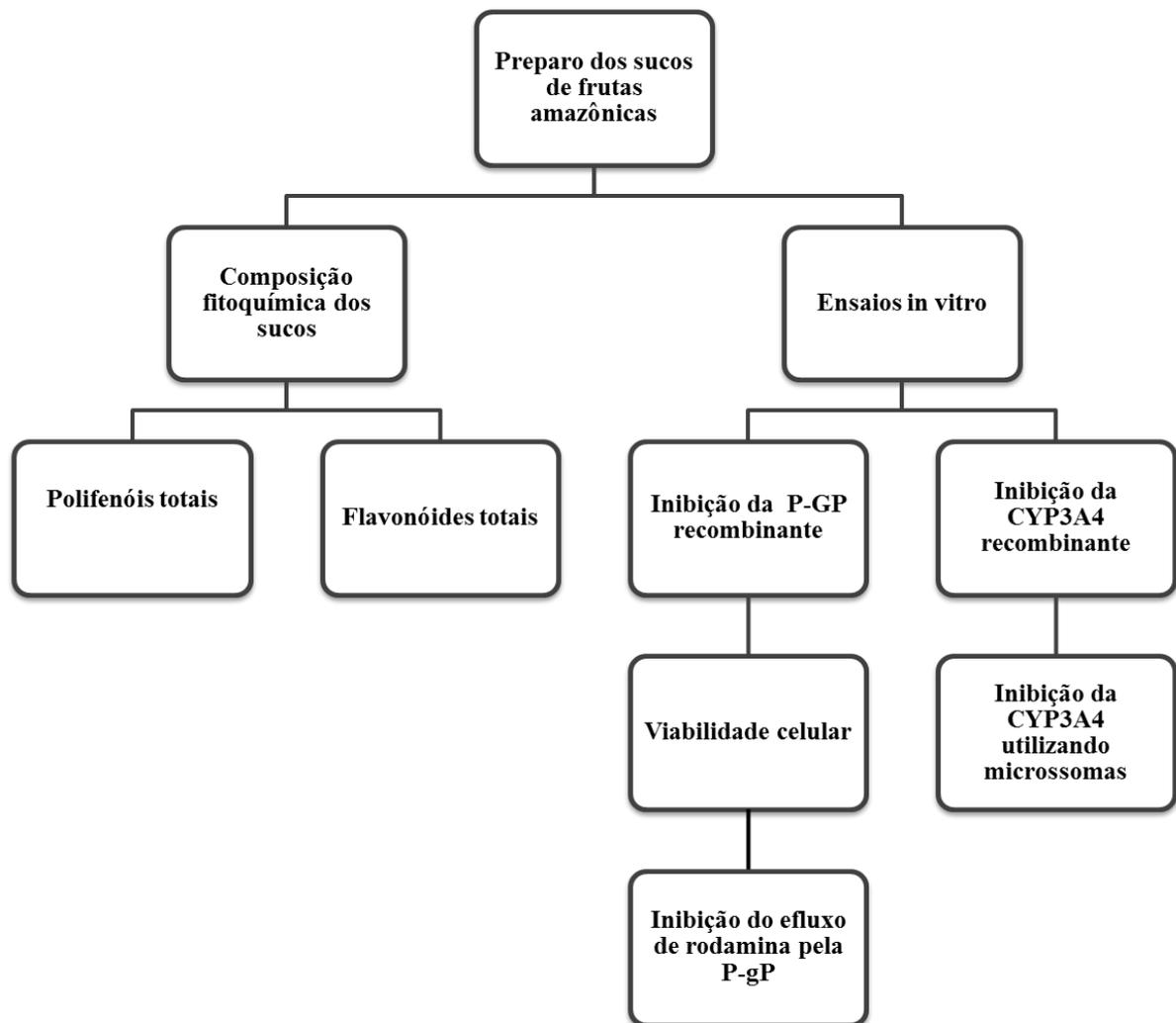


Figura 11: Delineamento experimental

#### 4.2.1 Tratamento das amostras de frutas

Todas as frutas selecionadas foram lavadas, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 30 minutos, seguido do enxágue em água destilada (YUYAMA *et al*, 2011). Para os ensaios utilizando proteínas humanas recombinantes, as frutas higienizadas foram despulpadas e, imediatamente, processadas em sucos conforme o item 4.2.2 (HIDAKA *et al*, 2006). Para os demais ensaios, após higienização, as frutas amazônicas foram armazenadas e congeladas a -20°C por cerca de 2 meses até o transporte aéreo, sob refrigeração, para a cidade de Ribeirão Preto–SP. Posteriormente, foram descongeladas em geladeira, sofreram o processo de despulpamento manual e, foram, então, processadas (HIDAKA *et al*, 2006).

#### 4.2.2 Preparação dos sucos

As partes das frutas (Tabela 1) foram submetidas ao processo de turbólise, utilizando liquidificador (2 min) como equipamento e água ultra pura como solvente (40% p/v), e centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos (GIRENNAVAR *et al*, 2007). O sobrenadante foi recolhido, filtrado e armazenado a -20°C até a utilização nos ensaios empregando proteínas humanas recombinantes (HIDAKA *et al*, 2006). Para os demais ensaios, o sobrenadante do suco foi recolhido, filtrado, e liofilizado (HIDAKA *et al*, 2004). Esses sucos liofilizados foram ressuspensos e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos para eliminação de possíveis fibras e o sobrenadante coletado de cada suco foi utilizado nas análises (GIRENNAVAR *et al*, 2007).

<b>Nome científico</b>	<b>Nome popular</b>	<b>Parte utilizada</b>
<i>Averrhoa carambola</i>	Carambola	Fruta inteira
<i>Euterpe precatoria</i> Mart.	Açaí	Polpa
<i>Mauritia flexuosa</i> L.f.	Buriti	Polpa
<i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVough	Camu-camu	Casca e polpa
<i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal	Cubiu	Polpa
<i>Theobroma grandiflorum</i> (Will ex Spreng)	Cupuaçu	Polpa
<i>Genipa americana</i> L.	Jenipapo	Semente e polpa
<i>Spondias mombin</i> L.	Taperebá	Casca e polpa

Tabela 1: Partes da fruta utilizada no preparo de cada suco

#### 4.2.3 Determinação de polifenóis totais

A determinação do teor de polifenóis totais presentes nos sucos estudados foi realizada utilizando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com modificações, descrito por Bonoli e colaboradores (2004).

Para a realização do ensaio, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de cada suco na concentração de 1 mg/mL em cada cavidade da microplaca. O padrão utilizado no ensaio foi ácido gálico (diluído em DMSO na mesma concentração dos sucos). Logo após, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu a 10% e a placa foi incubada por 8 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. Para finalizar, 240  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio foram adicionados à reação. A placa, então, foi novamente incubada por 3 minutos e, em seguida, foi realizada a leitura em leitor de microplaca, no comprimento de onda de 620 nm. O ensaio foi realizado em quadruplicata. Para quantificação foi empregada uma curva padrão com solução de ácido gálico nas seguintes concentrações: 7,8125, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . O

coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi  $R^2= 0,993$ . O teor de polifenóis totais foi expresso em  $\mu\text{g}$  equivalente de Ácido Gálico (EAG)/mL na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.2.4 Determinação de flavonóides totais

A determinação de flavonóides totais nos sucos de frutas foi realizada segundo metodologia utilizada por Chang e colaboradores (2002), com modificações.

Para a realização do ensaio, primeiramente, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de cada suco, na concentração de 1 mg/mL, e 90  $\mu\text{L}$  de etanol 95% em cada cavidade da microplaca. A quercetina, na mesma concentração dos sucos, foi utilizada como padrão. Em seguida, foi realizada a primeira leitura da placa no comprimento de onda de 405 nm em leitor de microplaca. Logo após, foram adicionados 6  $\mu\text{L}$  de cloreto de alumínio 10% e 6  $\mu\text{L}$  de acetato de potássio 1M, ambos diluídos em água destilada. Para finalizar, 168  $\mu\text{L}$  de etanol foram adicionados à reação. A placa, então, foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz, e, em seguida, a absorbância (Abs) da segunda leitura foi determinada. O ensaio foi realizado em quadruplicata. Os resultados foram obtidos utilizando-se, primeiramente, a diferença das absorbâncias da segunda leitura pela absorbância da primeira leitura. Logo após, a concentração de flavonóides em cada suco foi calculada. A quantificação foi realizada empregando uma curva padrão com solução de quercetina nas concentrações de 7,8125, 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,999. O teor de flavonoides totais foi expresso em  $\mu\text{g}$  equivalente de Quercetina (EQ)/mL na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.2.5 Ensaio de avaliação da interação do suco com a glicoproteína-P humana recombinante

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita pelo protocolo do kit “PgP-Glo™ Assay System with P-glycoprotein” (Promega Corporation, Madison, EUA), utilizando solução tampão de P-gP, fração de membrana celular contendo P-gP humana recombinante, padrão verapamil 0,5 mM, ortovanadato de sódio 0,25 mM, solução de MgATP 25 mM, e reagente de detecção de ATP.

Para realização do ensaio, foram adicionados, primeiramente, em cada cavidade da microplaca de cor branca, 20 µL de cada suco diluído em tampão de P-gP, o padrão verapamil, o ortovanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) nos seus respectivos poços, e o tampão de P-gP no poço não-tratado. Foram adicionados, então, 20 µL da solução de membranas com P-gP em todos os poços, e a placa foi incubada por 5 minutos em temperatura de 37°C. Em seguida, foram adicionados 10 µL de MgATP, e a placa foi incubada por 40 minutos a 37°C. Logo após, 50 µL de reagente de detecção foram adicionados à reação. A microplaca foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos, e depois foi realizada a leitura da luminescência (RLU) no leitor de microplaca. Os sucos foram testados na concentração de 50 µg/ mL, em triplicata.

O resultado da interação dos sucos de frutas com a P-gP foi avaliado, primeiramente, determinando-se a atividade basal (AT basal) da enzima pela diferença da leitura do poço contendo ortovanadato de sódio pela leitura do poço não-tratado. A seguir, foi calculada a diferença da leitura do poço com ortovanadato de sódio pela leitura dos poços com sucos de frutas, determinando-se a atividade da proteína na presença das amostras (AT teste). A partir disso, a interpretação do resultado seguiu pela comparação da atividade basal (AT basal) com a atividade apresentada pelas amostras de sucos de frutas amazônicas (AT teste) da seguinte forma:

AT teste > AT basal = suco de fruta estimula a P-gP

AT teste = AT basal = suco de fruta não interage com a P-gP

AT teste < AT basal = suco de fruta inibe a P-gP

#### 4.2.6 Viabilidade celular pelo método de Alamar Blue

O ensaio de viabilidade celular foi executado segundo a metodologia descrita por Nakayama e colaboradores (1997). A linhagem celular utilizada para o ensaio de viabilidade celular foi a MES-SA/DX (Células de sarcoma uterino resistentes a doxorubicina). As células foram plaqueadas na concentração de  $7 \times 10^3$  células/poço em placas de 96 poços e incubadas durante 24 horas, tempo ideal para aderência das mesmas na cavidade dos poços. Após esse período, as células foram tratadas com sucos de frutas em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 400, 600 e 800  $\mu\text{g/mL}$ ) no tempo de 72 horas de incubação. Logo após esse período de tratamento, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  da solução de resazurina 0,4% (diluída 1:20) em cada poço da placa. O controle negativo foi o meio de cultura. Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado, que compreendeu de 3 horas, foi realizada a leitura da fluorescência com excitação/emissão de 540/585 nm, respectivamente.. O ensaio foi realizado em triplicata. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde Ft = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina) e Fb = (fluorescência da célula + meio + resazurina).

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{F_t \times 100}{F_b} \quad \text{Equação 1}$$

#### 4.2.7 Inibição do efluxo de rodamina pela P-gP

O ensaio de efluxo de rodamina foi realizado segundo a metodologia descrita Roomi e coautores (2011), com modificações. Primeiramente, as células foram semeadas na densidade

de  $2 \times 10^5$  em uma placa de fundo plano e incubadas em estufa com 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ \text{C}$  durante 24 horas. Após esse tempo, a placa foi tratada com os sucos de frutas e incubada novamente. Após 3 horas de tratamento, foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  do corante rodamina (Rh123) (5  $\mu\text{M}$ ), e esperou-se 2 horas de incubação em estufa. A seguir, o meio de cultura foi removido, e as células foram lavadas com a solução de PBS gelado. Depois da etapa de lavagem, foi adicionado 1 mL de meio de cultura para que se pudesse realizar a leitura. Cada placa incluiu um controle (com células MESA-SA sem sucos de frutas), um controle (com células MESA-SA/DX sem sucos de frutas), e os poços testes (que continham células MESA-SA/DX com sucos de frutas). O resíduo de corante de rodamina celular foi visto em imagens captadas por microscopia de fluorescência.

#### 4.2.8 Ensaio da atividade inibitória do suco sobre a CYP3A4 humana recombinante

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita pelo protocolo do kit “P450-Glo™ Screening Systems” (Promega Corporation, Madison, EUA), utilizando tampão Tris-HCL a 100 mM pH 7,5, membranas contendo CYP3A4 humana recombinante, substrato PPXE a 50mM, membranas sem CYP3A4, solução de NADPH, e reagente de detecção.

Para realização do ensaio, foram adicionados, primeiramente, em cada cavidade da microplaca de cor branca, 12,5  $\mu\text{L}$  de cada suco, o padrão cetozolazol, e água livre de luciferina nos poços não tratado e branco. Foram adicionados, então, 12,5  $\mu\text{L}$  da solução de membranas no poço branco e solução de membranas com enzima nos outros poços, e a placa foi incubada por 10 minutos em temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram adicionados 25  $\mu\text{L}$  de NADPH, e a placa foi incubada por 15 minutos em temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Logo após, 50 $\mu\text{L}$  de reagente de detecção foram adicionados à reação. A microplaca foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos, e depois foi realizada a leitura da luminescência (RLU)

no leitor de microplaca. Os sucos foram testados na concentração de 50µg/mL, em triplicata. A atividade inibitória foi expressa em percentagem (%) de acordo com o cálculo a seguir, onde RLU<sub>suco</sub> = (luminescência dos poços contendo suco), RLU<sub>branco</sub> = (luminescência do poço branco), RLUNT = (luminescência do poço não tratado):

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - (\text{RLU}_{\text{suco}} - \text{RLU}_{\text{branco}}) \times 100}{(\text{RLUNT} - \text{RLU}_{\text{branco}})} \quad \text{Equação 2}$$

#### 4.2.9 Protocolo de experimentação da atividade inibitória do suco sobre a CYP3A4 utilizando microsomas de fígado humano

O ensaio da atividade inibitória da CYP3A4 utilizando microsomas foi realizado pela análise do aparecimento do metabólito 1-hidroximidazolam, segundo metodologia descrita por Fujita e colaboradores (2003) e Hidaka e colaboradores (2004), com modificações.

##### 4.2.9.1 Preparo das soluções padrão

As soluções dos padrões analíticos midazolam e 1-hidroximidazolam foram preparadas em metanol. A solução do padrão interno (PI) diazepam foi preparada em metanol, na concentração de 1,4 µg/mL, ideal para um pico simétrico. Todas as soluções foram preparadas protegidas da luz e armazenadas a -20°C.

##### 4.2.9.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise do metabólito de midazolam, o 1-hidroximidazolam, foi executada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna analítica Gemini C18 (250 mm x

4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula) da Phenomenex (Torrance, EUA). A separação do metabólito foi realizada com a fase móvel consistindo em acetonitrila e água ultra pura com 0,1% de dietilamina (45:55, v/v), vazão de 1,2 mL/min, temperatura de 30°C e volume de injeção de 50  $\mu\text{L}$  (Tabela 2). A quantificação dos padrões foi executada pelo monitoramento no comprimento de onda de 260 nm (para o 1-hidroimidazolam) e 239 nm (para o diazepam). Os dados foram analisados utilizando o software LC Solution versão 1.25 SP1.

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição otimizada</b>
Coluna	Octadecilsilano (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ de tamanho de partícula)
Fase móvel	Acetonitrila e água ultra pura com 0,1% de dietilamina (45:55, v/v)
Vazão	1,2 mL/min
Temperatura de análise	30°C
Volume de injeção	50 $\mu\text{L}$
Detecção	260 nm (HMDZ) e 239 nm (MDZ e PI)

Tabela 2: Condições cromatográficas estabelecidas. 1-hidroimidazolam (HMDZ), midazolam (MDZ), diazepam (PI).

#### 4.2.9.3 Meio microssomal

O meio microssomal foi preparado com solução de midazolam (5  $\mu\text{L}$ ), solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 (105  $\mu\text{L}$ ), um sistema gerador de NADPH com 5  $\text{mmol L}^{-1}$  de glicose-6-fosfato, 0,25  $\text{mmol L}^{-1}$  de fosfato de dinucleotídeo de  $\beta$ -nicotinamida e adenina e 0,5 unidade/mL da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (50  $\mu\text{L}$ ), e uma fração de microssomas de fígado humano (40  $\mu\text{L}$ ), completando um volume final de 200  $\mu\text{L}$ . As amostras foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C, em banho-maria com agitação. O metabolismo foi iniciado pela adição de microssomas hepático humanos (0,1 mg/mL), com

tempo de reação de 10 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 200 µL de acetonitrila gelada para parar a reação, e 30 µL de diazepam (PI). A mistura foi centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos para precipitação proteica. O sobrenadante foi coletado (200 µL) e as amostras foram analisadas no HPLC-DAD. O procedimento de preparo do meio microsomal está ilustrado na Figura 12.

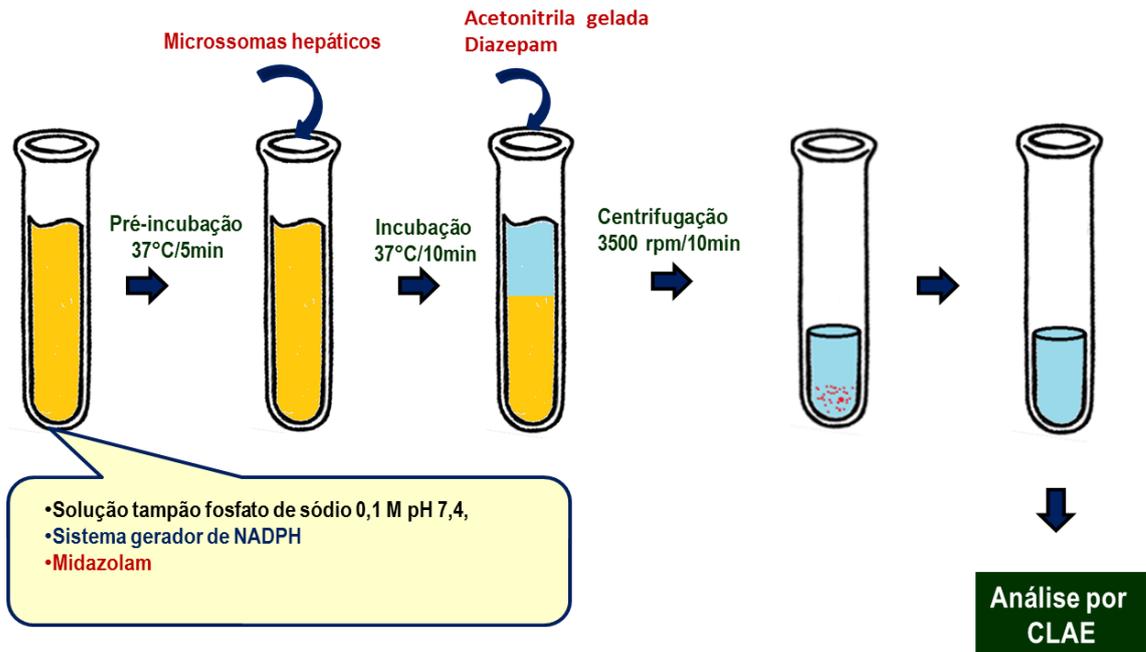


Figura 12: Esquema com o preparo do meio microsomal para o ensaio de inibição da CYP3A4

#### 4.2.9.4 Otimização das condições de metabolismo

Para determinar as condições de velocidade inicial da reação ( $V_0$ ), confirmando a depleção do midazolam (até 20%) na concentração proteica microsomal empregada e no tempo de reação, bem como a avaliação da formação do metabólito 1-hidroximidazolam, foram avaliadas três concentrações de midazolam: 1 µM (baixa); 50 µM (média); e alta (100 µM). O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.2.9.3.

#### 4.2.9.5 Cinética enzimática do midazolam

Para a avaliação da cinética enzimática do midazolam pela formação do metabólito 1-hidroimidazolam, foram avaliadas as concentrações do midazolam no intervalo de 1  $\mu\text{M}$  – 350  $\mu\text{M}$ . Para isso, o ensaio foi realizado conforme o item 4.2.9.3. As amostras foram analisadas e quantificadas por HPLC-DAD com o auxílio de uma curva analítica de 1-hidroimidazolam no intervalo de concentração de 0,035  $\mu\text{M}$  – 4,5  $\mu\text{M}$ , preparada no mesmo dia do estudo. A velocidade de reação enzimática, para cada concentração de midazolam, foi determinada pelo quociente da concentração de 1-hidroimidazolam encontrada, pela concentração proteica (0,1 mg/mL) e pelo tempo de incubação (10 minutos). O ensaio foi realizado em quintuplicata. Os resultados obtidos foram plotados em gráfico de velocidade de reação enzimática pela concentração de midazolam, e analisados por regressão não linear em modelos enzimáticos, utilizando o programa GraphPad Prism 6.

#### 4.2.9.7 Inibição enzimática da CYP3A4

A inibição da CYP3A4 pelos sucos foi avaliada pela formação do 1-hidroimidazolam, utilizando a concentração do midazolam determinada na cinética enzimática, que foi 5  $\mu\text{M}$ .

O ensaio foi realizado utilizando 5  $\mu\text{L}$  de solução de midazolam (5  $\mu\text{M}$ ), 125  $\mu\text{L}$  de suco liofilizado ressuspenso em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4, 50  $\mu\text{L}$  do sistema gerador de NADPH com 5 mmol L<sup>-1</sup> de glicose-6-fosfato, 0,25 mmol L<sup>-1</sup> de fosfato de dinucleotídeo de  $\beta$ -nicotinamida e adenina e 0,5 unidade/mL da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, e uma fração de microssomas de fígado humano (20  $\mu\text{L}$ ), completando um volume final de 200  $\mu\text{L}$ . As amostras foram pré-incubadas por 5 minutos a 37°C, em banho-

maria com agitação. O metabolismo foi iniciado pela adição de microssomas hepático humanos (0,1 mg/mL), com tempo de reação de 10 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 200 µL de acetonitrila gelada para parar a reação, e 30 µL de diazepam (PI). A mistura foi centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos para precipitação proteica. O sobrenadante foi coletado (200 µL) e as amostras foram analisadas no HPLC-DAD. O ensaio foi realizado em quintuplicata.

#### 4.2.10 Análise estatística

Os dados foram analisados com o programa estatístico GraphPad Prism 6. Foi realizada a análise descritiva através de medida de tendência central e respectiva medida de dispersão (média ± desvio padrão). Os valores obtidos no ensaio de viabilidade celular foram submetidos à análise de regressão não linear. Adicionalmente, os resultados obtidos nos ensaios in vitro foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ) para todas as análises.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação de polifenóis totais e flavonóides totais

Os resultados obtidos na determinação dos polifenóis totais, pelo método de Folin–Ciocalteu, e dos flavonóides totais estão apresentados na Tabela 3. O menor teor de polifenóis totais foi registrado no suco de cupuaçu ( $17,72 \pm 1,0 \mu\text{g EAG/mL}$ ) e o maior teor, no suco de açaí ( $102,56 \pm 7,2 \mu\text{g EAG/mL}$ ). Em relação ao teor de flavonóides totais, o suco de açaí apresentou  $7,16 \pm 0,58 \mu\text{g EQ/mL}$ , enquanto que os sucos de camu-camu, cupuaçu, cubiu, jenipapo e taperebá não tiveram a concentração de flavonoides determinada, pois não foi possível detectá-los pela metodologia empregada.

Sucos de frutas	Polifenóis totais ( $\mu\text{g EAG/mL} \pm \text{DP}$ )	Flavonóides totais ( $\mu\text{g EQ/mL} \pm \text{DP}$ )	Polifenóis totais (outros estudos)	Autores
Açaí	$102,56 \pm 7,2$	$7,16 \pm 0,58$	(Espécie <i>E. oleracea</i> ) $3,8108 \text{ mg EAG/g}$	MALCHIER, 2011
Buriti	$34,79 \pm 1,2$	$1,64 \pm 0,2$	$0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$ $\text{EAG/g}$	CANUTO <i>et al.</i> , 2010
Camu-camu	$70,25 \pm 2,5$	n.d.	$15,3465 \text{ mg/g}$	COHEN <i>et al.</i> , 2010
Cubiu	$19,77 \pm 3,0$	n.d.	$4,2 \text{ mg EAG/g}$	BAGATTOLI, 2013
Cupuaçu	$17,72 \pm 1,0$	n.d.	$0,004 \text{ mmol.L}^{-1}$ $\text{EAG/g}$	CANUTO <i>et al.</i> , 2010
Jenipapo	$19,57 \pm 1,6$	n.d.	$1,763 \text{ mg EAG/g}$	PACHECO <i>et al.</i> , 2014
Taperebá	$19,76 \pm 1,3$	n.d.	$0,006 \text{ mmol.L}^{-1}$ $\text{EAG/g}$	CANUTO <i>et al.</i> , 2010

Tabela 3: Teor de polifenóis totais equivalentes ao ácido gálico ( $\mu\text{g EAG/mL}$ ) e de flavonóides totais equivalentes à quercetina ( $\mu\text{g EQ/mL}$ ) nos sucos de frutas amazônicas. Valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). (n=4); n.d., não determinado.

O método de Folin-Ciocalteu é um dos mais antigos e utilizados para determinação de polifenóis totais em uma amostra, pois é um ensaio simples e reprodutivo (SINGLETON *et al*, 1999; SOUSA *et al*, 2007). O reagente de Folin consiste numa mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, que na presença de compostos fenólicos na amostra, é reduzida em óxidos de tungstênio e molibdênio, de coloração azulada (ANGELO & JORGE, 2007; SOUSA *et al*, 2007; ARCHELA & DALL'ANTONIA, 2013).

Apesar das vantagens da metodologia, a determinação de compostos fenólicos em alimentos, incluindo os sucos de frutas, encontra vários interferentes. Entre eles estão a ampla variedade de compostos químicos (ex. ácido ascórbico) e fibras, a complexidade química da matriz e a dificuldade de extração dos compostos fenólicos da matriz. Dessa forma, não é possível determinar com exatidão a concentração de polifenóis, mas utiliza-se uma estimativa da concentração total destes compostos (ANGELO & JORGE, 2007; ARCHELA & DALL'ANTONIA 2013).

A técnica da determinação de flavonóides totais emprega a medida de absorvância do complexo formado entre o alumínio e os flavonóides em etanol, formando compostos de coloração amarela (SÁ *et al*, 2012). Essa técnica apresenta alta sensibilidade e evita a interferência de outros compostos fenólicos (WOISKY, 1996).

O conteúdo de compostos fenólicos no suco varia de acordo com o tipo de fruta, a maturação, a região e o solo de plantação, o período de coleta, as condições de colheita, as práticas de cultivo, e o processo de armazenamento da mesma (VARGAS *et al*, 2008). Visto que as espécies nativas analisadas neste trabalho foram adquiridas nas feiras locais, não foi possível coletar informações sobre a coleta e a região produtora das frutas utilizadas na preparação dos sucos.

A literatura atual abrange vários estudos acerca do potencial antioxidante do açaí pela presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides antocianinas, tanto nas

espécies *E. precatória* Mart como na *E. oleracea* Mart (BORGES, 2013; YUYAMA *et al*, 2011<sub>B</sub>). Canuto e colaboradores (2010), encontraram uma concentração de polifenóis de 0,024 mmol.L<sup>-1</sup> EAG/g de amostra de polpa de açaí (espécie *E. oleracea*), utilizando a extração com metanol:água (8:2 v/v). Em outro estudo, Malcher (2011) encontrou no suco de açaí (espécie *E. oleracea*) 3,8108 ± 0,21 mg EAG/g de amostra para os polifenóis, e 1,1021 ± 0,31 mg/g de amostra para os flavonoides. Dessa forma, apesar da espécie estudada ser diferente da narrada nos estudos, o resultado encontrado confirma o que já é relatado na literatura sobre o alto teor de compostos fenólicos, também, na espécie *E. precatória* Mart.

Segundo Souza (2011), o camu-camu apresenta alta concentração de compostos fenólicos. Das amostras analisadas neste trabalho, o camu-camu apresentou a segunda maior concentração de polifenóis, sendo de 70,25 ± 2,5 µg EAG/mL. No estudo de Cohen e colaboradores (2010), a polpa do camu-camu apresentou o teor de polifenóis de 15,3465 mg/g de amostra, e casca 24,3047 mg/g de amostra, utilizando primeiramente a solução extratora metanol:água (50:50 v/v) e, posteriormente, acetona:água (70:30 v/v).

O buriti, também, é um fruto rico em compostos antioxidantes, como carotenoides, ácido ascórbico, compostos fenólicos, e outros (MELO *et al*, 2008). No presente estudo, o suco de buriti foi terceiro a apresentar a maior concentração de polifenóis totais (34,79 ± 1,27 µg EAG/mL), e de flavonoides totais 1,64 ± 0,2 µg EAG/mL. Canuto e colaboradores (2010) verificaram fato semelhante com a polpa de buriti, utilizando a extração com metanol:água (8:2 v/v), que apresentou a quarta maior concentração de polifenóis totais de um total de quinze frutas, correspondendo a 0,01 ± 0,0 mmol L<sup>-1</sup> EAG/g de amostra.

Os sucos de cubiu, taperebá, jenipapo e cupuaçu apresentaram as menores concentrações de polifenóis, com 19,77 ± 3,0 µg EAG/mL, 19,76 ± 1,3 µg EAG/mL, 19,57 ± 1,6 µg EAG/mL e 17,72 ± 1,0 µg EAG/mL, respectivamente. No estudo de Canuto e colaboradores (2010), a polpa de taperebá apresentou a concentração de polifenóis de 0,006 ±

0,0 mmol L<sup>-1</sup> EAG/g de amostra, e a de cupuaçu apresentou  $0,004 \pm 0,0$  mmol.L<sup>-1</sup> EAG/g de amostra, empregando solução extratora de metanol:água (8:2 v/v).

Yuyama e coautores (2008) avaliaram a composição físico-química da polpa de cubiu a fim de desenvolver uma geléia dietética, e encontraram  $1,8974 \pm 10,42$  mg de compostos fenólicos em 1 g de amostra de polpa. Em outro estudo, Bagattoli (2013) encontrou a concentração de compostos fenólicos de 4,2 mg EAG/g de amostra em extrato metanólico das cascas de cubiu.

O teor de compostos fenólicos do suco de jenipapo analisado nesta pesquisa foi de  $19,57 \pm 1,6$  µg EAG/mL, dado que não reforçou o teor de 1,763 mg EAG/g encontrado na fruta in natura por Pacheco e coautores (2014). Vale ressaltar que a análise dos compostos fenólicos pode ser influenciada por vários interferentes, como o método empregado, solvente de extração, tempo e condições de armazenamento da amostra, entre outros (PACHECO *et al*, 2014).

## **5.2 Avaliação da interação dos sucos com a glicoproteína-P humana recombinante**

Segundo a interpretação dada pelo ensaio, comparando-se a atividade basal da proteína com a atividade dela na presença das amostras é possível avaliar se houve ou não interação, e se a P-gP foi inibida ou estimulada. Dessa forma, de acordo com a Figura 13, pode-se verificar que a atividade da P-gP na presença do suco de cubiu foi semelhante à atividade basal, não possuindo diferença estatística significativa, representando que o mesmo não interage com a P-gP nas condições estabelecidas no teste. Já a atividade da proteína na presença do suco de cupuaçu foi menor que a atividade basal, revelando que o suco de cupuaçu não só interagiu com a P-gP, como a inibiu. Não foi possível avaliar a interação da P-gP com os sucos de açaí, buriti, camu-camu, jenipapo e taperebá, pois os resultados

apresentaram-se inconclusivos devido a grande dispersão obtida nos resultados (desvio padrão > 15%), apesar da repetição dos experimentos.

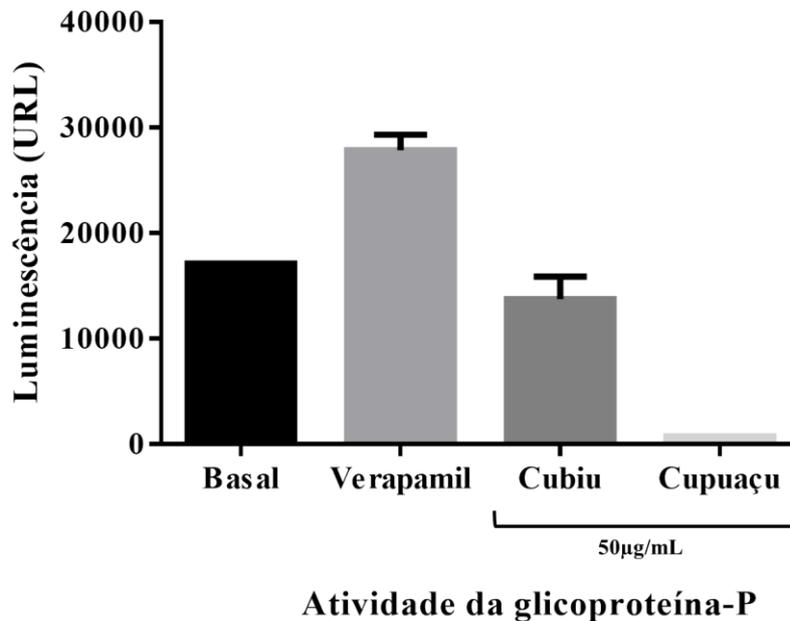


Figura 13: Atividade da P-gP basal, e na presença do verapamil ( $p=0,002$ ), do suco de cubiu ( $p=0,126$ ) e de cupuaçu ( $p=0,001$ )

O verapamil é referido na literatura como inibidor da P-gP, pois atua como um substrato que interfere no transporte de outros substratos de modo competitivo. No entanto, no ensaio, o verapamil foi utilizado como controle positivo de substrato de transporte, que estimula a atividade ATPase da P-gP (XUE *et al*, 2014).

A técnica emprega detecção por luminescência pela utilização da enzima luciferase, que transforma energia química em energia luminosa pela descarboxilação oxidativa das luciferinas de vagalume (sob a forma de adenilato de luciferina, obtido através da ativação de luciferina por ATP). Essa abordagem permite maior tempo de reação e simplifica o ensaio. Além disso, segundo o fabricante do kit, o protocolo permite fazer rastreamento com várias amostras e revelar a capacidade de um composto para estimular ou inibir a atividade da P-gP.

Apesar das vantagens, o ensaio apresentou limitações que dificultaram a obtenção de resultados fidedignos, com a falta de reprodutibilidade e alta taxa de erro. Primeiramente, acreditou-se que o resultado ocorreu pela complexidade de compostos químicos e fibras presentes nas amostras de sucos. Dessa forma, além da centrifugação, incluiu-se a etapa da filtração dos sucos a fim de amenizar a taxa de erro. No entanto, a limitação persistiu, sendo possível avaliar com segurança somente os sucos de cubiu e cupuaçu.

Os estudos de interação medicamentosa com produtos vegetais *in vitro* são relativamente fáceis de executar, baratos em comparação com estudos em animais ou humanos, e permitem condições de ensaio cuidadosamente controladas. Contudo, a absorção limitada ou desconhecida dos componentes botânicos, a incerteza sobre as concentrações relevantes para o ensaio, as dificuldades na padronização das amostras com perfil fitoquímico complexo, entre outros, podem propiciar a falta de reprodutibilidade nos experimentos (MARKOWITZ & ZHU, 2012).

Essas limitações dos ensaios *in vitro* têm sido discutidas pela discrepância entre os resultados pré-clínicos e clínicos. Um exemplo é a espécie *Silybum marianum* (cardo-de-leite), que demonstrou inibir os transportadores de efluxo e a CYP3A4 *in vitro*, mas não *in vivo*, possivelmente pela falta de absorção dos compostos responsáveis pela atividade, e pela presença de uma alta concentração de metabólitos de silimarina, respectivamente (MARKOWITZ & ZHU, 2012; SPROUSE & BREEMEN, 2016).

Sprouse & Breemen (2016) afirmam que os modelos *in vitro* utilizados atualmente para prever interações medicamentosas são passíveis de erros. No entanto, Markowitz & Zhu (2012) alegam que apesar das limitações, estudos *in vitro* tem sido uma alternativa de rastreio viável na identificação de compostos que podem representar risco de interação medicamentosa e, assim, servir como sinalizadores para a realização de estudos *in vivo*. Sendo assim, embora o ensaio com a P-gP recombinante tenha apresentando barreiras, ainda é

possível recomendar o emprego de outras metodologias *in vitro*, principalmente com o suco de cupuaçu, para confirmação do resultado.

### 5.3 Viabilidade celular pelo método de Alamar Blue

Com relação ao efeito dos sucos sobre a viabilidade celular da MES-SA/DX (Figura 14), as células apresentaram alta viabilidade na presença de todos os sucos, com exceção do açaí, no período de 72 horas. Ou seja, não foi observada qualquer citotoxicidade significativa pelos sucos de buriti, camu-camu, cubiu, cupuaçu, jenipapo e taperebá nas concentrações estabelecidas. A viabilidade celular foi inferior a 50% somente na presença do suco de açaí, que apresentou  $CI_{50}$  de 95,85  $\mu\text{g/mL}$ , concentração necessária para inibir metade da proliferação celular.

A resazurina, conhecida comercialmente por Alamar Blue, é um indicador de oxirredução. A forma oxidada do Alamar Blue é azul e não fluorescente, indicando célula não viável. Em células em proliferação, esse composto é reduzido a resofurina (composto de cor rosa e fluorescente) por flavinas ligadas a enzimas relacionadas com o transporte durante a atividade metabólica celular (RIBEIRO *et al*, 2004; SPRINGER *et al*, 2014). Dessa forma, é possível avaliar a viabilidade celular na presença de compostos-teste, ou a citotoxicidade desses compostos, por um método rápido e sensível (SPRINGER *et al*, 2014).

O açaí possui vários compostos antioxidantes, como flavonóides, que são assinalados como responsáveis pela citotoxicidade em células neoplásicas, principalmente em doses altas. Juntamente com as antocianinas, esses compostos são importantes na prevenção do câncer por inibirem o crescimento celular, como visto em frutas como mirtilo, morango e framboesa (KATSUBE *et al*, 2003; HOGAN *et al*, 2010).

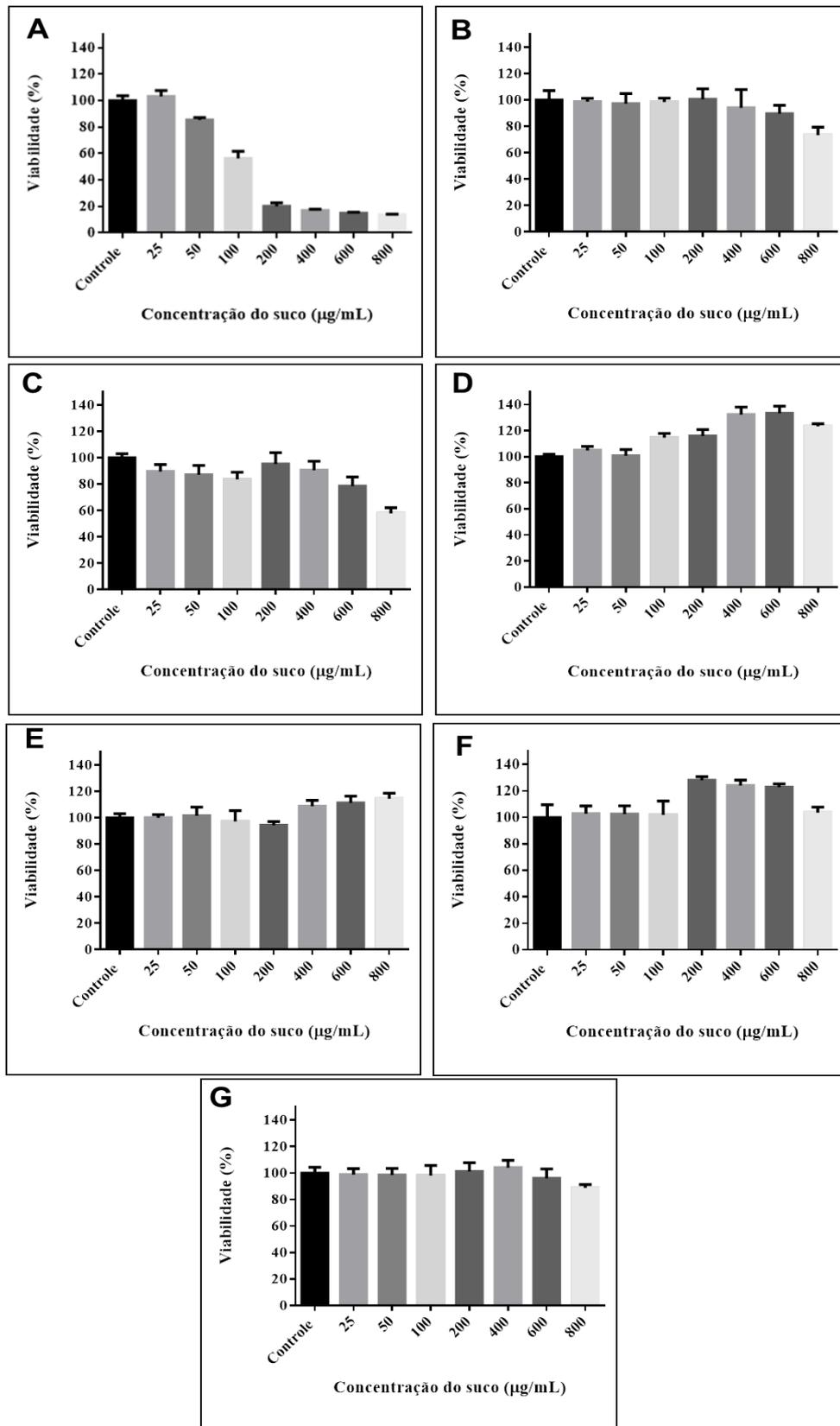


Figura 14: Viabilidade celular da linhagem MES-SA/DX após 72 horas de exposição ao suco de açaí (A), buriti (B), camu-camu (C), cubiu (D), cupuaçu (E), jenipapo (F), e taperebá (G)

Hogan e colaboradores (2010) verificaram a atividade anti-proliferativa do extrato de açai em células de glioma do cérebro de rato (C6), que poderia ser explicada pelo alto teor de antocianinas. No entanto, ao utilizar extratos de outras frutas que também apresentam alto teor de antocianinas, como mirtilo, morango, framboesa e amora, nas mesmas células, verificou-se que nenhum desses extratos inibiu a proliferação dessas células. Dessa forma, é pouco provável que as antocianinas presente no açai sejam as responsáveis pela inibição do crescimento das células de glioma do cérebro.

Assim como ocorreu com as células de glioma do cérebro, o suco de açai também inibiu o crescimento das células neoplásicas MES-SA/DX. No entanto, não foi possível determinar se essa atividade com a linhagem estudada é decorrente da presença de polifenóis, ou de outro mecanismo. Dessa forma, pesquisas adicionais são necessárias para investigar o mecanismo, e caracterizar as estruturas químicas que contribuem para a capacidade antiproliferativa.

No presente estudo, a realização da viabilidade celular foi indispensável para determinação da concentração dos sucos necessária no ensaio de inibição do efluxo de rodamina. Sendo assim, esses sucos podem ter suas atividades avaliadas seguramente sobre as células, sem determinar danos a elas, considerando-se as concentrações propostas no ensaio.

#### **5.4 Inibição do efluxo de rodamina pela P-gP**

Após a análise do ensaio de viabilidade celular, a concentração determinada para o ensaio de efluxo de rodamina foi de 50 µg/mL para o suco de açai, e 300 µg/mL para os sucos de buriti, camu-camu, cubiu, cupuaçu, jenipapo e taperebá. Analisando a Figura 15, pode-se verificar que os sucos de todas as frutas estudadas apresentaram perfil semelhante ao controle MES-SA/DX, sugerindo que os sucos não apresentam atividade inibitória da P-gP, pois o

resíduo de rodamina não permaneceu dentro da célula. Vale ressaltar que um estudo piloto utilizando a concentração de 50 µg/mL e, também, de 600 µg/mL para todos os sucos, apresentou o mesmo resultado, não havendo diferença com a utilização de concentrações menores ou maiores.

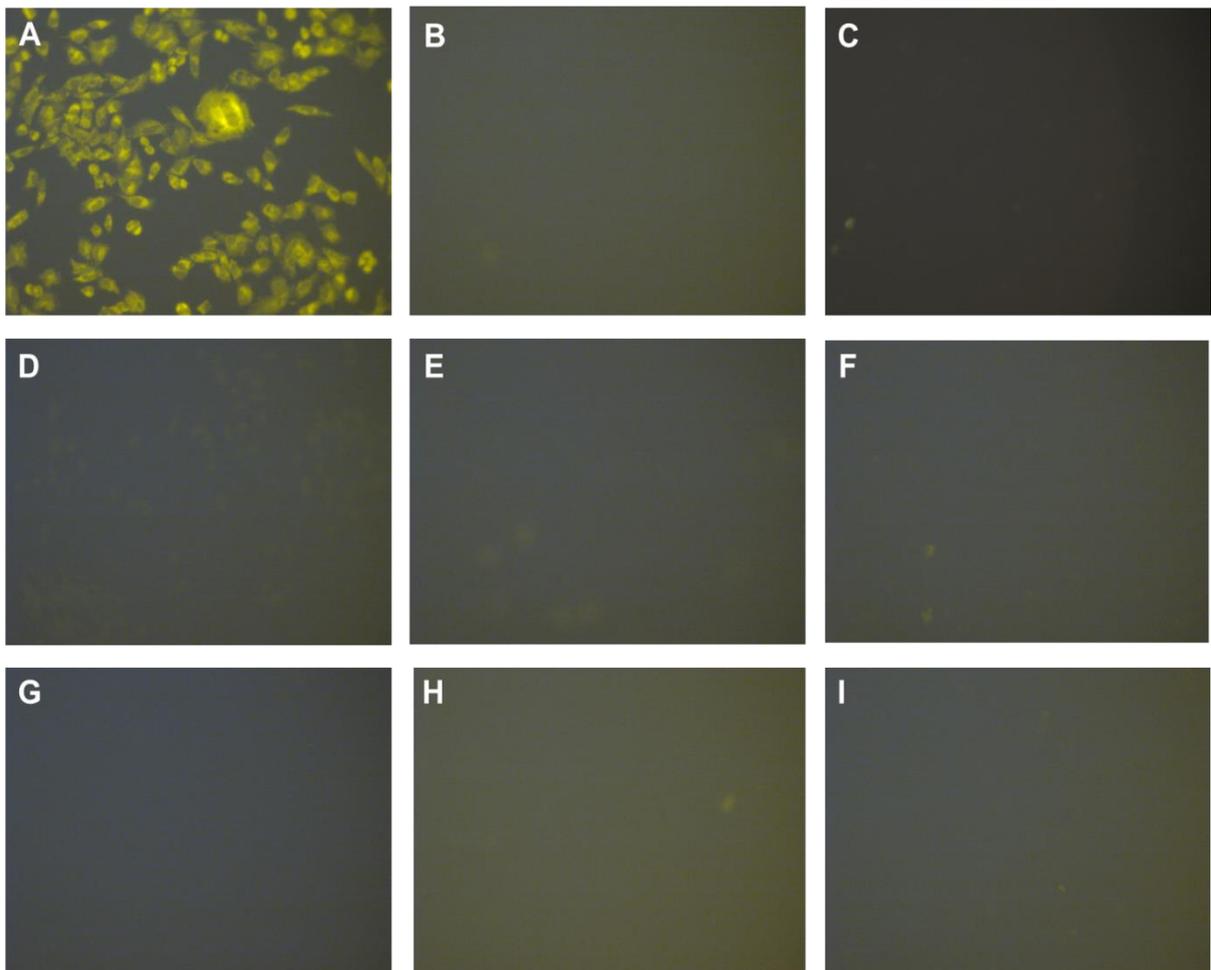


Figura 15: Efeito dos sucos sobre a P-gP expressa nas células MES-SA/DX: imunofluorescência (20x). Controle MES-SA sensível (A), controle MES-SA/DX (B), açai (C), buriti (D), camu-camu (E), cubiu (F), cupuaçu (G), jenipapo (H), e taperebá (I)

As células MES-SA (sensíveis a drogas) não apresentam o mecanismo de resistência a múltiplas drogas, como ocorre com a linhagem MES-SA/DX (resistente à doxorubicina). Essas células resistentes apresentam elevada expressão de P-gP na sua membrana, que permite o efluxo de substâncias para fora da célula. A rodamina 123 é um corante que se liga às membranas da mitocôndria, emitindo uma fluorescência intracelular na cor verde (HUBER

*et al*, 2010; ROOMI *et al*, 2011). Nas células sensíveis, que não apresentam elevada expressão da bomba de efluxo, o resíduo de rodamina entra nas células e permanece lá dentro, emitindo fluorescência. Já nas células resistentes, o resíduo de rodamina é expulso para fora da célula, assim como ocorre com fármacos antineoplásicos (HUBER *et al*, 2010).

Um importante mecanismo de resistência a agentes quimioterápicos ocorre pela super expressão de P-gP nas células neoplásicas. Estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos presentes nas plantas, incluindo vegetais e frutas, têm atividade anticancerígena e, também, podem modular a atividade da P-gP (ROOMI *et al*, 2011).

Ofer e colaboradores (2005) verificaram que flavonoides, como quercetina, rutina, nariginina, e outros, são capazes de interferir com os processos de transporte de membrana. Todavia, embora o suco de açaí, camu-camu e buriti tenham apresentado teor de fenóis totais superior ao dos outros sucos testados, no contexto desse experimento, esses compostos não foram capazes de inibir a P-gP.

O resultado encontrado para o suco de cupuaçu neste experimento não corroborou com o resultado evidenciado no ensaio com a P-gP recombinante, ou seja, não é possível afirmar se realmente houve inibição da proteína por esse suco. A discrepância nesse resultado pode ser explicado porque o suco usado nos dois ensaios foi diferente. No presente experimento, utilizou-se o suco liofilizado. Já no experimento com a P-gP recombinante, utilizou-se o suco sem ser liofilizado. Dessa forma, estudos posteriores, utilizando outras metodologias, são necessários para confirmar essa informação.

### **5.5 Atividade inibitória dos sucos sobre a CYP3A4 humana recombinante**

De acordo com a Figura 16, o suco de açaí apresentou  $91,3\% \pm 3,8$  de inibição da CYP3A4, sendo superior ao padrão cetoconazol ( $84,1\% \pm 1,9$ ). O suco de jenipapo inibiu

89,9%  $\pm$  1,8 da enzima, seguido do suco de cubiu (85,7%  $\pm$  1,1), e cupuaçu (72,2%  $\pm$  1,5). Não foi possível avaliar a inibição dos sucos de buriti, camu-camu e taperebá, pois os resultados apresentaram-se inconclusivos devido a grande dispersão obtida nos resultados (desvio padrão > 15%), apesar da repetição dos experimentos.

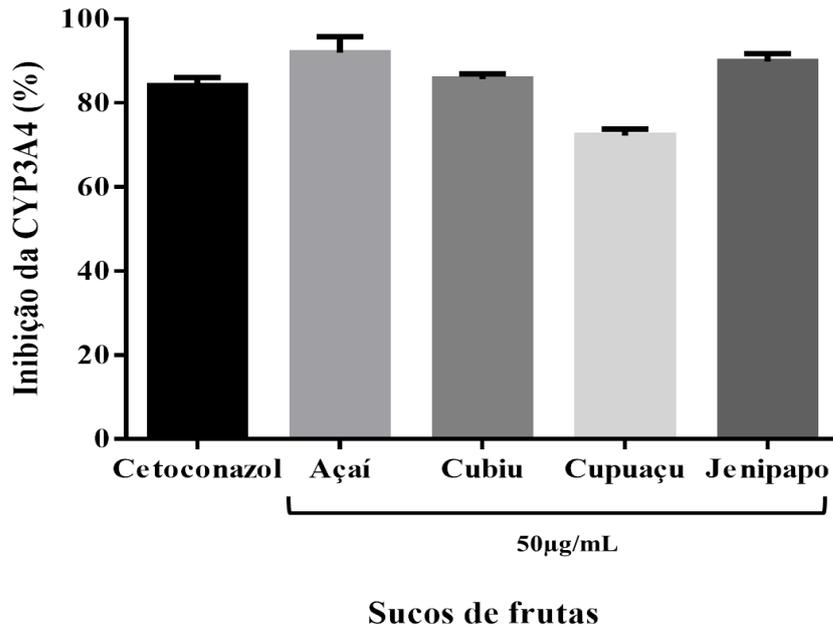


Figura 16: Atividade inibitória dos sucos de frutas amazônicas sobre a CYP3A4

Segundo a descrição do fabricante, o método emprega detecção por luminescência utilizando um substrato luminogênico derivado de luciferina de vagalume, que não reage com a luciferase, mas é convertido em produto de luciferina pela CYP3A4, que reage com um reagente de detecção de luciferina e produz luz. O ensaio é de simples execução, permitindo a análise de muitas amostras ao mesmo tempo; tem alta sensibilidade, necessitando de menos enzima do que em outras metodologias; e elimina a necessidade de ensaios demorados, sendo de rápida execução.

Todavia, assim como ocorreu no ensaio da P-gP recombinante, o ensaio apresentou-se sem reprodutibilidade, e mesmo utilizando a filtração dos sucos no preparo das amostras, a

limitação persistiu, sendo confirmada por testes piloto com substâncias isoladas. Dessa forma, foi possível avaliar, apenas, os sucos de açaí, cubiu, cupuaçu e jenipapo.

Como já relatado anteriormente, o estudo de interações medicamentosas envolvendo produtos naturais envolve uma série de complicações, e cada tipo de investigação tem suas vantagens e limitações. Além das inconsistências de resultados entre ensaios *in vitro* e *in vivo*, nem sempre experimentos em animais reproduzem o que acontece em humanos (GURLEY, 2012). Outra razão para essa diferença de achados ocorre pela falta de absorção *in vivo* dos compostos responsáveis pela atividade *in vitro* (SPROUSE & BREEMEN, 2016).

Apesar das limitações dos métodos *in vitro*, compostos fitoquímicos podem ser identificados como potenciais inibidores ou indutores enzimáticos, auxiliando na previsão de algumas interações medicamentosas significativas (GURLEY, 2012; SPROUSE & BREEMEN, 2016). Avaliando as interações de polifenóis sobre a atividade das enzimas do citocromo P450, Korobkova (2015) observou que muitos flavonóides podem modular a atividade da CYP3A4, CYP2C9 e CYP1A2 e, assim, interferir com o metabolismo de fármacos.

No contexto do presente experimento, a inibição da CYP3A4 pelos sucos de cubiu, cupuaçu e jenipapo parece não ter sido ocasionada pelos compostos polifenólicos. Já o suco de açaí, que apresentou a maior porcentagem de inibição da mesma enzima, teve uma relação positiva entre o teor de polifenóis e atividade inibitória. Entretanto, não podemos confirmar que os polifenóis atuantes no estudo são os responsáveis pela inibição da CYP3A4, sendo necessários estudos que avaliem esses compostos individualmente frente à atividade da CYP3A4.

## 5.6 Atividade inibitória dos sucos sobre a CYP3A4 utilizando microsomas de fígado humano

### 5.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A metodologia analítica de separação e quantificação do 1-hidroimidazolam (HMDZ) foi desenvolvida utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD) no modo fase reversa. Como pode ser observado no cromatograma da Figura 17, o tempo de análise total foi de 15 minutos, com o HMDZ, o MDZ (midazolam) e o PI possuindo tempos de retenção de 6,2, 9,6 e 11,8 minutos, respectivamente.

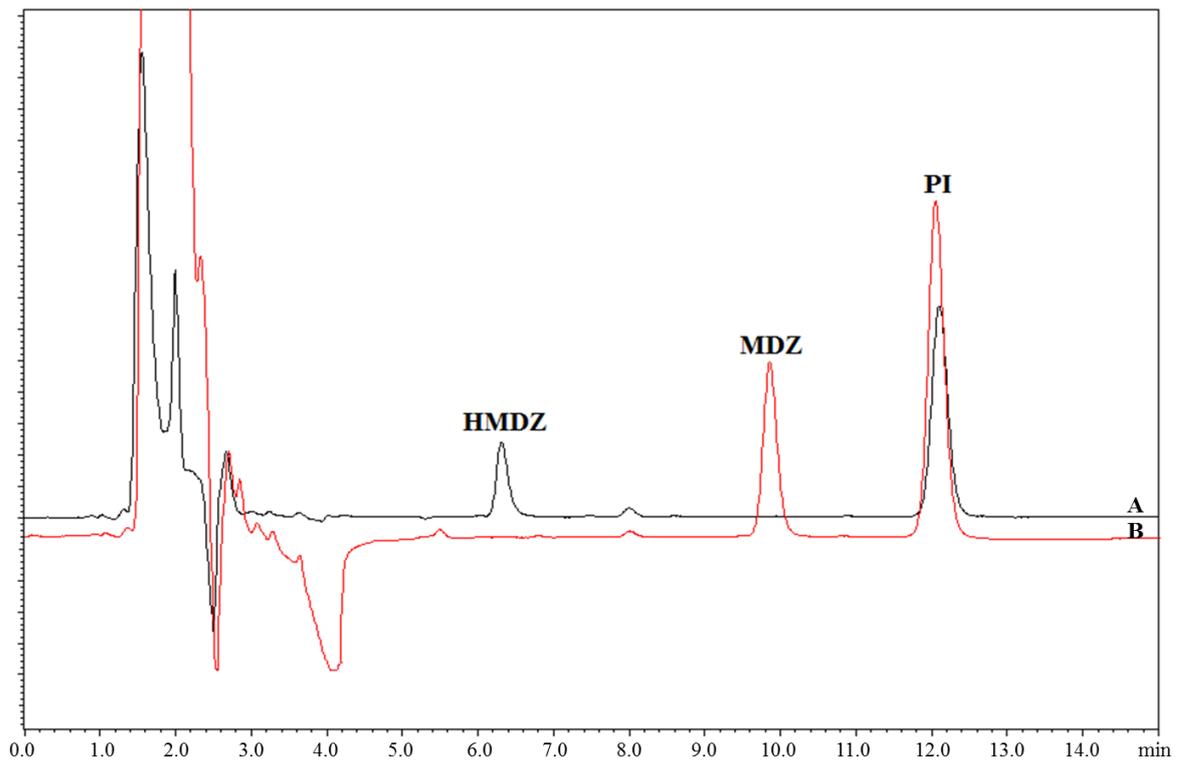


Figura 17: Cromatograma da análise do HMDZ por HPLC-DAD em (A) 260 nm e em (B) 239 nm. 1-hidroimidazolam (HMDZ), midazolam (MDZ), diazepam (PI)

### 5.6.2 Otimização das condições do metabolismo

Em estudos enzimáticos é necessário assegurar que todas as reações ocorram em condições de  $V_0$ , que é a velocidade inicial da reação enzimática. Essa velocidade corresponde a uma diminuição linear da concentração do substrato em relação à concentração de proteína e ao tempo de incubação (NELSON & COX, 2014). Na condição de  $V_0$ , menos de 20% do substrato deve ser consumido, garantindo assim uma concentração de substrato praticamente constante durante a reação (BEZERRA *et al*, 2013).

As condições de  $V_0$  foram determinadas utilizando três concentrações de midazolam no meio microsomal, sendo 1 (baixa), 50 (média) e 100  $\mu\text{M}$  (alta); concentração proteica microsomal de 0,1mg/mL; e tempo de incubação de 10 minutos. Analisando a Tabela 4 é possível observar que a concentração proteica e o tempo de reação foram adequados para os estudos, pois a depleção do substrato foi menor que 20% em todas as concentrações do midazolam.

Concentração de MDZ ( $\mu\text{M}$ )	Depleção de MDZ (%)
1	14
50	2
100	2

Tabela 4: Avaliação do percentual de depleção do MDZ na concentração proteica de 0,1 mg/mL e no tempo de incubação de 10 minutos, empregando microsomas hepáticos humanos.

### 5.6.3 Cinética enzimática

A cinética enzimática do midazolam empregando microsomas hepáticos humanos foi avaliada utilizando as condições de concentração proteica e tempo de incubação citadas anteriormente, e a concentração do substrato foi variada no intervalo entre 1 – 350  $\mu\text{M}$ . A

Figura 18 apresenta o gráfico da velocidade inicial da reação enzimática ( $V_0$ ) versus a concentração do midazolam.

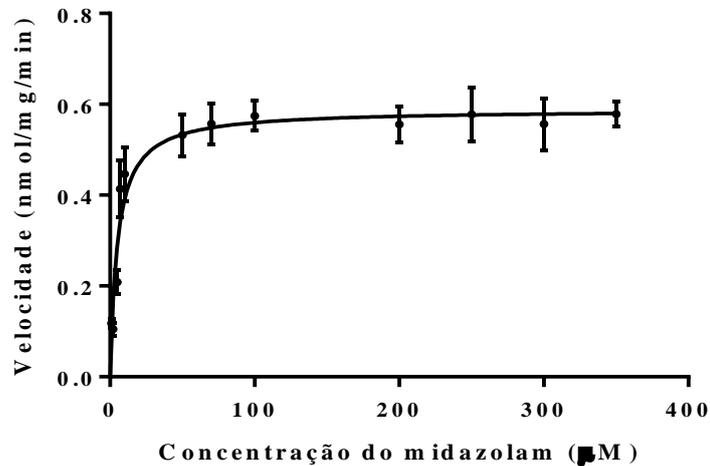


Figura 18: Cinética enzimática michaeliana do metabolismo do midazolam pela enzima CYP3A4 empregando microsomas hepáticos humanos

O comportamento observado do midazolam foi característico do modelo de Michaelis-Menten, frequentemente utilizado para descrever comportamentos cinéticos de enzima. O valor de  $K_m$  obtido foi de  $5,41 \pm 0,58 \mu\text{M}$ , que está dentro do intervalo aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) de  $1-14 \mu\text{M}$ , e o valor de  $V_{\text{max}}$  foi de  $0,581 \pm 0,011 \text{ nmol/mg proteína/min}$ . Esses parâmetros foram determinados para serem empregados no estudo de inibição enzimática.

Na bioquímica, a cinética de Michaelis-Menten é um dos modelos mais simples e importantes para a cinética enzimática (KIRTHIGA & RAJENDRAN, 2015). Esse modelo é representado por uma equação de velocidade em que a reação é catalisada por uma enzima que tem afinidade por um único substrato:

$$v = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Equação 3

em que,  $v$  – velocidade da reação enzimática,  $V_{max}$  – velocidade máxima da reação enzimática,  $[S]$  – concentração de substrato e  $K_m$  – constante de Michaelis-Menten (concentração de substrato na qual  $V_0$  é igual a metade de  $V_{max}$ ).

No modelo de Michaelis-Menten, em concentrações baixas, a velocidade da reação varia praticamente de forma linear com a concentração de substrato. Conforme a concentração vai aumentando, sendo superior ao valor de  $K_m$ , a enzima atinge a saturação, e a velocidade da reação passa a não ser mais significativamente influenciada por aumentos na concentração de substrato (SEIBERT & TRACY, 2014).

#### 5.6.4 Inibição enzimática

Os resultados da inibição da CYP3A4 humana por sucos de frutas amazônicas são encontrados na Figura 19. Entre os sucos de frutas testados, os sucos de açaí, buriti, camucamu, cubiu e taperebá demonstraram a inibição mais potente, pois causou a inibição do metabolismo do midazolam em 1-hidroximidazolam de 100%, ou seja, a atividade remanescente da CYP3A4 foi de 0%. A atividade remanescente da CYP3A4 na presença do suco de carambola, utilizado no ensaio como controle positivo, foi de 20%, enquanto no suco de cupuaçu foi 44,2% e do jenipapo, 54,3%.

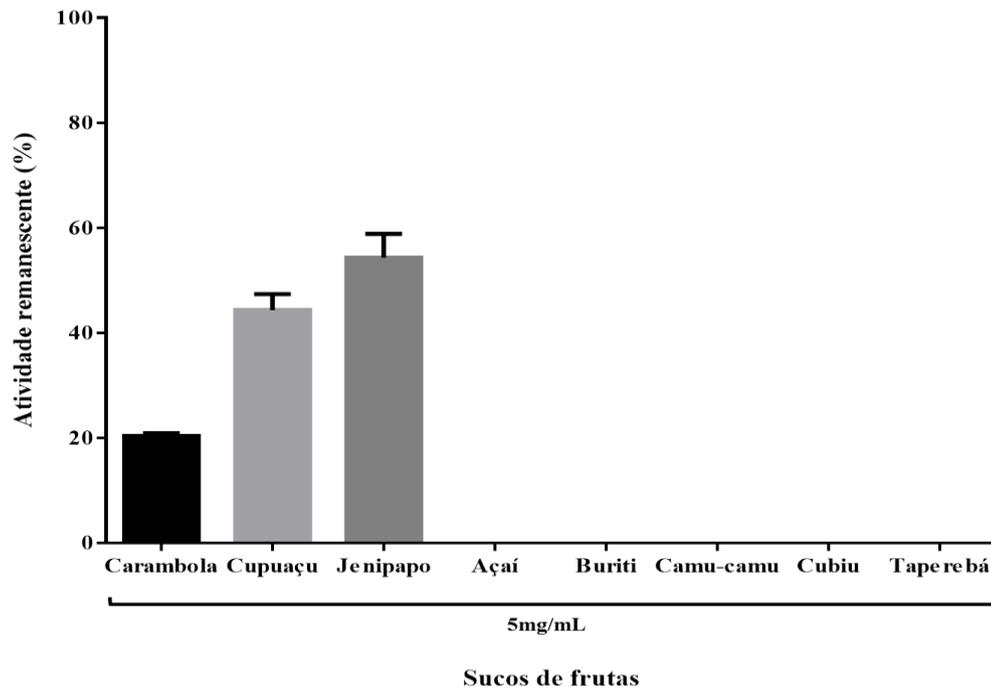


Figura 19: Atividade remanescente da CYP3A4 na presença do padrão suco de carambola e dos sucos de frutas amazônicas

Os microsossomas hepáticos representam o modelo mais utilizado em estudos de metabolismo *in vitro*, e conseqüentemente na avaliação de interação medicamentosa por inibição ou indução das enzimas. Eles consistem em fragmentos de retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, obtidos por centrifugação diferencial do fígado. A utilização de microsossomas permite uma metodologia de baixo custo, simples e bem caracterizada (MOREIRA, 2013).

Apesar das complicações presentes no ensaio da CYP3A4 recombinante, o estudo com os microsossomas apresentou resultado semelhante. A inibição da enzima pelos sucos de cupuaçu e jenipapo ocorreu em menor intensidade, mas confirmou o resultado anterior. Os sucos de açaí e cubiu também inibiram a CYP3A4, como já havia sido observado previamente.

Sprouse & Breemen (2016) fizeram uma lista de espécies popularmente utilizadas que ainda não possuem dados pré-clínicos ou clínicos de interação medicamentosa relatados.

Entre essas espécies está o açaí, fruta amazônica muito consumida no Brasil, e até em outros países.

Esse resultado inédito da inibição da CYP3A4 pelos sucos de açaí, buriti, camu-camu, cubiu e taperebá pode ser comparado ao de outras frutas descritas na literatura. No estudo de Hidaka e colaboradores (2004), o suco de carambola promoveu a atividade remanescente da CYP3A4 em 0% no maior volume utilizado no ensaio. Além da carambola e da toranja, a romã (HIDAKA *et al*, 2005) também causou a atividade remanescente da CYP3A4 em 0% no maior volume utilizado no estudo. A amora e a uva selvagem (KIM *et al*, 2006) também apresentam atividade inibitória potente.

Os compostos polifenólicos furanocumarínicos bergamotina, 6,7-diidroxibergamotina e paradisina presentes na toranja (GIRENNAVAR *et al*, 2006; GIRENNAVAR *et al*, 2007), bem como os estereoisômeros de procianidina B1 e B2 e/ou catequina/epicatequina encontrados na carambola (HOSOI *et al*, 2008) são sugeridos como os responsáveis pela inibição da CYP3A4.

Devido ao potencial de inibição enzimática pelos polifenóis, a alta concentração desses compostos no suco de açaí pode estar relacionada à inibição da CYP3A4. No entanto, estudos de isolamento e identificação desses constituintes, e a repetição do ensaio de inibição enzimática são necessários para confirmação dessa informação. Já a inibição da CYP3A4 pelos outros sucos testados parece não ter relação com o teor de polifenóis, mas essa informação também deve ser confirmada.

Por fim, é possível prever que elevadas quantidades desses sucos amazônicos podem interagir com medicamentos metabolizados pela CYP3A4. No entanto, uma vez que o efeito inibitório *in vitro* não representa necessariamente o que pode ocorrer *in vivo*, estudos adicionais são necessários para investigar a relevância clínica da interação desses sucos com a CYP3A4 *in vivo*.

## **CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

Dentre as amostras testadas, o suco de açaí apresentou o maior teor de polifenóis totais, bem como de flavonóides, seguido dos sucos de camu-camu e buriti.

Nos modelos moleculares, utilizando proteínas recombinantes, foi possível inferir que o suco de cupuaçu possui atividade inibitória sobre a P-gP. No entanto, no modelo celular, utilizando a linhagem MES-SA/DX, nenhum dos sucos estudados apresentou capacidade inibitória para P-gP.

Os sucos de açaí, cubiu, cupuaçu e jenipapo demonstraram a capacidade de inibir a CYP3A4 com o modelo da enzima recombinante. No estudo empregando microssomas hepáticos humano, foi possível sugerir que os sucos de açaí, buriti, camu-camu, cubiu e taperebá possuem significativa ação inibitória sobre a CYP3A4.

De um modo geral, os resultados do presente neste estudo *in vitro* corroboram para que esses sucos sejam candidatos a estudos de isolamento dos compostos responsáveis pela atividade inibitória da CYP3A4. Além disso, abrem novas perspectivas para estudos de interação medicamentosa com esses sucos *in vivo*.

## **REFERÊNCIAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. L. S.; GUEDES, I.; JUNIOR, P. A.; MOREIRA, S. G. C.; NETO, N. M. B.; CORREA, D. S. C.; ZILIO, S. C. Characterization of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n. 6, p. 1113-1117, 2005.

ANDERLE, P.; HUANG, Y.; SADEE, W. Intestinal membrane transport of drugs and nutrients: genomics of membrane transporters using expression microarrays. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, p. 17–24, 2004.

ANGELO, P. M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ARCHELA, E.; ANTONIA, H. D. Determinação de compostos fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, n. 2, p. 193-210, jul/dez, 2013.

BAGATTOLI, P. C. D. **Perfil fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante e citotóxica de alguns frutos e sementes encontrados na flora catarinense**. 2013. 119 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí - Santa Catarina.

BEZERRA, R. M. F.; FRAGA, I.; DIAS, A. A. Utilization of integrated Michaelis-Menten equations for enzyme inhibition diagnosis and determination of kinetic constants using Solver supplement of Microsoft Office Excel. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 26-31, 2013.

BICAS, J. L.; MOLINA, G.; DIONÍSIO, A. P.; BARROS, F. F. C.; WAGNER, R.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 1843–1855, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria colegiada. Guia para provas de bioequivalência de medicamentos genéricos. Resolução número 478, de 19 de março de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Uso racional de medicamentos: temas selecionados. Brasília, 2012.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman: manual de farmacologia e terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.; Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5195–5200, 2004.

BORGES, Graciele da Silva Campelo. **Determinação de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante das diferentes frações dos frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.) cultivados no estado de Santa Catarina**. 2013. 165 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Santa Catarina.

BOULLATA, J. I.; HUDSON, L. M. Drug–nutrient interactions: A broad view with implications for practice. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 4, p. 506-517, 2012.

CÂNDIDO, T.L.N.; SILVA, M.R.; COSTA, T.S. A. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313–319, 2015.

CARVALHO, Elisabete B. de. Estudos da interação entre proteínas e taninos: influência da presença de polissacarídeos. Tese (Doutorado em Química). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2007.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHOUGNET, A.; STOESEL, C.; WOGGON, W. Design and synthesis of a new fluorescent probe for cytochrome P450 3A4 (CYP 3A4). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 3643–3645, 2003.

COHEN, K. DE O; MONTE, D. DE C; PAES, N. S.; RIBEIRO, S. I. Determinação de compostos antioxidantes nos frutos de camu-camu. Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 2010.

CORRIE, K.; HARDMAN, J. G. Mechanisms of drug interactions: pharmacodynamics and pharmacokinetics. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 15, p. 305-308, 2014.

COSTA, E. M. M. B.; OLIVEIRA, V.; PIMENTA, F. C. Citocromos P450 e biotransformação microbiana. **Revista de patologia tropical**, v. 33, n. 1, p. 21-31, 2004.

COSTA, J. R.; MITJA, D. Uso dos recursos vegetais por agricultores familiares de Manacapuru (AM). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 49-58, 2010.

COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 43, p. 1603–1606, 2010.

CRESPI, C. L.; STRESSER, D. M. Fluorometric screening for metabolism-based drug±drug interactions. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 325-331, 2000.

DAHAN, A.; ALTMAN, H. Food–drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability mechanism, extent and relevance. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 1–9, 2004.

FILIPSKI, E.; BERLAND, E.; OZTURK, N.; GUETTIER, C.; HORTS, G. T. J. H.; LEVI, F.; OKYAR, A. Optimization of irinotecan chronotherapy with P-glycoprotein inhibition. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 274, p. 471–479, 2014.

FRANCO, Y. O.; FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde em Revista**, v. 5, n. 9, p. 69-76, 2003.

FOGER, F.; SCHMITZ, T.; SCHNURCH, A. B. In vivo evaluation of an oral delivery system for P-gp substrates based on thiolated chitosan. **Biomaterials**, v. 27, p. 4250–4255, 2006.

FUJITA, K.; HIDAKA, M.; YAMASAKI, K.; TAKAMURA, N.; IWAKIRI, T.; OKUMURA, M.; KODAMA, H.; YAMAGUCHI, M.; IKENOUE, T.; ARIMORI, K. Inhibitory effects of citrus fruits on cytochrome P450 3A (CYP3A) activity in humans. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, n. 9, p. 1371–1373, 2003.

GALLI, E.; FEIJOO, L. Citocromo P-450 y su importancia clínica. **Revista de Neuro-Psiquiatría**, v. 65, p. 187-201, 2002.

GAO, L. N.; ZHANG, Y.; CUI, Y. L.; YAN, K. Evaluation of genipin on human cytochrome P450 isoenzymes and P-glycoprotein *in vitro*. **Fitoterapia**, v. 98, p. 130–136, 2014.

GARRIGUES, A.; NUGIER, J.; ORLOWSKI, S.; EZAN, E. A high-throughput screening microplate test for the interaction of drugs with P-glycoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 305, p. 106–114, 2002.

GIRENNAVAR B.; POULOSE, S. M.; JAYAPRAKASHA, G. K.; BHAT, N. G. B.; PATIL, B. S. Furocoumarins from grapefruit juice and their effect on human CYP 3A4 and CYP 1B1 isoenzymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 2606–2612, 2006.

GIRENNAVAR, B.; JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. Potent inhibition of human cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 isoenzymes by grapefruit juice and its furocoumarins. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, 2007.

GOMEZ, J. C. C.; REÁTEGUI, A. D. C. E.; FLORES, J. T.; SAAVEDRA, R. R.; RUIZ, M. C.; CORREA, S. A. I. Isolation of high-quality total RNA from leaves of *Myrciaria dubia* “camu camu”. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 527-538, 2013.

GURLEY, Bill J. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions (Part 1): Origins, Mechanisms, and the Impact of Botanical Dietary Supplements. **Planta Med**, v. 78, p. 1478–1489, 2012.

HAN, Y. L.; YU, H. L.; LI, D.; MENG, X. L.; ZHOU, Z. Y.; YU, Q.; ZHANG, X.; WANG, F. J.; GUO, C. Inhibitory effects of limonin on six human cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 1828–1833, 2011.

HERNANDES, L. C.; AISSA, A. F.; ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D. C.; RODRIGUES, E.; BATISTA, B. L.; JÚNIOR, F. B.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. In vivo assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. **Food Research International**, v.62, p. 121–127, 2014.

HIDAKA, M.; FUJITA, K. I.; OGIKUBO, T.; YAMASAKI, K.; IWAKIRI, T.; OKUMURA, M.; KODAMA, H.; ARIMORI, K. Potent inhibition by star fruit of human cytochrome P450 3A (CYP3A) activity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 6, p. 581–583, 2004.

HIDAKA, M., OKUMURA, M., FUJITA, K., OGIKUBO, T., YAMASAKI, K., IWAKIRI, T., et al. Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 3A (CYP3A) and carbamazepine pharmacokinetics in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 5, p. 644–648, 2005.

HIDAKA, M.; OKUMURA, M.; OGIKUBO, T.; KAI, H.; FUJITA, K. I.; IWAKIRI, T.; YAMASAKI, K.; SETOGUCHI, N.; MATSUNAGA, N.; ARIMO, K. Transient inhibition of CYP3A in rats by star fruit juice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 3, p. 343–345, 2006.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v.118, p. 208–214, 2010.

HOSOI, S.; SHIMIZU, E.; ARIMORI, K. OKUMURA, M.; HIDAKA, M.; YAMADA, M.; SAKUSHIMA, A. Analysis of CYP3A inhibitory components of star fruit (*Averrhoa carambola* L.) using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 345–348, 2008.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148-2154, 2010.

IWATA, H.; YAMAGUCHI, K.; TAKESHITA, Y.; KUBOTA, A.; HIRAKAWA, S.; ISOBE, T.; HIRANO, M.; KIM, E. Y. Enzymatic characterization of in vitro-expressed Baikal seal cytochrome P450 (CYP) 1A1, 1A2, and 1B1: Implication of low metabolic potential of CYP1A2 uniquely evolved in aquatic mammals. **Aquatic Toxicology**, v. 162, p. 138–151, 2015.

KANE, G. C.; LIPSKY, JAMES J. Drug-grapefruit juice interactions. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 75, p. 933-942, 2000.

KANG, J.; THAKALI, K. M.; XIE, C.; KONDO, M.; TONG, Y.; OU, B.; JENSEN, G.; MEDINA, M. B.; SCHAUSS, A.; WU, X. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v. 133, p. 671–677, 2012.

KATAOKA, M.; YOKOYAMA, T.; MASAOKA, Y.; SAKUMA, S.; YAMASHITA, S. Estimation of P-glycoprotein-mediated efflux in the oral absorption of P-gP substrate drugs from simultaneous analysis of drug dissolution and permeation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 544–551, 2011.

KIRTHIGA, O. M.; RAJENDRAN, L. Approximate analytical solution for non-linear reaction diffusion equations in a mono-enzymatic biosensor involving Michaelis–Menten kinetics. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 751, p. 119–127, 2015.

KIM, H.; YOON, Y. J.; SHON, J. H.; CHA, I. J.; SHIN, J. G.; LIU, K. H. Inhibitory effects of fruit juices on CYP3A activity. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 4, p. 521–523, 2006.

KORHONEN, L.E.; TURPEINEN, M.; RAHNASTO, M.; WITTEKINDT, C.; POSO, A.; PELKONEN, O.; RAUNIO, H.; JUVONEN, R. O. New potent and selective cytochrome

P450 2B6 (CYP2B6) inhibitors based on three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) analysis. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. 932–942, 2007.

KOROBKOVA, E. A. Effect of natural polyphenols on CYP metabolism: implications for diseases. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, p.1359–1390, 2015.

LAU, C.; MOOIMAN, K. D.; MASS-BAKKER; H.; BEIJNEN, J. H.; SCHELLENS, J. H. M.; MEIJERMAN, I. Effect of Chinese herbs on CYP3A4 activity and expression in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 2, p. 543-549, 2013.

LI, X.; HU, J.; WANG, B.; SHENG, L.; LIU, Z.; YANG, S.; LI, Y. Inhibitory effects of herbal constituents on P-glycoprotein in vitro and *in vivo*: Herb–drug interactions mediated via P-gP. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 275, p. 163–175, 2014.

MADGULA, V. L. M.; ALI, Z.; SMILLIE, T.; KHAN, I. A.; WALKER, L. A.; KHAN, S. Alkaloids and saponins as cytochrome P450 inhibitors from blue cohosh (*Caulophyllum thalictroides*) in *in vitro* assay. **Planta Medica**, v. 75, p. 329–332, 2009.

MALCHER, Ediluci do Socorro Leoncio Tostes. **Influência da sazonalidade sobre a composição química e atividade antioxidante do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. 2011. 207 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) - Universidade Federal do Amapá, Macapá - Amapá.

MANHÃES, L. R. T.; SABAA-SRUR, A. U. O. Centesimal composition and bioactive compounds in fruits of buriti collected in Pará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 4, p. 856-863, 2011.

MARCO, M. P. D.; EDWARDS, D. J.; WAINER, I. W.; DUCHARME, M. P. The effect of grapefruit juice and seville orange juice on the pharmacokinetics of dextromethorphan: The role of gut CYP3A and P-glycoprotein. **Life Sciences**, v. 71, p. 1149–1160, 2002.

MARKOWITZ, J. S.; ZHU, H.-J. Limitations of In Vitro Assessments of the Drug Interaction Potential of Botanical Supplements. **Planta Med**, v. 78, p. 1421–1427, 2012.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MARTINY, V. Y.; MITEVA, M. A. Advances in Molecular Modeling of Human Cytochrome P450 Polymorphism. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, p. 3978–3992, 2013.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 639 - 644, 2006.

MOOIMAN, K. D.; MASS-BAKKER, R. F.; HENDRIKX, J. J. M. A.; BANK, P. C. D.; ROSING, H.; BEIJNEN, J. H. B.; SCHELLENS, J. H. M.; MEIJERMAN, I. The effect of complementary and alternative medicines on CYP3A4-mediated metabolism of three different substrates: 7-benzyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin, midazolam and docetaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 865–874, 2014.

MOREIRA, Fernanda de Lima. **Estudo de metabolism in vitro do triterpeno pentacíclico amirina empregando microsomas hepáticos de ratos**. 2013. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - São Paulo.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, n. 204, p. 205-208, 1997.

NEVES, L. C.; SILVA, V. X.; PONTIS, J. A.; FLASH, A.; ROBERTO, S. R. Bioactive compounds and antioxidant activity in pre-harvest camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mc Vaugh] fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 186, p. 223–229, 2015.

NELSON, D. R.; KAMATAKI, T.; WAXMAN, D. J.; GUENGERICH, F.P.; ESTABROOK, R.W.; FEYEREISEN, R.; GONZALEZ, F. J.; COON, M. J.; GUNSALUS, I. C.; GOTOH, O.; OKUDA, K.; NEBERT, D. W. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. **DNA Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-51, 1993.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NGUYEN, M. A.; STAUBACH, P.; LANGGUTH, P. High-dose short-term administration of naringin did not alter talinolol pharmacokinetics in humans. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 36–42, 2015.

NUMA, I. A. N.; SILVA, L. B. C.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G.; MURAMOTO, M. T.; FERREIRA, J. E. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, p. 70–76, 2013.

OFER, M.; WOLFFRAM, S.; KOGGEL, A.; LANGGUTH, H. S.; LANGGUTH, P. Modulation of drug transport by selected flavonoids: Involvement of P-gp and OCT? **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 263–271, 2005.

OGA, S.; YASAKA, W. J.; JEN, L. H. A importância da glicoproteína P (P-gP) e dos polipeptídios transportadores de ânions orgânicos (OATP) nas interações medicamentosas. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 60, n. 3, p. 121-130, 2003.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, Karina Bora de. Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., Lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PACHECO, P.; PAZ, J. G. da P.; SILVA, C. O. da S.; PASCOAL, G. B. Composição centesimal, compostos bioativos e parâmetros físico-químicos do jenipapo (*Genipa americana* L.) in natura. **Demetra: alimentação, nutrição & saúde**, v. 9, n. 4, p. 1041-1054, 2014.

PALENCIA, L. A. P.; DUNCAN, C. E., TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial acai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1199–1205, 2009.

PINTO, Carlos Enrique Daniel Lopez. **Produção e qualidade do fruto de camu-camu sob efeito de adubação orgânica e mineral no município de Presidente Figueiredo-AM**. 2011. 48 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus - Amazonas.

QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Volatile compounds of copoazu (*Theobroma grandiflorum* Schumann) fruit. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1123–1126, 2007.

RABELO, Afonso. Frutos nativos da Amazônia: comercializados nas feiras de Manaus – AM. Manaus: INPA, 2012.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REZENDE, C.M.; FRAGA, S.R.G. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 425-428, 2003.

RIBEIRO, M. O.; GOMES, M. da S.; SENNA, S. G.; ROSETTI, M. L. R.; FONSECA, L. de S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 30, n. 4, jul/ago, 2004.

RODRÍGUEZ-FRAGOSO, L., MARTÍNEZ-ARISMENDI, J. L., OROZCO-BUSTOS, D., REYES-ESPARZA, J., TORRES, E.; BURCHIEL, S. W. Potential risks resulting from fruit/vegetable–drug interactions: effects on drug-metabolizing enzymes and drug transporters. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 112–124, 2011.

ROOMI, M.W.; KALINOVSKY, T.; ROOMI, N.W.; RATH, M.; NIEDZWIECK, A. Anticancer effects of a specific mixture of nutrients in the multidrug-resistant human uterine sarcoma MES-SA/Dx5 and the drug-sensitive MES-SA cell lines. **Oncoly Reports**, 2011.

RUIZ, M. H.; ZAMILPA, A.; CORTAZAR, M. G.; CHILPA, R. R.; LEONC, E.; GARCIA, M. P.; TORTORIELLO, J. ; REYES, M. H. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1255– 1261, 2011.

SÁ, P. G. S. de; GUIMARÃES, M. L.; OLIVEIRA, A. P. de; FILHO, J. A. de S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; ALMEIDA, J. R. G. da S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.

SANTOS, C. A.; BOULLATA, J. I. An approach to evaluating drug–nutrient interactions. **Pharmacotherapy**, v. 25, n. 12, p. 1789–1800, 2005.

SECOLI, S. R. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.35, n. 1, p. 28-34, 2001.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Different Enzyme Kinetic Models. **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism- Fundamentals and Applications**: Human Press. Cap. 3, p. 23- 35, 2014.

SHIRASAKA, Y., SHICHIRI, M., MORI, T., NAKANISHI, T., TAMAI, I. Major active components in grapefruit, orange, and apple juices responsible for OATP2B1- mediated drug interactions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 3418–3426, 2013.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SILVA, C. V.; BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J. Fracionamento e germinação de sementes de Eugenia. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 27, n. 1, p.86-92, 2005.

SILVADO, Carlos. Farmacogenética e antiepilépticos (farmacologia das drogas antiepilépticas: da teoria à prática). **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, p. 51-56, 2008.

SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. J. M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

SOUSA, M. de M.; SILVA, H. R. e; JUNIOR, G. M. V.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, C. D.; BARROS, C. E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, Rodrigo Aparecido Moraes de. **Qualidade de polpa de camu-camu [*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh], submetidas ao processo de congelamento, pasteurização, alta pressão hidrostática e liofilização e armazenada por quatro meses**. 2011. 11 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba - São Paulo.

SPINA, E.; PISANI, F.; LEON, J. de. Clinically significant pharmacokinetic drug interactions of antiepileptic drugs with new antidepressants and new antipsychotics. **Pharmacological Research**, v. 106, p. 72–86, 2016.

SPROUSE, A. A.; BREEMEN, R. B. Pharmacokinetic Interactions between drugs and botanical dietary supplements. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, p.162–171, February, 2016.

SPRINGER, J. C. In vitro dermal and epidermal cellular response to titanium alloy implants fabricated with electron beam melting, **Journal Medical Engineering & Physics**, v. 36, n.10, p. 1367-72, 2014.

TARANTINO, G.; MINNO, M. N. D. D.; CAPONE, D. Drug-induced liver injury: Is it somehow foreseeable? **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 23, p. 2817-2833, 2009.

TIBURSKI, J. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. **Food Research International**, v. 44, p. 2326–2331, 2011.

VARGAS, P. N.; HOELZEL, S. C.; ROSA, C. S. da. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p. 11-15, jan./mar., 2008.

VIANA, E. S.; JESUS, J. L.; REIS, R. C.; FONSECA, M. D.; SACRAMENTO, C. K. Caracterização físico-química e sensorial de geleia de mamão com araçá-boi. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 4, p. 1154-1164, 2012.

VIEIRA, M. C.; TEIXEIRA, A. A.; SILVA, C. L. M. Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuacu (*Theobroma grandiorum*) néctar. **Journal of Food Engineering**, v. 43, p. 1-7, 2000.

WERLE, M.; HOFFER, M. Glutathione and thiolated chitosan inhibit multidrug resistance P-glycoprotein activity in excised small intestine. **Journal of Controlled Release**, v. 111, p. 41–46, 2006.

WON, C. S; OBERLIES, N. H, PAINE, M. F. Mechanisms underlying food–drug interactions: Inhibition of intestinal metabolism and transport. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 136, p. 186–201, 2012.

WOISKY, R.G. **Métodos de Controle Químico de Amostras de Própolis**. 1996. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo - São Paulo.

YUYAMA, L. K. O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J. P. L.; RISONILCE, F. S. Biodisponibilidade dos carotenoides do buriti (*Mauritia flexuosa* L.) em ratos. **Acta Amazônica**, v. 28, n. 4, p. 409-15, 1998.

YUYAMA, L. K. O. et al. Estudo da influência do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) sobre a concentração sérica de glicose. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 232-236, 2005.

YUYAMA, L. K. O.; PANTOJA, L.; MAEDA, R. N.; AGUIAR, J. P.; SILVA, S. B. da S. Desenvolvimento e aceitabilidade de geleia dietética de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 28, n. 4, out/dez, 2008.

YUYAMA, K.; YAYAMA, L. K. O.; VALENTE, J. P.; SILVA, A. C.; AGUIAR, J. P.L.; FLORES, W. B. C.; LIMA, C. G. B. C. Camu-camu. Jaboticabal: FUNEP, p.50, 2010.

YUYAMA, Kaoru. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, 2011A.

YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; FILHO, D. F. S.; YUYAMA, K.; VAREJÃO, M. de J.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. A.; PIMENTEL, S. A.; CARUSO, M. S. F. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 41, n. 4, 2011B.

YIN, O. Q. P.; GALLAGHER, N.; LI, A. ZHOU, W.; HARRELL, R.; SCHRAN. Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of nilotinib in healthy participants. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 50, p. 188-194, 2010.

ZHANG, J.; LIU, Y.; CHENG, J.; LI, W.; MA, H., LIU, H.; SUN, J.; WANG, L.; HE, Y. WANG, Y.; WANG, Z. YANG, L. Inhibition of human liver cytochrome P450 by star fruit juice. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 4, p. 496-503, 2007.