

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

Chris Krebs Danilevicz

PREDIÇÃO DE INTERAÇÕES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO SECO DE
Maytenus ilicifolia

Porto Alegre

2020

Chris Krebs Danilevicz

PREDIÇÃO DE INTERAÇÕES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO SECO DE
Maytenus ilicifolia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Danilevicz, Chris Krebs
PREDIÇÃO DE INTERAÇÕES FARMACOLÓGICAS DO EXTRATO
SECO DE *Maytenus ilicifolia* / Chris Krebs Danilevicz.
-- 2020.
78 f.
Orientador: Ionara Rodrigues Siqueira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,
BR-RS, 2020.

1. espinheira-santa. 2. plantas medicinais. 3.
Interações medicamentosa. 4. CYP2D6. 5. dano celular.
I. Siqueira, Ionara Rodrigues, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dra. Ionara Rodrigues Siqueira, grande entusiasta de plantas medicinais, o meu sincero agradecimento pela confiança, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa. Parece que foi ontem, eu recém-chegada ao Departamento de Farmacologia ela com grande empatia prontamente me indagou em fazer mestrado, serei eternamente grata pela oportunidade! Espero ter atendido suas expectativas.

Obrigada as minhas queridas colegas de grupo de pesquisa Lolita, Silvia, Laura, Monique, Luana, Cledir, Fabiana, Catherina, pelos bons momentos que compartilhamos em experimentos de grupo, seminários, café e gargalhadas. Sílvia querida, sempre solícita e de uma gentileza admirável, obrigada pelo acolhimento no grupo. Loli querida, sem palavras para dizer o quanto foi bom te conhecer, muitos mates, conversas e *whatsapps*, me ajudou tanto nesse mestrado, desde a bancada, protocolos, na escrita desde trabalho e até mesmo nas tantas disciplinas. Te admiro muito e te levarei no coração para sempre.

A melhor equipe e torcida organizada, Família - Laurinha, Arlindo, Papis, Angelita, Tay, *Petit*, Toti e Nine, eu não existo sem vocês! Gratidão por todos os ensinamentos, valores e incentivo. Muito mais do que pais, mães, irmãs e irmão, vocês são meus grandes amigos, parceiros desta vida e de muitas outras, despertam o meu melhor. Muito obrigada por entenderem as muitas ausências que esta jornada demandou, amo vocês!

A minha dupla de todos os momentos meu amor Marquinho, que tem o dom de suavizar a vida, muito obrigada por entender as tantas e tantas ausências, quer seja em experimentos de 15 horas ou +, quer seja em finais de semana de estudos e redação. Certamente, sem seu apoio, compreensão e parceria esta trajetória teria sido mais árdua.

As minhas amigas incríveis Beatriz, Gisele, e Thaís, que tanto me inspiram e por mim torcem. Obrigada por todo apoio e compreensão nos momentos de ausência!

As farmacêuticas do meu coração, Carolina Ferreira e Daiane Lima que toparam embarcar junto nesta jornada. Desde a FACFAR, sempre a postos para ajudar no que for preciso, com palavras amiga e de incentivo, vocês moram no meu coração!

Muito obrigada master ao meu grande colega e amigo Maikel Oliveira, que tanto me ajudou para o desenvolvimento prático deste trabalho. Sempre disponível, madrugando comigo inúmeras vezes para se aventurar na bancada. Certamente sem sua ajuda incondicional este trabalho não teria sido concluído. Agradeço também pelas conversas, amizade e incentivo, desde assistir e ouvir minhas apresentações e por comemorar minhas conquistas.

A colega Ana Carolina Mello, sempre solícita e com muita presteza em me auxiliar nas tantas idas a bioquímica, muito obrigada.

As queridas Adriana Souza (Drika) e Fernanda Santos (Fezinha), pesquisadoras brilhantes e professoras natas, que tive o privilégio de conhecer e dividir muitos westerns blots, cafés e boa conversa. Simplificaram o meu mundo estatístico e tanto me ensinaram, despertando meu interesse nessas análises, serei eternamente grata!

As minhas colegas e amigas, Ieda Regina (Iedinha) e Marilisa Garcia, são meus presentes da UFRGS, não sei o que fiz para merecer, mas agradeço a Deus por terem cruzado nossos caminhos, me incentivaram muito a embarcar no mestrado e em momentos de dúvida não me deixarem declinar.

Agradeço ao PPG Farmacologia e Terapêutica pelos conhecimentos compartilhados e transmitidos.

Ao professor Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski, muito obrigada pelos ensinamentos e por sua disponibilidade em nos confiar seu laboratório.

Ao CNPQ por incentivar e apoiar pesquisas com plantas medicinais.

RESUMO

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, popularmente conhecida como espinheira-santa, é usada no manejo da dispepsia, como antiácido e protetor da mucosa gástrica. Nosso objetivo geral foi determinar o potencial de interação farmacocinética do extrato de *Maytenus ilicifolia* e compostos isolados utilizando fatias de fígado e intestino de ratos Wistar, especificamente, com enzimas de biotransformação de fase I (CYP2D6 e CYP3A4), além de estudar o impacto da incubação em ensaios de dano celular, a citar, redução da viabilidade celular e liberação de enzimas intracelulares no meio de incubação. O projeto foi aprovado pela CEUA/UFRGS. Os resultados *in vitro* foram usados para elaborar uma lista de fármacos com possível interação farmacológica. Foram utilizadas fatias de fígados e intestinos de ratos Wistar de 3 meses de idade. Estes tecidos foram incubados com 6 diferentes concentrações do extrato de *Maytenus ilicifolia* ou compostos isolados, catequina, epicatequina, kaempferol e quercetina, durante 6 horas. As atividades enzimáticas, lactato desidrogenase, transaminase glutâmico-pirúvica, glutâmico-oxalacética, fosfatase alcalina, CYP3A4 e CYP2D6, foram avaliadas utilizando kits comerciais. A viabilidade celular foi avaliada pela atividade mitocondrial utilizando o sal de tetrazólio MTT. A incubação de fatias de fígado com o extrato de *Maytenus ilicifolia* (30 e 100 µg/mL), a catequina (341 µM), a epicatequina (684 µM) e a quercetina (300 e 600 µM) parece induzir a enzima CYP2D6, enquanto que a atividade da CYP3A4 não foi alterada nas concentrações testadas. Embora a atividade mitocondrial, um índice de viabilidade celular, não tenha sido afetada, as atividades das enzimas intracelulares nos meios de incubação de fatias hepáticas aumentaram a liberação da lactato desidrogenase (LDH) nos tratamentos com o extrato de *M. ilicifolia* (100 µg/mL), kaempferol (698 µM) e quercetina (300 e 600 µM) e o conteúdo da transaminase oxalacética (TGO) foi aumentado nas incubações com o extrato *M. ilicifolia* (50 e 100 µg/mL) e a quercetina (600 µM). Nas condições testadas, as incubações não impactaram significativamente os parâmetros analisados em fatias de intestino. Estes resultados evidenciam o potencial de interação farmacológica do extrato da planta *Maytenus ilicifolia* e dos compostos isolados com a enzima CYP2D6, responsável pela metabolização de fármacos relevantes na terapêutica, indicando que o uso concomitante desta planta e fármacos metabolizados por esta enzima deva ser evitado. A elevação nos níveis das enzimas TGO e LDH sugere evidências de toxicidade ao tecido hepático, de tal forma que indivíduos com hepatopatia devem evitar o uso de *Maytenus ilicifolia*. Estes dados demonstram o potencial de interação farmacológica entre o extrato de *Maytenus ilicifolia* e fármacos metabolizados pelo sistema CYP2D6.

Palavras-chave: espinheira-santa, plantas medicinais, interação medicamentosa, CYP2D6, dano celular.

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek, also known as “espinheira-santa”, is administered for dyspepsia acting as an antacid and gastric mucous protector. Our aim was determining the pharmacokinetic interaction potential of *Maytenus ilicifolia* extract and its isolated compounds individually, using slices of liver and intestine from Wistar rats, specifically to evaluate the phase I biotransformation enzymes (CYP2D6 and CYP3A4). We also studied this extract and their isolated compounds on the cellular injury, such as cell viability (MTT) assay and intracellular enzymes release. Our in vitro results were used to elaborate a list of drugs with possible extension of pharmacological interaction in humans. The project was approved by the UFRGS Animal Experiment Committee. For this study, samples of liver and intestines from 3 months old Wistar rats were used. The tissues were incubated for six hours with different concentrations of *Maytenus ilicifolia* extract or isolated compounds such as, catequin, epicatequin, kaempferol and quercetin. The enzyme activity of lactate dehydrogenase (LDH), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), alkaline phosphatase, CPY3A4 and CYP2D6, were analysed using of commercial kits. The cellular viability was evaluated by the mitochondrial activity in the MTT assay. The in vitro incubation of liver slices with *Maytenus ilicifolia* extract (30 and 100 µg/mL), catequin (341 µg/mL), epicatequin (684 µM) or quercetin (300 and 600 µM) seems to induce CYP2D6, while CYP3A4 activity was not affected. Although the mitochondrial activity was not affected, the in vitro incubation of liver cells modified the release of intracellular enzyme, with *M. ilicifolia* extract (100 µg/mL), kaempferol (698 µM) and quercetin (300 e 600 µM) raising LDH levels, and, *M. ilicifolia* extract (50 e 100 µg/mL) and quercetin (600 µM) increasing GOT levels. Neither *Maytenus ilicifolia* extract nor isolated compounds individually impacted these intestines parameters. These results could bring the pharmacological interaction potential of the *Maytenus ilicifolia* extract or its isolated compounds with CYP2D6, indicating that these associations should be avoided. The release of intracellular enzymes GOT and LDH, suggests cellular injury on liver tissues, and consequently patients with hepatopathy should avoid *Maytenus ilicifolia* administration. These data show the pharmacological interaction potential between the *Maytenus ilicifolia* and CYP2D6 substrates.

Keywords: Espinheira-santa , herbal medicine, drug interaction, CYP2D6, cell injury.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i>	9
Figura 2. Esquema de obtenção das fatias de fígado e intestino	18
Figura 3. Esquema de incubação de fatias de fígado e intestino	20
Figura 4. Atividade mitocondrial de fatias de fígado - extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i>	25
Figura 5. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado - extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i>	25
Figura 6. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado - extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i>	26
Figura 7. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias hepáticas - extrato de <i>M. ilicifolia</i>	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 8. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias hepáticas - extrato de <i>M. ilicifolia</i>	27
Figura 9. Atividade da TGO no meio de incubação de fatias hepáticas - extrato de <i>M. ilicifolia</i>	27
Figura 10. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias hepáticas - extrato de <i>M. ilicifolia</i>	28
Figura 11. Atividade mitocondrial de fatias de fígado - catequina.	29
Figura 12. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado - catequina.....	30
Figura 13. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado - catequina.....	30
Figura 14. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias hepáticas - catequina.....	31
Figura 15. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias hepáticas - catequina.....	31
Figura 16. Atividade da TGO no meio de incubação de fatias hepáticas - catequina.	32
Figura 17. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias hepáticas - catequina.....	32
Figura 18. Atividade mitocondrial de fatias de fígado - epicatequina.	33
Figura 19. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado - epicatequina.....	34
Figura 20. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado - epicatequina.....	34
Figura 21. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias hepáticas - epicatequina.....	35
Figura 22. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias hepáticas - epicatequina	35
Figura 23. Atividade da TGO no meio de incubação de fatias hepáticas - epicatequina	36
Figura 24. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias hepáticas - epicatequina.....	36
Figura 25. Atividade mitocondrial de fatias de fígado - kaempferol	37
Figura 26. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado - kaempferol.....	38
Figura 27. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado - kaempferol.....	38
Figura 28. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias hepáticas - kaempferol.....	39
Figura 29. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias hepáticas - kaempferol	39
Figura 30. Atividade da TGO no meio de incubação de fatias hepáticas - kaempferol	40
Figura 31. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias hepáticas - kaempferol.....	40
Figura 32. Atividade mitocondrial de fatias de fígado - quercetina.....	41
Figura 33. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado - quercetina	42
Figura 34. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado - quercetina.	43
Figura 35. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias hepáticas - quercetina	43
Figura 36. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias hepáticas - quercetina.....	43
Figura 37. Atividade da TGO no meio de incubação de fatias hepáticas - quercetina.....	44
Figura 38. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias hepáticas - quercetina	44
Tabela 1. Resumo dos resultados das incubações com fatias de fígado de ratos.	45
Figura 39. Atividade mitocondrial de fatias de intestino - extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i>	46

Figura 40. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino - extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i>	47
Figura 41. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias de intestino - extrato de <i>M. ilicifolia</i>	47
Figura 42. Atividade LDH no meio de incubação de fatias de intestino - extrato de <i>M. ilicifolia</i>	48
Figura 43. Atividade daTGP no meio de incubação de fatias de intestino - extrato de <i>M. ilicifolia</i>	48
Figura 44. Atividade mitocondrial de fatias de intestino - composto catequina	49
Figura 45. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino - composto catequina.....	50
Figura 46. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias de intestino -composto catequina	50
Figura 47. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias de intestino - composto catequina.....	51
Figura 48. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias de intestino - composto catequina.....	51
Figura 49. Atividade mitocondrial de fatias de intestino - composto epicatequina	52
Figura 50. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino - composto epicatequina.....	53
Figura 51. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias de intestino -composto epicatequina....	53
Figura 52. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias de intestino - composto epicatequina..	54
Figura 53. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias hepáticas - composto epicatequina	54
Figura 54. Atividade mitocondrial de fatias de intestino - composto kaempferol	55
Figura 55. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino - composto kaempferol.....	56
Figura 56. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias de intestino - composto kaempferol.....	56
Figura 57. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias de intestino - composto kaempferol....	57
Figura 58. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias de intestino – composto kaempferol....	57
Figura 59. Atividade mitocondrial de fatias de intestino - composto quercetina	58
Figura 60. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino - composto quercetina	59
Figura 61. Atividade da FAL no meio de incubação de fatias de intestino - composto quercetina	59
Figura 62. Atividade da LDH no meio de incubação de fatias de intestino - composto quercetina.....	60
Figura 63. Atividade da TGP no meio de incubação de fatias de intestino - composto quercetina	60
Tabela 2. Lista de medicamentos metabolizados pela CYP2D6.....	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

°C – graus Celsius

µg/mL – microgramas por mililitro

µm – micrometro

µM – micromolar

ABC-ATP - transportadores de cassette de ligação à adenosina trifosfato

ALT - alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de Variância

AST- aspartato aminotransferase

cm - centímetros

CO₂ - gás carbônico

CPY3A4 - isoforma 3A4 do citocromo P450

CYP 450 - citocromo P450

CYP1A2 - isoforma 1A2 do citocromo P450

CYP2A6 - citocromo P450 2A6

CYP2B6 - isoforma 2B6 do citocromo P450

CYP2C9 - isoforma 2C9 do citocromo P450

CYP2D6 – isoforma 2D6 do citocromo P450

CYP2E1 - isoforma 2E1 do citocromo P450

D.O./mg – densidade óptica por miligrama de tecido

DMSO - dimetilsulfóxido

EGCG - epigalocatequina-3-galato

FAL – enzima fosfatase alcalina

GST - glutationala S-transferase

i.p. - intraperitoneal

KHB - solução tampão de Krebs-Henseleit

LDH – enzima lactato desidrogenase

M. ilicifolia - Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek

Maytenus ilicifolia - Maytenus ilicifolia Mart. ex Reissek

mL – mililitro

mm³ - milímetros cúbicos

MTT - [brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio]

NAT - N- acetil transferase

nm - nanometro

OAT's - transportadores ânions orgânicos

OATP1B1 – transportador de polipeptídios de ânions orgânicos subtipo 1B1

OATPs - transportadores de polipeptídios de ânions orgânicos

OCTs - transportadores de cátions orgânicos

P-gp – glicoproteína P

RLU / mg – unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido

SLC - transportadores de soluto

ST - sulfotransferase

TGO - transaminase glutâmico-oxalacética

TGP - transaminase glutâmico-pirúvica

U / mL - unidade internacional por mililitro

U/ L – unidade internacional por litro

UGT - uridina difosfoglucuronossiltransferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo geral.....	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Matéria vegetal	16
2.2 Animais	17
2.3 Obtenção de fatias de tecido hepático e intestinal	17
2.4 Concentrações	19
2.5 Incubação	19
2.6 Atividade mitocondrial (Viabilidade Celular)	21
2.7 Dano celular	21
2.8 Ensaio P450-Glo™.....	22
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4. RESULTADOS	24
4.1 TECIDO HEPÁTICO	24
4.1.1. Extrato de <i>Maytenus ilicifolia</i>	24
4.1.2 Catequina	29
4.1.3 Epicatequina	33
4.1.4 Kaempferol.....	37
4.1.5 Quercetina	41
4.2 TECIDO INTESTINAL	46
4.2.1. <i>Maytenus ilicifolia</i>	46
4.2.2 Catequina	49
4.2.3 Epicatequina	52
4.2.4 Kaempferol.....	55
4.2.5 Quercetina	58
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	67
7. REFERÊNCIAS	68
Anexo	73
Anexo 1. Carta de aceite CEUA	73

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais contribui de forma significativa para cuidados primários de saúde em muitos países e serve de ponto de partida para o desenvolvimento de vários fitoterápicos (DUTRA *et al.*, 2016). Segundo a organização mundial da saúde, estima-se que 88% da população mundial utilizem plantas medicinais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Este panorama se repete no Brasil, pois a população brasileira está recorrendo cada vez mais a tratamentos com plantas medicinais e fitoterápicos (FEBRAFAR, 2020).

Houve um crescimento de 161% no interesse de tratamentos “naturais” entre 2013 e 2015 (MACIEL, 2020). O consumo de fitoterapia no Brasil equivale a aproximadamente 10% dos lucros do segmento farmacêutico nacional (FEBRAFAR, 2020). Adicionalmente, houve um incentivo às políticas públicas na inserção e ampliação no uso de plantas medicinais e fitoterápicos na terapêutica no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2008; 2015). Como consequência, a relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME, 2019) prevê 12 fitoterápicos, com formas farmacêuticas e concentrações distintas (BRASIL, 2020).

Dentre as plantas medicinais indicadas na RENAME, está a *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, presente também no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, que preconiza o uso da infusão com folhas secas para manejo de dispepsia, como antiácido e protetor da mucosa gástrica (ANVISA, 2010). A planta é popularmente conhecida como espinheira-santa, uma espécie nativa do Brasil (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2009). Pertence à família Celastraceae que possui 98 gêneros e aproximadamente 1.200 espécies, encontradas principalmente nas regiões tropicais sendo nativa na América do Sul (DE MAGALHÃES, 2002; SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2009; WILKER e TARCÍSIO, 2012).

Maytenus ilicifolia é um subarbusto cujo tamanho varia de 2 a 5 metros de altura. Suas folhas são pontiagudas (Figura 1.), medem entre 4 a 12 centímetros de comprimento com coloração verde. É a parte mais utilizada da planta na aplicação da fitoterapia e quando secas possuem características organolépticas de sabor levemente amargo e adstringente. A *Maytenus ilicifolia* possui diversos nomes populares como: espinheira-santa, maiteno, cancerosa, cancorosa, cancorosa-de-sete-espinhos, salva-vidas, coromilho-do-campo ou, ainda, espinho-de-deus. As nomenclaturas coloquiais estão relacionadas à presença de

espinhos em suas folhas e a crença dos benefícios à saúde desta planta (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 2009; ANVISA, 2010; 2011; ALMEIDA *et al.*, 2015).



Figura 1. Folhas de *Maytenus ilicifolia*
Fonte: DE MAGALHÃES, 2002.

As substâncias bioativas presentes nas folhas de *Maytenus ilicifolia* fornecem evidências de efeito antirrefluxo, assim como atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antidiarreica e antiulcerogênica (JORGE, R. M. *et al.*, 2004; CIPRIANI *et al.*, 2008; TABACH *et al.*, 2017). Ainda, um estudo recente mostrou efeito antitumoral de dois compostos extraídos da raiz desta planta, testados em camundongos (HERNANDES *et al.*, 2020).

Diversos componentes químicos foram identificados nessa espécie. Flavonoides livres, como catequina, epicatequina, quercetina e kaempferol, 29 flavonóis glicosídeos e 8 taninos. Os glicosídeos apresentam de um a quatro monossacarídeos tendo quercetina e kaempferol como principais agliconas, e os taninos são compostos por catequina/epicatequina e/ou afzelequina/epiafzelequina (BAGGIO *et al.*, 2009).

É relevante descrever que uma fração rica em flavonoides de *M. ilicifolia* reduziu a lesão induzida tanto por indometacina quanto por etanol (BAGGIO *et al.*, 2007). Estes autores demonstraram que esta fração reduziu a hipersecreção ácida e inibiu *in vitro* a atividade da

bomba de prótons. O mesmo grupo de pesquisa relatou que a administração intraperitoneal deste extrato em camundongos reduziu a velocidade de esvaziamento gástrico e a motilidade intestinal, o que pode justificar o uso desta espécie como antidiarreico. Considerando que a ação da fração foi revertida por betanecol, os autores concluíram estar relacionada com uma atividade antimuscarínica (BAGGIO *et al.*, 2009).

Os flavonoides galactiol, catequina e epicatequina foram os compostos majoritários da fração rica em flavonoides com atividade antiulcerogênica em modelo animal supracitado (BAGGIO *et al.*, 2007). Outros compostos, como a rutina, quercetina e flavonoides monoglicosilados, também já foram identificados em folhas desta planta (TIBERTI *et al.*, 2007).

Diferentes polissacarídeos hidrossolúveis isolados de *M. ilicifolia* apresentaram atividade antiúlcera, ácido poligalacturônico (CIPRIANI *et al.*, 2009), arabinogalactano tipo II (CIPRIANI *et al.*, 2004) e heteroxilanoacídico (CIPRIANI *et al.*, 2008). Considerando o mecanismo de ação de fármacos usados em clínica, podemos inferir que estes compostos poderiam ter ação semelhante aos agentes de barreira. Ainda, terpenoides com propriedades antiulcerosas foram descritos nesta espécie (VILEGAS *et al.*, 1991).

Outro atrativo quanto ao uso terapêutico desta planta, além da sua eficácia potencial no tratamento de úlceras e outras doenças gástricas, é que ela também parece apresentar boa segurança quanto a sua toxicidade, tanto no uso agudo como no crônico, testadas em três espécies (TABACH *et al.*, 2017). Também em ensaio clínico, o extrato de *Maytenus ilicifolia* mostrou-se seguro e bem tolerado, os indivíduos tratados não apresentaram alteração significativa nos parâmetros bioquímicos, hematológicos ou psicomotores (TABACH (b) *et al.*, 2017). Outro estudo de eficácia, que utilizou extrato da planta em pacientes com diagnóstico de dispepsia alta não ulcerada, observou que os indivíduos tratados apresentaram melhora na sintomatologia dispéptica global, principalmente melhora nos sintomas de azia e dor no estômago (Carlini & Frochtengarten, 1988; Geocze *et al.*, 1988, apud Santos-Oliveira, 2009). Apesar de haver advertência quanto seu uso por gestantes e lactantes (ANVISA, 2010), estudos pré-clínicos mostram que a administração de um extrato de folhas de *Maytenus ilicifolia* não apresenta efeitos tóxicos em ratas prenhas e parece não interferir com o progresso do desenvolvimento embrionário (CUNHA-LAURA *et al.*, 2014).

É interessante que o potencial de interação farmacológica de plantas medicinais, como a *Maytenus ilicifolia*, e de seus compostos isolados é pouco explorado. Além de interações farmacodinâmicas, interações farmacocinéticas, especialmente no parâmetro de biotransformação de fármacos, são descritas para plantas medicinais, fitoterápicos, fitomedicamentos, alimentos funcionais e nutracêuticos. A biotransformação de xenobióticos ocorre geralmente em fases. Na Fase I, através de reações enzimáticas moléculas não polares as substâncias são convertidas a um composto mais polar. Estas reações expõem ou inserem grupamentos, por exemplo, hidroxilas, modificando a estrutura química do xenobiótico induzindo uma perda de atividade farmacológica ou, no caso de pró-fármacos, produzindo um metabólito (fármaco) ativo. Dentre estas reações está o sistema de mono-oxigenase dependente do citocromo P450 (CYP 450), que possui diversas isoenzimas que desempenham um papel importante nas reações de oxidação da fase I. Estas enzimas também atuam na biossíntese e metabolismo de compostos endógenos como esteroides, ácidos biliares e graxos, prostaglandinas entre outras (GIRARDI 2006; ASHA e VIDYAVATHI, 2010; MCDONNELL e DANG, 2013).

Já as reações de fase II, são reações enzimáticas de conjugação entre um grupamento do xenobiótico e compostos endógenos (ácido glucurônico, sulfato, glutathione ou aminoácidos), gerando compostos conjugados, com características polares, mais hidrossolúveis, e assim com sua excreção facilitada na bile ou urina. As enzimas de fase II como a UGT, GST, NAT e ST também possuem um papel importante na metabolização de xenobióticos (GÜLÇİN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2019). A fase III é composta pelos transportadores de membrana, formada por diferentes grupos. Entre eles, os ABC-ATP, os SLCs, os OATs, os OATPs e os OCTs (KOEPSSELL e ENDOU, 2004; CHOUDHURI e KLAASSEN, 2006; PAL e MITRA, 2006; RAUB, 2006; GIACOMINI *et al.*, 2010). De forma geral, funcionam como uma bomba de efluxo de xenobióticos e/ou seus metabólitos. Vários fármacos utilizam estes transportadores para atravessar as membranas e alcançarem seu sítio de ação. Estes transportadores têm sido amplamente estudados e já existem diversos subtipos, como o transportador OATP1B1, responsável pela captação hepática de fármacos e compostos endógenos pouco ácidos, como alguns fármacos (estatinas e metotrexato) e também a bilirrubina (GIACOMINI *et al.*, 2010; STIEGER e HAGENBUCH, 2014). Vale destacar que os principais transportadores e enzimas metabolizadoras de fármacos estão

localizados nos enterócitos (intestino delgado) e nos hepatócitos (fígado) (FILPPULA *et al.*, 2019).

Como citado, o sistema CYP450 é composto por diversas isoformas, distribuídas em diferentes tecidos. As de maior concentração no fígado e no intestino humano são CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4. Dentre elas destaca-se o CYP3A4, que é responsável por cerca de 50% da metabolização dos fármacos atualmente comercializados (ZHOU, 2008). Esta isoforma corresponde a 35% do total das expressas no fígado e 80% no intestino (MOULY *et al.*, 2017). Já o CYP2D6, embora expresso em menor quantidade nestes tecidos, metaboliza aproximadamente 25% dos fármacos de relevância clínica (ZHOU *et al.*, 2009). Esta isoforma é responsável pela metabolização de fármacos importantes na terapêutica como: analgésicos opioides, antipsicóticos, antidepressivos, betabloqueadores, entre outros. Ambas isoformas são relacionadas a interações farmacológicas (BECKER, 2011).

As interações farmacocinéticas podem ocorrer em diferentes níveis como absorção, metabolização, distribuição e excreção de xenobióticos, bem como entre fármacos, plantas e até mesmo nutracêuticos. Na biotransformação estas substâncias podem inibir ou induzir enzimas de metabolização e transportadores (BECKER, 2011; DOLTON *et al.*, 2012; MOULY *et al.*, 2017). Se alterada a capacidade metabólica das enzimas e/ou transportadores de xenobióticos, pode-se prever que ocorra alteração na concentração sérica do fármaco e conseqüentemente da sua ação farmacológica (THU *et al.*, 2017). A redução da capacidade de metabolização de um fármaco levará ao aumento da sua concentração no organismo podendo causar efeitos tóxicos, enquanto que a indução destas enzimas diminuiriam as concentrações plasmáticas, gerando doses subterapêuticas, insuficientes para ação no tecido alvo. Ambas as condições podem resultar em interações medicamentosas clinicamente relevantes (PAL e MITRA, 2006; RAUB, 2006; GIACOMINI *et al.*, 2010; OSWALD *et al.*, 2019).

Há a descrição de que alguns compostos isolados, descritos previamente em *Maytenus ilicifolia* alterem tanto enzimas de metabolização quanto de transporte de fármacos (NISHIKAWA, Masataka *et al.*, 2004). Porém, do nosso conhecimento extratos e produtos fitoterápicos de *Maytenus ilicifolia* ainda não foram estudados quanto ao potencial de interação farmacológica.

Neste contexto, fitomedicamentos, fitoterápicos e até mesmo seus compostos isolados devem ser utilizados com cautela devido ao potencial destes em modular os mecanismos farmacocinéticos e alterar a biodisponibilidade dos fármacos (GURLEY *et al.*, 2002; WANWIMOLRUK e PRACHAYASITTIKUL, 2014). Markowitz e DeVane (2001) sugerem que o uso concomitante de fitocompostos e medicamentos convencionais devem ser desencorajados até a obtenção de evidências de segurança na associação.

Um fitomedicamento amplamente utilizado, a erva de São João, tem descrição de significantes interações farmacológicas, uma vez que reduz os níveis séricos de diferentes fármacos, possivelmente pela capacidade de induzir a expressão da enzima CYP3A4 e da glicoproteína-P (BILIA *et al.*, 2002; GURLEY *et al.*, 2008). Essa alteração nos níveis plasmáticos pode acarretar graves consequências clínicas. Por exemplo, Bilia e colaboradores (2002) relataram que o uso concomitante da erva de São João com ciclosporina levou a rejeição de transplante agudo em oito casos, demonstrando a necessidade de atenção das equipes de saúde para o assunto (BILIA *et al.*, 2002).

Fármacos usados no tratamento do refluxo gastroesofágico, como o omeprazol, apresentam relevantes interações farmacológicas. Embora haja controvérsias, diferentes evidências sobre a interação entre os inibidores da bomba de prótons e os antiagregantes plaquetários, especialmente o clopidogrel, têm sido demonstradas. Recentemente, Bundhun e colaboradores (2017) em uma revisão sistemática e meta-análise, demonstraram que o uso concomitante de clopidogrel e inibidores da bomba de prótons aumentaram significativamente os eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio e trombose do stent, contudo não alterou a mortalidade a longo prazo (BUNDHUN *et al.*, 2017).

Há relatos de que compostos bioativos previamente descritos na *M. ilicifolia* alterem parâmetros farmacocinéticos, como enzimas de metabolização e transportadores de fármacos. Por exemplo, a epigalocatequina-3-galato (EGCG), presente na *M. ilicifolia* inibiu a atividade da glicoproteína-P pertencente ao grupo ABC-ATP (JODOIN *et al.*, 2002) e inibiu as atividades de enzimas CYP3A4 e 1A2 em culturas primárias (NETSCH *et al.*, 2006). Um extrato de chá verde com elevado teor de catequinas alterou os parâmetros farmacocinéticos em roedores quando coadministrado com midazolam, dobrando a concentração máxima deste fármaco devido à inibição de CYP3A4 (NISHIKAWA *et al.*, 2004). A quercetina

administrada em associação com a doxorrubicina via oral, em ratos, inibiu a glicoproteína-P e CYP3A4, causando alterações na biodisponibilidade da doxorrubicina (CHOI *et al.*, 2011).

Para a investigação de toxicidade de compostos utilizam-se diversos métodos *in vitro* que modelem adequadamente os processos observados *in vivo*. Um modelo bastante aceito é o de fatias de precisão de tecidos *ex vivo*. As fatias são incubadas com os compostos investigados, permitindo que diferentes tipos celulares presentes no tecido sejam expostos aos compostos. Isto ocorre, pois uma única fatia é composta por praticamente toda maquinaria celular, enquanto as culturas celulares primárias contêm apenas células isoladas. O método de fatias também é mais rápido do que o de cultura celular, pois não necessita de um período prolongado de incubação para obtenção da quantidade de células mínimas para realizar um ensaio. Além de ser relativamente econômico e seguir preceitos éticos, quando comparado aos ensaios *in vivo*, pois com um único animal é possível testar diversos compostos e concentrações diferentes (DE GRAAF *et al.*, 2010; PHAM *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

Desta forma, investigamos o potencial de interação farmacocinética com enzimas relevantes de biotransformação de fármacos utilizando fatias de fígado e de intestino de ratos Wistar. Este trabalho produziu evidências de segurança e de potenciais interações do extrato de *Maytenus ilifolia* com fármacos, o que servirá de guia para a prescrição, levando a uma maior segurança e eficácia na terapêutica no ensaio clínico randomizado duplo cego de *Maytenus ilicifolia* como estratégia no tratamento da doença de refluxo gastroesofágico.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Nosso objetivo geral foi determinar o potencial de interação farmacocinética do extrato de *Maytenus ilicifolia* e compostos isolados utilizando fatias de fígado e intestino de ratos Wistar.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar o impacto da incubação de fatias de fígado e intestino de ratos Wistar com extratos de *M. ilicifolia* e seus compostos isolados sobre a atividade de enzimas de biotransformação de fase I (CYP2D6 e CYP3A4).
- Avaliar o efeito de extratos de *M. ilicifolia* e seus compostos isolados sobre a liberação de enzimas no meio de incubação, FAL, LDH, TGO e TGP, utilizando fatias de tecido hepático e entérico de ratos Wistar.
- Avaliar a viabilidade celular, pela técnica do MTT, de células de fatias de fígado e intestino de ratos Wistar expostas ao extrato de *M. ilicifolia* e seus compostos isolados.
- Elaborar uma lista de medicamentos com possível interação farmacológica. A fim de contribuir para a etapa clínica do projeto guarda chuva intitulado “Ensaio clínico randomizado duplo cego de *Maytenus ilicifolia* como estratégia no tratamento da doença de refluxo gastroesofágico”.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde e à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, documento número 37315 (anexo 1).

Os procedimentos propostos obedecem a normas da Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978), dos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS), “Canadian Council on Animal Care” e o Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of University of Minnesota, e dos Procedimentos para o Uso Científico de Animais conforme a Lei 11.794 (8 de outubro de 2008), assim como, a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA.

Foram aplicadas as Normas de Segurança e Procedimentos de boas práticas de laboratório. Todas as medidas de proteção aos pesquisadores foram asseguradas. Para manipulação dos animais, o uso de luvas de látex e de jalecos limpos foi obrigatório.

2.1 Matéria vegetal

O material vegetal foi adquirido do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícola (CPQBA), Paulínia/SP, constituído por folhas secas da espécie *Maytenus ilicifolia*.

O material vegetal foi identificado pela Profa. Dra. Mara Ritter (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Exsicatas foram depositadas no Herbário ICN do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A coleta do material botânico (comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) e o acesso ao patrimônio genético foram registrados, respectivamente, no sistema SISBIO (69443) e no SisGen (ACE 02A1).

A obtenção e a caracterização do extrato seco foram coordenadas pela professora Valquiria Linck Bassani (Faculdade de Farmácia UFRGS). Conforme o edital preconiza, 3 g de folhas foram submetidas à extração por infusão a quente com 150 mL de água destilada (q.s.p.), aquecida entre 85 e 100°C durante 15 min (BRASIL, 2010; TABACH *et al.*, 2017). O extrato seco da solução extrativa foi analisado de acordo com a Farmacopeia Brasileira V edição (ANVISA, 2010), foi obtido um produto final com teor de taninos totais de $8,74 \pm 0,82\%$ e teor de epicatequina de $35,15 \pm 4,94$ mg.

Foram adquiridos comercialmente os seguintes compostos isolados com elevado padrão de qualidade: catequina (marca: Sigma, número de catálogo C1251); epicatequina (marca: Sigma, número de catálogo E1753); kaempferol (marca: Sigma, número de catálogo 96353) e quercetina (marca: Sigma, número de catálogo Q4951).

2.2 Animais

Foram utilizados 12 ratos Wistar de 3 meses de idade obtidos do CREAL/UFRGS e mantidos em condições padrão de biotério (Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia) com líquido e comida *ad libidum*, com temperatura controlada $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, e ciclo de 12h claro/escuro. Os experimentos foram realizados nos Departamentos de Farmacologia, Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

2.3 Obtenção de fatias de tecido hepático e intestinal

Os ratos foram decapitados, fígados e intestinos foram imediatamente removidos e colocados em solução tamponada KHB, previamente gaseificada com 95% de O_2 por 30 minutos e continuamente resfriada com gelo (DE GRAAF *et al.*, 2010; PHAM *et al.*, 2015).

Para obtenção de fatias hepáticas (Figura 2), o lóbulo medial direito foi utilizado, medindo cerca de $30 \times 15 \times 4 \text{ mm}^3$. Este foi seccionado em pedaços menores de aproximadamente $10 \times 5 \times 4 \text{ mm}^3$, que foram seccionados transversalmente à $300 \mu\text{m}$ no fatiador de tecidos (McIlwain) (Figura 1). As fatias obtidas retornaram a solução KHB gelada e delicadamente foram separadas com auxílio de agulhas histológicas e transferidas para um microtubo de 1,5 mL contendo $200 \mu\text{L}$ de meio de cultura Hepatozyme® (Thermofisher,

USA, número de catálogo: 17705021) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco™ Fetal Bovine Serum, qualified, USA, número de catálogo: 26140079) e 1% de antibiótico (Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) USA, número de catálogo: 15140122), juntamente com 50 µL de solução *in vitro* (WANG *et al.*, 2016). Os microtubos foram pesados sem e com a fatia de tecido a fim de estimar o peso do tecido por diferença.

Para obtenção de fatias intestinais, foi utilizado o jejuno. Foi medido cerca de 25 cm do intestino a partir do final do estômago e descartado; utilizados os 15 cm de comprimento seguintes (Figura 2), que foram lavados através do lúmen com seringa contendo solução KHB. Então foram seccionados em tamanhos de 2 cm de comprimento (PHAM *et al.*, 2015). Estes fragmentos menores foram cortados transversalmente a 300 µm no fatiador de tecidos (McIlwain) (Figura 1). As fatias obtidas retornaram à solução KHB gelada e delicadamente foram separadas com auxílio de agulhas histológicas e transferidas para um microtubo de 1,5 mL contendo 200 µL de meio de cultura meio de cultura DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium ® (Gibco™, USA número de catálogo 949230) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco™ Fetal Bovine Serum, qualified, USA, número de catálogo 26140079) e 1% de antibiótico (Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) USA, número de catálogo 15140122), juntamente com 50 µL de solução *in vitro*. Os microtubos foram pesados sem e com a fatia de tecido a fim de estimar o peso do tecido por diferença.

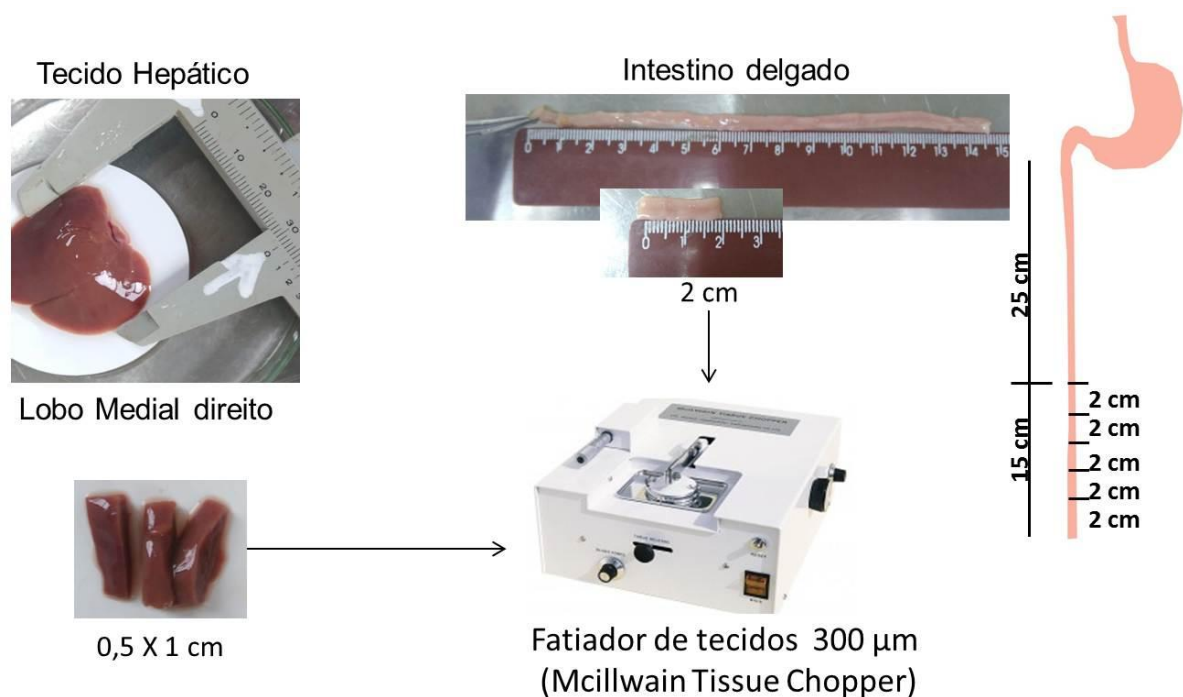


Figura 2. Esquema de obtenção das fatias de fígado e intestino.

2.4 Concentrações

Foram preparadas soluções contendo o extrato de *Maytenus ilicifolia* (ASHOUR *et al.*, 2017) e compostos isolados. Todas as soluções foram previamente diluídas em DMSO, sem que este excedesse 0,1% da solução final.

Maytenus ilicifolia - 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL

Catequina - 10 µM; 34,1 µM; 172 µM; 341 µM; 684 µM

Epicatequina - 10 µM; 34,1 µM; 172 µM; 341 µM; 684 µM

Kaempferol - 10,5 µM; 35 µM; 175 µM; 349 µM; 698 µM

Quercetina - 8,8 µM ; 30 µM; 150 µM; 300 µM; 600 µM

2.5 Incubação

Em uma placa para cultivo de células de 96 poços (Kasvi, número de catálogo k12-096), as fatias dos tecidos foram transferidas juntamente com seus tratamentos, sendo uma fatia por poço (Figura 3). A placa foi levada a uma estufa aclimata a 37°C e ambiente com 5% de CO₂, onde permaneceram para incubação durante 6 horas.

Para o controle das incubações foram testadas fatias de tecido somente na presença do meio de cultura e meio de cultura na concentração máxima de DMSO idêntica às máximas concentrações de DMSO presente nas soluções de maiores concentrações, equivalente a 0,1% (ASHOUR *et al.*, 2017).

Após o período de incubação das fatias, os meios de culturas contendo os respectivos tratamentos e enzimas liberadas pelos tecidos, foram coletados e acondicionados a 8°C para dosagens posteriores de enzimas.

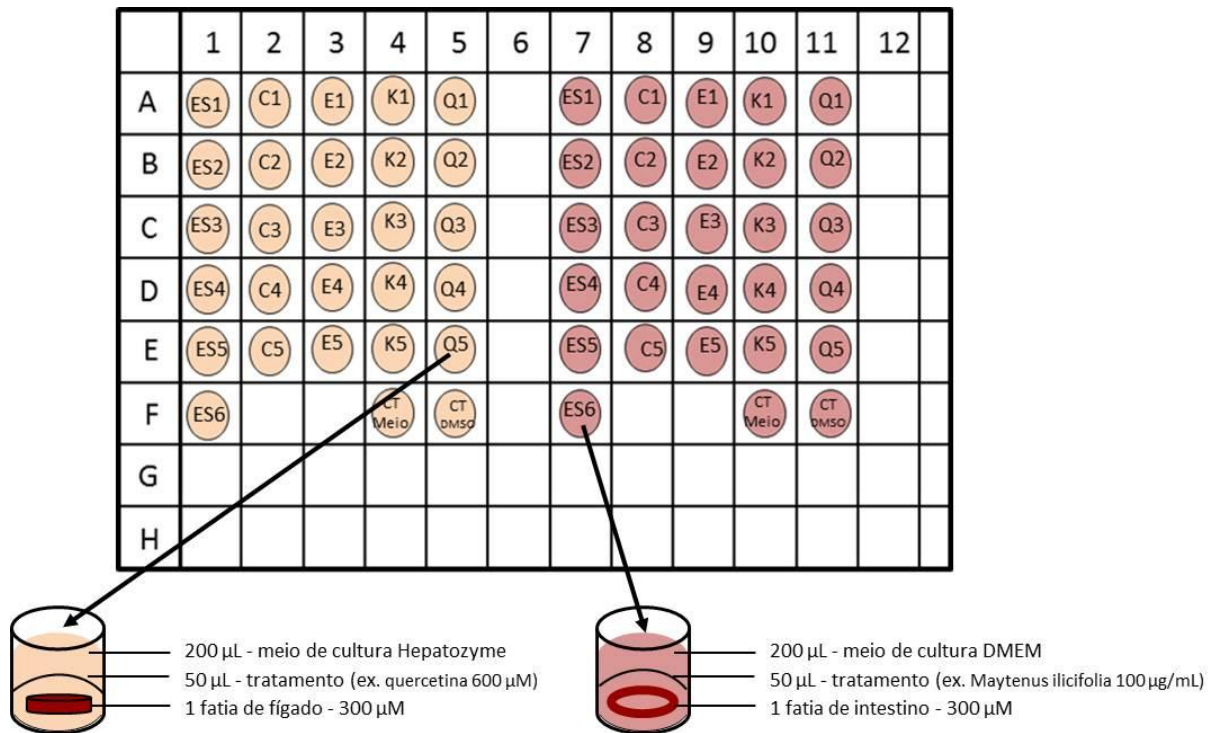


Figura 3. Esquema de incubação de fatias de fígado (A1-F1; A2-E2; A3-E3; A4-F4; A5-F5) e intestino (A7-F7; A8-E8; A9-E9; A10-F10; A11-F11), em placa de 96 poços, com seus respectivos tratamentos*

*Tratamentos:

ES1 - Solução de *M.ilicifolia* 1 μ g/mL

ES2 - Solução de *M. ilicifolia* 3 μ g/mL

ES3 - Solução de *M. ilicifolia* 10 μ g/mL

ES4 - Solução de *M. ilicifolia* 30 μ g/mL

ES5 - Solução de *M. ilicifolia* 50 μ g/mL

ES6 - Solução de *M. ilicifolia* 100 μ g/mL

C1 – Solução de catequina 10 μ M

C2 – Solução de catequina 34,1 μ M

C3 – Solução de catequina 172 μ M

C4 – Solução de catequina 341 μ M

C5 – Solução de catequina 684 μ M

E1 – Solução de epicatequina 10 μ M

E2 – Solução de epicatequina 34,1 μ M

E3 – Solução de epicatequina 172 μ M

E4 – Solução de epicatequina 341 μ M

- E5 – Solução de epicatequina 684 μM
- K1 – Solução de kaempferol 10,5 μM
- K2 – Solução de kaempferol 35 μM
- K3 – Solução de kaempferol 175 μM
- K4 – Solução de kaempferol 349 μM
- K5 – Solução de kaempferol 698 μM
- Q1 – Solução de quercetina 8,8 μM
- Q2 – Solução de quercetina 30 μM
- Q3 – Solução de quercetina 150 μM
- Q4 – Solução de quercetina 300 μM
- Q5 – Solução de quercetina 600 μM
- CT Meio – meio de cultura (Hepatozyme e DMEM)
- CT DMSO – DMSO 0,1%

2.6 Atividade mitocondrial (Viabilidade Celular)

A viabilidade celular foi avaliada pela atividade mitocondrial utilizando o sal de tetrazólio MTT (Sigma Chemicals). A atividade das desidrogenases mitocondriais das células vivas causa a clivagem e redução do corante MTT amarelo solúvel para o formazan púrpura insolúvel, que é extraído com DMSO. Este conteúdo foi transferido para uma placa limpa de 96 poços translúcida e a densidade óptica foi medida em espectrofotometria a 540 nm (MOSMANN, 1983).

Os valores foram tabulados em uma planilha de utilizando Microsoft Excel (versão 2010) e foi descontado o valor do branco de todos os tratamentos. Foram considerados 100 % de viabilidade celular o grupo CT DMSO.

2.7 Dano celular

Os níveis de enzimas marcadoras de dano celular (lise da membrana) foram quantificados pelos níveis de enzimas liberadas no meio e medidos com kits comerciais:

LDH (Labtest diagnóstica S.A., MG, Brasil, número de catálogo 86);

FAL (Labtest diagnóstica S.A., MG, Brasil, número de catálogo 79);

TGO (Labtest diagnóstica S.A., MG, Brasil, número de catálogo 52);

TGP (Labtest diagnóstica S.A., MG, Brasil, número de catálogo 53).

As análises foram realizadas de acordo a orientação do fabricante.

2.8 Ensaio P450-Glo™

Para a avaliação da atividade enzimática das isoformas CYP3A4 e CYP2D6 foram utilizados kits comerciais P450-Glo™ (Promega, USA, catálogo V8911 e V8891).

Os ensaios foram preparados conforme a orientação do fabricante. Após o período de incubação de 6 horas das fatias de tecidos juntamente com seu respectivo tratamento nas placas de 96 poços, foi retirado o meio reservado para posterior dosagem de enzimas. Sobre cada fatia foi adicionado 50 µL de substrato próliferina e incubado por 60 minutos (CYP3A4) e 45 minutos (CYP2D6), em estufa 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após o volume sobre as fatias foram transferidos a uma placa de 96 poços branca opaca e adicionado igual volume do reagente de detecção, homogeneizado em plataforma horizontal e após 20 minutos em temperatura ambiente e a reação foi medida em luminômetro SpectraMax M5, utilizando tempo de integração de 500 ms (CYP3A4) e 250 ms (CYP2D6). Os valores foram tabulados em uma planilha de utilizando Microsoft Excel (versão 2010) e foi descontado o valor do branco de todos os tratamentos. Os valores de cada tratamento foram corrigidos pelo valor do grupo controle correspondente, ou seja, foi considerado 100% a luminescência do grupo controle DMSO e verificou-se qual a porcentagem equivalente de cada tratamento (X%), este número foi utilizado para as análises estatísticas. Por exemplo:

750 (luminescência CT-DMSO) ----- 100 %

1500 (luminescência Extrato M. ilicifolia 3 µg/mL) -----X%

Para o ensaio da CYP3A4, foi utilizado como controle positivo o fenobarbital na concentração de 50 µM como agente indutor e cetoconazol na concentração de 100 µM como agente inibidor. Para o ensaio da CYP2D6, foram utilizados como controles positivos o fenobarbital na concentração de 1000 µM como agente indutor, metoclopramida na concentração de 250 µM e paroxetina na concentração de 50 µM, como agentes inibidores.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Ao final dos experimentos, os dados foram coletados e armazenados em uma planilha (Microsoft Excel 2010). Os resultados foram submetidos ao teste de homogeneidade para determinar a análise estatística a ser realizada. Os dados normais foram analisados com o teste paramétricos ANOVA de uma via, seguido pelo *post hoc* de Dunnett quando necessário. Para dados não normais foi utilizado o teste não-paramétricos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Para isso, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism, versão 7.0 (Graph Pad Inc, La Jolla, CA), adotando-se nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 TECIDO HEPÁTICO

4.1.1. Extrato de *Maytenus ilicifolia*

As incubações das fatias de fígado com o extrato de *Maytenus ilicifolia* em 6 concentrações (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL) não alteraram de forma significativa a viabilidade celular testada através do ensaio de MTT (Figura 4). Mostrando que estes extratos, nestas concentrações, não alteraram a atividade mitocondrial de fatias hepáticas de ratos.

A atividade da enzima CPY3A4 não foi modulada com as incubações de extrato de *M. ilicifolia* (KW=1.476; p= 0,961) (Figura 5). No entanto, o extrato de *M. ilicifolia*, nas concentrações de 30 e 100 µg/mL, aumentou a liberação da significativamente a atividade da CYP2D6 (KW=12.26; p<0,05) (Figura 6). A enzima fosfatase alcalina não alterou em nenhuma das concentrações testadas (F (3,5)=1,143; p=0,3886) (Figura 7); o extrato aumentou a liberação da lactato desidrogenase na maior concentração testada do extrato (Figura 8) e da atividade da transaminase glutâmico-oxalacético nas duas maiores concentrações testadas F (2,6)=5,376; *p < 0,05 ***p < 0,001. (Figura 9). Transaminase glutâmico pirúvica (F(2,5)=1,657; p=0,2042) (Figura 10) não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o controle.

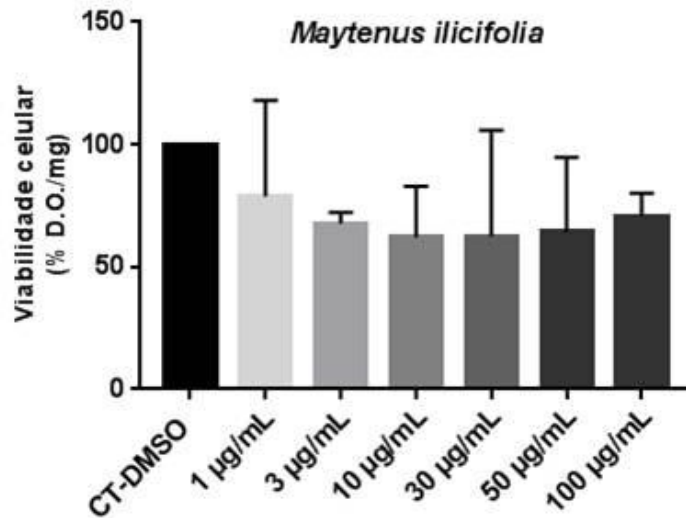


Figura 4. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de fígado de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do extrato de *Maytenus ilicifolia*. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO), Kruskal-Wallis, KW=5,399; p=0,4937.

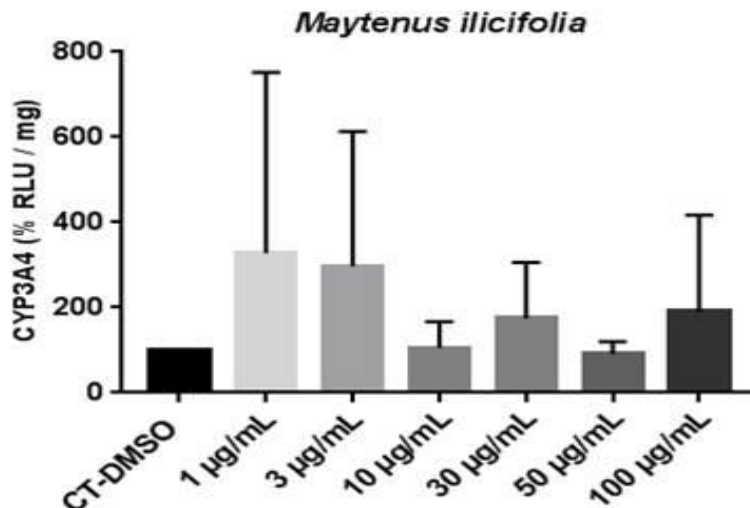


Figura 5. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações de extrato de *Maytenus ilicifolia*. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO), Kruskal-Wallis, KW=1,476; p = 0,9611.

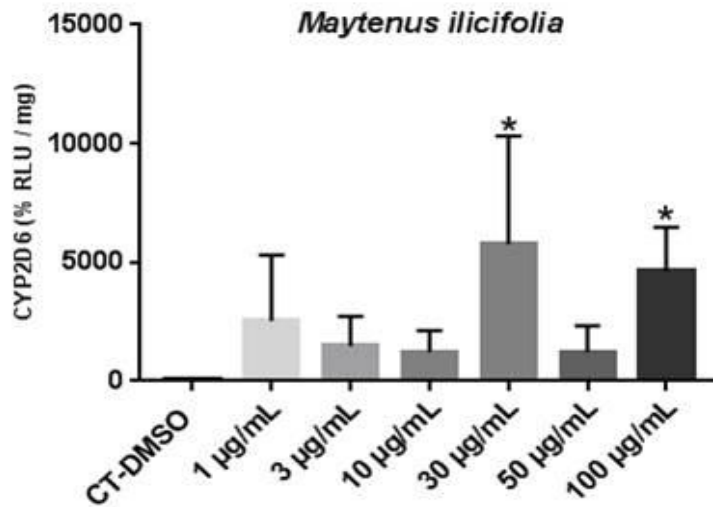


Figura 6. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações de extrato de *Maytenus ilicifolia*. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO), Kruskal-Wallis, KW = 12,26; *p < 0,05.

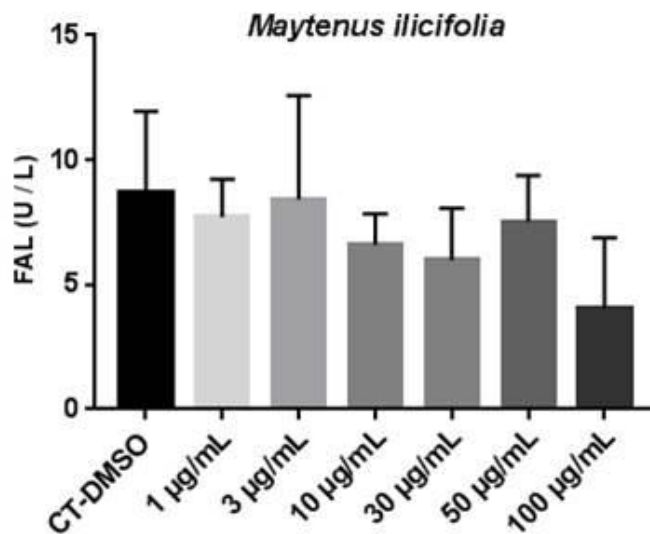


Figura 7. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do extrato de *M. ilicifolia*. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3), ANOVA, F (2,6)=1,143; p = 0,3886.

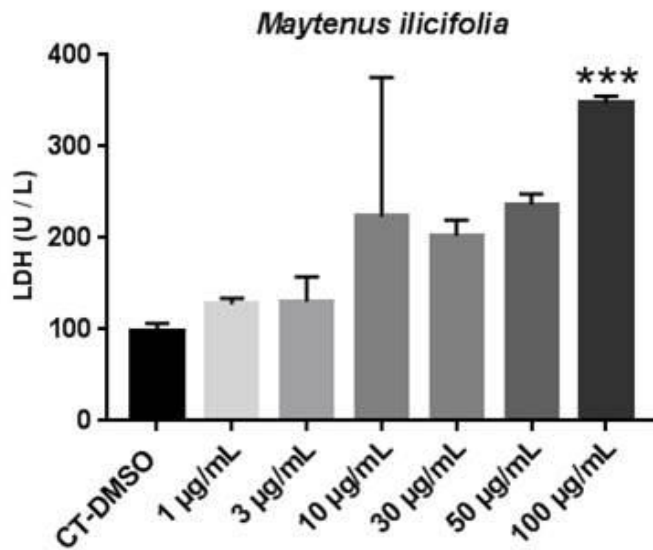


Figura 8. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do extrato de *M. ilicifolia*. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3), ANOVA seguida de *post hoc* de Dunnett, $F(2,6)=6,326$; *** $p < 0,001$.

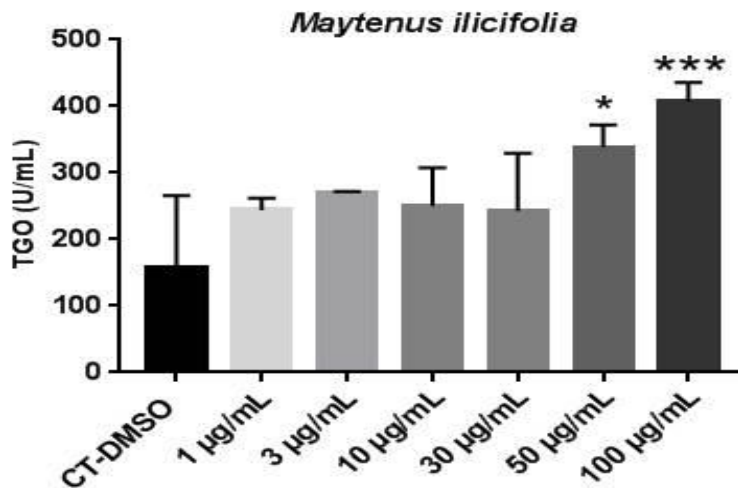


Figura 9. Atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do extrato de *M. ilicifolia*. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3), ANOVA seguida de *post hoc* de Dunnett, $F(2,6)=5,376$; * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$.

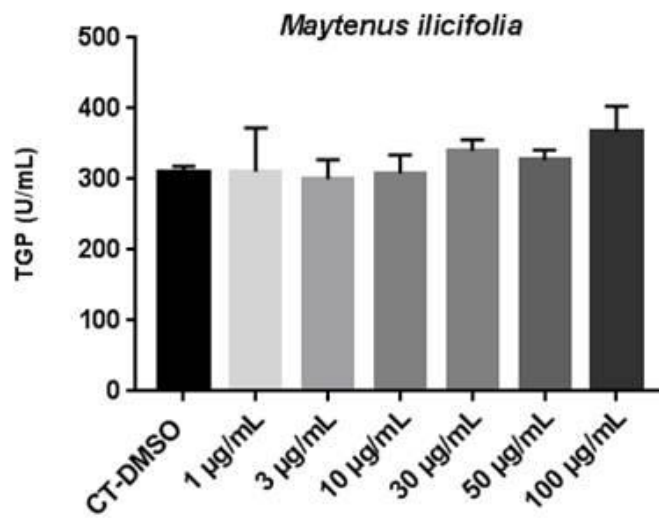


Figura 10. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do extrato de *M. ilicifolia*. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3), ANOVA, F(2,6) =1,657; p= 0,2042.

4.1.2 Catequina

A incubação das fatias de fígado com o composto isolado, catequina nas 5 concentrações testadas (10 μM ; 34,1 μM ; 172 μM ; 341 μM e 684 μM) não alterou de forma significativa a viabilidade celular pelo ensaio da atividade mitocondrial, redução do MTT (KW = 5,373; p= 0,321) (Figura 11). Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas nas atividades da CPY3A4 (KW=0,8632; p=0,9728) (Figura 12); da fosfatase alcalina (F(2,4)=0,1011; p=0,9900) (Figura 14); da lactato desidrogenase (KW=4,793; p=0,4417) (Figura 15); da transaminase glutâmico-oxalacética (F(2,4)=0,8973; p=0,5133) (Figura 16) e na transaminase glutâmico-pirúvica (F(2,4)=2,05; p=0,1430) (Figura 17), o que indica que este composto isolado, nas condições testadas, não causa dano celular. Porém, a catequina aumentou a atividade da enzima CYP2D6, apresentando um efeito indutor, na concentração de 341 μM (KW=11,07; p=0,05) (Figura 13).

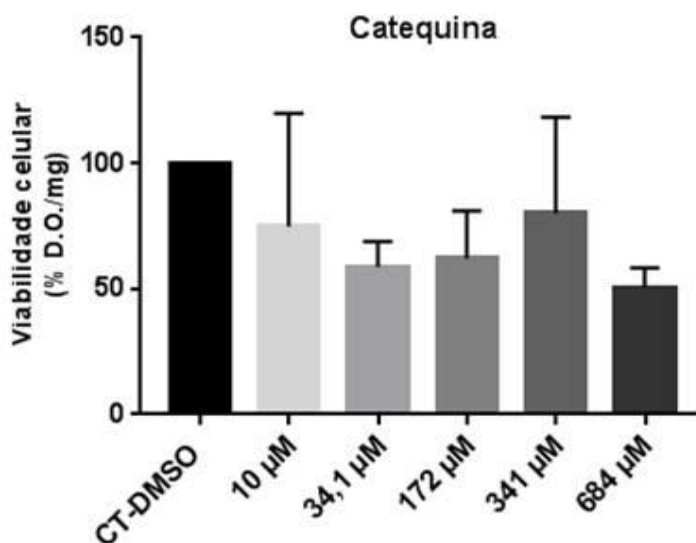


Figura 11. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de fígado de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO).Kruskal-Wallis, KW=5,373; p=0,3721.

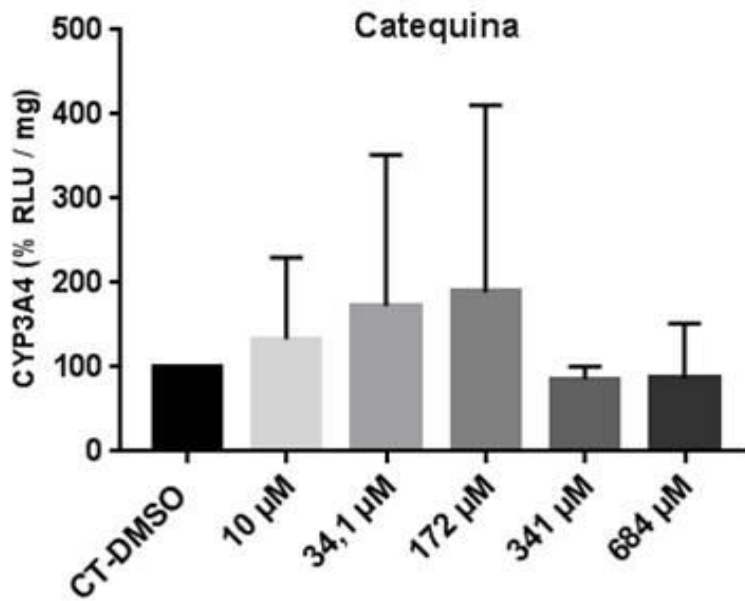


Figura 12. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=0,8632; p=0,9728.

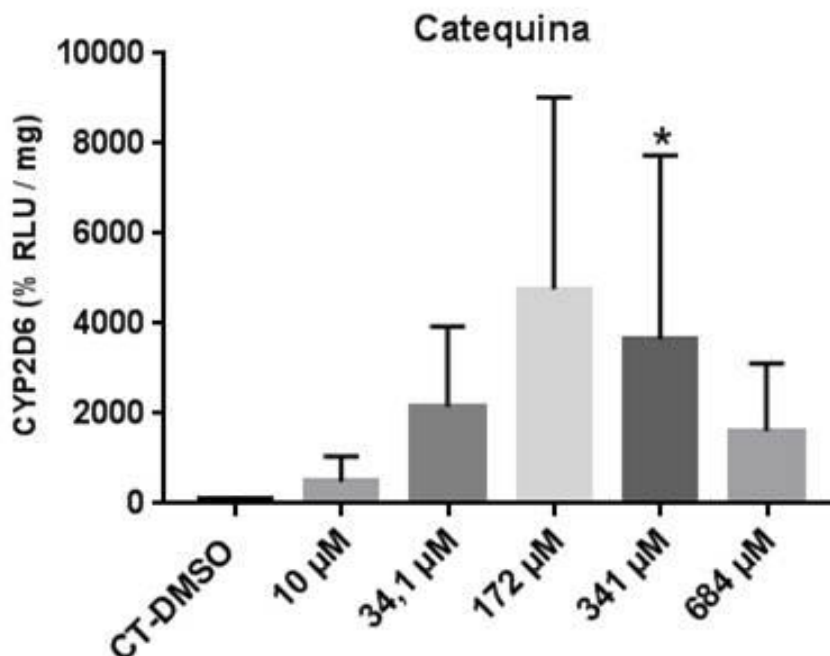


Figura 13. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, seguido do *post hoc* de Dunn, KW=11,07; *p < 0,05.

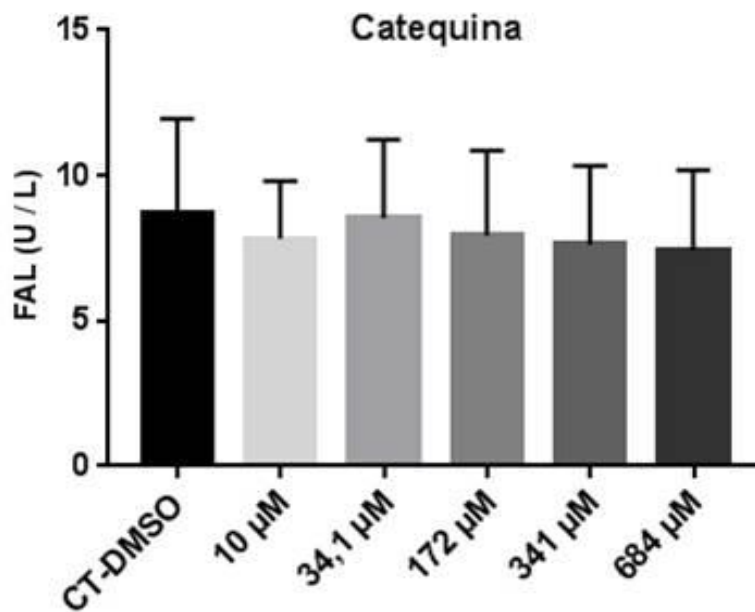


Figura 14. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,1011$; $p=0,9900$.

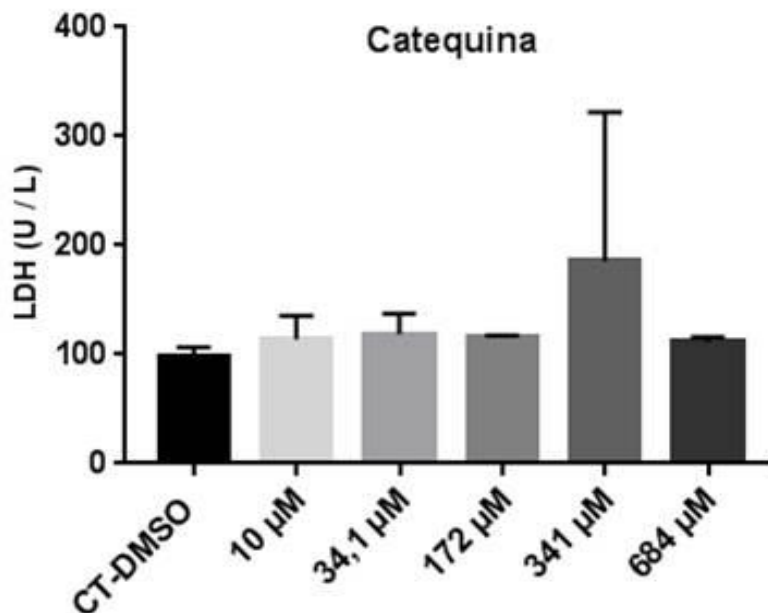


Figura 15. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). Kruskal-Wallis, $KW=4,793$; $p=0,4417$.

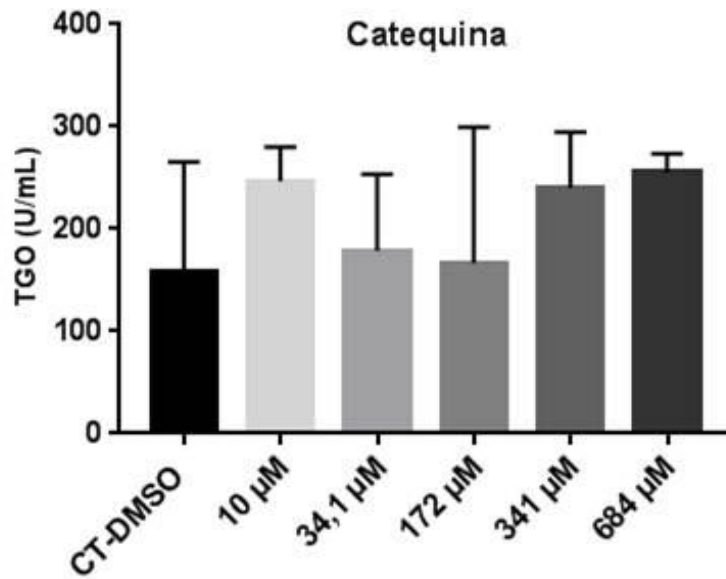


Figura 16. Atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,8973$; $p=0,5133$.

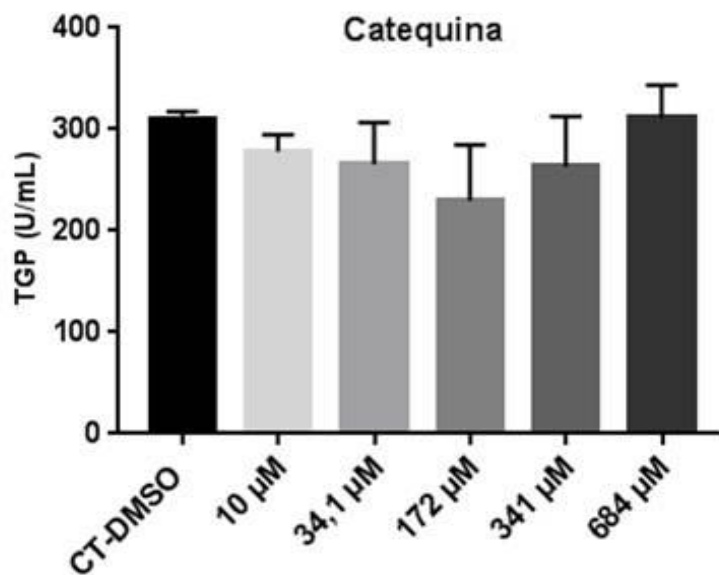


Figura 17. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=2,05$; $p=0,1430$.

4.1.3 Epicatequina

A incubação de fatias de fígado com o composto isolado epicatequina nas 5 concentrações testadas (10 μM ; 34,1 μM ; 172 μM ; 341 μM e 684 μM) não alterou de forma significativa a viabilidade celular testada através do ensaio de MTT (KW=5,819; $p=0,342$) (Figura 18). Não houve diferença significativa nos ensaios das atividades da CPY3A4 (KW=2,648; $P=0,7540$) (Figura 19), da fosfatase alcalina ($F(2,4)=0,164$; $p=0,971$) (Figura 21), da lactato desidrogenase (KW=2,625; $p=0,7575$) (Figura 22), da transaminase glutâmico-oxalacética (KW=1,087; $p=0,9553$) (Figura 23) e da transaminase glutâmico-pirúvica (KW=0,2145; $p=0,9989$) (Figura 24). Este composto isolado parece não causar danos celulares, bem como não modular a atividade da CYP3A4. Porém, este composto apresentou efeito indutor da atividade da enzima CYP2D6 nas maiores concentrações testadas, KW=12,65; $p=0,0269$ (Figura 20).

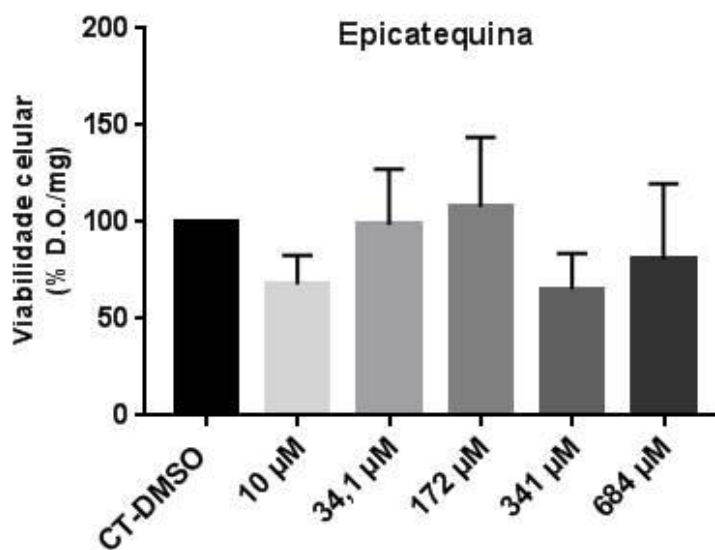


Figura 18. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de fígado de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=5,819; $p=0,342$.

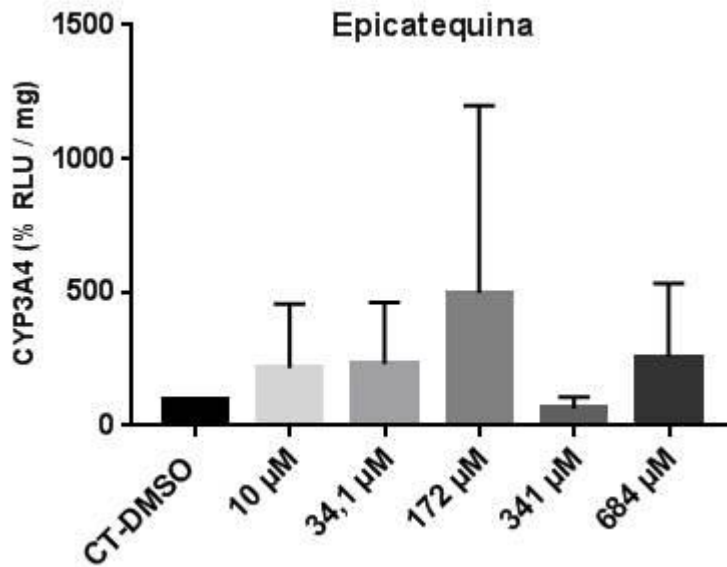


Figura 19. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=2,648; p=0,7540.

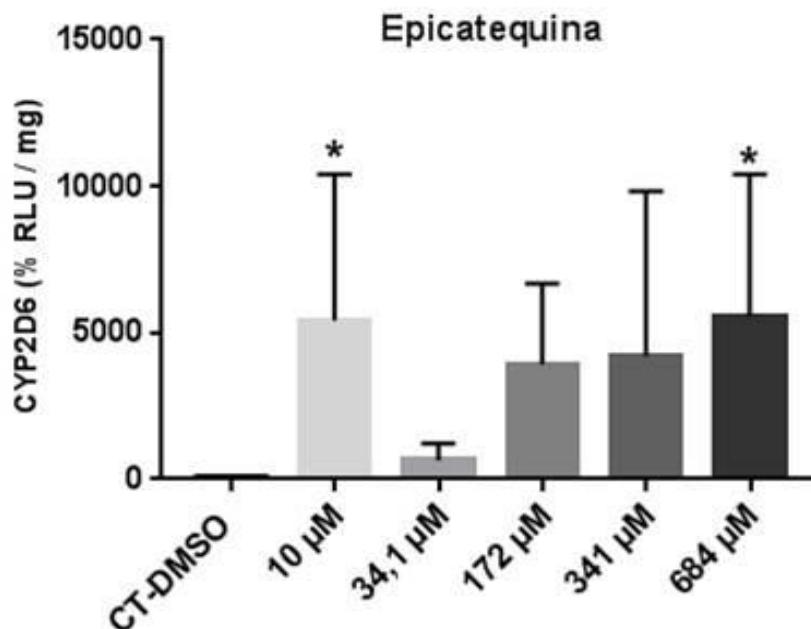


Figura 20. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis seguido do *post hoc* de Dunn, KW=12,65, *p < 0,05.

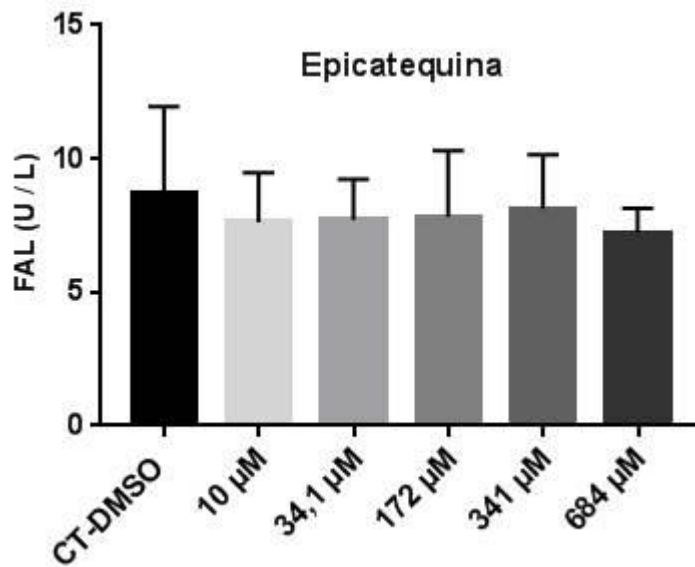


Figura 21. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,164$; $p=0,9711$.

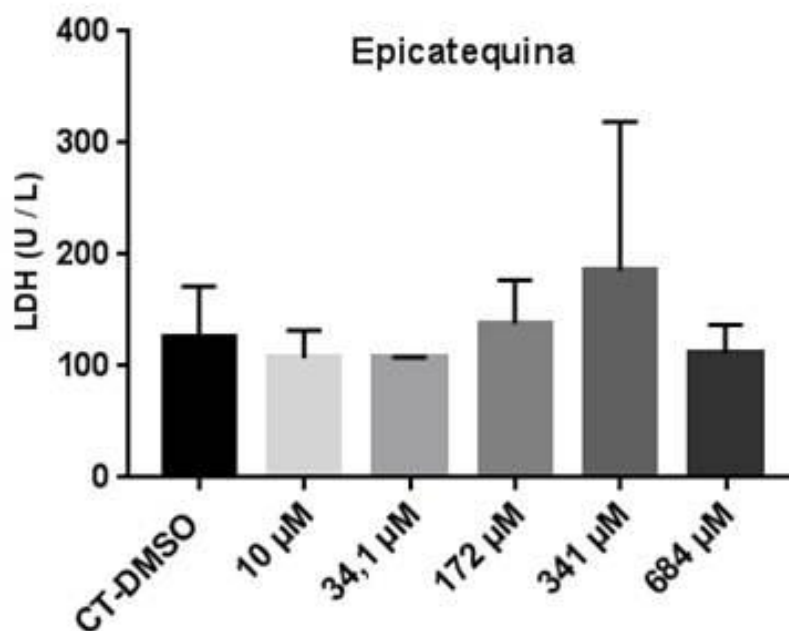


Figura 22. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). Kruskal-Wallis, $KW=2,625$, $p=0,7575$.

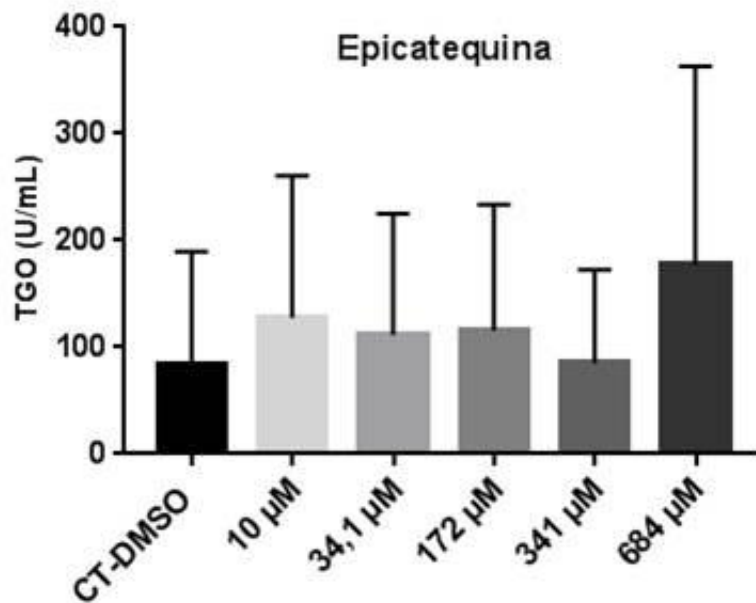


Figura 23. Atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). Kruskal-Wallis, KW=1,087; p=0,9553.

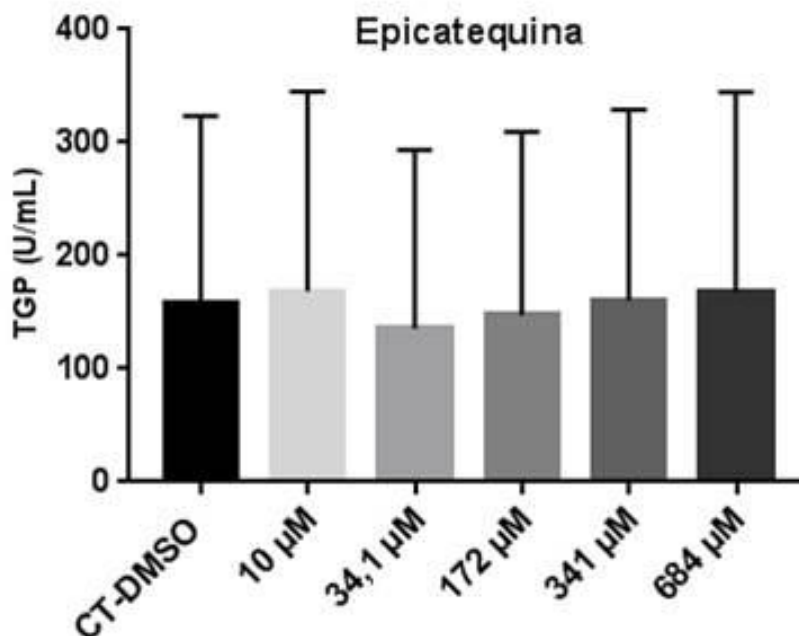


Figura 24. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). Kruskal-Wallis, KW=0,2145; p=0,9989.

4.1.4 Kaempferol

A incubação de fatias de fígado com 5 diferentes concentrações do composto isolado Kaempferol (10,5 μ M; 35 μ M; 175 μ M; 349 μ M e 698 μ M) não demonstrou diferença significativa nos testes viabilidade celular (KW=4,645; p=0,4607) (Figura 25), atividades da CPY3A4 (KW=1,638; P=0,8966) (Figura 26), atividade da Fosfatase Alcalina (F(2,4)=0,6967; p=0,6967) (Figura 28), atividade da CYP2D6 (KW=4,773; p=0,442) (Figura 27), TGO (F(2,4)=0,7012; p=0,6332) (Figura 30) e TGP (F(2,4)=0,9169; p=0,5024) (Figura 31), tampouco modular as isoformas testadas do CYP450 nas condições experimentais. Porém, a incubação com kaempferol aumentou a liberação de LDH no meio de incubação, nas concentrações do composto de 10,5 e 698 μ M (F(2,4)=7,556; p=0,0022 (Figura 29).

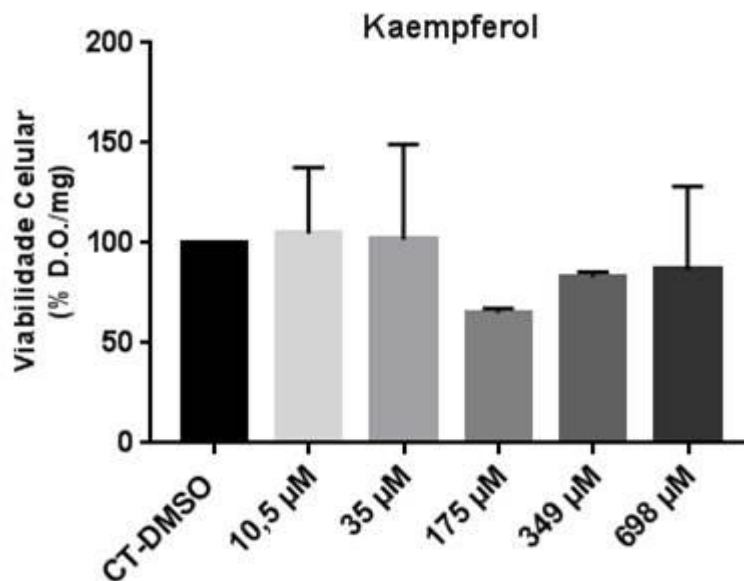


Figura 25. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de fígado de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=4,645; p=0,4607.

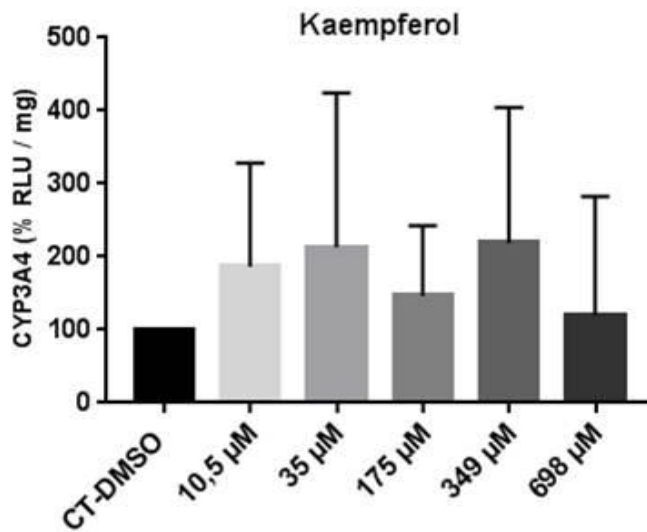


Figura 26. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=1,638; p=0,8966.

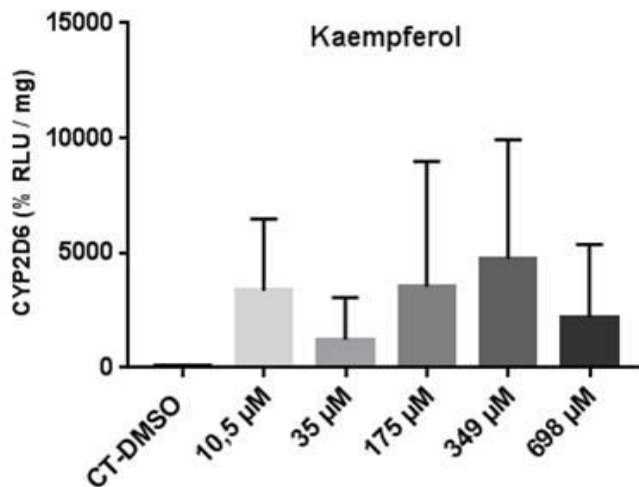


Figura 27. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=4,773; p=0,4442.

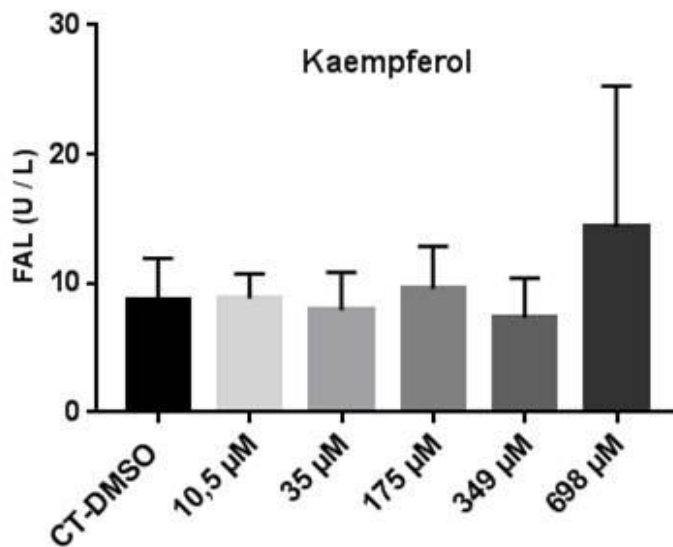


Figura 28. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,6967$; $p=0,6361$.

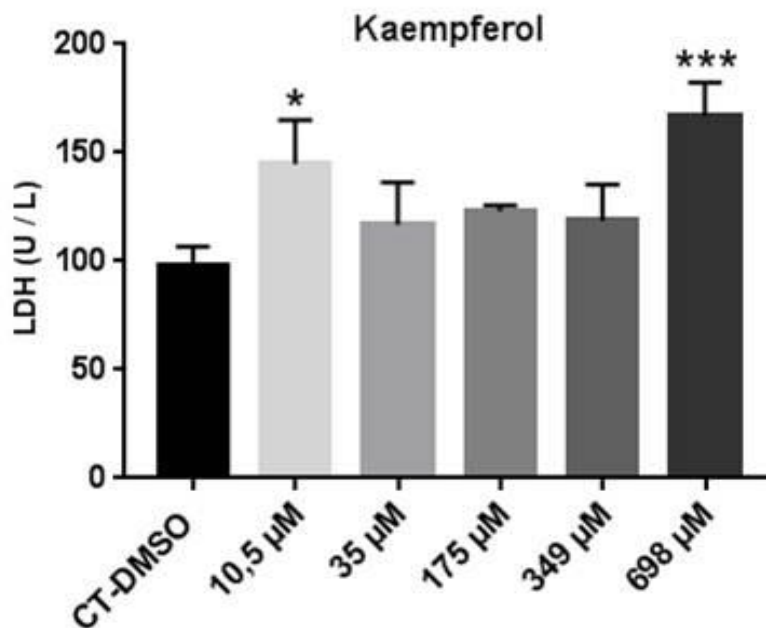


Figura 29. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, seguido do *post hoc* de Dunnett, $F(2,5)=7,556$; * $p<0,05$, *** $p<0,001$.

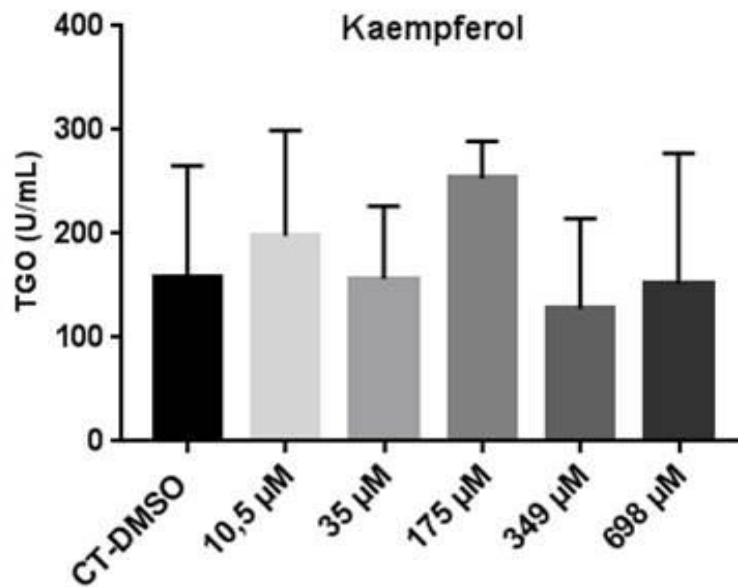


Figura 30. Atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,7012$; $p=0,6332$.

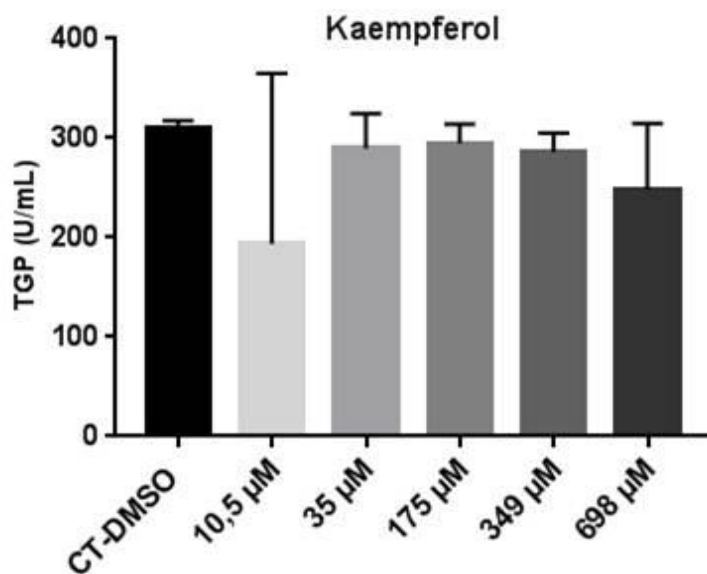


Figura 31. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,9169$; $p=0,5024$.

4.1.5 Quercetina

Após ter incubado fatias de fígado juntamente com 5 diferentes soluções do composto Quercetina (8,8 μM ; 30 μM ; 150 μM ; 300 μM ; 600 μM) não foram observadas diferenças significativas nos testes de viabilidade celular (KW=2,86; P=0,7216) (Figura 32) e atividades enzimáticas, CPY3A4 (KW=0,6048; P=0,9878) (Figura 33), fosfatase Alcalina (F(2,5)=0,3857; P=0,8492) (Figura 35) e TGP (KW=3,152; P=0,6766) (Figura 38). Porém, observou-se um efeito indutor do composto, em três concentrações testadas, uma vez que houve um aumento na atividade da CYP2D6 (KW=15,26; p=0,0093) (Figura 33). A LDH nas duas maiores concentrações testadas (F(2,5)=8,666; p=0,0011) (Figura 36) e a TGO na maior concentração testada do composto isolado foram estatisticamente aumentadas (F(2,5)=3,005; p=0,05) (Figura 37). Estas diferenças significativas sugerem que o composto isolado, quercetina nas condições experimentais, podem causar dano celular nas maiores concentrações e parece ser capaz de modular a isoforma CYP2D6 (Figura 34).

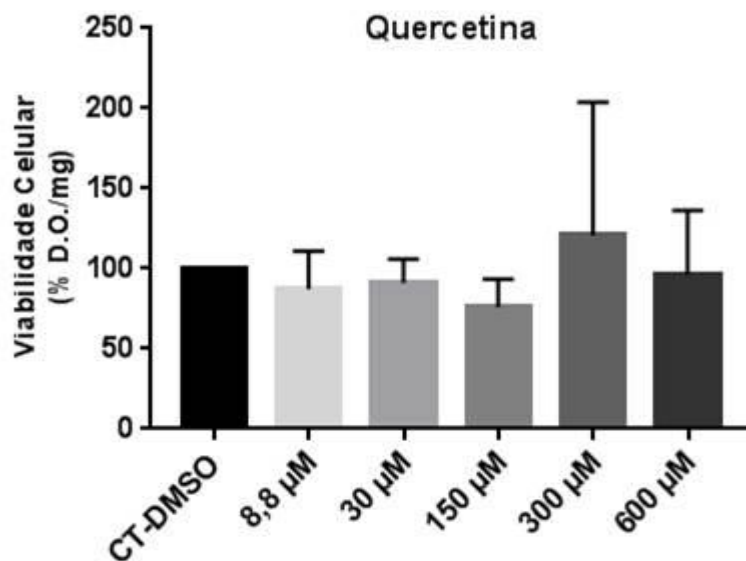


Figura 32. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de fígado de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=2,86; p=0,7216.

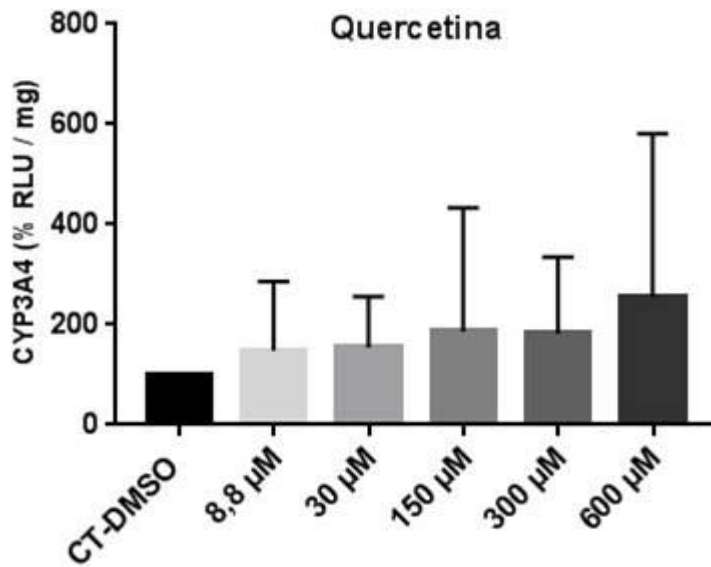


Figura 33. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=0,6048; p=0,9878.

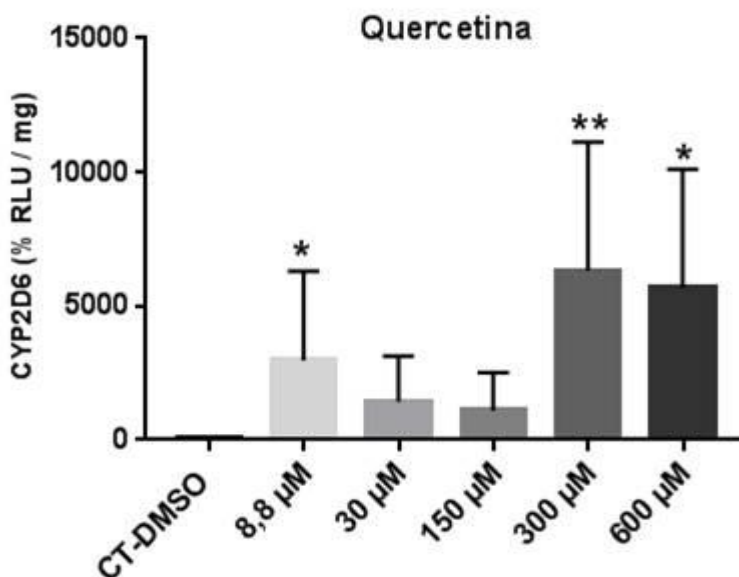


Figura 34. Atividade da enzima CYP2D6 em fatias de fígado de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal Wallis, seguido do post hoc de Dunn, KW=15,26; *p<0,05, **p<0,01.

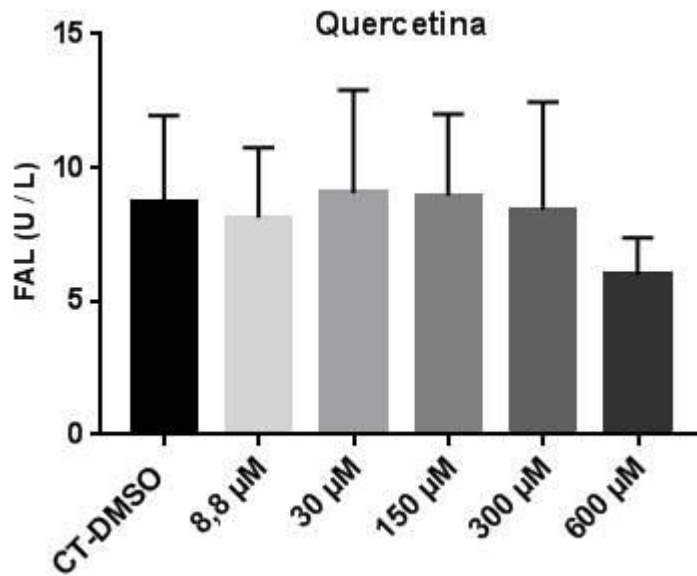


Figura 35. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, ANOVA, $F(2,5)=0,3857$; $p=0,8492$.

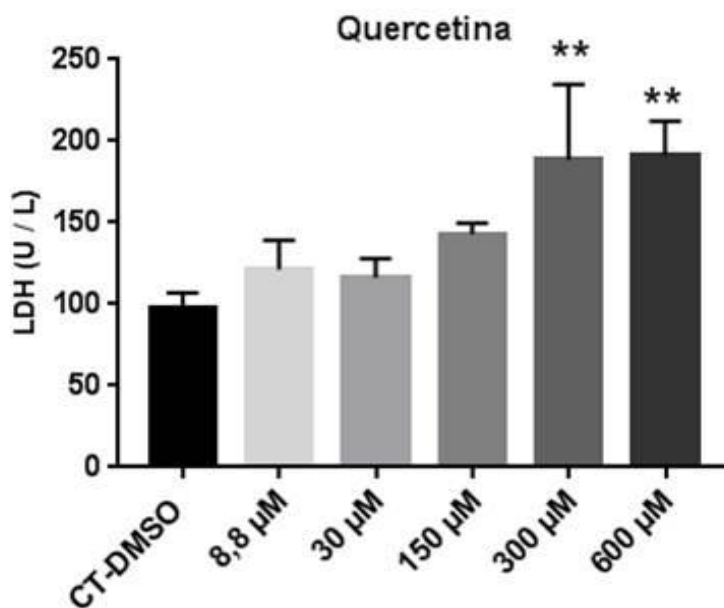


Figura 36. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, seguido do *post hoc* de Dunnett, $F(2,5)=8,666$; $**p<0,01$.

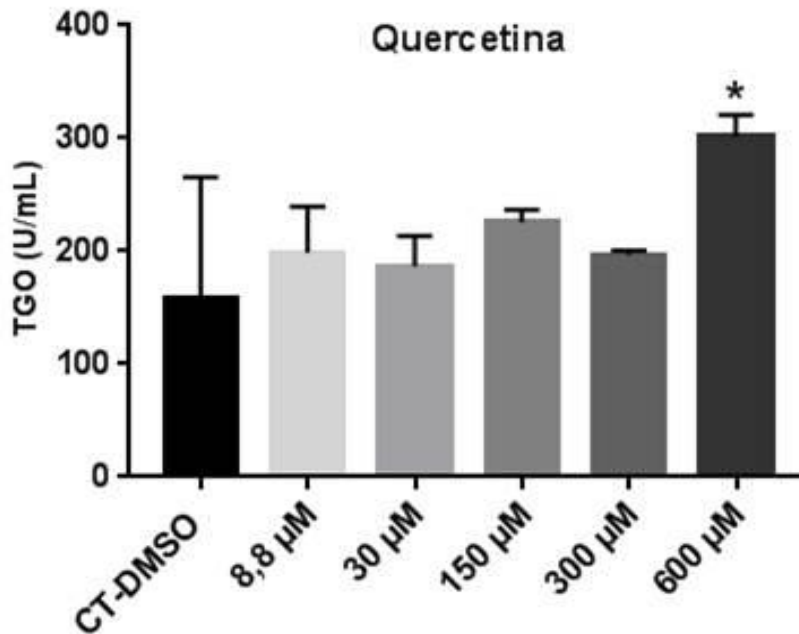


Figura 37. Atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA seguido do *post hoc* de Dunnett, $F(2,5)=3,005$; * $p<0,05$.

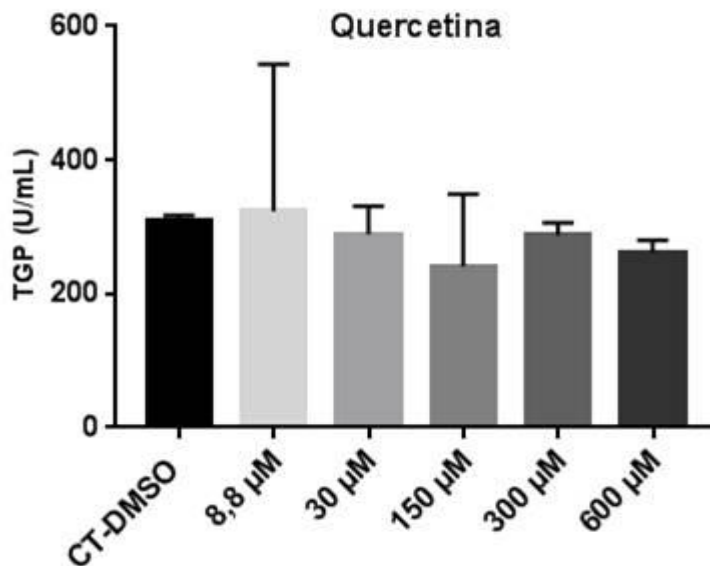


Figura 38. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). Kruskal-Wallis, $KW=3,152$; $p=0,6766$.

Tabela 1 Resumo dos resultados das incubações do extrato de *M. ilicifolia* e os compostos isolados com fatias de fígado de ratos.

Composto	MTT	CYP3A4	CYP2D6	FAL	LDH	TGO	TGP
<i>M. ilicifolia</i> (1 µg/mL)							
<i>M. ilicifolia</i> 3 µg/mL							
<i>M. ilicifolia</i> (10 µg/mL)							
<i>M. ilicifolia</i> (30 µg/mL)			↑				
<i>M. ilicifolia</i> (50 µg/mL)						↑	
<i>M. ilicifolia</i> (100 µg/mL)			↑		↑	↑	
Catequina (10 µM)							
Catequina (34,1 µM)							
Catequina (172 µM)							
Catequina (341 µM)			↑				
Catequina (684 µM)							
Epicatequina (10 µM)			↑				
Epicatequina (34,1 µM)							
Epicatequina (172 µM)							
Epicatequina (341 µM)							
Epicatequina (684 µM)			↑				
Kaempferol (10,5 µM)					↑		
Kaempferol (35 µM)							
Kaempferol (175 µM)							
Kaempferol (349 µM)							
Kaempferol (698 µM)					↑		
Quercetina (8,8 µM)			↑				
Quercetina (30 µM)							
Quercetina (150 µM)							
Quercetina (300 µM)			↑		↑		
Quercetina (600 µM)			↑		↑	↑	

4.2 Tecido Intestinal

4.2.1. *Maytenus ilicifolia*

A incubação de fatias de intestino de ratos com o extrato de *Maytenus ilicifolia*, nas concentrações de 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, não induziu diferenças significativas nos testes de Viabilidade Celular (KW=4,774; p=0,5731), bem como nas atividades enzimáticas: CPY3A4 (KW=1,528; p=0,9576); Fosfatase Alcalina (F(2,5)=0,6568; p=0,6852); Lactato Desidrogenase (KW=2,459; p=0,8730); Transaminase glutâmico-pirúvica (F(2,5)=0,7365; p=0,6289), quando comparadas com o controle CT DMSO.

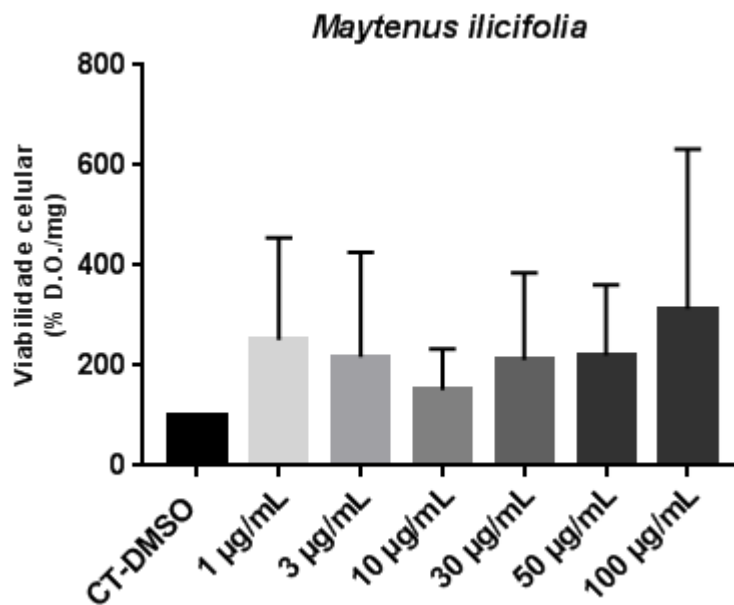


Figura 39. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de intestino de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do extrato de *Maytenus ilicifolia*. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg ± DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=4,774; p=0,5731.

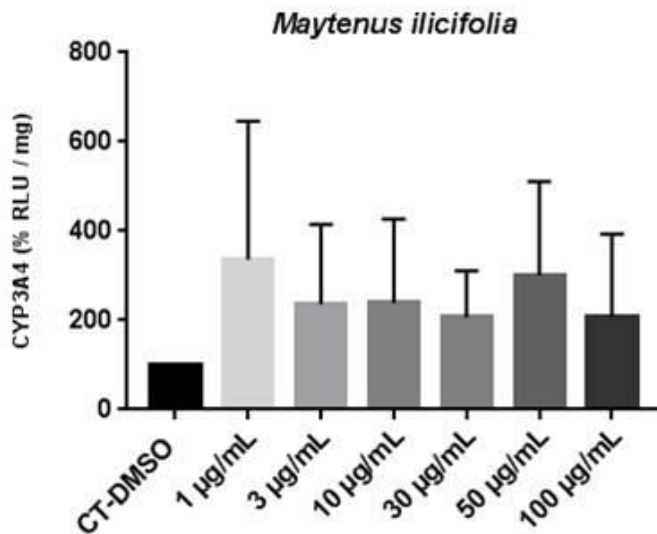


Figura 40. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino de ratos incubadas com diferentes concentrações de extrato de *Maytenus ilicifolia*. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW= 1,528, p=0,9576.

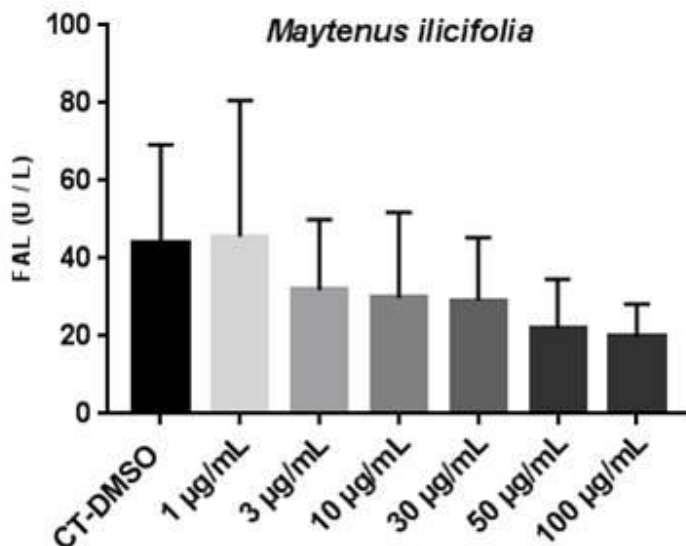


Figura 41. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do extrato de *M. ilicifolia*. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, F (2,6)=0,6568; p = 0,6852.

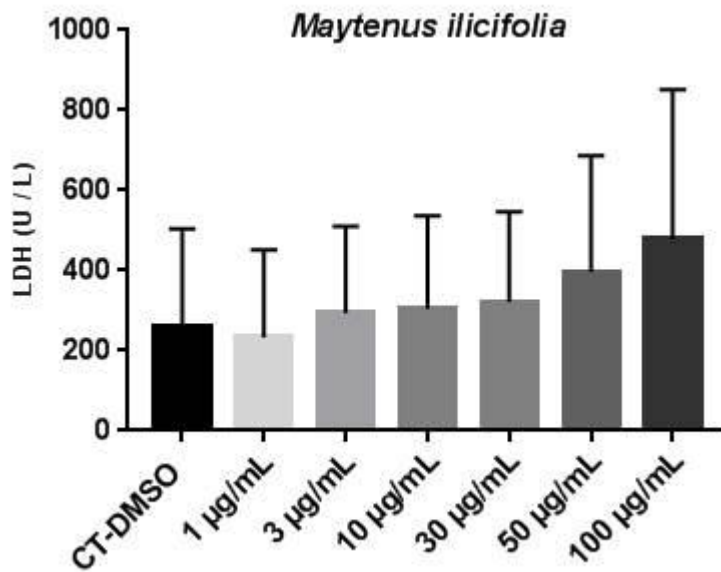


Figura 42. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do extrato de *M. ilicifolia*. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). Krusal-Wallis, KW=2,459, p=0,8730.

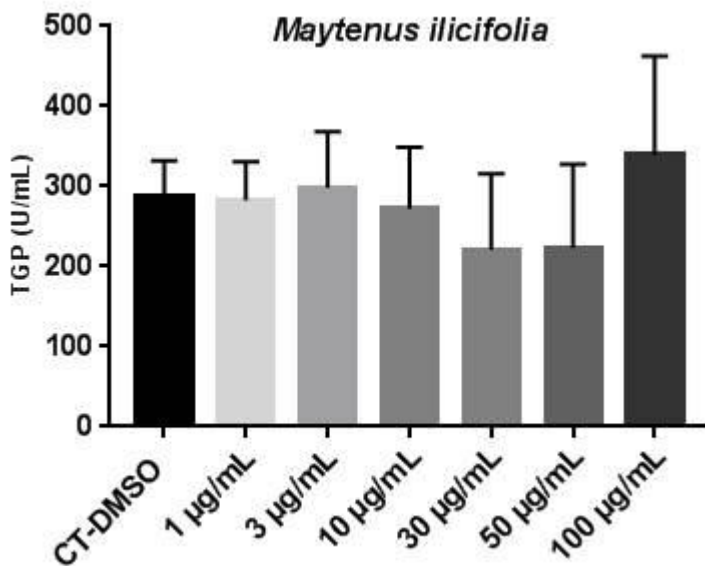


Figura 43. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do extrato de *M. ilicifolia*. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, F(2,6) = 0,7365; p = 0,6289.

4.2.2 Catequina

As incubações de fatias de intestino de ratos com soluções contendo o composto isolado Catequina - 10 μM ; 34,1 μM ; 172 μM ; 341 μM ; 684 μM , não apresentou diferença significativa nos testes de: Viabilidade Celular (KW=2,437; $p=0,7860$), bem como nas atividades enzimáticas: CPY3A4 (KW=4,316; $p=0,5049$); Fosfatase Alcalina ($F(2,5)=0,234$; $p=0,9401$); Lactato Desidrogenase (KW=0,6725; $p=0,9844$); Transaminase glutâmico-pirúvica ($F(2,5)=0,3544$; $p=0,8697$), quando comparadas com o controle CT DMSO.

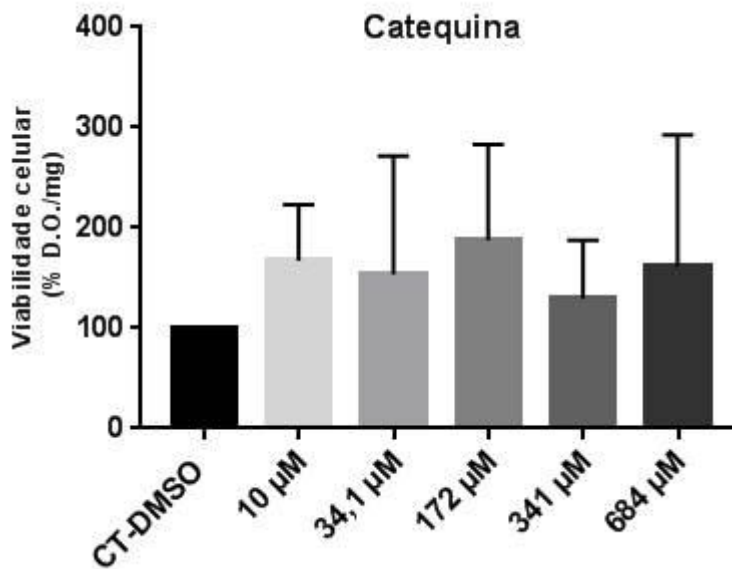


Figura 44. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de intestino de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=2,437; $p=0,7860$.

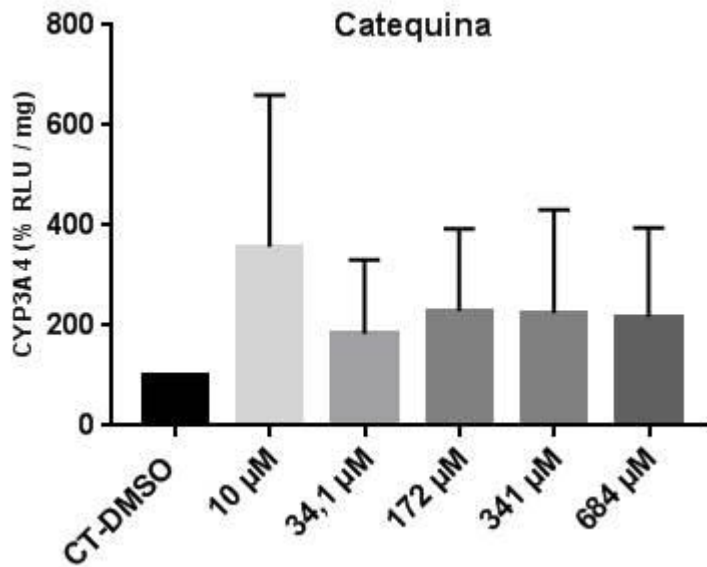


Figura 45. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=4,316, p=0,5049.

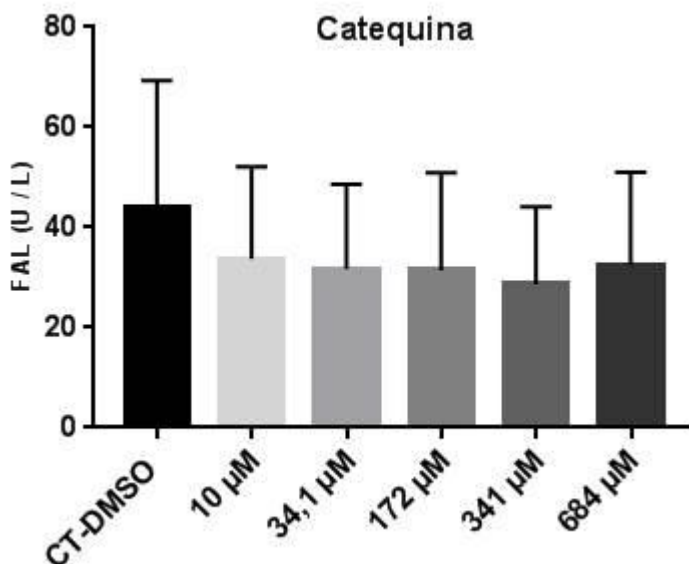


Figura 46. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, F(2,5)=0,234; p=0,9401.

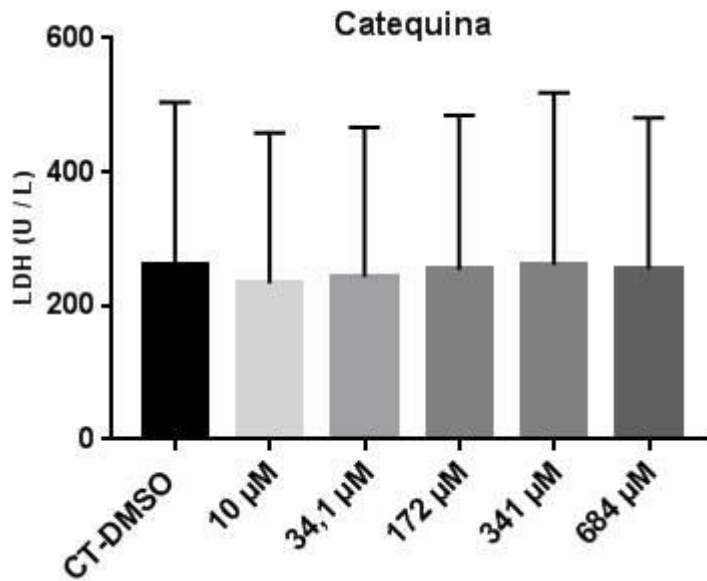


Figura 47. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). Kruskal-Wallis, KW=0,6725, p=0,9844.

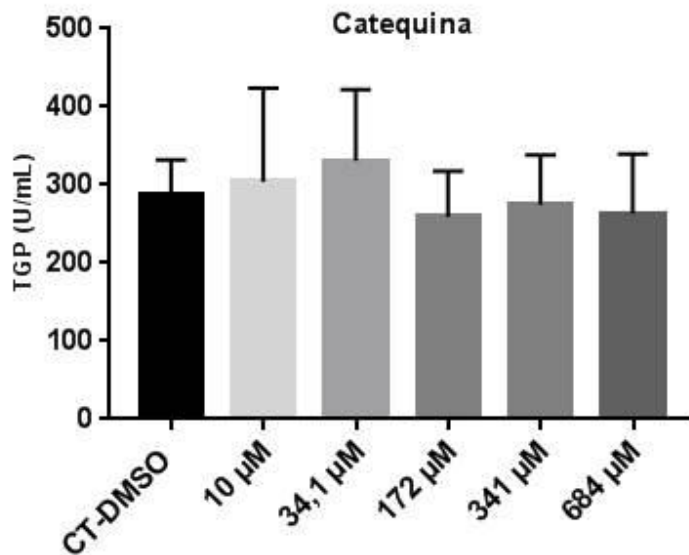


Figura 48. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado catequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, F(2,5)= 0,3544; p = 0,8697.

4.2.3 Epicatequina

As incubações de fatias de intestino com soluções contendo Epicatequina em 5 concentrações 10 μM ; 34,1 μM ; 172 μM ; 341 μM ; 684 μM , não induziram diferenças significativas nos testes de: Viabilidade Celular (KW=4,903; p=0,4278), bem como nas atividades enzimáticas: CPY3A4 (KW=5,984; p=0,3078); Fosfatase Alcalina (F(2,5)=0,1814; p=0,9643); Lactato Desidrogenase (F(2,5)=0,1302; p=0,9825); Transaminase glutâmico-pirúvica (F(2,5)=0,5066; P=0,7662), quando comparadas com o controle CT DMSO.

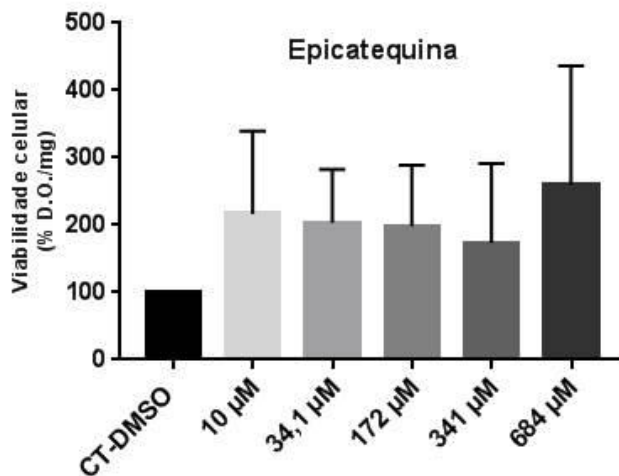


Figura 49. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de intestino de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=4,903, p=0,4278.

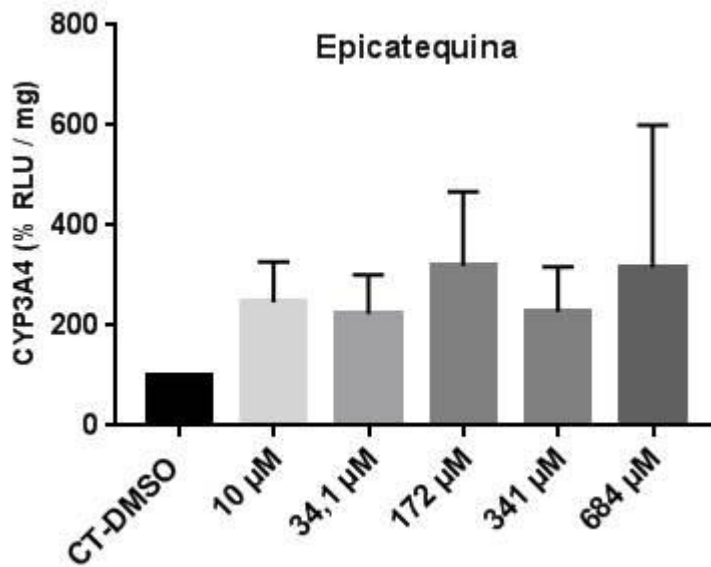


Figura 50. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=5,984, p=0,3078.

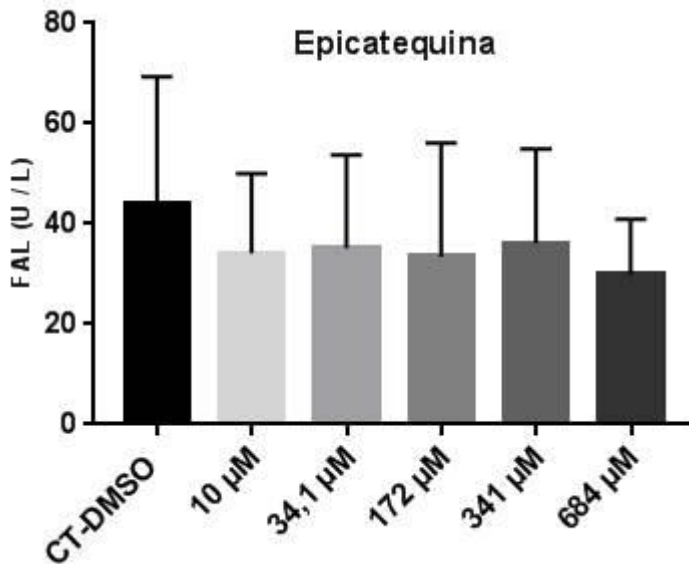


Figura 51. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, F(2,5)=0,1814; p = 0,9643.

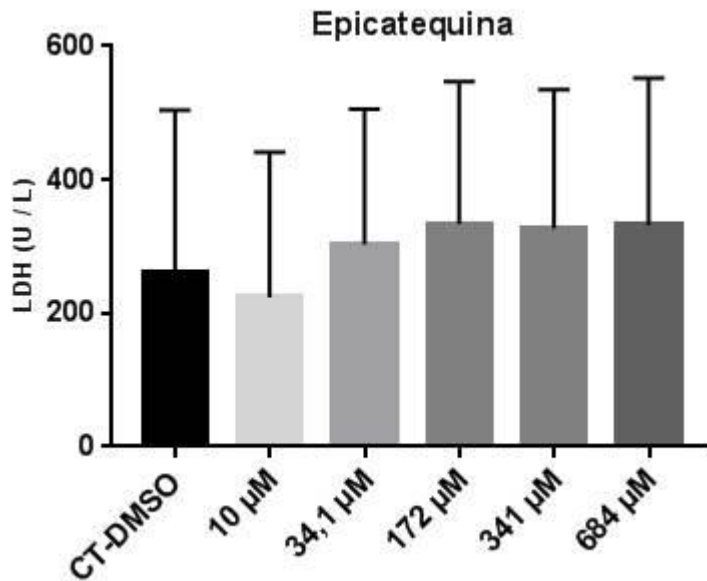


Figura 52. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,1302$; $p = 0,9825$.

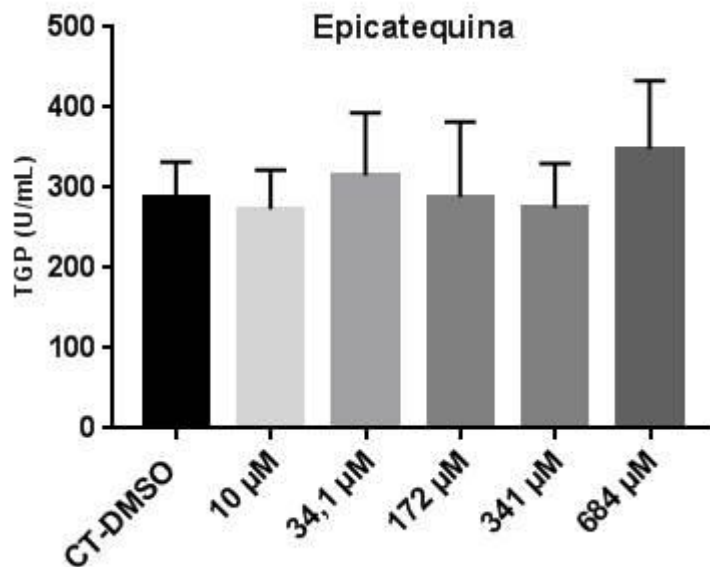


Figura 53. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias hepáticas expostas a diferentes concentrações do composto isolado epicatequina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,5066$; $p = 0,7662$.

4.2.4 Kaempferol

As incubações de fatias de intestino juntamente com 5 soluções do composto isolado Kaempferol, nas concentrações de 10,5 μM ; 35 μM ; 175 μM ; 349 μM ; 698 μM , não demonstraram diferenças significativas nos testes de: Viabilidade Celular (KW=3,095; $p=0,6854$), bem como nas atividades enzimáticas: CPY3A4 (KW=7,628; $p=0,1780$); Fosfatase Alcalina ($F(2,5)=0,662$; $p=0,6591$); Lactato Desidrogenase (KW=1,889; $p=0,8643$); Transaminase glutâmico-pirúvica ($F(2,5)=0,09488$; $p=0,9913$), quando comparadas com o controle CT DMSO.

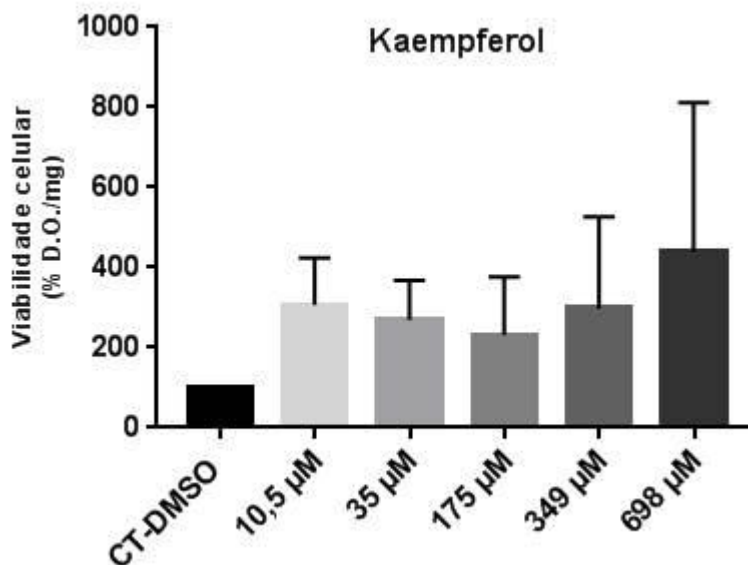


Figura 54. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de intestino de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP ($n = 3$), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=3,095; $p=0,6854$.

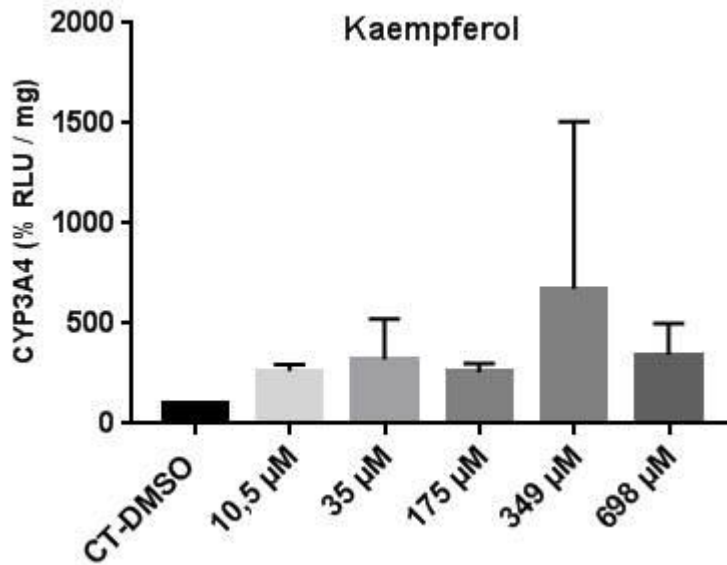


Figura 55. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=7,628; p=0,1780.

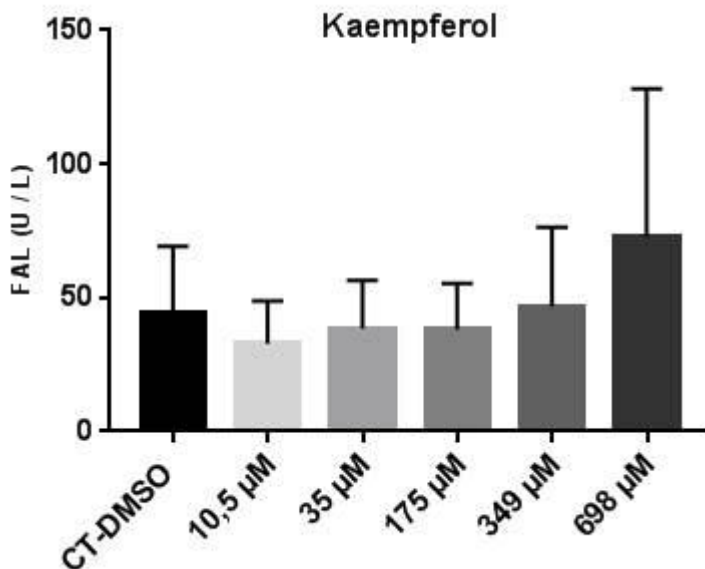


Figura 56. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, , F(2,5)=0,662; p = 0,6591.

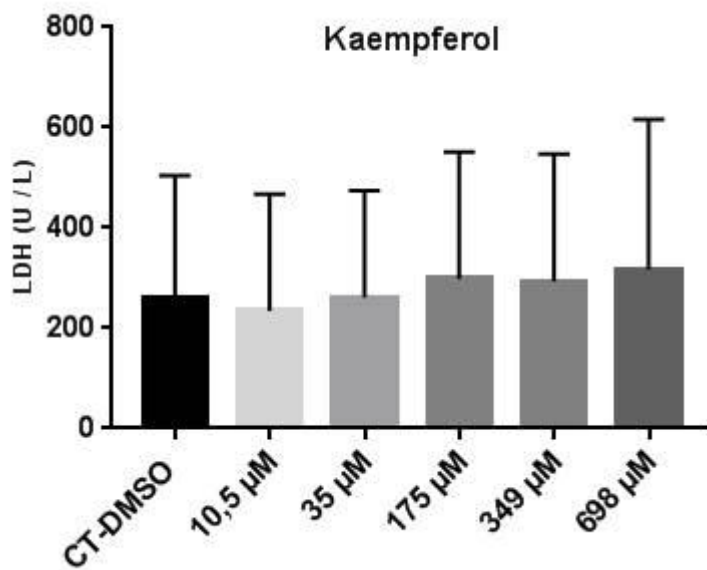


Figura 57. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). Kruskal-Wallis, KW=1,889; p=0,8643.

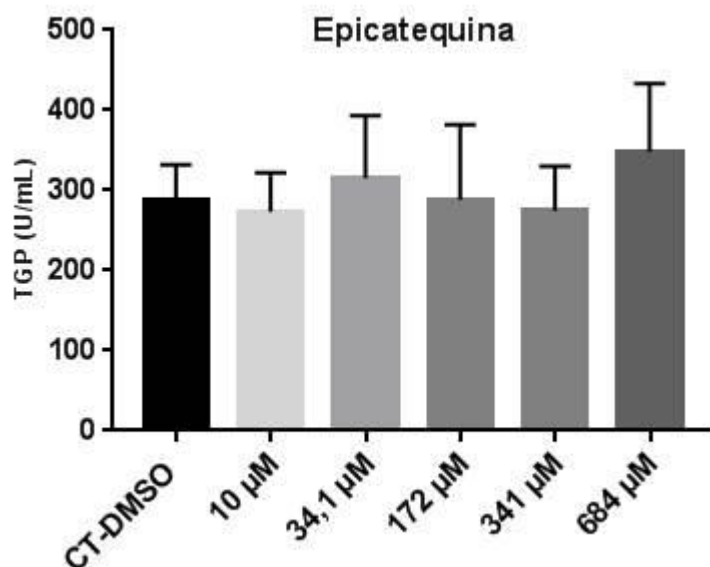


Figura 58. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado kaempferol. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, F (2,5)=0,5066; p=7662.

4.2.5 Quercetina

As incubações de fatias de intestino de ratos com 5 concentrações do composto isolado Quercetina, 8,8 μM , 30 μM , 150 μM , 300 μM e 600 μM , não induziram diferenças significativas nos testes de: Viabilidade Celular (KW=4,41; $p=0,4920$), bem como nas atividades enzimáticas, CYP3A4 (KW=1,873, $p=0,8664$), Fosfatase Alcalina ($F(2,5)=0,4362$; $p=0,8150$), Lactato Desidrogenase ($F(2,5)=0,1701$; $p=0,9688$), Transaminase glutâmico-pirúvica ($F(2,5)=0,1701$; $p=0,9688$), quando comparadas com o controle CT DMSO.

Os resultados indicam que o extrato de *Maytenus ilicifolia* e os compostos isolados Catequina, Epicatequina, Kaempferol e Quercetina não modulam as atividades das isoformas CYP3A4 e CYP2D6 ou causam danos às células entéricas de ratos nas condições experimentais.

Nas incubações de fatias de intestino nenhum parâmetro analisado mostrou-se significativamente alterado.

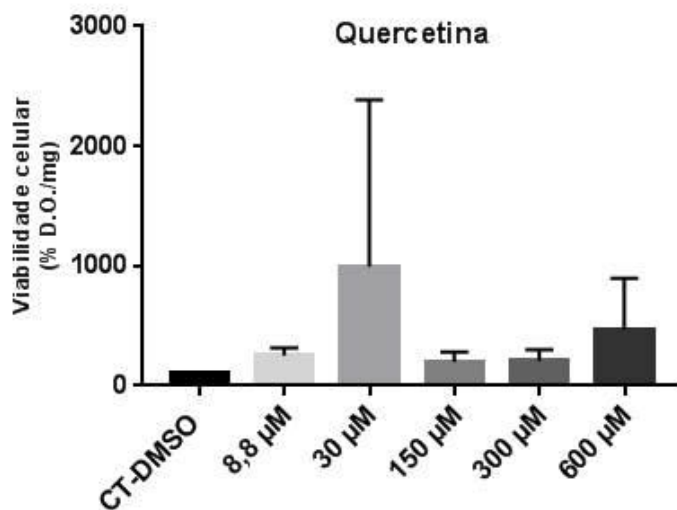


Figura 59. Atividade mitocondrial (viabilidade celular) de fatias de intestino de ratos incubadas durante 6 horas com diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como porcentagem de densidade óptica por miligrama de tecido (% D.O./mg \pm DP (n = 3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=4,41; $p=0,4920$.

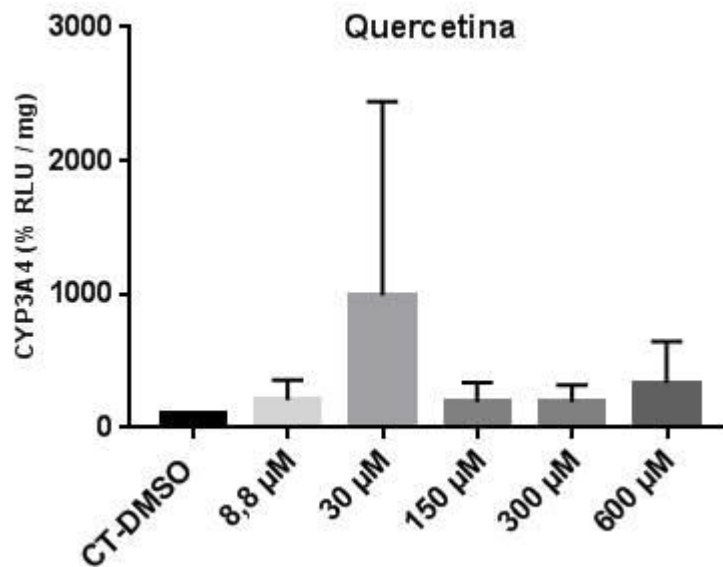


Figura 60. Atividade da enzima CYP3A4 em fatias de intestino de ratos incubadas com diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como porcentagem de unidades relativas de luminescência por miligrama de tecido (% RLU / mg) \pm DP (n=3), sendo considerado 100% o grupo controle (CT-DMSO). Kruskal-Wallis, KW=1,873; p=0,8664.

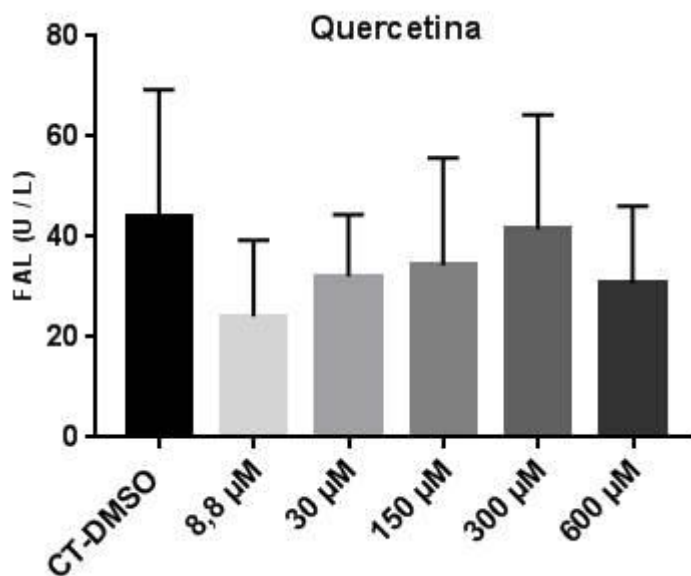


Figura 61. Atividade da fosfatase alcalina (FAL) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, F(2,5)=0,4362; p=0,8150.

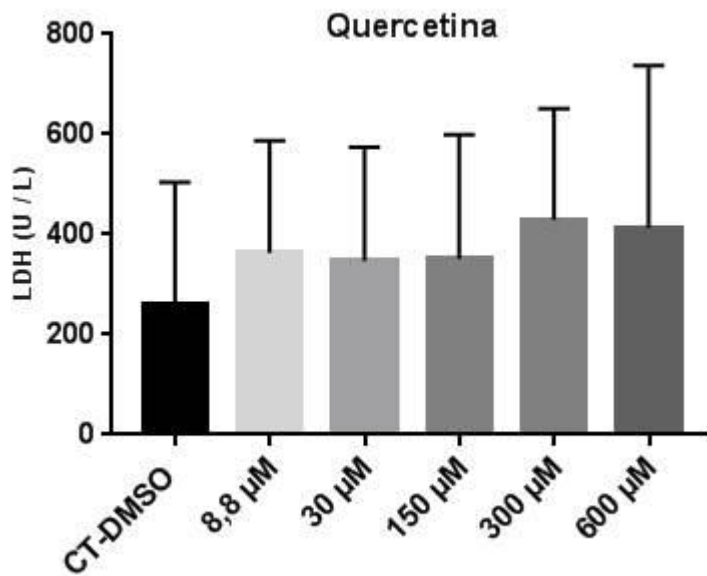


Figura 62. Atividade da lactato desidrogenase (LDH) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como médias de unidades por litro (U/L) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,1701$; $p=0,9688$.

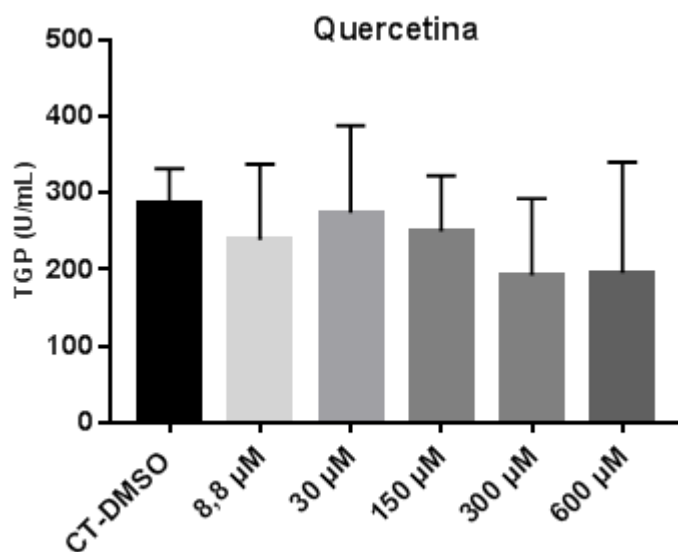


Figura 63. Atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) no meio de incubação de fatias de intestino expostas a diferentes concentrações do composto isolado quercetina. Os resultados são expressos como médias de unidades por mililitro (U/mL) \pm DP (n=3). ANOVA, $F(2,5)=0,4098$; $p=0,8057$.

5. DISCUSSÃO

Os resultados, obtidos a partir de incubações de fatias de fígado e intestino de ratos com soluções contendo extrato de *Maytenus ilicifolia* e compostos isolados (catequina, epicatequina, kaempferol e quercetina), demonstram que esta espécie apresenta potencial interação farmacológica. Este trabalho visa avaliar parâmetros que determinem segurança aos pacientes do ensaio clínico randomizado duplo cego de *Maytenus ilicifolia* como estratégia no tratamento da doença de refluxo gastroesofágico. Os pacientes que fizerem o uso diário de medicamentos metabolizados pela enzima CYP2D6 serão excluídos do ensaio clínico.

Esta investigação é de grande relevância, uma vez que, o uso da fitoterapia está cada vez mais difundido na população mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). O aumento do uso da fitoterapia pode ser uma alternativa na terapêutica, mas também deve ser utilizada com cautela uma vez que compostos a base de plantas podem aumentar o risco de hepatotoxicidade em humanos (LIU *et al.*, 2016). Também fitoterápicos, quando coadministrados com medicamentos, podem induzir o metabolismo das enzimas do sistema enzimático do CYP450 e diminuir a concentração de certos medicamentos (BILIA *et al.*, 2002).

Também é relevante destacar que o modelo experimental escolhido para a investigação de toxicidade de compostos foi o de fatias de precisão de tecidos *ex vivo*. Na qual, fatias de órgãos são incubadas com os compostos de interesse, o que permite que diferentes tipos celulares presentes no tecido sejam expostos aos compostos sob as mesmas condições experimentais no mesmo instante. Isto ocorre, pois uma única fatia de tecido é composta por praticamente toda maquinaria celular, enquanto as culturas celulares primárias contêm apenas células isoladas. Este método é mais rápido do que o de cultura celular, pois não necessita de um período prolongado de incubação para obtenção da quantidade de células mínimas para realizar um ensaio. Além de ser relativamente econômico e seguir preceitos éticos quando comparado aos ensaios *in vivo*, pois com um único animal é possível testar diversos compostos e concentrações diferentes (DE GRAAF *et al.*, 2010; PHAM *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

Nas fatias de fígados, o extrato da planta em duas concentrações (30 e 100 µg/mL) foi capaz de modular a isoforma CYP2D6, causando efeito indutor desta. O mesmo ocorreu nos compostos isolados, catequina, epicatequina e quercetina que induziram a metabolização desta enzima.

Em nosso trabalho, o extrato de *Maytenus ilicifolia* e os compostos isolados, catequina, epicatequina e quercetina, atuaram como indutores da enzima CYP2D6, isoforma responsável pela metabolização de fármacos de relevância clínica e bastante relacionada com interações farmacológicas (ZHOU *et al.*, 2009; BECKER, 2011). Já a enzima CYP3A4 não se mostrou alterada nas condições experimentais testadas, apesar desta isoforma estar envolvida na metabolização da maior parte dos fármacos comercializados (ZHOU, 2008). Embora estudos mostrem evidências de plantas modularem a enzima CYP3A4, é possível que o extrato de *Maytenus ilicifolia* e os compostos isolados testados não estejam atuem da mesma forma. Um estudo que avaliou o efeito de duas plantas (Paeoniflorin e Albiflorin) quando incubadas com culturas de células primárias de hepatócitos, na expressão das proteínas CYP3A4 e CYP2D6, observou que ambas as plantas aumentaram a expressão da CYP2D6 (GAO *et al.*, 2015). Enquanto a Albiflorina diminuiu a expressão da CYP3A4 a Paeoniflorina não alterou esta isoforma (GAO *et al.*, 2015). Outro trabalho analisou o efeito da fórmula de *Baoyuan*, tradicional da medicina chinesa, composta por quatro plantas (*Astragalus membranaceus*, *Panax ginseng*, *Glycyrrhiza uralensis* e *Cinnamomum cassia*), em 7 isoenzimas do CYP em ratos. Demonstrou que estas plantas induziram a CYP2D6 e inibiram CYP3A4 (LU *et al.*, 2018). O fitoterápico *Genipin*, obtido a partir da *Gardenia jasminoides Ellis*, incubado com células humanas aumentou a expressão da proteína da CYP2D6 e diminuiu a CYP3A4, analisado pelo método de Western blot. Este fitoterápico apresentou efeito indutor da CYP2D6 e inibidor da CYP3A4, nas análises realizadas pelo ensaio P450-Glo™ (GAO *et al.*, 2014). Um extrato de chá verde com elevado teor de catequinas alterou os parâmetros farmacocinéticos em roedores quando coadministrado com midazolam, dobrando a concentração máxima deste fármaco devido à inibição de CYP3A4 (NISHIKAWA *et al.*, 2004).

Os resultados sobre a modulação da atividade da CYP3A pela quercetina são controversos, quando administrada em associação com a doxorrubicina via oral, em ratos, inibiu a glicoproteína-P e CYP3A4, causando elevação na biodisponibilidade da

doxorubicina (CHOI *et al.*, 2011). O oposto foi observado com este mesmo composto, induziu as funções da P-gp e CYP3A4, causando a diminuição da concentração plasmática da ciclosporina, em roedores (YU *et al.*, 2011). Nos testes realizados no nosso ensaio, o composto isolado quercetina não apresentou efeitos modulatórios da enzima CYP3A4, talvez por ter sido apenas uma exposição aguda a este composto. Visto que a quercetina em exposição prolongada leva a um aumento nos níveis de expressão do mRNA da CYP3A4 (BASHEER e KEREM, 2015).

Nossos dados sugerem a necessidade do cuidado na coadministração do extrato de *Maytenus ilicifolia* juntamente com fármacos metabolizados pela CYP2D6, devido ao potencial de interação farmacológica. O extrato ao induzir a capacidade metabólica desta isoforma trará como consequências a falha na terapêutica, causado pela diminuição da concentração plasmática dos fármacos por ela metabolizados, como antidepressivos, betabloqueadores, antipsicóticos (BECKER, 2011), entre outros. Na tabela 2, listamos fármacos que devem ser evitados quando se fizer uso do extrato de *Maytenus ilicifolia*.

Tabela 2. Lista de fármacos metabolizados pela CYP2D6

Medicamentos que são substratos da CYP2D6	
Classe	Medicamentos
Analgésicos opióides	Codeína
	Oxicodona
	Metadona
	Tramadol
Antiarrítmicos	Amiodarona
Anticonvulsivantes	Carbamazepina
	Fenobarbital
Antibiótico	Rifampicina
Antidepressivos	Bupropiona
	Citalopram
	Clomipramina
	Escitalopram
	Fluoxetina
	Fluvoxamina
	Mirtazapina
	Nortriptilina
	Paroxetina
	Sertralina
Venlafaxina	
Antidiabético	Alogliptina
Antifúngico	Itraconazol
Anti-helmíntico	Ivermectina
Anti-histamínicos	Cimetidina
	Clorfeniramina
	Loratadina
Anti-inflamatórios não esteróides (AINES)	Celecoxibe
Anti-maláricos	Cloroquina
	Quinidina
Antineoplásicos	Cetuximab
	Ibrutinibe
	Imatinibe
	Nilotinibe
Antiparkinsoniano	Biperideno
Antipsicóticos	Clorpromazina
	Clozapina
	Flufenazina
	Haloperidol
	Olanzapina
	Pimozida
Risperidona	
Trifluoperazina	
Antirretroviral	Ritonavir
Beta-bloqueadores	Carvedilol
	Metoprolol
DMARDs (drogas antirreumáticas modificadoras do curso da doença)	Upadacitinibe

Quanto aos estudos de citotoxicidade dois métodos bastante utilizados são o de viabilidade celular, pelo ensaio do MTT (MOSMANN, 1983) e dosagem da enzima LDH, frequentemente utilizada como um indicador de dano à membrana celular (lise celular), podendo sugerir necrose celular (SMITH et al., 2013). Observamos que o tecido hepático liberou uma quantidade maior da enzima nos meios de cultura oriundos da incubação com o extrato da planta e com os compostos isolados kaempferol e quercetina. Porém, no resultado do ensaio do MTT (atividade mitocondrial) todos os tratamentos utilizados não alteraram a viabilidade celular. Embora estudos mostrem que extratos fitoquímicos possam aumentar o conteúdo de LDH e evidenciar prejuízo na viabilidade celular (WANG et al., 2019), é possível que estas alterações não sejam observadas em ambos os testes. Abdull e colaboradores (2011) investigaram potencial de desintoxicação de carcinógenos com o fitoquímico sulfurano S em fatias de fígado e pulmão. Este também analisou o conteúdo do LDH, que apresentou elevado e no ensaio de viabilidade celular, pelo método do MTT não observou alteração no tratamento com o fitoquímico.

A enzima TGO mostrou-se aumentada nos meios oriundos dos tratamentos realizados em fatias de fígado nas maiores concentrações do extrato de *M. ilicifolia* e no composto quercetina na maior concentração. Já a enzima TGP não apresentou alteração em nenhum dos tratamentos. Estas enzimas são utilizadas como marcador de dano celular e auxiliam na manutenção da formação de glicose (MCGILL, 2016; TELLI et al., 2016). Um estudo com cultura celular incubada com o composto *Rhizoma Paridis* da medicina tradicional chinesa verificou um aumento significativo destas transaminases (ZHAO et al., 2020). Embora pudessemos esperar um aumento também na transaminase glutâmico-pirúvica, diretrizes clínicas indicam que indivíduos com alterações hepáticas apresentem perfil metabólico dentro da normalidade desta enzima (KWO et al., 2017). Nutt e colaboradores (2000) relataram que pacientes com hepatite C crônica apresentaram níveis de TGP normais (NUTT et al., 2000)

Considerando as evidências de toxicidade no tecido hepático, verificados nos ensaios da LDH e da TGO, pacientes com quadro conhecido de hepatopatia serão excluídos do ensaio randomizado duplo cego de *Maytenus ilicifolia* como estratégia no tratamento da doença de refluxo gastroesofágico.

É importante descrever que há evidências de que a enzima CYP2D6, que tem papel importante na metabolização de xenobióticos, está relacionada com dano hepático. Esta

isoforma é o principal alvo do autoantígeno anti-LMK-1(antígeno microsomal hepático-renal) contra CYP2D6, presente na AIH-2 (hepatite autoimune tipo 2) e na HCV (hepatite D crônica) (ZACHOU et al., 2004; MIZUTANI et al., 2005). Os LKM-1 reconhecem uma sequência linear curta da CYP2D6 (Manns et al., 1991). A associação entre respostas de células T de defesa com a isoforma é relacionada à atividade da HAI-2 (MA, 2006). O extrato de *M. ilicifolia* alterou a liberação de TGO e LDH no meio de incubação e a atividade da CYP2D6, assim é possível sugerir o envolvimento do dano celular sobre a modulação da CYP2D6 hepáticos.

Ainda, a incubação de fatias de intestino com o extrato da espécie estudada não alterou quaisquer parâmetros de dano celular, bem como a atividade das enzimas do CYP450. Desta forma, estes achados reforçam o envolvimento da toxicidade nos tecidos com a modulação da CYP2D6, conseqüentemente da falta de toxicidade no tecido entérico e a não modulação dessa isoforma.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método de incubação de fatias de tecido (*ex vivo*) incubadas com compostos a base de plantas é uma ferramenta interessante, reproduz de uma forma bastante fidedigna o tecido *in vivo*, uma vez que contém boa parte do arcabouço fisiológico (tecidos, diferentes células, membranas, espaços inter e intracelulares). Contudo o método de incubação de fatias de tecido apresenta a limitação para investigação de tratamentos crônicos, uma vez que devido à complexidade dos tecidos não é possível mantê-los por um período prolongado sem eventuais prejuízos.

Este trabalho demonstra o potencial de interação farmacológica entre o extrato de *Maytenus ilicifolia* e fármacos metabolizados pelo sistema CYP2D6, reforçando que a fitoterapia deve ser utilizados com cautela, e pesquisas neste campo devem ser encorajadas, tanto para elucidação de eficácia e de mecanismos de ação, quanto para fornecer uma base teórica para o uso racional desta planta.

Como perspectivas deste estudo, pretendemos avaliar a interação com outros sistemas enzimáticos, como enzimas de fase II (glutathione transferase) e transportador III (glicoproteína-P), para melhor entendimento do potencial e dos mecanismos de interação farmacocinética do extrato de *M. ilicifolia* e seus compostos com sistemas de biotransformação e transporte de fármacos.

7. REFERÊNCIAS

- ABDULL RAZIS, Ahmad Faizal; IORI, Renato; IOANNIDES, Costas. The natural chemopreventive phytochemical R-sulforaphane is a far more potent inducer of the carcinogen-detoxifying enzyme systems in rat liver and lung than the S-isomer. **International journal of cancer**, v. 128, n. 12, p. 2775-2782, 2011.
- ALMEIDA, C. et al. Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.): saber de erveiros e feirantes em Pelotas (RS). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 722-729, 2015.
- ANVISA, Brasil et al. Farmacopeia brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 5a edição**, v. 2, p. 1-523, 2010.
- ASHA, Sepuri; VIDYAVATHI, Maravajhala. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs—a review. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 6, p. 1699-1722, 2010.
- ASHOUR, Mohamed L. et al. Inhibition of cytochrome P450 (CYP3A4) activity by extracts from 57 plants used in traditional chinese medicine (TCM). **Pharmacognosy magazine**, v. 13, n. 50, p. 300, 2017.
- BAGGIO, Cristiane Hatsuko et al. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 433-440, 2007.
- BAGGIO, Cristiane Hatsuko et al. Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex. Reissek. **Journal of ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 385-391, 2009.
- BASHEER, Loai; KEREM, Zohar. Interactions between CYP3A4 and dietary polyphenols. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015.
- BECKER, Daniel E. Adverse drug interactions. **Anesthesia progress**, v. 58, n. 1, p. 31-41, 2011.
- BILIA, Anna Rita; GALLORI, Sandra; VINCIERI, Franco F. St. John's wort and depression: efficacy, safety and tolerability-an update. **Life sciences**, v. 70, n. 26, p. 3077-3096, 2002.
- BRASIL, M. D. S. **PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 2.960, DE 9 DE DEZEMBRO DE 2008**, 2008.
- BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2011.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : Rename 2020 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2020.**
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso. 2015.
- BUNDHUN, Pravesh Kumar et al. Is the concomitant use of clopidogrel and Proton Pump Inhibitors still associated with increased adverse cardiovascular outcomes following coronary angioplasty?: a systematic review and meta-analysis of recently published studies (2012–2016). **BMC cardiovascular disorders**, v. 17, n. 1, p. 3, 2017.
- CHOI, Jun-Shik; PIAO, Yong-Ji; KANG, Keon Wook. Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. **Archives of pharmacal research**, v. 34, n. 4, p. 607-613, 2011.

CHOUDHURI, Supratim; KLAASSEN, Curtis D. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. **International journal of toxicology**, v. 25, n. 4, p. 231-259, 2006.

CIPRIANI, Thales R. et al. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 274-278, 2008.

CIPRIANI, Thales R. et al. An arabinogalactan isolated from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 703-706, 2004.

CIPRIANI, Thales R. et al. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thrombosis and haemostasis**, v. 101, n. 05, p. 860-866, 2009.

CUNHA-LAURA, A. L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* on reproduction and embryo-fetal development in Wistar rats. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 3711-3720, 2014.

DE GRAAF, Inge AM et al. Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. **Nature protocols**, v. 5, n. 9, p. 1540, 2010.

DE MAGALHÃES, PEDRO MELILLO. Agrotecnologia para o cultivo da Espinheira Santa. 2002.

DOLTON, Michael J.; ROUFOGALIS, Basil D.; MCLACHLAN, Andrew J. Fruit Juices as Perpetrators of Drug Interactions: The Role of Organic Anion-Transporting Polypeptides. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 5, p. 622-630, 2012.

DUTRA, Rafael C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FEBRAFAR. Cresce o consumo de fitoterápicos no Brasil. **Novo FEBRAR**, 2020. Disponível em: <<http://novo.febrafar.com.br/cresce-o-consumo-de-fitoterapicos-no-brasil/>>. Acesso em: 10, julho, 2020.

FILPPULA, Anne M. et al. Improved predictions of time-dependent drug-drug interactions by determination of cytosolic drug concentrations. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

GAO, Li-Na et al. Comparison of paeoniflorin and albiflorin on human CYP3A4 and CYP2D6. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

GAO, Li-Na et al. Evaluation of genipin on human cytochrome P450 isoenzymes and P-glycoprotein in vitro. **Fitoterapia**, v. 98, p. 130-136, 2014.

GIACOMINI, Kathleen M. et al. Membrane transporters in drug development. **Nature reviews Drug discovery**, v. 9, n. 3, p. 215, 2010.

GIRARDIN, François. Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 311, 2006.

GÜLÇİN, İlhami et al. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1698-1702, 2016.

GURLEY, Bill J. et al. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 72, n. 3, p. 276-287, 2002.

GURLEY, Bill J. et al. Gauging the clinical significance of P-glycoprotein-mediated herb-drug interactions: Comparative effects of St. John's wort, Echinacea, clarithromycin, and rifampin on digoxin pharmacokinetics. **Molecular nutrition & food research**, v. 52, n. 7, p. 772-779, 2008.

HERNANDES, Camila et al. Anticancer Activities of the Quinone-Methide Triterpenes Maytenin and 22- β -hydroxymaytenin Obtained from Cultivated *Maytenus ilicifolia* Roots Associated with Down-Regulation of miRNA-27a and miR-20a/miR-17-5p. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 760, 2020.

- JODOIN, Julie; DEMEULE, Michel; BÉLIVEAU, Richard. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1542, n. 1-3, p. 149-159, 2002.
- JORGE, R. M. et al. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.
- KOEPSSELL, Hermann; ENDOU, Hitoshi. The SLC22 drug transporter family. **Pflügers Archiv**, v. 447, n. 5, p. 666-676, 2004.
- KWO, Paul Y.; COHEN, Stanley M.; LIM, Joseph K. ACG clinical guideline: evaluation of abnormal liver chemistries. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, n. 1, p. 18-35, 2017.
- LIU, Changxiao et al. Research advances on hepatotoxicity of herbal medicines in China. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.
- LU, Ying-Yuan et al. Effects of Baoyuan decoction, a traditional Chinese medicine formula, on the activities and mRNA expression of seven CYP isozymes in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 225, p. 327-335, 2018.
- MA, Yun et al. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p. 868-882, 2006.
- MACIEL, Victor. Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS. Ministério da Saúde. 2016. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>>. Acesso em: 10, julho de 2020.
- MANNS, M. P. et al. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. **The Journal of clinical investigation**, v. 88, n. 4, p. 1370-1378, 1991.
- MARKOWITZ, J. S.; DEVANE, C. L. The emerging recognition of herb-drug interactions with a focus on St. John's wort (*Hypericum perforatum*). **Psychopharmacology bulletin**, v. 35, n. 1, p. 53, 2001.
- MARKOWITZ, J. S.; DEVANE, C. L. The emerging recognition of herb-drug interactions with a focus on St. John's wort (*Hypericum perforatum*). **Psychopharmacology bulletin**, v. 35, n. 1, p. 53, 2001.
- MCDONNELL, Anne M.; DANG, Cathy H. Basic review of the cytochrome p450 system. **Journal of the advanced practitioner in oncology**, v. 4, n. 4, p. 263, 2013.
- MCGILL, Mitchell R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. **EXCLI journal**, v. 15, p. 817, 2016.
- MIZUTANI, Takaharu et al. Autoantibodies against CYP2D6 and other drug-metabolizing enzymes in autoimmune hepatitis type 2. **Drug metabolism reviews**, v. 37, n. 1, p. 235-252, 2005.
- MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOULY, Stéphane et al. Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John's Wort?. **Pharmacological research**, v. 118, p. 82-92, 2017.
- NETSCH, M. I. et al. Induction of CYP1A by green tea extract in human intestinal cell lines. **Planta medica**, v. 72, n. 06, p. 514-520, 2006.
- NISHIKAWA, Masataka et al. Effects of continuous ingestion of green tea or grape seed extracts on the pharmacokinetics of midazolam. **Drug metabolism and pharmacokinetics**, v. 19, n. 4, p. 280-289, 2004.
- NUTT, Angela K. et al. Liver biopsy in the evaluation of patients with chronic hepatitis C who have repeatedly normal or near-normal serum alanine aminotransferase levels. **The American journal of medicine**, v. 109, n. 1, p. 62-64, 2000.

- OSWALD, Stefan. Organic anion transporting polypeptide (OATP) transporter expression, localization and function in the human intestine. **Pharmacology & therapeutics**, v. 195, p. 39-53, 2019.
- PAL, Dhananjay; MITRA, Ashim K. MDR-and CYP3A4-mediated drug–herbal interactions. **Life sciences**, v. 78, n. 18, p. 2131-2145, 2006.
- PHAM, Bao Tung et al. Precision-cut rat, mouse, and human intestinal slices as novel models for the early-onset of intestinal fibrosis. **Physiological reports**, v. 3, n. 4, p. e12323, 2015.
- RAUB, Thomas J. P-glycoprotein recognition of substrates and circumvention through rational drug design. **Molecular pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 3-25, 2006.
- RENAME. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2020. Ministério da Saúde, 2019.
- SANTOS-OLIVEIRA, Ralph; COULAUD-CUNHA, Simone; COLAÇO, Waldecir. Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 650-659, 2009.
- SMITH, Graham S.; WALTER, Gail L.; WALKER, Robin M. Clinical pathology in non-clinical toxicology testing. In: **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. Academic Press, 2013. p. 565-594.
- STIEGER, Bruno; HAGENBUCH, Bruno. Organic anion-transporting polypeptides. In: **Current topics in membranes**. Academic Press, 2014. p. 205-232.
- TABACH, Ricardo; DUARTE-ALMEIDA, Joaquim M.; CARLINI, E. A. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract Part II—Clinical Study (Phase I). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 921-926, 2017.
- TABACH, Ricardo; DUARTE-ALMEIDA, Joaquim M.; CARLINI, Elisaldo A. Pharmacological and toxicological study of *Maytenus ilicifolia* leaf extract. part I—preclinical studies. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 915-920, 2017.
- TELLI, E. M. P. R.; FRIGERI, M.; MELLO, S. R. Avaliação da atividade de enzimas hepáticas em dependentes, ex-dependentes e não usuários do etanol. **Rev Bras Análises Clínicas**, v. 48, n. 3, p. 245-52, 2016.
- THU, Ole Kristian Forstrønen; SPIGSET, Olav; HELLUM, Bent. Noncompetitive inhibition of human CYP 2C9 in vitro by a commercial *Rhodiola rosea* product. **Pharmacology research & perspectives**, v. 5, n. 4, p. e00324, 2017.
- TIBERTI, Luciana A. et al. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 846, n. 1-2, p. 378-384, 2007.
- VILEGAS, Wagner et al. Diterpenic adducts from *Xylopi* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 1869-1872, 1991.
- WANG, Hailin et al. Application of precision-cut rat liver slice to study the influence of Monocrotaline, Tussilago farfara alkaloids on the expression of cytochrome P450 enzymes. **Health**, v. 8, n. 4, p. 370-379, 2016.
- WANG, Rui et al. Evaluation of the liver toxicity of *Pterocephalus hookeri* extract via triggering necrosis. **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 142, 2019.
- WANWIMOLRUK, Sompon; PRACHAYASITTIKUL, Virapong. Cytochrome P450 enzyme mediated herbal drug interactions (Part 1). **EXCLI journal**, v. 13, p. 347, 2014.
- WILKER, M. M. J.; TARCÍSIO, N. C. Study of the pharmacological properties of espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) and of two adulterating species. **Rev Saúde Desenv**, v. 1, p. 20-46, 2012. (JESUS AND CUNHA) 2012
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. World Health Organization, 2019.

YANG, Jinlan et al. Anthraquinones in the aqueous extract of Cassiae semen cause liver injury in rats through lipid metabolism disorder. **Phytomedicine**, v. 64, p. 153059, 2019.

YU, Chung-Ping et al. Quercetin and rutin reduced the bioavailability of cyclosporine from Neoral, an immunosuppressant, through activating P-glycoprotein and CYP 3A4. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4644-4648, 2011.

ZACHOU, Kalliopi; RIGOPOULOU, Eirini; DALEKOS, George N. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. **Journal of autoimmune diseases**, v. 1, n. 1, p. 2, 2004.

ZHAO, Chongjun et al. Similar hepatotoxicity response induced by Rhizoma Paridis in zebrafish larvae, cell and rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, p. 112440, 2020.

ZHOU, Shu-Feng. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. **Current drug metabolism**, v. 9, n. 4, p. 310-322, 2008.

ZHOU, Shu-Feng; LIU, Jun-Ping; LAI, Xin-Sheng. Substrate specificity, inhibitors and regulation of human cytochrome P450 2D6 and implications in drug development. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 21, p. 2661-2805, 2009.

ANEXO

Anexo 1. Carta de aceite CEUA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37315

Título: Predição de interações farmacológicas do extrato seco de *Meytenus ilicifolia*

Vigência: 01/09/2019 à 31/08/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

IONARA RODRIGUES SIQUEIRA - coordenador desde 01/09/2019
VALQUIRIA LINCK BASSANI - pesquisador desde 01/09/2019
MIRIAM ANDERS APEL - pesquisador desde 01/09/2019
JOSE ANGELO SILVEIRA ZUANAZZI - pesquisador desde 01/09/2019
CHRIS KREBS DANILEVICZ - Aluno de Mestrado desde 01/09/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 02/09/2019 - Sala 56 do prédio 11209-Salas de Aula do Campus Centro/UFRGS/R. Sarmento Leite, 425, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 22 ratos machos Wistar de 3 meses, provenientes do CREAL/UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 13 de Setembro de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética