

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Carlos Henrique Ramos

Efeito de substâncias fenólicas presentes na dieta humana sobre enzimas da subfamília
CYP2C

Rio de Janeiro

2018

Carlos Henrique Ramos

Efeito de substâncias fenólicas presentes na dieta humana sobre enzimas da subfamília
CYP2C

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Saúde Pública. Área de concentração: Abordagem ecológica de doenças transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten.

Coorientador: Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira.

Rio de Janeiro

2018

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Título do trabalho em inglês: Effect of phenolic substances present in human diet about of CYP2C subfamily enzyme.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

R175e Ramos, Carlos Henrique.
Efeito de substâncias fenólicas presentes na dieta humana sobre enzimas da subfamília CYP2C / Carlos Henrique Ramos. – 2018.
92 f. ; il. color.

Orientadores: Francisco Jose Roma Paumgarten e Davyson de Lima Moreira.
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2018.

1. Compostos Fenólicos - análise. 2. Sistema Enzimático do Citocromo P-450. 3. Flavonoides. 4. Diclofenaco. 5. Eritromicina. 6. Rifampina. 7. CLUE-DAD-UV. 8. rhCYP2C9*1. 9. 4'hidroxiclofenaco. I. Título.

CDD – 22 ed. – 668.4222

Carlos Henrique Ramos

Efeito de substâncias fenólicas presentes na dieta humana sobre enzimas da subfamília
CYP2C

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título Mestre em Saúde Pública. Área de concentração: Abordagem ecológica de doenças transmissíveis.

Aprovada em: 29 de maio de 2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marco Eduardo do Nascimento Rocha
Fundação Oswaldo Cruz – Farmanguinhos

Prof.^a Dra. Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira (Coorientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Farmanguinhos

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgartten (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2018

Este trabalho é dedicado a meus pais (*in memoriam*), minha família,
minha esposa Luciana da Costa, minha irmã Neli Ramos e meus
sobrinhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me ter me dado a vida e saúde até aqui, mas peço sabedoria e humildade para continuar minha jornada.

Agradeço a meus pais (*in memoriam*) por toda educação e que me ensinaram o significado do respeito, humildade e alto estima. Espero estar a altura de seus olhares.

Agradeço a minha esposa Luciana da Costa por cuidar de mim, me apoiando sempre em todas as decisões que tomei e venha a tomar, apesar de todas as dificuldades.

Agradeço aos meus irmãos por estarem sempre juntos e sempre quererem o melhor pra mim, além de todo o carinho e orgulho.

Agradeço a minha irmã Neli Ramos por ser sempre minha parceira pra tudo e por tudo, quero que saiba da minha admiração e espero ter a capacidade de retribuir tudo o que já fez por mim.

Agradeço ao meu orientador professor Dr. Francisco José Roma Paumgarten, por me receber em seu grupo, por todo apoio, confiança e por todo aprendizado.

Agradeço a Professora Dra. Ana Cecilia Amado Xavier de Oliveira por ter me aberto às portas do laboratório de bioquímica, por todo ensinamento e paciência a cada pipetada, deixo meu carinho.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Davyson Moreira, por todo ensinamento, apoio, aprendizado e amizade.

Agradeço ao Departamento de Ciências Biológicas /Ensp-Fiocruz por me receber como aluno e permitir o compartilhamento com diferentes profissionais de saúde.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo incentivo financeiro.

Agradeço ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) por permitir a utilização das dependências e equipamentos que foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço as colegas Thais Rolin e Vanessa Gonzalez por todo carinho que tiveram com as análises, sempre torcendo para que tudo desse certo e aos ensinamentos junto ao equipamento analítico.

Agradeço as alunas Thamyris, Jéssica e Marina pelo acompanhamento no experimental bioquímico e analítico, sempre ajudando e intenso otimismo.

Agradeço aos colegas Ary e Marcelo pelos trabalhos no laboratório e biotério, além das instruções com os equipamentos.

Agradeço aos colegas Rafael e Rosângela pelo treinamento e tratamento com os animais, me passando aprendizado e segurança.

Agradeço a colega Hellen Leal por fazer e ensinar todo o procedimento para a obtenção da fração microssomal dos animais.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Toxicologia Ambiental.

Agradeço aos meus colegas de Mestrado por todo companheirismo e cumplicidade; desejo todo sucesso a todos.

Agradeço a Manipulando Farmácia de Manipulação LTDA – ME pela colaboração incondicional em meus estudos.

Agradeço a todos os meus amigos por toda a força e incentivo, sempre torcendo pelo meu melhor.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado.

RESUMO

Substâncias fenólicas estão presentes em frutas, vegetais e suplementos dietéticos; possuem diversas atividades biológicas e, por isso, estão associadas à prevenção de distúrbios crônicos, principalmente, às doenças associadas pelo estresse oxidativo. É importante avaliar seus efeitos sobre as enzimas do citocromo P450 (CYPs) que são responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos, que, em humanos é realizado principalmente por três famílias: CYP1, CYP2 e CYP3. O CYP2C é a segunda subfamília mais abundante, responsável pelo metabolismo de aproximadamente 20% dos fármacos atualmente disponíveis no mercado. A inibição das CYPs é a causa mais comum de interações droga-droga prejudiciais que têm levado à remoção de vários medicamentos do mercado. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi estabelecer métodos de experimentação *in vitro* para avaliar o efeito de substâncias fenólicas presentes na dieta humana sobre as enzimas da sub-família CYP2C. Ratas Wistar foram tratadas (v.o.) com rifampicina por 9 dias com doses de 300 mg/kg/dia, seus fígados foram removidos e as induções das CYPs 2E1 e 3A foram confirmadas. Os microsossomos foram utilizados para testar a atividade inibitória *in vitro* da CYP2C11 (ortóloga da CYP2C9 de humanos) por substâncias fenólicas, na concentração de 1mg/mL em 20 min de incubação. No estudo de cinética, a CYP recombinante humana (rhCYP2C9*1, BD Bioscience) e uma fração microsossomal de Ratas Wistar foram testadas para avaliar a conversão de 100 μ M de diclofenaco de sódio (DCF, substrato) ao 4'-hidroxiclofenaco (4'-OH-DCF), principal produto da reação. A avaliação da reação foi realizada por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) acoplada a detector de ultravioleta em rede de díodos (DAD-UV), no equipamento Shimadzu Nexera XR. Diferentes colunas e fases móveis foram testadas para análise do produto de reação por CLUE-DAD-UV. As melhores condições cromatográficas foram obtidas com a coluna Ascentis Express C18 Supelco (75 mm x 2,1 mm i.d. x 2,7 μ m), gradiente de eluição utilizando água ultrapura acidificado com ácido acético glacial (pH = 3,0), fluxo de 0,25 μ L / min, temperatura do forno em 50°C e volume de injeção de 1 μ L. O tempo de retenção para o DCF foi registrado entre 8,32 - 8,40 min e para o 4'-OH-DCF entre 4,89-4,95min. O fator de retenção obtido para o produto de reação (4'-OH-DCF) foi 5,8 e para o substrato (DCF) 10,6 e a resolução cromatográfica foi calculada em 6,0, portanto, as condições cromatográficas obtidas para a quantificação do 4'-OH-DCF foram excelentes. A melhor concentração enzimática da rhCYP2C9*1 para conversão ao produto foi 75 pmol / mL em 10 min de incubação em 37°C. Diferentes concentrações do substrato (0,78 - 100 μ M) foram incubadas com enzima nessas condições. A quantificação do produto permitiu a obtenção da velocidade máxima da reação (3,1 μ g 4'-OH-DCF/mg ptn / min) e a constante de Michaelis-Menten ($K_m = 2,80 \mu$ M, Lineaver-Burke). O valor do K_m foi confirmado com o gráfico de Eadie Hofstee ($K_m=2,96 \mu$ M) mas não foi confirmado pelo gráfico de Hanes-Woolf ($K_m = 6,68 \mu$ M). Os flavonoides testados rutina, hesperidina e quercetina (100 μ M) demonstraram inibição da CYP2C, sendo a rutina o flavonoide mais ativo (21%). Os ácidos fenólicos testados ácidos cafeico, vanílico e *p*-cumárico (100 μ M) não inibiram a CYP2C, porém, o ácido ferúlico que demonstrou uma discreta inibição. O CGA não foi testado nesta dissertação por apresentar impurezas, serão realizados estudos futuros com esta substância. Esses resultados são importantes e guiarão os estudos de inibição em rhCYP2C9*1.

Palavras-chave: Substâncias fenólicas. Sistema enzimático citocromo-P450. 4'-hidroxiclofenaco. rhCYP2C9*1. CLUE-DAD-UV.

ABSTRACT

Phenolic compounds are found in fruits, vegetables and dietary supplements; have several biological activities and are therefore associated with the prevention of chronic disorders. It is important to evaluate its effects on cytochrome P450 enzymes (CYPs) that are responsible for the metabolism of xenobiotics, and in humans it is performed mainly by three families: CYP1, CYP2 and CYP3. Inhibition of CYPs is the most common cause of harmful drug-drug interactions that have led to the withdrawal of many drugs from the market. In this context, the objective of this study was to establish *in vitro* experimental methods to evaluate the activity of phenolic compounds present in the human diet in enzymes of the CYP2C subfamily. Wistar rats were treated with rifampicin for 9 days at doses of 300 mg/kg/day, their livers were removed and inductions of CYPs 2E1 and 3A were confirmed. Microsomes were used to test the *in vitro* inhibitory activity of CYP2C11 by phenolic compounds at a concentration of 1 mg/mL in 20 min of incubation. In the kinetics study, human recombinant CYP (rhCYP2C9*1, BD Bioscience) and a microsomal fraction of Wistar rats were tested to evaluate the conversion of 100 μ M diclofenac sodium (DCF, substrate) to 4'-hydroxydiclofenac (4'-OH-DCF), the main product of the reaction. The evaluation of the reaction was performed by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled to a diode array-ultraviolet detector (UPLC-DAD-UV) in the Shimadzu Nexera XR equipment. Different columns and mobile phases were tested. The best chromatographic conditions were obtained with the Ascentis Express C18 Supelco column (75 mm x 2.1 mm id x 2.7 μ m), elution gradient using ultrapure water acidified with glacial acetic acid (pH = 3.0), flow rate at 0.25 μ L/min, oven temperature at 50° C. Retention time for DCF was recorded between 8.32-8.40 min and for 4'-OH-DCF between 4.89-4.95 min. The retention factor obtained for the reaction product (4'-OH-DCF) was 5.8 and for the substrate (DCF) 10.6; and the chromatographic resolution was calculated at 6.0, therefore, the chromatographic conditions obtained for the quantification of 4'-OH-DCF was excellent. The best enzymatic concentration of rhCYP2C9*1 for conversion to the product was 75 pmol /ml in 10 min incubation at 37°C. Different concentration of the substrate (0.78 - 100 μ M) were incubated with enzyme under these conditions. The quantification of the product allowed to obtain the maximum reaction rate (3.1 μ g 4'-OH-DCF/mg ptn/min) and the Michaelis-Menten constant (K_m = 2.59 μ M, Lineawer-Burke). The K_m value was confirmed with the Eadie Hofstee plot (K_m = 2.96 μ M) but was not confirmed by the Hanes-Woolf plot (K_m = 6.68 μ M). The flavonoids tested rutin, hesperidin and quercetin (100 μ M) demonstrated inhibition of CYP2C, with rutin being the most active flavonoid (21%). The phenolic acids tested caffeic, vanillic and *p*-coumaric acid (100 μ M) did not inhibit CYP2C, except ferulic acid, which demonstrated a slight inhibition. The CGA was not tested in this dissertation because it presents impurities, future studies will be carried out with this substance. These results are important and will guide inhibition studies in rhCYP2C9*1.

Keywords: Phenolic compounds. Cytochrome-P450 enzyme system. 4'-hydroxydiclofenac. rhCYP2C9*1. UPLC-DAD-UV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Produtos da dieta, fontes de substâncias fenólicas.....	19
Figura 2 -	Esquema de degradação de fenilpropanóides.....	20
Figura 3 -	Estrutura básica C ₆ -C ₃ -C ₆	22
Figura 4 -	Estrutura química de alguns flavonóides de ocorrência natural em plantas.....	23
Figura 5 -	Principais metabólitos do CGA identificados no plasma e na urina de humanos.....	25
Figura 6 -	Esquema da Bioconversão do diclofenaco pelo CYP2C9.....	29
Quadro 1 -	Regime de doses da rifampicina para administração às ratas Wistar por via oral.....	38
Gráfico 1 -	Evolução ponderal das ratas controles e tratadas com 300 mg/kg durante nove dias com rifampicina.....	47
Gráfico 2 -	Pesos absolutos dos fígados das ratas controles e tratadas com 300 mg/kg durante nove dias com rifampicina.....	47
Gráfico 3 -	Pesos relativos dos fígados das ratas controles e tratadas com 300 mg/kg durante nove dias com rifampicina.....	48
Figura 7 -	Atividades da <i>N</i> -desmetilação da eritromicina (nanomoles de formaldeído/mg de proteína/min) na rata não tratada (controle) e na tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias.....	49
Figura 8 -	Atividades da hidroxilação do <i>p</i> -nitrofenol (nanomoles de 4-nitrocatecol/mg de proteína/min) na rata não tratada (controle) e na tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias.....	50
Figura 9 -	Concentrações de 4'-OH-DCF (µg/mL) produzidas na reação de diclofenaco hidroxilase com concentrações de proteínas de 0,25; 0,5; 1 ou 2 mg/mL) de microsomos hepáticos de rata não tratada <i>versus</i> tempo (10, 20 ou 30 min) de reação.....	51
Quadro 2 -	Concentrações de 4'-OH-DCF (µg/mL) produzidas na reação de DCFh com 0,25; 0,5; 1 ou 2 mg/mL de proteínas durante 10, 20 ou 30 min de reação com microsomos hepáticos de rata não tratada	

	(controle).....	51
Quadro 3 -	Comparação das concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) produzidas na reação de DCFh com 1 ou 2 mg/mL de proteínas durante 20 min de reação entre microsossomos hepáticos de rata não tratada (controle) e rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina.....	52
Figura 10 -	Concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) produzidas na reação de diclofenaco hidroxilase com concentrações de proteínas de 1 e 2 mg/mL de microsossomos hepáticos de rata não tratada (controle) e de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias durante 20 min de reação.....	52
Figura 11 -	Atividades de diclofenaco hidroxilase (ng de 4'-OH-DCF/mg proteína/min, Média \pm S.E.M) durante 20 min de reação com 1 mg/mL de proteínas de microsossomos hepáticos de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias, na ausência (C, controle) e na presença dos ácidos presentes no café (cafeico, ferúlico, <i>p</i> -cumárico e vanílico) e do fluconazol. Análise estatística (ANOVA seguida do teste de comparações de Bonferroni) mostrou que a: \neq do fluconazol e b: \neq do <i>p</i> -cumárico ($P < 0,05$).....	53
Quadro 4 -	Atividades de DCFh (ng de 4'-OH-DCF/mg proteína/min) durante 20 min de reação com 1 mg/mL de proteínas de microsossomos hepáticos de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias, na ausência (C, controle) e na presença dos ácidos presentes no café, e do fluconazol.....	54
Figura 12 -	Atividades de DCFh (ng de 4'-OH-DCF/mg proteína/min, Média \pm S.E.M.) durante 20 min de reação com 1 mg/mL de proteínas de microsossomos hepáticos de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias, na ausência (C, controle) e na presença de flavonoides (hesperidina, quercetina e rutina) e do fluconazol. Análise estatística (ANOVA seguida do teste de comparações de Bonferroni) mostrou que a: \neq de C e b: \neq do fluconazol ($P < 0,05$).....	54

Quadro 5 -	Atividades de DCFh (ng de 4'-OH-DCF/mg proteína/min) durante 20 min de reação com 1 mg/mL de proteínas de microsossomos hepáticos de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias, na ausência (C, controle) e na presença de flavonoides ou do fluconazol.	55
Figura 13 -	Concentrações de 4'-OH-DCF (µg/mL) produzidas na reação de diclofenaco hidroxilase com concentrações de proteínas de 25; 50; 75 ou 100 picomoles /mL de rhCYP2C9*1.....	56
Quadro 6 -	Concentrações de 4'-OH-DCF (µg/mL) produzidas na reação de DCFh com 25; 50; 75 ou 100 picomoles/mL de rhCYP2C9*1 durante 10 min.....	56
Figura 14 -	Representação gráfica (traçado de Michaelis-Menten, <i>v versus</i> [S]) da cinética da reação de hidroxilação do diclofenaco com 75 picomoles/mL de CYP2C9*1 humana recombinante e concentrações de substrato [S] de 0,781; 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µM, assinalando $V_{m\acute{a}x}$, $\frac{1}{2} V_{max}$ e K_m	57
Figura 15 -	Traçado de duplas recíprocas de Lineweaver-Burke ($1/v$ <i>versus</i> $1/[S]$), assinalando $-1/K_m$, $1/V_{m\acute{a}x}$ e $(K_m/V_{m\acute{a}x})$ (angulação da reta) Determinação do $V_{m\acute{a}x}$ e K_m por Lineweaver-Burke.....	58
Figura 16 -	Traçado de Eadie-Hofstee (<i>v versus</i> $v/[S]$), assinalando as interseções $V_{m\acute{a}x}$, $V_{m\acute{a}x}/K_m$, bem como a angulação da reta ($-K_m$).....	58
Figura 17 -	Traçado de Hanes-Woolf ($[S]/v$ <i>versus</i> [S], assinalando as interseções $-K_m$, $K_m/V_{m\acute{a}x}$, bem como a angulação da reta ($1/V_{m\acute{a}x}$).....	59
Quadro 7 -	Condições testadas para análise do 4'-OH-DCF.....	60
Quadro 8 -	Sistema de gradiente usado para análise do 4'-OH-DCF por CLUE-DAD-UV.....	61
Figura 18 -	Cromatograma de análise do DCF (100 µg/mL, solução aquosa) obtido por CLUE-DAD-UV.....	62
Figura 19 -	Espectro de absorção no ultravioleta do DCF obtido por CLUE-DAD-UV.....	62
Figura 20 -	Espectro de absorção no ultravioleta do 4'-OH-DCF obtido por CLUE-DAD-UV com visualização em 264nm.....	63

Figura 21 -	Cromatograma com 4'-OH-DCF (25 µg/mL) e DCF (12,5 µg/mL) obtido por CLUE-DAD-UV.....	63
Figura 22 -	Curva analítica obtida para quantificação do 4'-OH-DCF no intervalo de concentração de 3,125 a 50 µg/mL, em 3 dias diferentes.....	64
Figura 23A -	Cromatograma do 4'-OH-DCF no limite de detecção.....	64
Figura 23B -	Cromatograma expandido do 4'-OH-DCF no limite de detecção, com destaque para o sinal do analito.....	64
Figura 24A -	Cromatograma do 4'-OH-DCF no limite de quantificação.....	65
Figura 24B -	Cromatograma expandido do 4'-OH-DCF no limite de quantificação.	65

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorvância
ACN	Acetonitrila
AAG	Ácido Acético Glacial
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Monofosfato de adenosina cinase
C18	Sílica modificada com hidrocarbonetos linear C18
C8	Sílica modificada com hidrocarbonetos linear C8
CQA	Ácido Cafeoilquínico
CGA	Ácido Clorogênico
CLAE	Cromatografia em Fase líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia em Fase líquida de Ultra Eficiência
COX	Cicloxygenase
CYP	Sistema de Enzimas do Citocromo - P450
DAD	Detector por arranjo de diodos, do inglês <i>Diode Array Detector</i>
DCB	Departamento de Ciências Biológicas
DCF	Diclofenaco
DCFh	Hidroxilação do Diclofenaco
DDI	Interação Droga-Droga
DDL	Diacetil-Diidrolutidina
DiCQA	Dicafeoilquínico
DMT2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2

DP	Desvio Padrão
Ensp	Escola Nacional de Saúde Pública
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ERITRO-d	Reação de <i>N</i> -desmetilação da eritromicina
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G6Pase	Glicose 6-fosfatase
HLM	Microsossomos do Fígado Humano do inglês <i>Human Liver Microsomes</i>
4'-OH-DCF	4'-Hidroxi-Diclofenaco
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IVIVE	Extrapolação <i>in vitro-in vivo</i>
k_m	Constante de Michaelis
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
M	Média
MM	Michaelis-Menten
NADP	Fosfato Dinucleotídeo Adenina Nicotinamida
NADPH	Fosfato Dinucleotídeo Adenina Nicotinamida Hidroxilase
PNP	<i>p</i> -nitrofenol
PNPh	Hidroxilação do <i>p</i> -nitrofenol
RAF	Fator de Atividade Relativa
rhCYP	Citocromo P450 Humano Recombinante

[S]	Concentração do Substrato
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima (Taxa máxima de eliminação, em unidades de massa/ tempo)
WC	Ratas Wistar Controle
WR	Ratas Wistar tratadas com Rifampicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Substâncias Fenólicas.....	19
1.2	Flavonoides.....	22
1.2.1	<i>Farmacocinética do CGA</i>	24
1.3	Enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos.....	26
1.4	Enzimas CYP e substâncias fenólicas.....	27
1.5	Subfamília CYP2C.....	28
1.5.1	<i>CYP2C9 Humana</i>	29
1.5.2	<i>CYP2C11/12 no rato</i>	30
1.6	Proteínas Humanas Recombinantes.....	30
1.7	Fármacos usados nesse estudo.....	31
1.7.1	<i>Diclofenaco de sódio</i>	31
1.7.2	<i>Eritromicina</i>	32
1.7.3	<i>p-Nitrofenol</i>	32
1.7.4	<i>Rifampicina</i>	33
2	JUSTIFICATIVA.....	34
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	Objetivo Geral.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	Ensaio Enzimáticos.....	36
4.1.1	<i>Atividades de CYP</i>	36
4.1.2	<i>Tratamento de Ratas Wistar</i>	36
4.1.3	<i>Tratamento com Rifampicina</i>	37
4.1.4	<i>Manejo dos Animais</i>	39
4.1.5	<i>Preparo da Fração Microssomal Hepática</i>	39
4.1.6	<i>Quantificação de Proteínas na Fração Microssomal</i>	40
4.1.7	<i>Atividade da CYP3A11 – Reação de N-desmetilação da Eritromicina</i>	40
4.1.8	<i>Atividade da CYP2E1 – Reação de Hidroxilação do p-nitrofenol</i>	41
4.1.9	<i>Atividade de CYP2C11 – Reação de Hidroxilação do Diclofenaco</i>	42

4.1.9.1	Padronização do Método no Animal Controle.....	42
4.1.9.2	Comparação da Atividade entre os Animais Controle e Tratado.....	43
4.1.9.3	<i>Inibição de CYP2C em Rata Induzida</i>	43
4.1.9.4	Inibição de CYP2C por Ácidos Fenólicos.....	43
4.1.9.5	Inibição de CYP2C por Flavonoides.....	44
4.1.10	<i>Atividade da rhCYP2C9*1 – Reação de Hidroxilação do Diclofenaco</i>	44
4.1.10.1	Quantificação de Proteínas na Solução de rhCYP2C9*1.....	44
4.1.10.2	Curvas de Proteínas com o Supersomo rhCYP2C9*1.....	44
4.1.10.3	Cinética Enzimática.....	45
4.2	Análises cromatográficas.....	46
4.3	Análise estatística.....	46
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Estado Geral dos Animais.....	46
5.2	Evolução Ponderal.....	46
5.3	Pesos Absolutos e Relativos dos Fígados.....	47
5.4	Atividade de <i>N</i> -desmetilação da Eritromicina.....	49
5.5	Atividade de <i>p</i> -nitrophenol hidroxilase.....	49
5.6	Atividade de hidroxilação do diclofenaco.....	50
5.6.1	<i>Curvas de Proteína versus Tempo</i>	50
5.7	Inibição de CYP2C por Ácidos Fenólicos.....	53
5.8	Inibição de CYP2C por Flavonoides.....	54
5.9	Curva de proteína de rhCYP2C9*1.....	55
5.10	Cinética da Reação de Hidroxilação do Diclofenaco.....	57
5.10.1	<i>Modelo de Michaelis-Menten</i>	57
5.10.2	<i>Traçado de Lineweaver-Burke</i>	57
5.10.3	<i>Traçado de Eadie-Hofstee</i>	58
5.10.4	<i>Traçado de Hanes-Woolf</i>	59
5.11	Método analítico.....	60
5.11.1	<i>Condições de análise do DCF e do 4'-OH-DCF</i>	60
5.12	Linearidade.....	63
5.13	Limite de Detecção.....	64
5.14	Limite de Quantificação.....	65

6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72
	ANEXO	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 – Substâncias Fenólicas

Estudos tem destacado a importância dos produtos naturais na medicina tradicional em diversos países. Exemplificando, existe uma associação inversa do consumo de substâncias fenólicas com a mortalidade causada por várias doenças pela sua ação anti oxidante (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2013). Foi proposto que existe modulação de uma variedade de mecanismos moleculares pelo consumo de substâncias fenólicas, o que contribui para a manutenção da saúde humana (Kitsati *et al.*, 2012; Hwang, 2012). Dentre essas substâncias destaca-se o ácido clorogênico (CGA), amplamente distribuído em pequenas concentrações em tubérculos (batata doce, raiz de bardana), frutas (pêssego, maçã e pêra), legumes (abóbora), sementes (milho, feijão), especiarias e ervas aromáticas (tomilho, sálvia, manjeriçao), própolis, vinhos, azeite de oliva, chocolates e, principalmente, em café e mate (Virgili *et al.* 2000; Alevizou & Voutsas, 2013). A figura 1 fornece exemplos de produtos da dieta humana como fonte de substâncias fenólicas

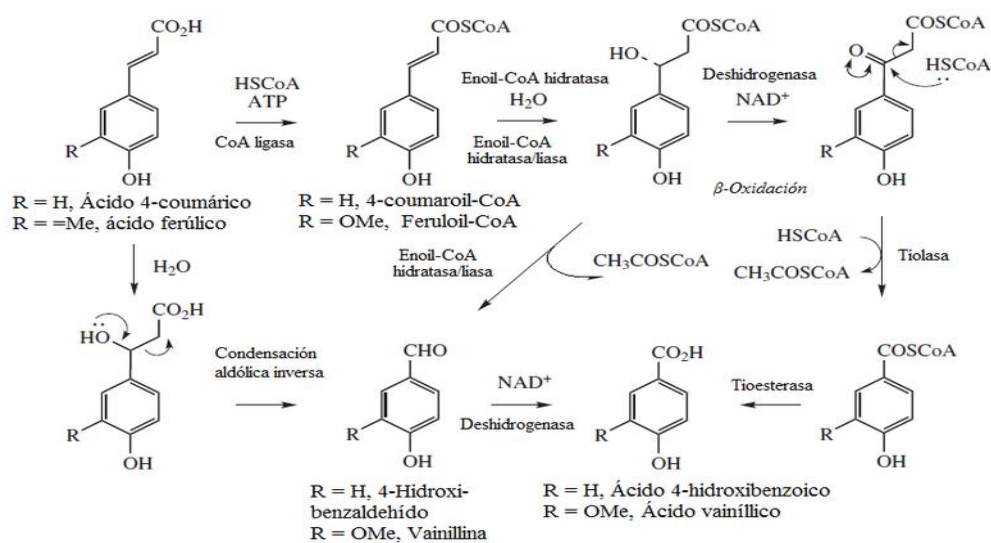
Figura 1. Produtos da dieta, fontes de substâncias fenólicas.



Fonte. Próprio autor , 2018.

O CGA é um metabólito especial encontrado em plantas, com importantes funções regulatórias e protetoras, visto que altera as atividades de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, peroxidase de ascorbato e glutathiona redutase, que podem desempenhar papéis relevantes para neutralizar a toxicidade de oxigênio reativo envolvido na oxidação lipídica, oxidação de proteínas, ruptura de cadeia de DNA e modulação de expressão gênica (Xi et al., 2017). O CGA é formado pela esterificação de ácidos *trans*-cinâmicos, como ácidos caféicos, ferúlico e *p*-cumárico, com o ácido quínico (Farah et al., 2005). Existe uma série de substâncias que pertencem a esta classe de fenólicos, sendo nove os majoritários: três isômeros do ácido cafeoilquínico (3-CQA, 4-CQA e 5-CQA), três isômeros de dicafeoilquínico (3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA) e três isômeros de feruloilquínico (3-FQA, 4-FQA e 5-FQA), que possuem inúmeras atividades biológicas (Roy et al., 2013; Pragasam et al., 2013; Prince, 2013). Em menores concentrações são encontrados os ácidos *p*-cumaroilquínicos (3-*p*-CoQA, 4-*p*-CoQA, 5-*p*-CoQA). Entre esses isômeros, o 5-CQA ou CGA é o mais prevalente, mais estudado e quantificado em plantas. No entanto, dados sobre as concentrações de CGA em alimentos são escassos na literatura. Entre os alimentos já investigados, o café destaca-se como a maior fonte de CGA (comumente 5-9 g/100 g de grãos verdes) (Farah & Donangelo, 2006), com teores também elevados em mate e alguns tipos de própolis da Mata Atlântica Brasileira (Tatefugi et al., 1996). A figura 2 apresenta o esquema de degradação dos fenilpropanóides.

Figura 2. Esquema de degradação de fenilpropanóides



Fonte. Wikipédia, 2012.

O CGA possui propriedades farmacológicas *in vitro* e *in vivo*. Dentre as mais estudadas está a atividade antioxidante que está relacionada à prevenção de doenças degenerativas, de forma que eliminam os radicais superóxido e os radicais hidroxila, reduzem os radicais lipídicos peroxil e inibem o lipídio peroxidação (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998; Higdon & Frei, 2006), como a doença de Alzheimer e lesão por isquemia-reperusão (Gordon & Wishart, 2010; Omar *et al.*, 2012), doenças cardiovasculares e um baixo risco de *Diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) (Van Dam, 2008; Ong *et al.*, 2013). O CGA também está associado à atividade antibacteriana, aumentando a permeabilidade da membrana (Z. Lou *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013); à atividade citoprotetora da heme oxigenase-1 contra a lesão oxidativa (Kweon *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013); à inibição da glicose 6-fosfato translocase I e à redução do transporte do gradiente de glicose impulsionado pelo sódio no intestino (McCarty, 2005; Ong *et al.*, 2013); à inibição da gliconeogênese hepática pela inibição da atividade da glicose 6-fosfatase (G6Pase) (Bassoli *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 2013); à estimulação da captação de glicose nos miotúbulos (Prabhakar & Doble, 2009; Ong *et al.*, 2013) e à estimulação da captação de glicose no músculo esquelético por meio da ativação da cinase dependente de AMP (AMPK) (Ong *et al.*, 2012; Ong *et al.*, 2013). Além disso, possui também, atividade anti-inflamatória (Omar *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2006; Larrosa *et al.*, 2009), antiviral, hepatoprotetora, imuno-estimulante e anticarcinogênica (Farah, 2009; Shearer *et al.*, 2003; Antônio *et al.*, 2010), Porém, o CGA não foi testado nesta dissertação por apresentar impurezas, serão realizados estudos futuros com esta substância.

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos e podem ser indicados para tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares onde a presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferem suas propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo (Soares, 2002).

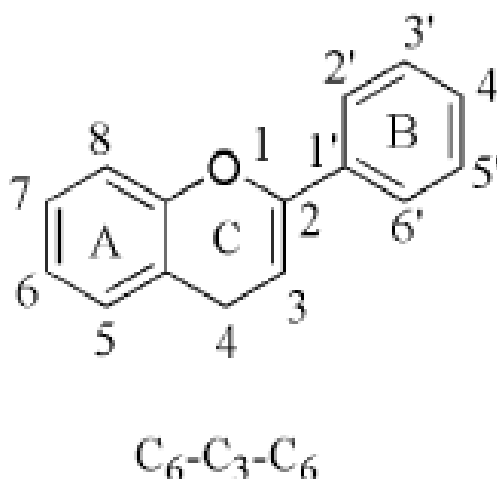
O ácido cafeico é produto da metabolização do CGA que tem a mesma atividade fisiológica. Tem sido relatado que o ácido cafeico protege contra dislipidemia e elevação da glicose sanguínea devido à sua atividade antioxidante, porém sua aplicação é limitada pela má biodisponibilidade e absorção oral (Shiozawa *et al.*, 2018). O ácido cafeico é um importante composto fenólico, é encontrado em amostras de plantas, alimentos e própolis,

de forma bem particular como éster fenetílico de ácido cafeico, devidamente conhecido por suas propriedades farmacológicas, incluindo antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatório e anticancerígeno, além disso sua atividade antiviral tem sido relatada para alguns vírus, incluindo o vírus da influenza A (Wu *et al.*, 2017).

1.2 – Flavonoides

De acordo com Hodek e colaboradores (2001), os flavonoides pertencem a uma classe de metabólitos secundários especiais produzidos por uma grande variedade de plantas e muitas vezes em quantidades relevantes. Com base no seu esqueleto C₆-C₃-C₆ (Figura 3), os flavonoides são classificados em diferentes tipos, tais como flavanonas, isoflavanonas, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas e flavolignananas ((Figura 4). Essas substâncias estão presentes em frutas, vegetais, bebidas e suplementos dietéticos, possuem diversas atividades biológicas e tem grande associação com a prevenção de desordens crônicas (Sousa *et al.*, 2013). Até o momento, mais de 9000 flavonoides foram descritos, e sua ingestão diária varia entre 20 mg e 500 mg, principalmente através do consumo de suplementos dietéticos (incluindo chá), vinho tinto, maçã, cebola e tomate (Wang *et al.*, 2018).

Figura 3. Estrutura básica C₆-C₃-C₆

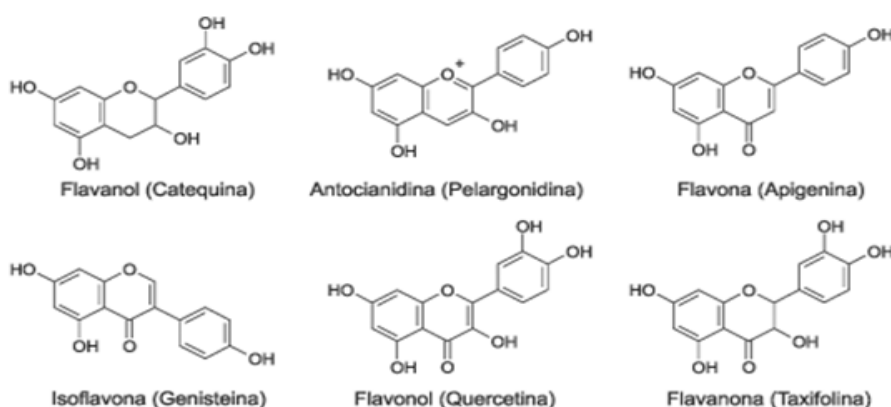


Fonte. Wang *et al.*, 2018.

Para o entendimento do metabolismo dos flavonoides em seres humanos, é importante avaliar seus efeitos sobre as enzimas do complexo citocromo P450 (CYPs), sua

capacidade de se ligar a esse complexo e a conversão metabólica mediada por CYP (Hodek *et al.*, 2001). Nesse contexto, o risco de eventos adversos pode aumentar pela overdose farmacológica destas substâncias e/ou suplementos contendo flavonoides para prevenção de doenças, levando a interações alimentos-fármaco-suplementos que podem resultar na inibição ou indução do citocromo P450 (Kimura *et al.*, 2010), pois as isoformas CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 e CYP3A4, são as principais enzimas responsáveis pelo metabolismo hepático de fase I (Sousa *et al.*, 2013; Graham & Lake, 2008).

Figura 4. Estrutura química de flavonoides de ocorrência natural em plantas



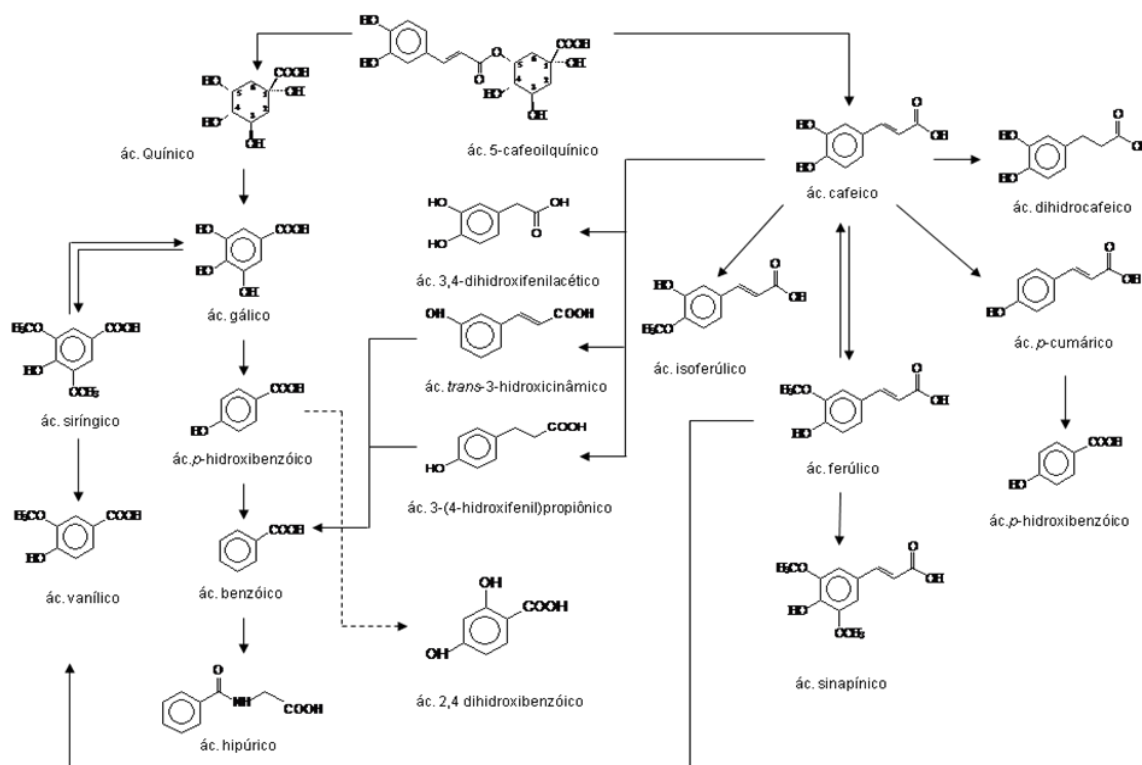
Fonte. Cerqueira *et al.*, 2007.

Estudos epidemiológicos sugerem que os flavonóides com estruturas típicas podem interagir com os sistemas enzimáticos envolvidos em vias cruciais, mostrando comportamentos farmacológicos eficazes. Desta forma, pode-se dizer que as relações entre estruturas e atividades químicas tenham sido extensivamente estudadas, por exemplo, a hidroxilação do anel A, leva a um papel importante dos derivados 5- / 7-hidroxilo, sendo sugerido um potente anti-H5N1 vírus influenza A (Wang *et al.*, 2018).

1.2.1 – Farmacocinética do CGA

Apesar dos teores do CGA terem sido correlacionados com vários benefícios à saúde em estudos epidemiológicos (Rosengreen *et al.*, 2004), dados sobre a biodisponibilidade, metabolismo e bioatividade em humanos são ainda insuficientes, devido às dificuldades analíticas existentes e também porque, até pouco tempo atrás, se pensava que estas substâncias apresentavam baixa biodisponibilidade em humanos (Nardini *et al.*, 2002). Hoje, sabe-se que o CGA é consideravelmente absorvido por humanos (até 75%) desde o estômago até o íleo, e que circula no plasma basicamente na forma conjugada com sulfato e ácido glucurônico (Monteiro *et al.*, 2007; Farah *et al.*, 2008). O CGA também está presente nos fluidos digestivos, tanto na forma livre, quanto na conjugada (Farah & Trugo, 2007), sendo provavelmente reabsorvido através desses fluidos. Produtos de seu metabolismo primário, os ácidos hidroxicinâmicos, especificamente os ácidos cafeico, dihidrocafeico, ferúlico e isoferúlico, foram também identificados no plasma humano (Nardini *et al.*, 2002; Farah *et al.*, 2008), e mais de trinta metabólitos foram identificados na urina humana, como hidroxicinamatos produzidos pela hidrólise do CGA, assim como ácidos dihidrocaféico, isoferúlico, gálico, vanílico, sinapínico, *p*-hidroxibenzóico, siríngico, 3,4-dihidroxifenilacético e *trans*-3-hidroxicinâmico (Monteiro *et al.*, 2007; Rechner *et al.*, 2001; Duarte & Farah, 2011; Renoulf *et al.*, 2010). A Figura 3 representa a hidrólise do CGA (Ác. Cafeico e Ác. Quínico) em derivados de fenilpropanóides (C₃-C₆) e Ác. Quínico (C₆ sem cadeia lateral) – biossíntese de Ác. Chiquímico.

Figura 5. Principais metabólitos do CGA identificados no plasma e na urina de humanos



Fonte . Farah *et al.*, 2008; Marques & Farah, 2010; Duarte & Farah, 2011.

As respostas metabólicas a fatores externos, como o hábito alimentar, podem ocasionar modificações de uma série de padrões e adaptações metabólicas, o que inclui adaptações físicas no lúmen intestinal, alterações na flora intestinal e alterações na expressão de enzimas (Monteiro *et al.*, 2007; Farah *et al.*, 2008; Duarte & Farah, 2011; Manach *et al.*, 2004). Assim, para estimar a concentração capaz de provocar as respostas fisiológicas desejadas do CGA e de seus análogos no organismo, é importante conhecer a extensão de sua absorção e metabolização, incluindo a possibilidade de interações entre substâncias fenólicas e fármacos ou nutrientes, cuja metabolização envolve os mesmos grupos de enzimas. Algumas substâncias fenólicas, quando ingeridas simultaneamente com alguns fármacos, podem interagir com as mesmas enzimas de metabolização, provocando a sua indução, ou ainda a sua inibição, levando, no último caso, ao aumento da sua biodisponibilidade e meia-vida, podendo, por fim, potencializar os seus efeitos ou, em alguns casos, elevar o risco de eventos adversos e toxicidade. O suco de toranja é um exemplo clássico de inibidor do CYP3A4 intestinal (Genser, 2008).

As interações entre medicamentos e nutrientes podem levar a alterações da cinética ou da dinâmica de um medicamento ou nutriente, ou o comprometimento do estado nutricional, de forma que essas possíveis interações dos medicamentos com a alimentação dos pacientes podem levar ao prejuízo da ação do medicamento e/ou alimento, podendo causar um aumento da necessidade de utilização dos fármacos em tratamentos crônicos ou desnutrição, ocasionado aumentos no custo e no tempo de internação hospitalar (Lopes *et al.*, 2010). Entretanto, foi proposto que a co-injeção da quercetina com extratos de chá verde poderia aumentar a biodisponibilidade de catequinas e que Piperina de pimenta preta melhorou a absorção da epinocatequina galato (Choi *et al.*, 2017).

1.3 – Enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos

As enzimas da superfamília Citocromo P450 (CYP) são heme-monooxigenases responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos (drogas e outras substâncias químicas) e substratos endógenos. CYPs estão amplamente distribuídos nos diferentes tecidos do corpo humano, como fígado, intestino, pulmão e rins (Krishna & Klotz, 1994), existindo muitas isoformas em mamíferos. Embora muitas isoformas CYP de diferentes famílias já tenham sido identificadas e caracterizadas, o metabolismo dos xenobióticos em humanos é realizado, principalmente, por três famílias de enzimas: CYP1, CYP2 e CYP3 (Nakajima *et al.*, 1999), sendo o CYP2C a segunda subfamília mais abundante no tecido hepático e responsável pelo metabolismo de aproximadamente 20% dos fármacos atualmente disponíveis no mercado (Kumar *et al.*, 2006). As CYPs estão envolvidas em um número substancial de interações droga-droga (DDIs), constituindo uma das causas principais dos graves efeitos adversos que ocorrem na prática clínica, comumente resultando da inibição do metabolismo da droga-alvo pela droga co-administrada (Kumar *et al.*, 2006).

A partir desse conhecimento, uma melhor busca sistemática tem sido feita por pesquisadores e pela indústria farmacêutica para prever as DDIs. Frequentemente, em experimentos *in vitro*, um substrato é utilizado para uma única enzima CYP para determinar a potencial interação com a droga em processo de desenvolvimento. Esses resultados são extrapolados para uma potencial interação com outras substâncias metabolizadas pelo mesmo CYP. Infelizmente, esta busca não é sempre bem sucedida. Um fator importante a ser considerado, quando as extrapolações forem insatisfatórias, é o fato de haver regiões de múltiplas ligações dentro do sítio ativo da enzima, sobretudo em CYP3A4, o que também já

é descrito para outras enzimas CYP (Kumar *et al.*, 2006). Diante disso, os resultados de Kenworthy e colaboradores (1999), que estudaram a correlação do potencial inibitório *in vitro* de 34 fármacos com dez substratos de CYP3A4, sugeriram que os substratos fossem divididos em três grupos, o que traduziria a possível ligação em três regiões diferentes dentro do sítio do CYP3A4. Houve a sugestão, então, que para se prever corretamente a potencial inibição do CYP3A4, deveriam ser investigados separadamente três substratos para essa isoforma. No caso de CYP2C9, as evidências também sugerem a presença de mais de uma região de ligação no seu sítio ativo (Kumar *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2003). Assim, estudos com múltiplos substratos de CYP2C9, e também de CYP2C19 e CYP3A, seriam necessários para prever eventuais ocorrências das DDIs. No entanto, estudos de inibição *in vitro* das enzimas CYPs, especialmente, os relevantes para previsões farmacocinéticas e para a escolha dos substratos para a otimização, são complexos devido à diversidade das interações substrato-inibidor com algumas dessas enzimas (Kenworthy *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2006; Foti & Wahlstrom, 2008).

Portanto a inibição das CYPs é a causa mais comum de interações medicamentosas prejudiciais que têm levado à remoção de vários fármacos do mercado nos últimos anos. As interações entre substâncias bioativas presentes nos alimentos/suplementos e fármacos ganharam importância e os estudos de inibição, uma nova aplicabilidade investigativa (Chavez, *et al.*, 2006; Pelkonen *et al.*, 2008).

1.4 – Enzimas CYP e substâncias fenólicas

Estudos demonstraram que flavonoides foram capazes de inibir a expressão de diferentes monooxigenases. A galangina (um flavonoide encontrado no mel) foi um potente inibidor da CYP1A1 em células intactas e em microsomos isolados de células tratadas com dimetilbenzantraceno (Ciolino & Yeh, 1999). Doostbar e colaboradores (2000) demonstraram que as flavonas acacetina e diosmetina foram inibidores mais potentes das CYP1A1 e CYP1A2 quando comparado às flavanonas eriodictyol, hesperetina, homoeriodictyol e naringenina. A principal isoflavona da soja, a daidzeína, foi capaz de inibir a atividade da CYP1A2, alterando a farmacocinética da teofilina (broncodilatador) em voluntários saudáveis (Peng *et al.*, 2003). No estudo de Kimura e colaboradores (2010) foi descrito que as substâncias Shikonin, bergamottin, imperatorin, luteolin, e amentoflavona

demonstraram efeitos inibitórios notáveis, pois foram capazes de inibir em 100% a atividade de ambas as enzimas CYP3A4 e CYP2C9.

1.5 – Subfamília CYP2C

A subfamília CYP2C é bem complexa e a terceira mais importante para o metabolismo de xenobióticos do complexo Citocromo P450 em seres humanos. Elas são encontradas predominantemente no fígado, mas também podem ser encontradas em tecidos extra-hepáticos como cérebro, rins, duodeno, útero e ovário (Shukla *et al.*, 2005).

A subfamília 2C contém quatro membros altamente homólogos, sendo CYP2C9 e CYP2C19 as isoformas mais semelhantes (a homologia na sequência de ácidos aminados é de 91%), enquanto CYP2C8 e CYP2C18 são as mais distantes (homologia na sequência de ácidos aminados é de 77%) (Isvoran *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que a ocorrência do polimorfismo genético das enzimas da subfamília CYP2C, bem como de outras enzimas metabolizadoras de drogas, representa uma das principais causas de reações adversas indesejáveis a medicamentos. Assim, o polimorfismo é uma preocupação primária na descoberta e no desenvolvimento de drogas (Sun & Scott, 2011). Nesse contexto, vários substratos dos CYP2C mostraram reações cruzadas em relação a outros substratos de teste, tornando difícil estudar as atividades mais específicas do CYP2C de forma independente. Por exemplo, a hidroxilação do diclofenaco, que é mediada pelo CYP2C9, foi avaliada em porcos pequenos e mostraram baixas atividades comparados a seres humanos. Esta hidroxilação pode ser inibida 80-100% em seres humanos pelo sulfafenazol, porém a atividade foi apenas ligeiramente inibida (20%) no suíno, indicando que os substratos ou o inibidor não são específicos para esta enzima em porcos, ou a reação é catalisada por outra enzima. (Skaanild & Friis, 2008).

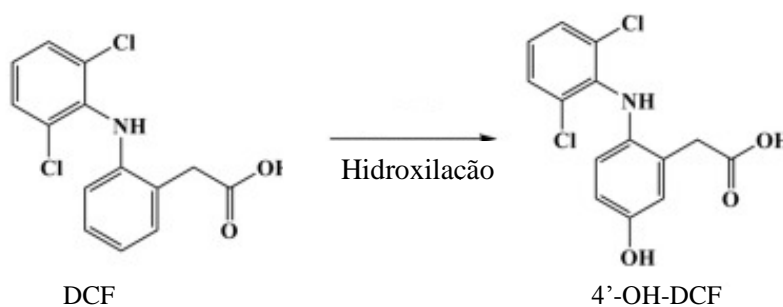
No fígado do rato, CYP2C é a principal subfamília CYP, onde várias isoformas se expressam, como CYP2C6, CYP2C11, CYP2C12 e CYP2C13. As isoformas CYP2C no rato, diferentemente do que ocorre no homem, são sexo-específicas (*Gentest Catalog 2001-2002*; Czerniak, 2001).

1.5.1- CYP2C9 Humana

O CYP2C9 responde por aproximadamente 20% do teor total de CYPs hepáticos e está envolvido no metabolismo de 15% dos medicamentos utilizados na prática clínica atual. Entre os substratos de CYP2C9, encontram-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) diclofenaco, ibuprofeno e piroxicam; os hipoglicemiantes orais, como tolbutamida e glipizida; os bloqueadores da angiotensina II, como a losartana; e outros, como S-varfarina, fenitoína, torsemida e ácido valproico (Ishizaki, 2002).

O principal metabólito do diclofenaco (DCF), que é metabolizado pelo CYP2C9, no plasma e urina é o 4-hidroxi diclofenaco (4'-OH-DCF) (Figura 4), enquanto o 3-OH diclofenaco e o 5-OH diclofenaco são metabólitos produzidos em menor concentração.

Figura 6. Esquema da bioconversão do diclofenaco pelo CYP2C9



Fonte. Li *et al.*, 2017.

O polimorfismo genético do CYP2C9 tem sido extensivamente estudado em diferentes populações étnicas. Até o momento, já foram descritas pelo menos 33 variantes do gene CYP2C9, sendo CYP2C9*2 e CYP2C9*3 as mais encontradas e mais estudadas, diferindo do tipo selvagem CYP2C9*1 em apenas uma mutação pontual (Wang *et al.*, 2009). Em caucasianos, a frequência destes subtipos CYP2C9*2 e CYP2C9*3 foi de 11% e 7%, respectivamente, nos estudos de Ishizaki (2002) e Chen *et al.* (2015).

Wang e colaboradores (2009) descrevem que a frequência do CYP2C9*2 na população boliviana (4,8%) foi evidentemente maior que as frequências relatadas para a população oriental (0%), porém foi menor do que da população europeia (10,6%) e populações norte-americanas (15%). Em outro estudo, CYP2C9*2 estava ausente nos asiáticos, enquanto na população negra a frequência foi de 3,2%. No caso da CYP2C9*3, a frequência em negros foi de 1,3%, enquanto no chinês foi de 3,3% (Zheng *et al.*, 2017). O

alelo CYP2C9*3 confere maior eficiência catalítica à enzima, mostrando uma redução significativa do substrato com a proteína quando comparado com a enzima de tipo selvagem (Kumar *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2002; Higashi *et al.*, 2002).

Dessa forma, as diferenças nos genótipos CYP2C9 refletem-se nas diferentes respostas a medicamentos (substratos de CYP2C9) observadas entre as diferentes etnias. Os estudos *in vitro* e *in vivo*, que demonstram que os polimorfismos do gene CYP2C9 modificam a atividade da enzima CYP2C9 e alteram a biotransformação de vários fármacos são, portanto, de extrema importância para a prevenção de DDIs (De-Saro *et al.*, 2017). A farmacogenômica surge e se destaca como a disciplina do futuro para se alcançar máxima eficácia terapêutica e toxicidade mínima, tendo como exemplo prático o metabolismo da varfarina pelo CYP2C9, por ser bastante utilizada em estudos de interações (Wang *et al.*, 2009).

1.5.2 – CYP2C11/12 no rato

Os ratos são comumente usados na pesquisa em laboratórios, bem como, na indústria farmacêutica, como espécies primárias de roedores para estudos de metabolismo e toxicologia (Wang *et al.*, 2015). O CYP2C11 em ratos pode ser considerado como uma contrapartida funcional do CYP2C9 humano, pois apresenta preferência de substrato e analogia com a CYP humana catalisadora de fármacos clinicamente importantes, como já citado nesta dissertação (Wójcikowski *et al.*, 2013).

A isoforma CYP2C11 compreende, aproximadamente, 50% do CYP total hepático de ratos adultos e desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase de muitas substâncias fisiológicas, como hormônios esteroidais. Tal como CYP2C13, o CYP2C11 é expresso preferencialmente nos machos, enquanto o CYP2C12 é expresso em fêmeas (Czerniak, 2001; Haduch *et al.*, 2011; Wójcikowski *et al.*, 2013).

1.6 - Proteínas Humanas Recombinantes

As enzimas CYPs humanas recombinantes tem se mostrado úteis para pesquisas sobre o metabolismo de drogas. Dessa forma, muitos sistemas de expressão de CYP heterólogos foram desenvolvidos (Ahn & Yun, 2004). Os sistemas com expressão em bactérias, sobretudo *Escherichia coli*, tem sido utilizados para a produção de proteínas

recombinantes de várias CYPs. Nesses sistemas, a expressão e o rendimento chega a 30% de proteínas recombinantes. Proteínas como insulina, eritropoietina, hormônio de crescimento, entre outros, podem ser produzidas por sistema usando bactérias (Ahn & Yun, 2004; Espejo-Mojica *et al.*, 2015; Quehl *et al.*, 2016).

A expressão das enzimas CYPs humanas recombinantes (rhCYP) é importante na identificação de rotas metabólicas e na quantificação da contribuição dos CYPs individuais no metabolismo total de substâncias candidatas a novos fármacos (Kitsati *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2013). As rhCYP são de fácil aquisição no mercado e de grande reprodutibilidade experimental, o que promove uma alta procura para estudos *in vitro*. Recentemente, tem havido crescente interesse na utilização dos rhCYPs, como alternativa aos Microsomas Hepáticos Humanos (MHH) e cultura de hepatócitos, na extrapolação *in vitro-in vivo* (IVIVE), para estimar a dimensão da depuração hepática *in vivo* de substâncias químicas (Kudugunti *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2011). Além disso, para alcançar atividade máxima catalítica, bem como expressão proteica, são empregadas várias estratégias (Ahn & Yun, 2004).

Outra questão a se considerar é a escolha da quantidade de enzima recombinante a ser utilizada na reação, podendo variar de acordo com a estratégia experimental empregada, pois os supersomos podem produzir atividades, em geral, mais altas que o microsomo hepático quando da avaliação de uma determinada isoforma CYP (BD Bioscience, 2009).

1.7 - Fármacos usados nesse estudo

1.7.1 – Diclofenaco de sódio

O diclofenaco de sódio (DCF) é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) e antiflogístico, que inibe a síntese de prostaglandinas pela inibição das ciclooxigenases (COX) 1 e 2 de forma não seletiva. As COXs 1 e 2 podem sintetizar prostaglandina, que induz inflamação, dor, coagulação sanguínea e uma resposta imune geral, e por conseguinte, o DCF suprime a inflamação (Efosa *et al.*, 2017). Estima-se que uma média de 256.000 pacientes são tratados diariamente com DCF em atenção primária (Dorado *et al.*, 2003). O DCF é comumente usado como substrato para estudos de atividade metabólica do CYP2C9, e a hidroxilação do DCF forma o principal metabólito, 4'-hidroxi-diclofenaco (4'OH-DCF) (Zi *et al.*, 2010).

A atividade do CYP2C9 tem sido avaliada *in vitro* e em estudos com voluntários saudáveis, usando a razão DCF/4'OH-DCF. Além disso, muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para a quantificação de DCF e de seus metabólitos, tal como a cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) (Dorado *et al.*, 2003).

1.7.2 – Eritromicina

A eritromicina, como um dos antibióticos macrolídeos mais utilizados, é produzido por uma cepa de *Streptomyces erythreus* que inibe a síntese de proteínas através da sua ligação às proteínas ribossômicas (Zhou *et al.*, 2018). A família CYP3A desempenha um papel importante na biotransformação de drogas comumente usadas na prática médica. Há registros de grande variabilidade interindividual da atividade do CYP3A, de forma que algumas abordagens tem demonstrado interações medicamentosas *in vitro* envolvendo essa isoforma (Sugiyama *et al.*, 2011). A *N*-desmetilação da eritromicina tem uso generalizado em um ensaio não invasivo com o qual a função hepática do fenótipo do CYP3A é avaliada. A eritromicina é catalisada pela isoforma CYP3A com boa sensibilidade e especificidade na detecção colorimétrica da formação de formaldeído (Zhang & Thomas, 1996). Berg-Candolfi & Candolfi (1996) descreveram o ensaio da *N*-desmetilação de antibióticos macrolídeos em camundongos como um marcador seletivo para as reações enzimáticas catalisadas pelo CYP3A. Yamazaki e colaboradores, no mesmo ano, sugeriram que a *N*-desmetilação da eritromicina (ERITRO-d) em ratos, era catalisada, sobretudo pelo CYP3A1, e parcialmente pelo CYP2B1.

1.7.3 – *p*-Nitrofenol

Nitrofenol, é uma matéria-prima amplamente aplicado em muitos campos, incluindo sínteses de pesticidas, peptídeos, explosivos, e corantes nas indústrias de couro, de forma que tem grande importância duas formas: *o*-nitrofenol (ON) e o *p*-nitrofenol (PNP) (Zhang *et al.*, 2017). A oxidação do PNP para 4-nitrocatecol tem mostrado ser um ensaio rápido, fácil e relativamente específico para determinar a atividade catalítica dependente do CYP2E1 e tem sido amplamente usado na literatura (Cederbaum, 20140).

A reação de hidroxilação do *p*-nitrofenol (PNFh), marcadora da atividade catalítica do CYP2E1, foi descrita por Reinke e Moyer (1985), e posteriormente modificada por Allis & Robinson (1994). Essa reação modificada, que tem como substrato o *p*-nitrofenol (PNF),

e como produto, o 4-nitrocatecol, está descrita no seção Material e Métodos. A reação de PNFh, de acordo com Yue & Peng (2009), também pode ser catalisada por CYP3A no homem e no rato.

O CYP2E1 tem a capacidade de metabolizar vários endo e xenobióticos, como corpos cetônicos, acetaminofeno, clorofluorhidrocarbonetos, clorzoxazona e etanol. Devido à importância desta CYP2E1, algumas substâncias têm sido utilizadas para investigação da catálise por essa isoforma, como o *p*-nitrofenol. A hidroxilação dessa substância em 4-nitrocatecol é usada como marcador da atividade desta CYP em espécies animais (Tessaneeyakul *et al.*, 1993).

1.7.4 – Rifampicina

A indução de enzimas que metabolizam fármacos, especialmente a família do citocromo P450 por algumas drogas, é um fenômeno bem conhecido (Prueksaritanont *et al.*, 2006). RIF é um antibiótico bactericida do grupo das rifamicinas, clássico usado contra *Mycobacterium tuberculosis* e lepra (Liang *et al.*, 2017), indutor pleiotrópico das atividades de CYP. Alguns animais são particularmente susceptíveis à ação indutora da RIF, como camundongos e coelhos (Strolin Benedetti & Dostert, 1994), enquanto outros, como ratos e cobaias, são particularmente resistentes ao seu efeito indutor. Assim, Oesch *et al.* (1996) observaram que doses de 150 mg/kg de RIF administradas a ratas durante 21 dias não alteravam de forma significativa as atividades de enzimas de metabolismo de xenobióticos. No entanto, Daujat *et al.* (1991, Apud Oesch *et al.*, 1996), por fim, observaram que a dose de 300 a 600 mg/kg de RIF incorporada à ração, dependendo da ingestão individual, provocava indução da atividade de ERITRO-d e da proteína CYP3A.

As isoformas CYP2C8, CYP2C9 e CYP2C19 são indutíveis por compostos conhecidos por ativar o receptor pregnano X, como a RIF que induz CYP2C8 e CYP2C9 e em menor expressão CYP2C19 (Martignoni *et al.*, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

Este trabalho fundamenta-se no fato de que, as substâncias fenólicas naturais são fundamentais à saúde humana, pois garantem uma melhor qualidade de vida, por apresentarem atividade biológica contra muitas doenças degenerativas, principalmente contra àquelas geradas pelo estresse oxidativo. Diariamente, a população consome grande quantidade de substâncias fenólicas que estão presentes em frutas, verduras, legumes, bebidas (café, mate, vinho) ou na forma de suplementos.

Dentro deste contexto, a realização de estudos de metabolismo e de interação enzimática de substâncias fenólicas é justificada, devido à pouca informação na literatura atual, pois as possíveis interações destas substâncias com fármacos (como por exemplo AINEs) podem reduzir a eficácia desses, levando à descontinuidade do tratamento, falha terapêutica ou mesmo a eventos toxicológicos.

3 OBJETIVOS

3.1-Objetivo Geral:

Estabelecer métodos de experimentação *in vitro* para avaliar o efeito de substâncias fenólicas presentes na dieta humana sobre as enzimas da subfamília CYP2C.

3.2-Objetivos Específicos

- Desenvolver metodologia de análise por Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), acoplada a detector de ultravioleta (UV) em rede de diodos (DAD) para dosagem do principal produto da hidroxilação do DCF, o 4'OH-DCF, no sentido de estabelecer as atividades da rhCYP2C9*1 e da CYP2C12 de ratas;
- Investigar as eventuais diferenças cinéticas entre microsossomos hepáticos de ratas e sistemas de expressão de CYP humana recombinante, utilizando a reação de hidroxilação do DCF como marcador da atividade de isoformas da sub-família CYP2C;
- Investigar os perfis de inibição de ácidos fenólicos (cafeico, vanílico, ferúlico e *p*-cumárico) e de flavonoides (rutina, hesperidina e quercetina) sobre as isoformas CYP da subfamília CYP2C em microsossomos hepáticos de ratas e sistemas de expressão de CYP humana recombinante.

4 MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 - Ensaio Enzimáticos:

4.1.1 - Atividades de CYP

As atividades das isoformas CYP da subfamília CYP2C foram avaliadas pela reação de hidroxilação do diclofenaco (DCFh), cujo método de avaliação por CLUE-DAD-UV permitiu a quantificação do produto final da reação, 4'-OH-DCF. Como um dos objetivos desse estudo foi avaliar o potencial inibidor de CYP por flavonoides e por ácidos fenólicos, foi utilizada a rifampicina (RIF) como indutor de CYP, visto que já foi bem estabelecido que RIF é indutora pleiotrópica de CYPs humanas e, em altas doses, de CYPs de ratos (Oesch *et al.*, 1996; Küblbeck *et al.*, 2011).

A indução de CYP pela RIF foi investigada, portanto, com os ensaios das atividades de *p*-nitrofenol-hidroxilase (PNPh), marcadora de CYP2E1, e da eritromicina-desmetilase (ERMd), marcadora da CYP3A11, já padronizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LTA) Ensp/Fiocruz, anteriormente à padronização do ensaio da DCFh. Estabelecidos os fatores de indução das reações de PNPh e ERMd, procedeu-se, então, à padronização do ensaio da DCFh com microsossomos de ratas não tratadas (não induzidas) e tratadas, quando se estabeleceu, por fim, o fator de indução de CYP2C pela RIF em ratas.

4.1.2 – Tratamento de Ratas Wistar

Foram utilizadas seis ratas Wistar em idade adulta, pesando entre 190 e 210 g, fornecidas pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz. Os animais receberam suprimento de água e ração *ad libitum* (ração para camundongos e ratos Nuvital CR1, Nuvilab® Curitiba, PR, Brasil). No biotério do LTA, os animais foram acomodados em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável e cama de maravalha de pinho branco. A temperatura e a umidade relativa do ar, $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e aproximadamente 70%, respectivamente, foram mantidas estáveis no ambiente e os animais permaneceram em ciclo claro/escuro de 12h (ciclo claro, de 7:00 às 19:00 h).

4.1.3 – Tratamento com Rifampicina

O tratamento dos animais aqui apresentado foi feito segundo Oesch e colaboradores (1996), com algumas modificações, visto que as ratas daquele estudo que haviam recebido doses de 300 a 450 mg/kg de peso animal haviam mostrado sinais de toxicidade após cinco dias de tratamento (1 mL/100 g de peso corporal). Neste estudo, portanto, foram utilizadas doses de 300 mg/kg de peso animal durante cinco dias, quando optou-se por um intervalo de dois dias antes que se desse continuidade ao tratamento com RIF na mesma dose (por um dia). Em seguida, a dose foi fracionada (duas vezes ao dia) durante três dias, como mostra o Quadro 1.

Três ratas não receberam nenhum tratamento (controles, WC1, WC2 e WC3) e três ratas receberam, por via oral, RIF, sendo essas últimas identificadas como WR1, WR2 e WR3.

Quadro 1. Regime de doses de rifampicina para administração às ratas Wistar por via oral.												Morte	
Animal	DT Dose (mg/kg)												
	DT0	DT1	DT2	DT3	DT4	-	-	DT5	DT6	DT7	DT8	16 h após a última dose	
Controle 1 (WC1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Controle 2 (WC2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Controle 3 (WC3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Tratada RIF 1 (WR1)	300					-	-	300	300 (fracionada em duas doses de 150)				
Tratada RIF 2 (WR2)	300					-	-	300	300 (fracionada em duas doses de 150)				
Tratada RIF 3 (WR3)	300					-	-	300	300 (fracionada em duas doses de 150)				

DT: Dia de Tratamento; WC1= Wistar Controle; WR1= Wistar Tratada com RIF; RIF= Rifampicina

A suspensão de RIF, preparada diariamente, foi diluída em solução aquosa contendo 0,5% de carboximetilcelulose e 0,4% de Tween 20.

Dezesseis horas após a administração da última dose de RIF, os animais foram eutanasiados por exposição ao CO₂. Os fígados foram retirados rapidamente e colocados em banho de gelo, limpos de gordura, pesados, embalados em papel alumínio, identificados e imediatamente imersos em nitrogênio líquido.

A RIF foi gentilmente cedida por Farmanguinhos/Fiocruz e o estudo foi licenciado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA LW-51/12) da Fiocruz.

4.1.4 – Manejo dos Animais

Todos os animais foram pesados e observados diariamente, e as alterações devidamente registradas, conforme o descrito abaixo. Para as ratas separadas para receber o tratamento com a RIF, o volume da solução contendo o fármaco para obter a dose desejada foi calculado diariamente (1 mL/100 g de peso corporal) , após o registro do peso dos animais.

- **Evolução Ponderal dos Animais**

O registro diário do peso dos animais permitiu que se avaliasse o ganho de peso durante o período de tratamento (nove dias). O ganho de peso foi calculado como o peso do animal no dia da eutanásia subtraído do peso do animal no dia 0 de tratamento.

- **Pesos Absolutos e Relativos dos Fígados dos Animais**

Após a excisão e registro dos pesos dos fígados, foram calculados os pesos relativos do tecido hepático, que corresponde ao peso do fígado dividido pelo peso do animal. Esse cálculo permite uma melhor avaliação da eventual alteração ponderal do tecido hepático decorrente do tratamento

4.1.5 - Preparo da Fração Microssomal Hepática

A fração microssomal dos tecidos hepáticos das ratas tratadas e controles foi realizada segundo De-Oliveira e colaboradores (1997). Os órgãos foram retirados do nitrogênio líquido e imediatamente transferidos para o banho de gelo. Os fígados foram pesados, lavados com solução de sacarose 250 mM e secos com papel de filtro. Em seguida, os órgãos foram homogeneizados em solução tampão Tris 100 mM com KCl 150 mM (pH

7,4), usando homogeneizador de vidro (capacidade de 50 mL) e pistilo de teflon, a uma velocidade aproximada de 1.200 rpm. O volume da solução tampão correspondeu a quatro vezes o peso do órgão. Em seguida, o homogeneizado hepático foi levado à centrifugação em ultracentrífuga Beckman XL-90 (rotor 70.1 Ti, gentilmente autorizado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS) a 4° C e a 9.000 x g por 30 min e o sedimento contendo núcleo, mitocôndrias e restos celulares foi desprezado. O sobrenadante obtido foi filtrado em gaze e centrifugado a 100.000 x g a 4 °C por 1 h na ultracentrífuga Beckman®. Após a segunda ultracentrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento contendo as enzimas ligadas ao retículo endoplasmático liso (microsomas) foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio dibásico 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM (pH 7,4) a uma velocidade de aproximadamente 250 rpm. Os microsomas assim obtidos foram distribuídos em tubos para criogenia e congelados em nitrogênio líquido até o momento de uso.

O motor do homogeneizador usado para a preparação microssomal foi da Novatécnica® (Agitador Mecânico 110v modelo NT136 50W – 0,5A 60Hz).

4.1.6 - Quantificação de Proteínas na Fração Microssomal

A concentração total de proteínas nas amostras de fração microssomal das ratas controles e tratadas foi determinada usando o método de Bradford (1976), que se baseia na ligação do corante azul de Coomassie (Reagente de Bradford) à proteína, sendo a intensidade da cor do corante proporcional à concentração de proteínas da amostra. Padrão de proteínas e reagente de Bradford foram utilizados para construir a curva padrão do ensaio. A leitura de absorvância das diferentes concentrações do padrão (0,28, 0,56, 0,84 e 1,4 mg/mL, além do branco) e das frações microssomais foi realizada por espectrofotometria a 595 nm na leitora de microplacas EZ Read 2000 Biochrom®.

A concentração total de proteínas nas amostras foi expressa em mg de proteínas / mL. Os resultados representam a média de três leituras das concentrações do padrão e das amostras.

4.1.7 – Atividade da CYP3A11 – Reação de N-desmetilação da Eritromicina

Nesse estudo, avaliamos a atividade da ERITRO-d para investigar se o tratamento com o regime de doses de RIF aqui apresentado induzia CYP3A em ratas.

A reação foi feita em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, com volume de reação de 1 mL em banho-maria com agitação Heto[®] a 37°C. O produto obtido, formaldeído, transformado em diacetil-dihidrolutidina (DDL) com a reação de Nash (1953), de cor amarela, e foi quantificado por espectrofotometria a 412 nm na leitora de microplacas EZ Read 2000 Biochrom[®].

Inicialmente, os tubos imersos em gelo continham solução tampão Tris 50 mM KCl 150 mM (pH 7,4), eritromicina 1 mM e proteína (1mg/mL). Após 3 min de pré-incubação, o sistema regenerador de NADPH foi adicionado (β -NADP 0,4 mM; G6P 10 mM; G6PD 1 U/mL and MgCl₂ 10 mM) para disparar a reação. Após 30 min, a reação foi finalizada com a adição de solução de ZnSO₄ 25% e solução de Ba(OH)₂ saturado para precipitação de proteínas. Os tubos foram levados à centrifugação a 12.000 x g em centrífuga Hettich[®] modelo Mikro 220R por 10 min. Em seguida, 700 μ L do sobrenadante foram retirados para novos tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, para onde foram adicionados 300 μ L do reagente de Nash recém-preparado (acetato de amônio 2 M; ácido acético 0,05 M e acetilacetona 0,02 M). Os tubos foram levados à estufa a 50 °C por 30 min para a produção de DDL. O produto foi transferido para microplacas de 96 poços e levado à leitura da absorvância.

Anteriormente ao ensaio, uma curva padrão com formaldeído foi construída: solução de formaldeído 1 μ M em solução tampão Tris 50 mM KCl 150 mM (pH 7,4) para obter as concentrações de 1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 nM. O branco foi constituído de água em tampão.

A atividade da CYP3A11 foi expressa como nanomoles de formaldeído/mg de proteína/min.

4.1.8 – Atividade da CYP2E1 – Reação de Hidroxilação do p-nitrofenol

Às cubetas de poliestireno foram adicionados tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 M (pH 6,8); 0,2 mg/mL de proteínas e, em seguida, PNF para obter concentração final de 0,1 mM. A cubeta foi pré-incubada por 5 min em banho-maria Heto[®] com agitação à 37 °C. Em seguida, foi adicionado o sistema regenerador de NADPH (glicose 6-fosfato 5 mM, glicose 6-fosfato desidrogenase 1 U/mL e β -NADP 0,25 mM) para dar início à reação. Após 5 min adicionais de pré-incubação, a cubeta foi levada ao espectrofotômetro Shimadzu UV1601[®], conectado ao banho-maria Fanem[®] modelo 116R com circulação externa, para manter a temperatura estável a 37 °C. A reação, em comprimento de onda de 480 nm, foi

acompanhada em tempo real durante 10 min e após finalizada, as absorvâncias diferenciais ($\Delta A = A_0 - A_{10}$) foram registradas.

Para o cálculo da atividade da CYP2E1 (expressa em nanomoles de 4-nitrocatecol/mg de proteína/min) foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 3,57 mM/cm (Allis & Robinson, 1994).

Anteriormente a cada ensaio, 1 mL da solução de PNF 0,1 mM em tampão fosfato de potássio dibásico 0,1 M (pH 6,8) foi adicionado à cubeta de quartzo e levado ao espectrofotômetro para a construção da curva espectral do PNF na amplitude de comprimentos de onda entre 300 e 600 nm. Apenas após a confirmação do sinal de absorção máxima de luz característico do PNF, comprovando a total solubilização do substrato no tampão, o ensaio cinético tinha início.

4.1.9 – Atividade de CYP2C11 – Reação de Hidroxilação do Diclofenaco

4.1.9.1 – Padronização do Método no Animal Controle

Para a padronização do ensaio da hidroxilação do diclofenaco (DCFh) em ratas no LTA, inicialmente construiu-se uma curva de proteína *versus* tempo com a fração microssomal da rata não tratada para estabelecer esses parâmetros (quantidade de proteína e tempo) para a otimização da reação.

Concentrações de proteína de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/mL foram, portanto, utilizadas nas reações que ocorreram durante 10; 20 e 30 min: DCF para obter a concentração de 100 μ M (substrato da reação preparado em Tris 100 mM, pH 7,5), Tris 20 mM (pH 7,5), solução de cofatores (cofatores e concentrações finais na reação: β -NADP 0,5 mM; G6P 1,24 mM e $MgCl_2$ 0,8 mM) e solução de G6PD para obter a concentração de 0,4 U/mL foram adicionados aos tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL para um volume final de reação de 250 μ L.

A reação ocorreu em banho-maria com agitação marca Heto[®] a 37 °C. Os tubos foram pré-incubados por 3 min, quando a reação teve início com a adição da fração microssomal diluída no tampão Tris para atingir as concentrações de uso.

A reação foi interrompida aos 10, 20 ou 30 min, com a adição de uma solução de acetonitrila (94%) e ácido acético glacial (6%). Após cessada a reação, os tubos foram levados à centrifugação a 12.000 x g por 4 min para a precipitação de proteínas. Em seguida, foram retirados os sobrenadantes e levados ao congelamento em freezer a - 20 °C até o momento das análises por CLUE-DAD-UV.

O controle negativo das reações de DCFh foi a mistura de reagentes que não continha a proteína, não havendo, portanto, a formação do produto final da reação, 4'OH-DCF.

Os valores quantitativos do produto da reação foram obtidos por CLUE-DAD-UV e expressos como $\mu\text{g/mL}$ de 4'OH-DCF.

4.1.9.2 – Comparação da Atividade entre os Animais Controle e Tratado

Após analisar os resultados do ensaio da DCFh com a rata controle, foram selecionadas as concentrações de 1 e 2 mg/mL de proteínas e o tempo de reação de 20 min para realizar o ensaio da atividade da DCFh e, por conseguinte, avaliar se o regime de doses da RIF usado nesse estudo havia provocado indução suficiente sobre a atividade da CYP2C, que permitisse o estudo do potencial inibidor dos derivados de ácidos cinâmicos e flavonoides sobre essa subfamília CYP.

4.1.9.3 – Inibição de CYP2C em Rata Induzida

Finalizado o processo de padronização do ensaio da DCFh utilizando a rata não tratada, e após evidenciada a indução de CYP2C na rata tratada com o regime de dose de RIF usado nesse estudo, teve início o estudo de inibição da reação de DCFh, utilizando as condições do ensaio já descritas. Nessa etapa, foi utilizada 1 mg/mL da fração microsossomal e a reação ocorreu durante 20 min.

4.1.9.4 - Inibição de CYP2C por Ácidos Fenólicos

Para os testes de inibição do CYP2C pelos derivados de ácidos cinâmicos, foram selecionadas as seguintes substâncias que podem ser encontradas no café: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido vanílico. O CGA disponível no laboratório não foi usado por estar impuro, provavelmente devido à degradação. A reação com CGA será feita em outra oportunidade. As substâncias foram solubilizadas em solução Tris 20 mM (pH 7,5) para a concentração final de 100 μM e seguindo as condições do ensaio já descritas.

Nessa etapa, foi utilizada 1 mg/mL da fração microsossomal e a reação ocorreu durante 20 min.

4.1.9.5 – Inibição de CYP2C por Flavonoides

Para os testes de inibição do CYP2C foram utilizados os flavonóides rutina, quercetina e hesperidina. As substâncias foram solubilizadas em solução Tris 20mM (pH

7,5), para obter a concentração final de 100 μ M e seguindo as condições do ensaio já descritas.

Nessa etapa, foi utilizada 1 mg/mL da fração microssomal e a reação ocorreu durante 20 min.

4.1.10 - Atividade da rhCYP2C9*1 – Reação de Hidroxilação do Diclofenaco

A atividade da rhCYP2C9 foi padronizada no LTA, com a reação da hidroxilação do diclofenaco (DCFh). Para tal, foi utilizada a rhCYP2C9 alelo 1 (rhCYP2C9*1) expressa em baculovirus infectante de células de inseto, seguindo o protocolo do fabricante (BD Bioscience[®]), com algumas modificações.

Inicialmente, a solução de rhCYP2C9*1 mantida em banho de gelo, foi distribuída em alíquotas em tubos para criogenia e rapidamente imersa em nitrogênio líquido para uso posterior.

4.1.10.1 – Quantificação de Proteínas na Solução de rhCYP2C9*1

A concentração total de proteínas na solução de 1 nanomol/mL de rhCYP2C9*1 foi determinada usando o método de Bradford (1976) como já descrito anteriormente, previamente à padronização do método de DCFh com o supersomo.

A concentração total de proteínas na solução de rhCYP2C9*1 foi expressa em mg de proteínas/mL. Os resultados representam a média de três leituras das concentrações do padrão e da amostra.

4.1.10.2 – Curvas de Proteínas com o Supersomo rhCYP2C9*1

A primeira etapa da padronização do método da DCFh com o supersomo rhCYP2C9*1 foi a construção de uma curva de proteínas com concentrações de 25; 50; 75 e 100 picomoles/mL de rhCYP2C9*1.

Foram adicionados aos tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, DCF para obter a concentração de 100 μ M (substrato da reação preparado em Tris 100 mM, pH 7,5), Tris 20 mM (pH 7,5), solução de cofatores (cofatores e concentrações finais na reação: β -NADP 0,5 mM; G6P 1,24 mM; MgCl₂ 0,8 mM) e solução de G6PD para obter a concentração de 0,4 U/mL. O volume final da reação foi de 250 μ L. Os tubos foram pré-incubados por 3 min, quando a reação teve início com a adição da proteína rhCYP2C9*1.

A reação ocorreu em banho-maria com agitação marca Heto a 37 °C, sendo interrompida após 10 min com a adição de uma solução de acetonitrila (94%) e ácido acético glacial (6%). Após cessada a reação, os tubos foram levados à centrifugação a 12.000 x g por 4 min para a precipitação de proteínas. Em seguida, foram retirados os sobrenadantes e levados ao congelamento em freezer a - 20 °C até o momento das análises por CLUE-DAD-UV.

O controle negativo das reações de DCFh foi a mistura de reagentes que não continha a proteína, não havendo, portanto, a formação do produto final da reação, 4'-OH-DCF.

Vale ressaltar que foi feita uma experiência piloto com concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 picomoles de CYP2C9*1, seguindo o mesmo protocolo já descrito, para selecionar a faixa de concentrações de CYP2C9*1 que seria usada.

Após a análise dos resultados das curvas de concentrações da enzima *versus* o produto da reação (4'-OH-DCF), foi selecionada a concentração de 75 pmoles/mL de rhCYP2C9*1 para utilização nos estudos subsequentes.

4.1.10.3 – Cinética Enzimática

Após selecionada a concentração de proteínas (75 picomoles/mL de rhCYP2C9*1) para o estudo da cinética enzimática, construiu-se uma curva com diferentes concentrações de substrato (DCF) na mistura de reação. Foram utilizadas as concentrações de 0,781; 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µM de DCF, seguindo o protocolo descrito acima.

Os valores quantitativos do produto da reação foram obtidos por CLUE-DAD-UV e expressos como µg/mL de 4'-OH-DCF.

A representação gráfica da cinética enzimática foi realizada traçando os gráficos de Michaelis-Menten e, em seguida, o traçado de duplas recíprocas de Lineweaver-Burke, para cálculo de K_m e V_{max} .

Os gráficos de Eadie-Hofstee e de Hanes-Woolf também foram construídos para confirmar os valores de K_m e V_{max} .

A representação gráfica da cinética enzimática foi realizada com o *software GraphPad Prism 5 for Windows*, 2007.

4.2 – Análises cromatográficas

As análises por CLUE-DAD-UV foram realizadas no sobrenadante do meio reacional ou em solução com os padrões DCF e 4'OH-DCF.

As determinações quantitativas do 4'OH-DCF foram realizadas por CLUE-DAD-UV em equipamento Shimadzu Nexera® XR equipado com bomba binária LC-20AD, injetor automático SIL-20AF, forno CTO-20A, detector DAD-UV-VIS APD-20MA e controlador CBM-20A, no LTA. Os cromatogramas foram manipulados no programa Labsolutions.

Os parâmetros de validação **seletividade, linearidade, limites de identificação e quantificação** foram determinados de acordo com Instrução Normativa DOQ-CGCRE 008 do INMETRO, 2008.

4.3 – Análise estatística

Os resultados foram analisados pela ANOVA seguida do teste de comparações de Bonferroni, quando aplicável. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

5 – Resultados

5.1 – Estado Geral dos Animais

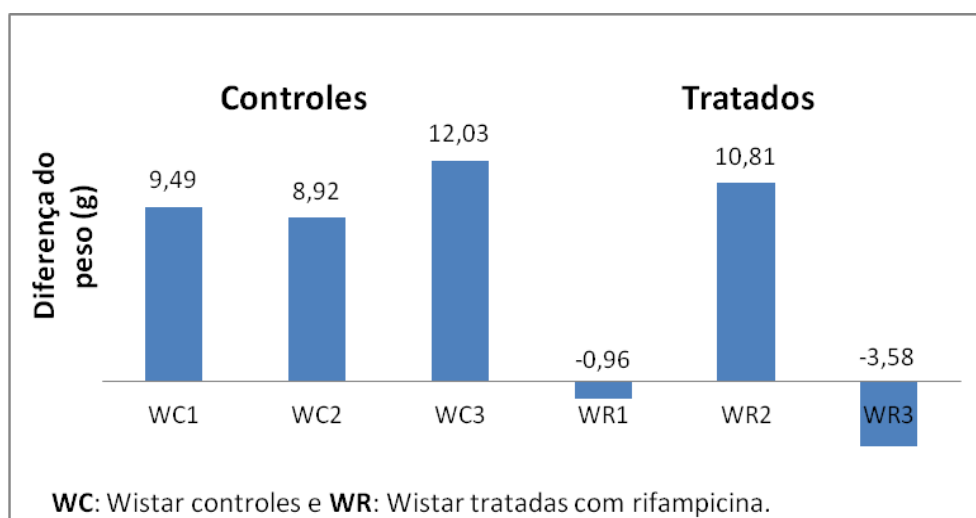
Durante o período de tratamento, as fezes e urinas dos animais que receberam RIF tomaram uma cor avermelhada e alaranjada, respectivamente. Essas alterações foram observadas no segundo e terceiro dias de tratamento, regredindo gradativamente até a coloração normal ao final do tratamento.

No terceiro dia de tratamento, também foi notada perda de pelo dos animais, que prosseguiu até o final do tratamento.

5.2 – Evolução Ponderal

O gráfico 1 mostra a evolução ponderal (ganho ou perda de peso) das ratas não tratadas e das que receberam a dose de 300 mg/kg de RIF durante o tratamento.

Gráfico 1. Evolução ponderal das ratas controles e tratadas com 300 mg/kg durante nove dias com rifampicina.



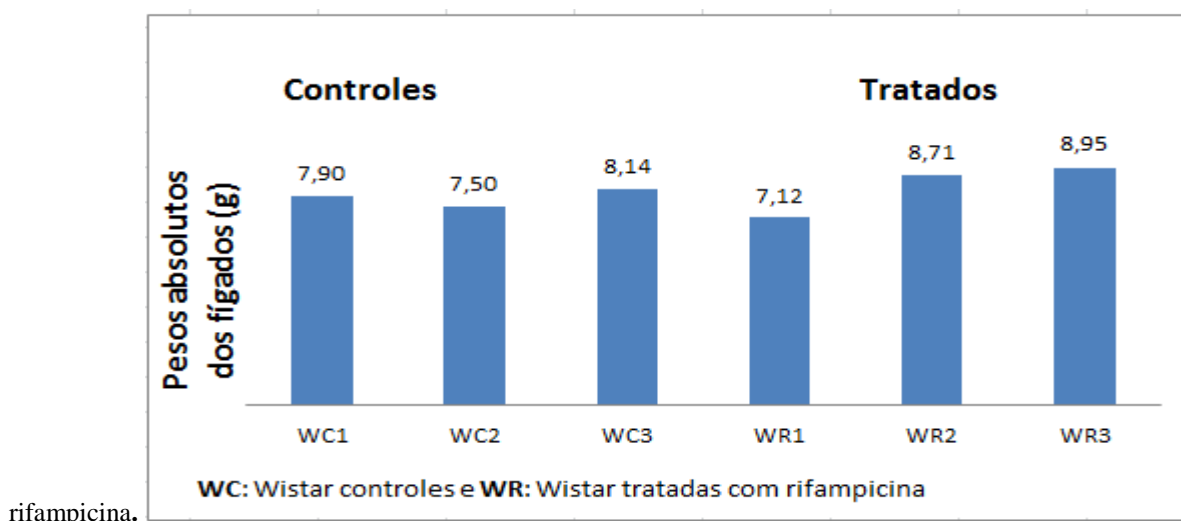
Fonte. Autor, 2018.

O gráfico acima demonstra que os animais tratados com RIF exibiram perda de peso quando comparados aos animais que não receberam o tratamento, com exceção do WR2 que apresentou ganho de peso, possivelmente este animal foi mais resistente ao tratamento que os demais.

5.3 – Pesos Absolutos e Relativos dos Fígados

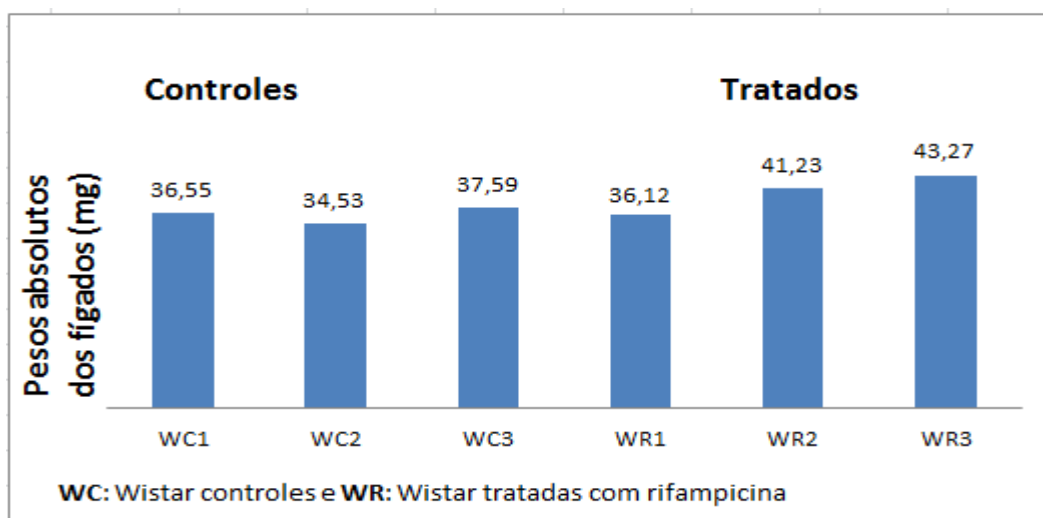
O gráfico 2 mostra os pesos absolutos e o gráfico 3 mostra os pesos relativos dos fígados das ratas não tratadas (controles) e das que receberam a rifampicina durante nove dias.

Gráfico 2. Pesos absolutos dos fígados das ratas controles e tratadas com 300 mg/kg durante nove dias com



Fonte. Autor, 2018.

Gráfico 3. Pesos relativos dos fígados das ratas controles e tratadas com 300 mg/kg durante nove dias com rifampicina.



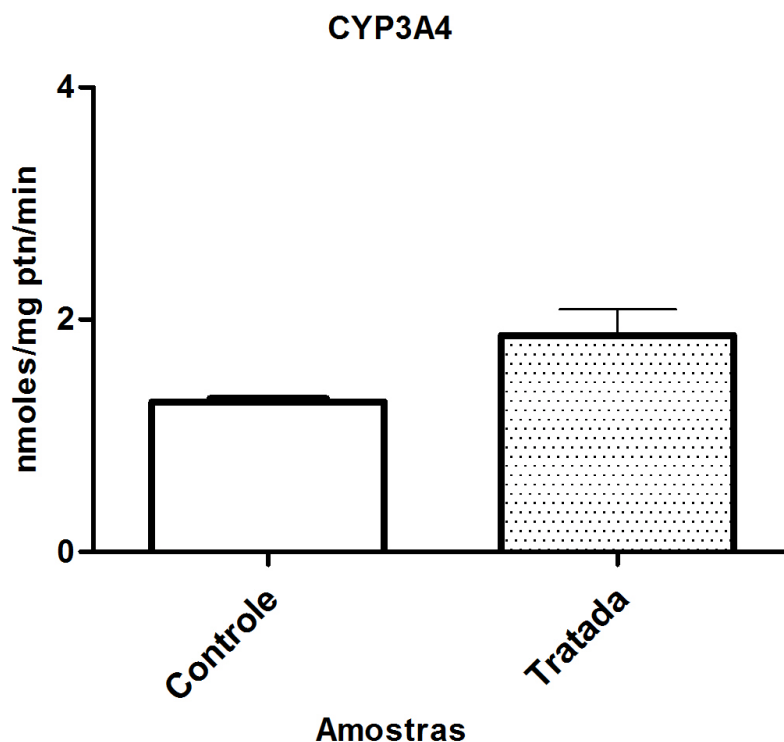
Fonte. Autor, 2018.

Os gráficos 2 e 3 demonstraram que não houveram diferenças significativas dos pesos relativos e absolutos, respectivamente, dos animais tratados com RIF quando comparados aos animais que não receberam tratamento.

5.4 – Atividade de *N*-desmetilação da Eritromicina

A atividade da *N*-desmetilação da eritromicina (ERMd) foi avaliada para investigar se o tratamento com a RIF induziu a CYP3A nas ratas Wistar. Os resultados mostraram que as atividades foram de 1,29 e 1,87 nanomoles de formaldeído/mg de proteína/min nas ratas controles e tratadas, respectivamente. A atividade na rata tratada foi 1,45 vezes maior que na rata controle (não tratada). O resultado está representado na Figura 7.

Figura 7. Atividades da *N*-desmetilação da eritromicina (nanomoles de formaldeído/mg de proteína/min)) em microsomo de uma rata não tratada (controle) e uma rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina.

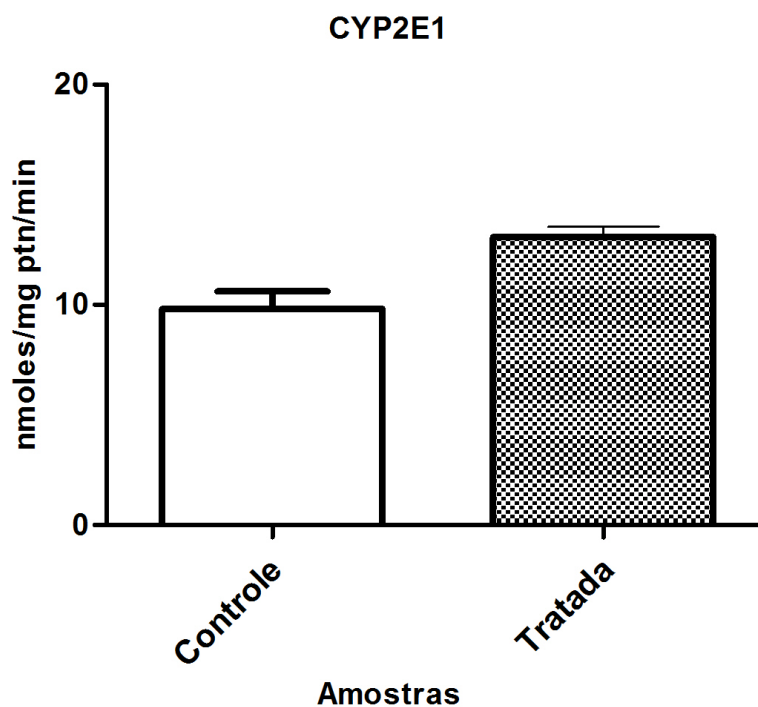


A Figura 7 demonstra que nos animais tratados com RIF houve uma maior atividade na reação de *N*-desmetilação da eritromicina quando comparado ao controle.

5.5 – Atividade de *p*-nitrophenol hidroxilase

A atividade da hidroxilação do *p*-nitrofenol (PNPh) foi avaliada para investigar se o tratamento com a RIF induziu a CYP2E1 nas ratas Wistar. Os resultados mostraram que as atividades foram de 9,8 e 13,07 nanomoles de 4-nitrocatecol /mg de proteína/min nas ratas controles e tratadas, respectivamente. A atividade na rata tratada foi de 1,33 vezes maior que na rata controle (não tratada). O resultado está representado na Figura 8.

Figura 8. Atividades da hidroxilação do *p*-nitrofenol (nanomoles de 4-nitrocatecol/mg de proteína/min) em microsomo de uma rata não tratada (controle) e uma rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias.



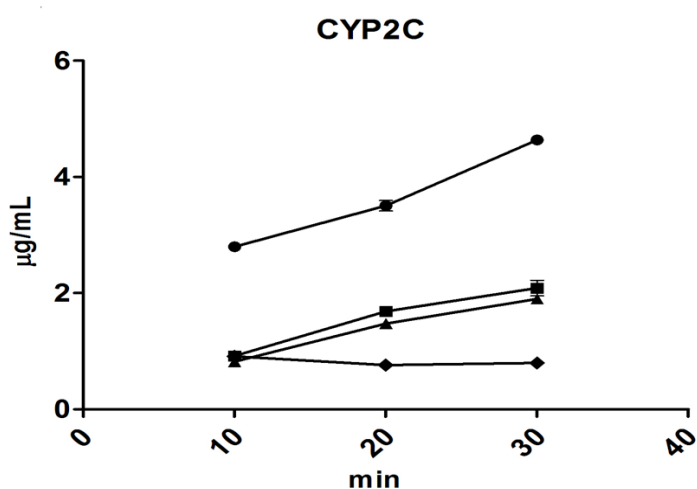
Na Figura 8 está demonstrado que nos animais tratados com RIF houve uma maior atividade na reação de PNPh quando comparado ao controle.

5.6 – Atividade de hidroxilação do diclofenaco

5.6.1 – *Curvas de Proteína versus Tempo*

Foram testadas concentrações de proteínas com os microsomos da rata não tratada (controle, não induzida) de 0,25; 0,5; 1 e 2 mg/mL em tempos de reação de 10, 20 e 30 min. Os resultados estão apresentados na Figura 9.

Figura 9. Concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) produzidas na reação de DCFh com concentrações de proteínas de 0,25 (\blacklozenge); 0,5 (\blacktriangle); 1 (\blacksquare) ou 2 (\bullet) mg/mL) de microsossomos hepáticos de rata não tratada *versus* tempo (10, 20 ou 30 min) de reação.



A figura 9 demonstra que no tempo de 20 min, com as concentrações de proteínas de 1 e 2 mg/mL durante a reação de DCFh, apresentaram resultados mais satisfatórios.

As concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) produzidas na reação de DCFh com as diferentes concentrações de proteínas com os três tempos de reação estão apresentadas no Quadro 2.

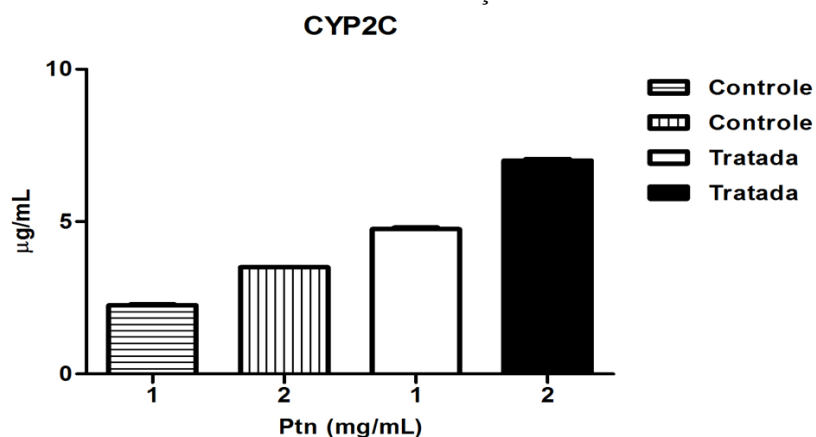
Quadro 2. Concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) produzidas na reação de DCFh com 0,25; 0,5; 1 ou 2 mg/mL de proteínas durante 10, 20 ou 30 min de reação com microsossomos hepáticos de rata não tratada (controle).

Ptn (mg/mL)	Tempo de reação (min)		
	10	20	30
0,25	0,91 ± 0,01	0,76 ± 0,02	0,80 ± 0,01
0,5	0,82 ± 0,02	1,48 ± 0,04	1,90 ± 0,06
1	0,92 ± 0,01	1,69 ± 0,06	2,08 ± 0,23
2	2,80 ± 0,08	3,51 ± 0,16	4,64 ± 0,09

Em seguida, as concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de 4'-OH-DCF produzidas na reação de diclofenaco hidroxilase durante 20 min com 1 ou 2 mg/mL de proteínas em microsossomos

hepáticos da rata não induzida foram comparadas às concentrações obtidas com os microsossomos da rata tratada com RIF, como mostra a Figura 10, representada como gráficos de barras. A concentração de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) usando a concentração de 1 mg/mL de proteínas foi considerada adequada para ser utilizada nas próximas etapas do estudo.

Figura 10. Concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) produzidas na reação de DCFh com concentrações de proteínas de 1 e 2 mg/mL de microsossomos hepáticos de rata não tratada (controle) e de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias durante 20 min de reação.



A figura 10 demonstra que, utilizando concentrações de proteínas de 1 e 2 mg/mL, uma maior produção de 4'-OH-DCF, quando utilizados microsossomos de animais tratados com RIF comparados ao controle, optando-se pela concentração de 1 mg/mL para as demais reações de DCFh.

Os valores das concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) correspondentes à Figura 10 estão apresentados no Quadro 3.

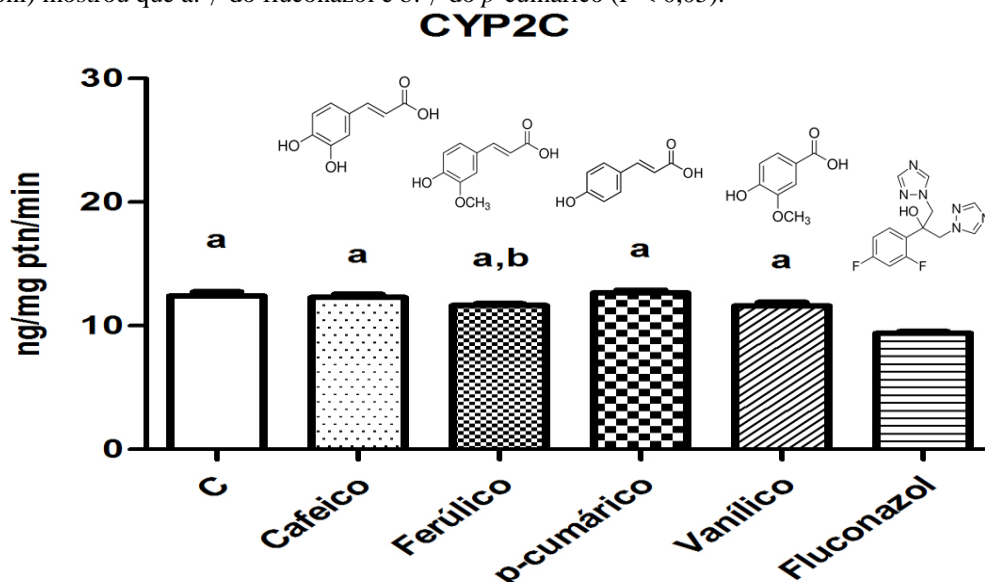
Quadro 3. Comparação das concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g/mL}$) produzidas na reação de DCFh com 1 ou 2 mg/mL de proteínas durante 20 min de reação entre microsossomos hepáticos de rata não tratada (controle) e rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina.

Ptn (mg/mL)	Microsossomos hepáticos	
	Rata não tratada	Rata tratada
1	2,25 ± 0,06	4,76 ± 0,03
2	3,47 ± 0,01	7,03 ± 0,11

5.7 - Inibição de CYP2C por Ácidos Fenólicos

As atividades de DCFh dos microsossomos hepáticos da rata tratada com rifampicina foram avaliadas mediante a adição dos ácidos cafeicos à reação para avaliar o potencial inibitório dessas substâncias sobre a atividade de CYP2C. O fluconazol, inibidor clássico da CYP2C9, foi utilizado como controle positivo no experimento. (Martignoni, *et al.*; 2006). Os resultados estão apresentados na Figura 11.

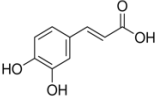
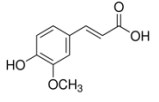
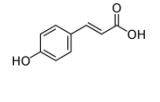
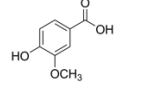
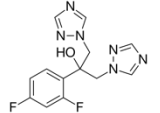
Figura 11. Atividades de DCFh (ng de 4'-OH-DCF/mg proteína/min, Média \pm S.E.M) durante 20 min de reação com 1 mg/mL de proteínas de microsossomos hepáticos de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias, na ausência (C, controle) e na presença dos ácidos presentes no café (cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e vanílico) e do fluconazol. Análise estatística (ANOVA seguida do teste de comparações de Bonferroni) mostrou que a: \neq do fluconazol e b: \neq do *p*-cumárico ($P < 0,05$).



A Figura acima demonstra que os ácidos fenólicos, não foram capazes de inibir a atividade da enzima quando comparado ao controle.

Os valores das atividades de DCFh na ausência e na presença dos ácidos presentes no café e do fluconazol referentes à Figura 11 estão apresentados no Quadro 4.

Quadro 4. Atividades de DCFh (ng de 4'-OH-DCF/mg proteína/min) durante 20 min de reação com 1 mg/mL de proteínas de microsomos hepáticos de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias, na ausência (C, controle) e na presença dos ácidos presentes no café, e do fluconazol.

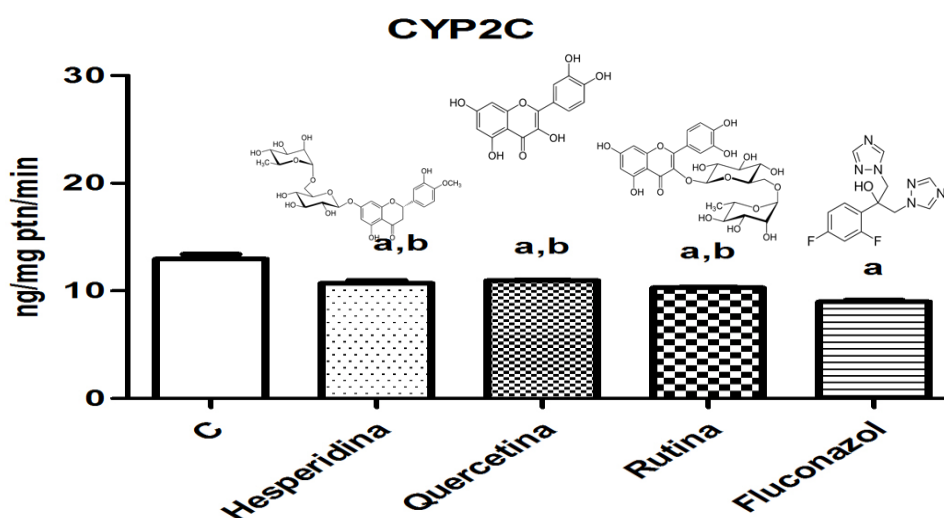
Ácidos presentes no café						
	C	cafeico	ferúlico	<i>p</i> -cumárico	vanílico	fluconazol
µg de 4'-OH-DCF/mL M±DP	0,0124±0,0001	0,0123±0,0001	0,0116±0,0005	0,0127±0,0007	0,0116±0,0007	0,0094±0,0005
						

C (controle)= Amostra com substrato (DCF) + microsomo 1 mg/mL no meio reacional e na ausência de ácidos fenólicos.

5.8 - Inibição de CYP2C por Flavonoides

As atividades de DCFh dos microsomos hepáticos da rata tratada com rifampicina foram avaliadas mediante a adição de flavonoides à reação para avaliar o potencial inibitório dessas substâncias sobre a atividade de CYP2C. O fluconazol foi utilizado como controle positivo no experimento. Os resultados estão apresentados na Figura 12.

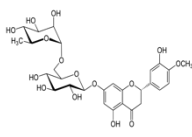
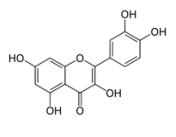
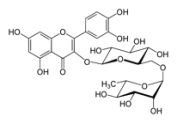
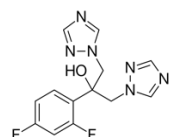
Figura 12. Atividades de DCFh (ng de 4'-OH-DCF/mg proteína/min, Média±S.E.M.) durante 20 min de reação com 1 mg/mL de proteínas de microsomos hepáticos de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias, na ausência (C, controle) e na presença de flavonoides (hesperidina, quercetina e rutina) e do fluconazol. Análise estatística (ANOVA seguida do teste de comparações de Bonferroni) mostrou que a: ≠ de C e b: ≠ do fluconazol (P < 0,05).



A Figura 12 demonstra que todos os flavonoides foram capazes de inibir a atividade da enzima quando comparado ao controle e ao fluconazol, de forma que a rutina apresentou melhor atividade inibitória.

Os valores das atividades de DCFh na ausência e na presença dos flavonoides, ou do fluconazol referentes à Figura 10 estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5. Atividades de DCFh (ng de 4'OH-DCF/mg proteína/min) durante 20 min de reação com 1 mg/mL de proteínas de microsomos hepáticos de rata tratada com 300 mg/kg de rifampicina durante nove dias, na ausência (C, controle) e na presença de flavonoides ou do fluconazol.

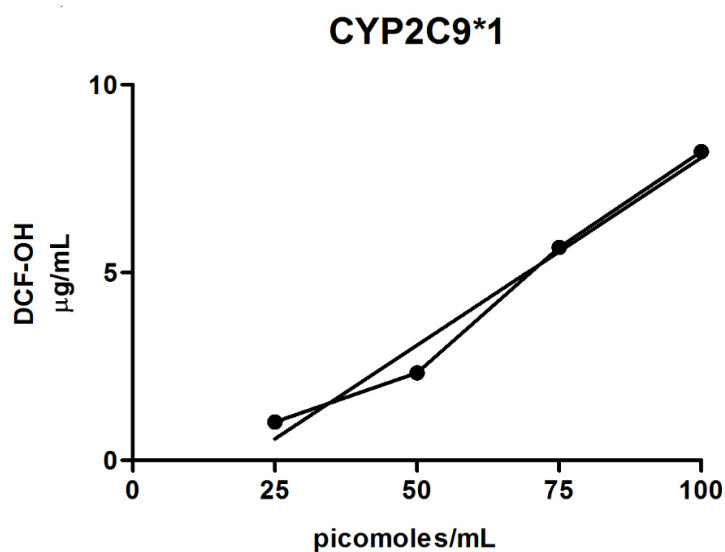
Flavonoides					
	C	Hesperidina	Quercetina	Rutina	Fluconazol
µg de 4'OH- DCF/mL M±DP	0,0130±0,0014	0,0107±0,0008 	0,0110±0,0002 	0,0103±0,0002 	0,0090±0,0005 

C (controle)= Amostra com substrato (DCF) + microsomo 1 mg/mL no meio reacional e na presença de flavonóides.

5.9 – Curva de proteína de rhCYP2C9*1

Testes preliminares foram realizados para verificar a concentração de supersomo (de 25 a 100 picomoles/mL) adequada para investigar a cinética da reação de hidroxilação do DCF com o rhCYP2C9*1 com um tempo de reação de 10 min. Pode-se observar na Figura 13 a formação do produto em relação à concentração de proteína.

Figura 13. Concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g}/\text{mL}$) produzidas na reação de DCFh com concentrações de proteínas de 25; 50; 75 ou 100 picomoles /mL de rhCYP2C9*1.



A Figura 13 demonstra que, no tempo de 10 min de reação, a concentração de proteínas de 75 picomoles apresentou uma melhor linearidade quando comparado as demais, sendo utilizada nas demais reações com supersomas.

Os valores das concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g}/\text{mL}$) correspondentes à Figura 11 estão apresentados no Quadro 6.

Quadro 6. Concentrações de 4'-OH-DCF ($\mu\text{g}/\text{mL}$) produzidas na reação de DCFh com 25; 50; 75 ou 100 picomoles/mL de rhCYP2C9*1 durante 10 min.

Picomoles/mL				
	25	50	75	100
μg de 4'-OH-DCF/mL	1,02 \pm 0,02	2,33 \pm 0,04	5,67 \pm 0,06	8,22 \pm 0,06
M\pmDP				

A concentração de 75 picomoles/mL mostrou-se adequada para a reação de hidroxilação do DCF e determinação dos parâmetros cinéticos da reação (V_{max} e K_m).

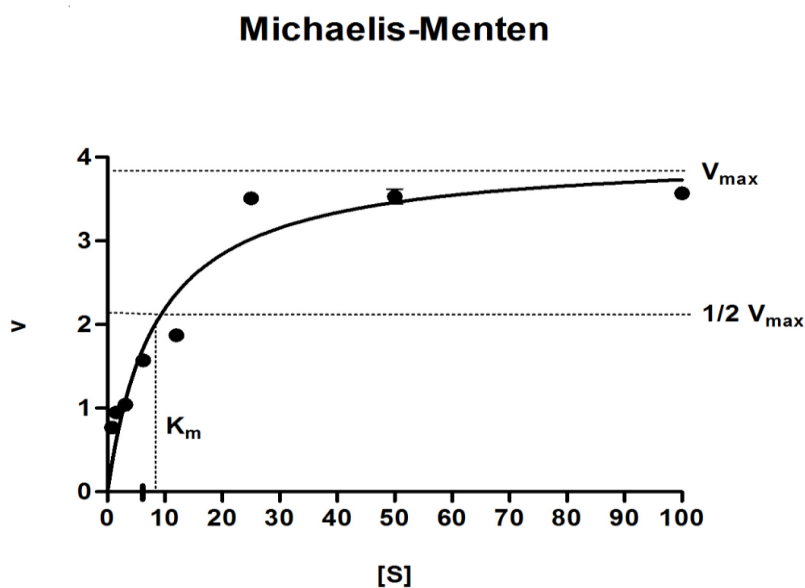
5. 10 – Cinética da Reação de Hidroxilação do Diclofenaco

5.10.1 – Modelo de Michaelis-Menten

A curva de Michaelis-Menten (MM), variando a concentração do substrato [S] de 0,781 a 100 μM , e as respectivas velocidades (v) da reação de hidroxilação do diclofenaco utilizando 75 picomoles/mL de rhCYP2C9*1 estão apresentadas na Figura 14, onde estão assinaladas a V_{max} , $1/2$ da V_{max} e K_m .

A curva MM foi traçada com o ajuste não linear do programa *GraphPad Prism 5* ($R^2=0,92$) e os valores de V_{max} e K_m (Média \pm E.P.M.) assim obtidos foram 4,05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ptn/min e $8,5 \pm 1,4$ μM , respectivamente.

Figura 14. Representação gráfica (traçado de Michaelis-Menten *versus* [S]) da cinética da reação de DCFh com 75 picomoles/mL de CYP2C9*1 humana recombinante e concentrações de substrato [S] de 0,781; 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μM , assinalando $V_{\text{máx}}$, $1/2 V_{\text{máx}}$ e K_m .

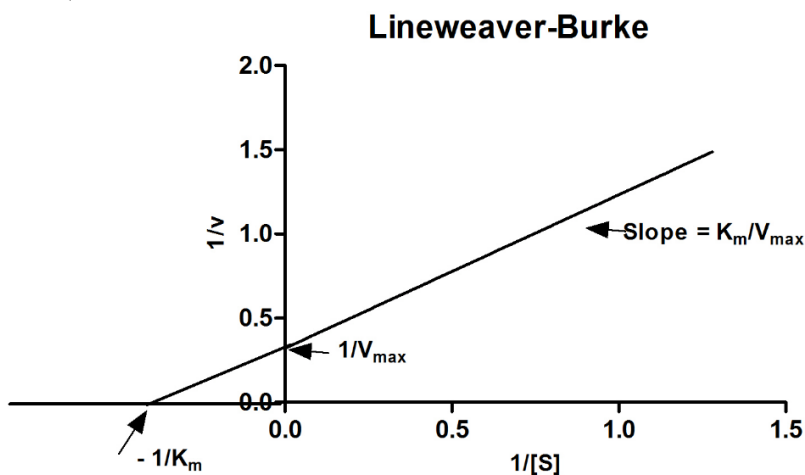


5.10.2 – Traçado de Lineweaver-Burke

O traçado de duplas recíprocas de Lineweaver-Burke ($1/v$ *versus* $1/[S]$) foi elaborado seguindo as instruções do programa *GraphPad Prism 5*.

Com a linearização por Lineweaver-Burke e ajuste pelo programa ($R^2 = 0,73$) foi possível calcular a $V_{\text{máx}}$ (3,1 μg 4'-OH-DCF/ mg ptn/ min) e K_m (2,59 μM). A Figura 15 mostra as interseções nos eixos que correspondem à $-1/K_m$ (eixo x) e $1/V_{\text{máx}}$ (eixo y), bem como a angulação da reta ($K_m/V_{\text{máx}}$).

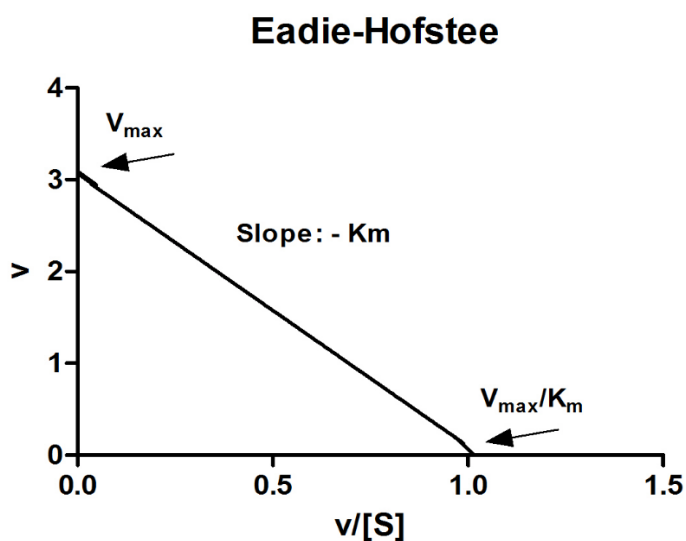
Figura 15. Traçado de duplas recíprocas de Lineweaver-Burke ($1/v$ versus $1/[S]$), assinalando $-1/K_m$, $1/V_{\text{máx}}$ e $(K_m/V_{\text{máx}})$ (angulação da reta).



5.10.3 – Traçado de Eadie-Hofstee

Em seguida, ainda utilizando o programa *GraphPad Prism 5*, procurou-se confirmar os valores de $V_{\text{máx}}$ e da constante de MM com base na regressão linear de Eadie-Hofstee (v versus $v/[S]$, $R^2 = 0,6013$). A Figura 16 representa esse traçado, assinalando os pontos de $V_{\text{máx}}$, $V_{\text{máx}}/K_m$, bem como a angulação da reta ($-K_m$). Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m foram $3,06 \mu\text{g } 4\text{'OH-DCF/ mg ptn/ min}$ e $2,96 \mu\text{M}$, respectivamente.

Figura 16. Traçado de Eadie-Hofstee (v versus $v/[S]$), assinalando as interseções $V_{\text{máx}}$, $V_{\text{máx}}/K_m$, bem como a angulação da reta ($-K_m$).

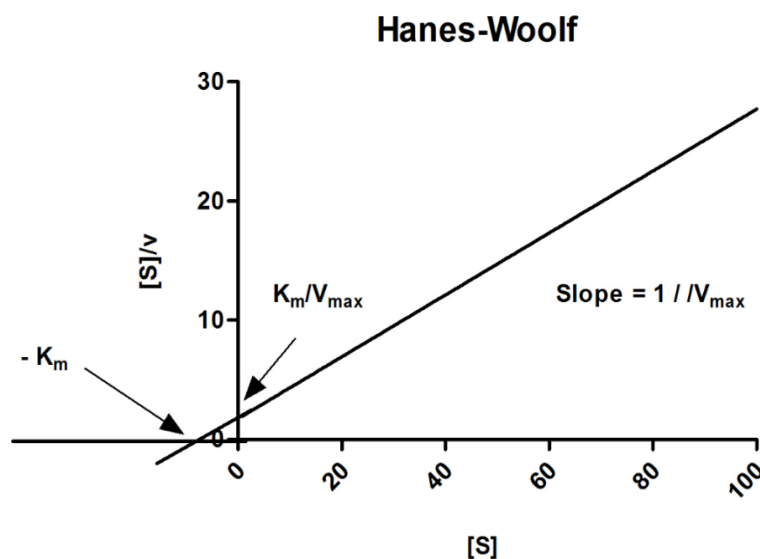


O traçado de Eadie-Hosftee confirmou os valores encontrados para $V_{\text{máx}}$ e K_m quando comparados ao traçado de Lineweaver-Burke, porém diferem dos valores encontrados por Michaelis-Menten, pelo programa *GraphPad Prism 5*.

5.10.4 – Traçado de Hanes-Woolf

No sentido de confirmar, mais uma vez, os parâmetros cinéticos da reação de hidroxilação do DCF com o CYP2C9*1 e ainda utilizando o programa *GraphPad Prism 5*, foi traçado o gráfico $[S]/v$ versus $[S]$ com base na regressão linear de Hanes-Woolf ($R^2 = 0,99$) (Figura 17). Na figura, estão assinalados os pontos de interseção $-K_m$, $K_m/V_{\text{máx}}$, bem como a angulação da reta ($1/V_{\text{máx}}$). Os valores encontrados foram $6,68 \mu\text{M}$ e $3,85 \mu\text{g } 4\text{'-OH-DCF /mg ptn/min}$ para K_m e $V_{\text{máx}}$, respectivamente.

Figura 17. Traçado de Hanes-Woolf ($[S]/v$ versus $[S]$), assinalando as interseções $-K_m$, $K_m/V_{\text{máx}}$, bem como a angulação da reta ($1/V_{\text{máx}}$).



O traçado de Hanes-Woolf confirmou o valor encontrado de $V_{\text{máx}}$ por Michaelis-Menten, porém não confirmou o K_m pelo programa *GraphPad Prism 5*.

5.11 - Método analítico

5.11.1 - Condições de análise do DCF e do 4'-OH-DCF

Os parâmetros analíticos para quantificação do 4'-OH-DCF por CLUE-DAD-UV foram determinados a partir de solução do padrão em água (50 µg/mL) e ensaios variando condições de fase móvel e fase estacionária, de acordo com a Quadro 10, mantendo estável a temperatura do forno (50°C) e volume de injeção que variou de 5 – 20 µL.

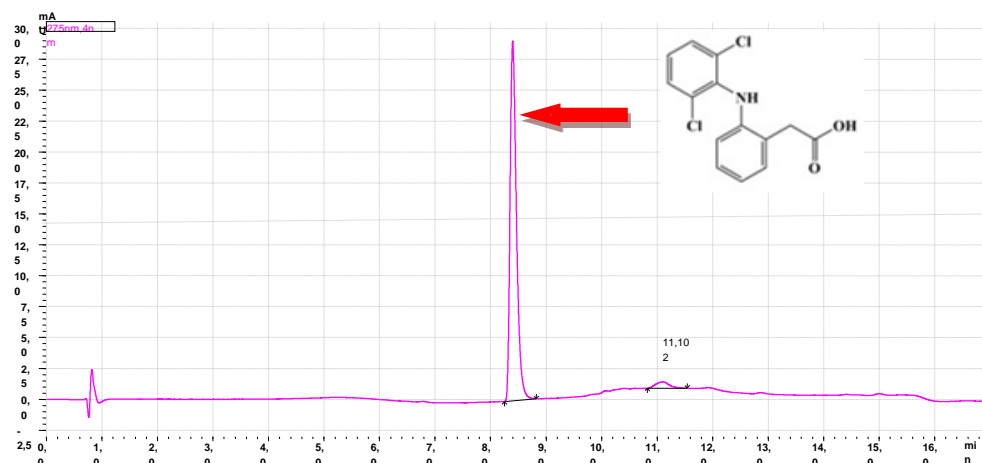
Quadro 7. Condições testadas para análise do 4'-OH-DCF		
Condição	Fase Móvel (v/v)	Fase Estacionária
1	Acetonitrila (50%) / Água ultrapura acidificada (50%)	Coluna ACE C18 (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm)
2	Acetonitrila (70%) / Água ultrapura acidificada (30%)	Coluna ACE C18 (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm)
3	Acetonitrila (75%) / Água ultrapura acidificada (25%)	Coluna ACE C18 (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm)
4	Acetonitrila (78%) / Água ultrapura acidificada (22%)	Coluna ACE C18 (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm)
5	Acetonitrila (70%) / Água ultrapura acidificada (25%) / MeOH (5%) gradiente	Coluna ACE C18 (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 µm)
6	kit Bioscience (Fase A 30% ACN, 70% Água ultrapura acidificada – Fase B 100% Metanol) gradiente	Coluna ACE C18 (250 mm x 4,6 i.d. mm x 5 µm)
7	Sistema em gradiente, vide Quadro 11	Coluna Supelco Ascentis Express C18 (75 mm x 2,1 mm i.d. x 2,7 µm)

O sistema de eluição com o melhor resultado em termos de fator de capacidade ou retenção (k'), simetria do sinal (~ 1), tempo de retenção (4'-OH-DCF 4,89 – 4,95 min; DCF 8,32 – 8,40 min), melhor resolução ($R = 6$) e tempo total de análise para separação do diclofenaco de sódio (DCF) e 4'-OH-DCF foi alcançado com sistema de eluição por

gradiente, de acordo com a quadro 8, onde as condições cromatográficas para a análise foram obtidas por **CLUE-DAD-UV**, utilizando-se uma coluna Supelco Ascentis Express C18 (75 mm x 2,1 mm i.d. x 2,7 μ m); condição 7 (quadro 7), gradiente de eluição usando água ultrapura (Milli-Q-MiliREP) acidificada com ácido acético glacial (pH = 3.0), na fase móvel A e acetonitrila (ACN) na fase móvel B, com um fluxo de 0.25 μ g/mL, temperatura do forno 50°C e volume de injeção de 1 μ L para um tempo de análise total de 17 min (Figura 18).

Quadro 8. Sistema de gradiente usado para análise do 4 ^o -OH-DCF por CLUE-DAD-UV.		
Tempo (minutos)	Fase A (Água ultrapura) %	Fase B (ACN) %
0,0 – 0,10	70	30
0,10 – 4,00	50	50
4,00 – 6,00	30	70
6,00 – 12,00	30	70
12,01 – 17,00	70	30

Figura 18. Cromatograma de análise do DCF (100 µg/mL, solução aquosa) obtido por CLUE-DAD-UV e com visualização em 275nm.



O comprimento de onda (λ) máximo obtido por CLUE-DAD-UV no espectro de absorção ultravioleta do DCF foi de 275 nm (Figura 19) e para 4'-OH-DCF foi de 264 nm (Figura 20), com os tempos de retenção de 8,32 – 8,40 min e 4,89 – 4,95 min, respectivamente, demonstrando a completa separação das substâncias, ou seja, a seletividade do método (Figura 21).

Figura 19: Espectro de absorção no ultravioleta do DCF obtido por CLUE-DAD-UV.

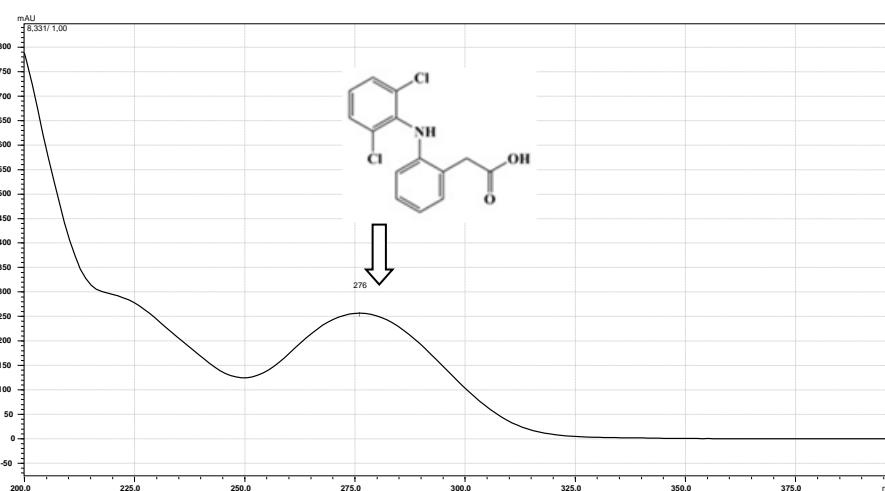


Figura 20: Espectro de absorção no ultravioleta do 4' OH-DCF obtido por CLUE-DAD-UV.

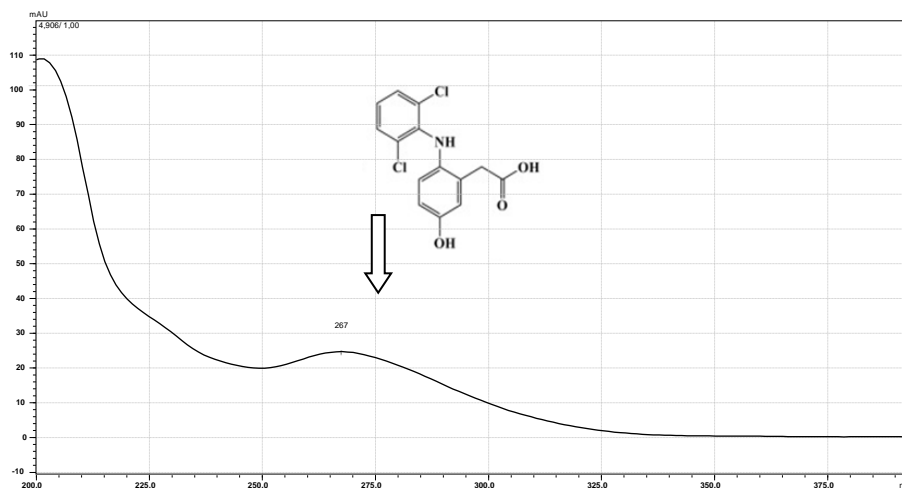
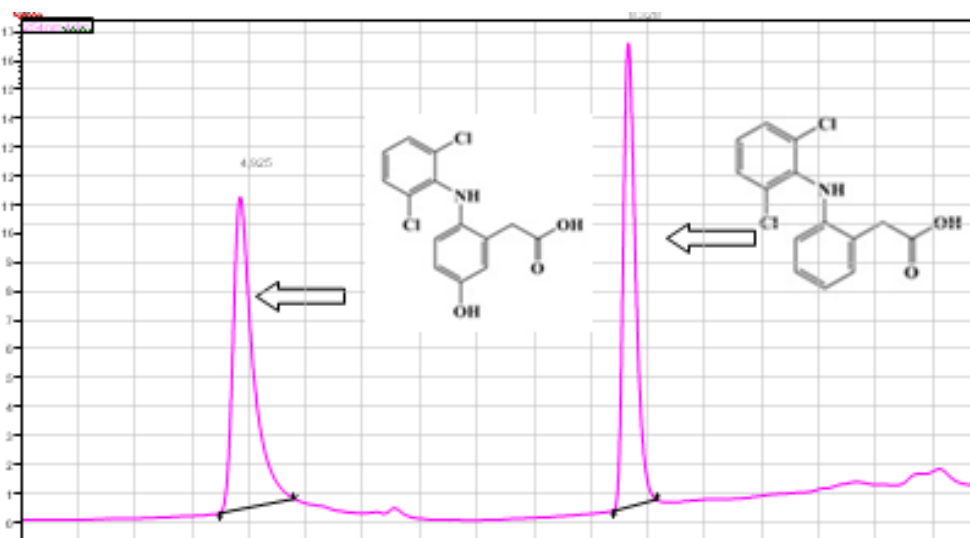


Figura 21: Cromatograma de análise do 4'-OH-DCF (25 µg/mL, em solução aquosa) e DCF (12,5 µg/mL, em solução aquosa) obtido por CLUE-DAD-UV .

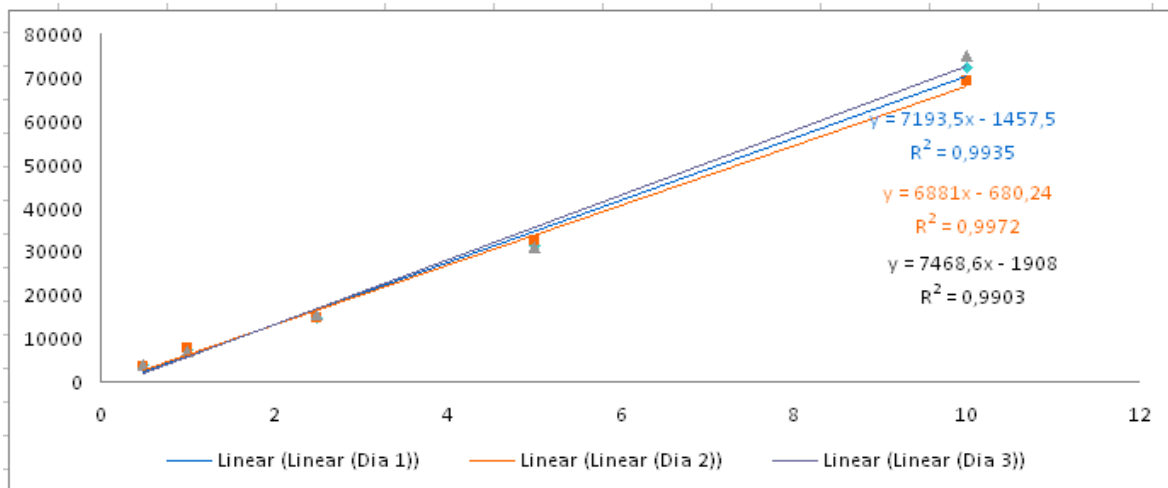


5.12 - Linearidade

As curvas analíticas obtidas para o 4'-OH-DCF foram feitas no intervalo de concentração de 3,125 a 50 µg/mL. Os resultados obtidos das três curvas analíticas estão ilustrados na figura 22. As curvas de analíticas apresentaram correlação linear positiva, com $r^2_{\text{Dia 1}} = 0,9935$, $r^2_{\text{Dia 2}} = 0,9972$, $r^2_{\text{Dia 3}} = 0,9903$. A fórmula abaixo foi obtida por regressão linear e utilizada para a quantificação do 4'-OH-DCF, tendo sido calculada pela média e desvio padrão dos coeficientes lineares e angulares das três equações, obtidas nos três diferentes dias:

$$[] 4'\text{-OH-DCF } \mu\text{g/mL} = (\text{ABS} + 1349 \pm 621) / 7181 \pm 294$$

Figura 22: Curvas analíticas obtidas para quantificação do 4'-OH-DCF no intervalo de concentração de 3,125 a 50 $\mu\text{g/mL}$, em 3 dias diferentes.



5.13 - Limite de Detecção

O Limite de detecção (LD) encontrado para o 4'-OH-DCF foi de 100 ng/mL, obtido por meio da técnica de diluição sucessiva (figura 23 A, B) e razão sinal/ ruído de linha base igual a 3.

Figura 23A: Cromatograma obtido para o 4'-OH-DCF no limite de detecção.

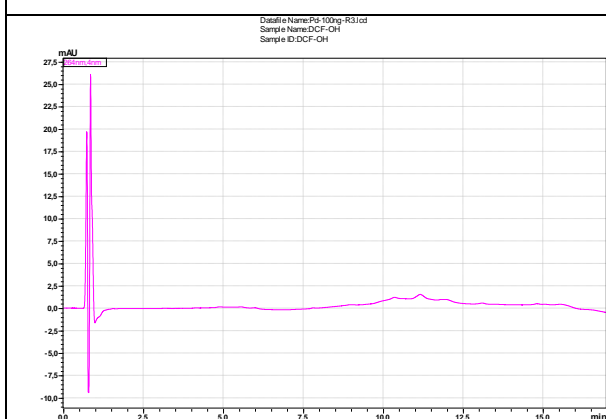
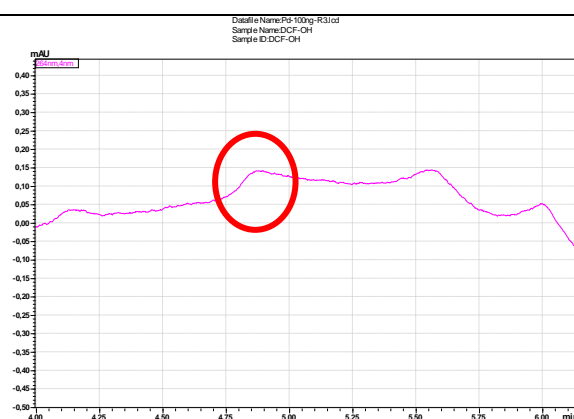
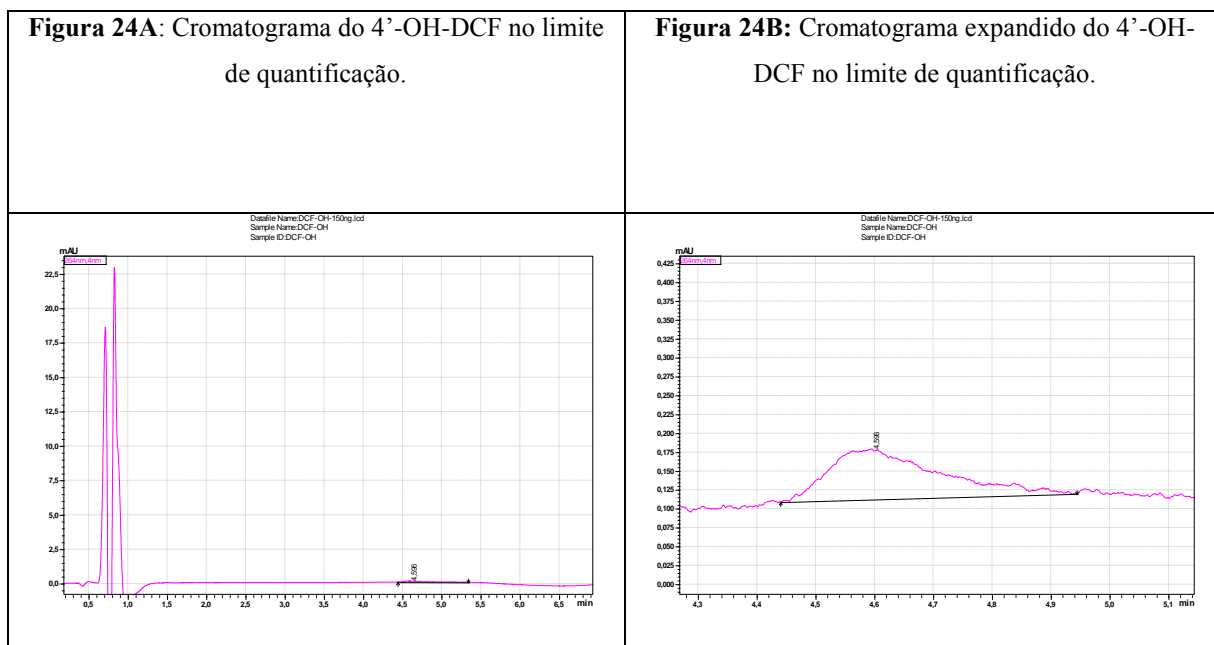


Figura 23B: Cromatograma expandido obtido para o 4'-OH-DCF no limite de detecção, com destaque para o sinal do analito.



5.14 - Limite de Quantificação

O Limite de Quantificação (LQ) encontrado para o 4'-OH-DCF foi de 150 ng/mL, obtido por meio da técnica de diluição sucessiva (figura 24 A, B) e razão sinal/ruído de linha base igual a 10.



6 – Discussão

As enzimas do citocromo P450 (CYP) são responsáveis pelo metabolismo de fármacos, substâncias químicas e substratos endógenos, amplamente distribuídos nos diferentes tecidos do corpo humano como fígado, intestino, pulmão e rins (Krishna & Klotz, 1994). Estudos de inibição *in vitro* das enzimas CYPs, especialmente os relevantes para previsões farmacocinéticas e para a escolha dos substratos para a otimização são complexos, devido à diversidade das interações substrato-inibidor de algumas dessas enzimas (Kenworthy *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2006; Foti & Wahlstrom, 2008).

As reações de *N*-desmetilação da eritromicina e de hidroxilação do *p*-nitrofenol foram utilizadas para avaliar a resposta do tratamento com RIF. Por exemplo, estudos conduzidos por Mahnke e colaboradores (1996) em ratos machos e fêmeas com dexametasona, pregnenolona-16 α -carbonitrila ou fenobarbital (uma injeção de 100 mg/kg i.p./3 dias) demonstraram *in vivo* que as proteínas CYP3A foram fortemente induzidas em microsomas hepáticos com dexametasona.

Os achados de Oesch e colaboradores (1996) demonstraram que as propriedades indutoras da RIF na subfamília CYP3A ocorrem no rato após altas doses de RIF. Doses abaixo de 200 mg/kg/dia não se mostraram eficazes em estudos anteriores. Doses acima de 250 mg/kg/dia indicam que existe uma dose limite para indução do CYP. A RIF comportou-se como um forte indutor da CYP3A no fígado de ratos, demonstrando uma indução desta subfamília de 1,8-2,5 vezes.

Kim e colaboradores (2007) trataram ratos com acetaminofeno (i.p.500 mg/kg). Após 18h o tratamento foi observado um aumento na expressão da CYP2E1 de 65% e um aumento significativo do CYP3A.

Zerilli e colaboradores (1997) realizaram um estudo em que ratos Wistar foram tratados com duas famílias de indutores: o pirazol conhecido por induzir o CYP2E1 e dexametasona que induz o CYP3A. O estudo mostra que o tratamento com pirazol (80mg/kg/dia, i.p./ 4 dias) aumentou a atividade de PNPh em cerca de 2,5 vezes comparado ao controle.

Nessa dissertação, ratas Wistar foram tratadas com RIF 300 mg/kg/dia por 9 dias (v.o.) onde foi demonstrado que a atividade do PNPh foi aumentada em 1,33 vezes. Tal

resultado está bem relacionado com o da literatura e pode ser justificado pelo achado de Moreal e colaboradores (1999), que tratou ratos e ratas Sprague – Dawley com seis diferentes indutores do CYP2E1 e constatou que os efeitos dos indutores de CYP2E1 em função do sexo mostram que os machos exibem aumentos mais significativos nas atividades do PNP_h do que as fêmeas.

No presente estudo, a atividade da *N*-desmetilação da eritromicina (ERM_d) foi avaliada para investigar se o tratamento com a rifampicina induziu a CYP3A nas ratas Wistar. Os resultados mostraram que as atividades foram de 1,29 e 1,87 nanomoles de formaldeído/mg de proteína/min nas ratas controles e tratadas, respectivamente. A atividade na rata tratada foi 1,45 vezes maior que na rata controle. Esses resultados demonstram que a indução da subfamília CYP3A realizada nesta dissertação está de acordo com os dados da literatura.

Em outro estudo, Oesch e colaboradores (1996) verificaram que após 5 dias de tratamento com RIF foram observados hipotermia, dispneia, redução de atividade espontânea, perda de peso corporal, redução do consumo de alimentos e tremor. Após 10 dias, dois animais do grupo de dosagem média (300 mg/kg/dia) e três animais do grupo de dosagem alta (450 mg de RIF/kg/dia) haviam morrido. Os animais tratados desta dissertação, seguindo o modelo 300 mg/kg/dia, apresentaram perda de peso, coloração alaranjada nas fezes e urina e perda de pelos, como descrito na literatura, porém, nenhum animal veio a óbito. Esse resultado pode ser atribuído pelo intervalo de dois dias entre a quinta e sexta administração da RIF e por não ter extrapolado de doses acima de 300 mg/kg/dia.

Kimura e colaboradores (2010) realizaram um trabalho utilizando rhCYP3A4 e rhCYP2C9 (BD Guentest[®]) (10 picomoles/mL) em cada teste para avaliar a hidroxilação dos substratos testosterona e diclofenaco, respectivamente, em um sistema de regeneração de NADPH em 1h de incubação. Os valores de k_m obtidos pela equação de Michaelis-Menten foi de 17,4 μ M para a 6 β -hidroxilação da testosterona por rhCYP3A4 e 2,4 μ M para a 4'-OH-DCF por rhCYP2C9.

Zi e colaboradores (2010) realizaram estudos de cinética com DCF variando a concentração de 0,25 – 160 μ M em sistema regenerador de NADPH, pré incubados por 5 min e adicionadas as enzimas CYP2C9*1 (0,5 mg/mL) e CYP2C9*3 (1,0 mg/mL) com tempos de incubação de 5, 10 e 15 min para CYP2C9*1, CYP2C9*3 e CYP2C9*13,

respectivamente. Os valores de k_m obtidos foram 5,5 mM, 13,1 mM e 24,1 mM para CYP2C9*1, CYP2C9*3 e CYP2C9*13, respectivamente. Esses valores de k_m foram 2,4 e 4,4 vezes maiores para CYP2C9*3 e CYP2C9*13, respectivamente, do que a do tipo selvagem. No entanto, estudos anteriores como de Yamazaki e colaboradores (1998), obtiveram o valor de k_m 1,8 μM e o de Ierir e colaboradores (2000), registraram o valor de k_m 2,03 μM , para o tipo selvagem (CYP2C9*1). Portanto, há registro de diferenças nos valores de k_m da CYP2C9*1 na literatura.

No presente estudo para a determinação da cinética, as concentrações do substrato (DCF) foram variadas de 0,781 – 100 μM , com sistema similar de regeneração de NADPH, uma pré incubação de 3 min e adicionado 75 picomoles/mL (~0,08 mg/mL) da rhCYP2C9*1 (BD Bioscience[®]), para um tempo de incubação de 10 min. Os valores de k_m ($8,5 \pm 1,4$ μM) e $V_{\text{máx}}$ (4,05 $\mu\text{g}/\text{mg ptn}/\text{min}$) foram determinados pela equação de Michaelis-Menten. Com a linearização de Lineweaver-Burke foi possível calcular a $V_{\text{máx}}=3,1$ $\mu\text{g}/\text{mg ptn}/\text{min}$ e $k_m=2,59$ μM , confirmado pela equação de Eadie-Hofstee ($k_m=2,96$ μM e $V_{\text{máx}}=3,06$ $\mu\text{g}/\text{mg ptn}/\text{min}$). A equação de Hanes-Woolf, não confirmou os valores encontrados por Eadie-Hofstee ($k_m=6,68$ μM e $V_{\text{máx}}=3,85$ $\mu\text{g}/\text{mg ptn}/\text{min}$). O programa *GraphPad Prism 5* recomenda a não utilização por duplo recíproco (Lineweaver-Burke) para demonstrar resultados mais precisos, pois distorcem os valores do experimental. Recomenda-se, assim, um método de regressão não linear. Portanto, o método do presente estudo se mostrou excelente e reprodutivo, quando comparado à literatura.

Martignoni e colaboradores (2006) descrevem que em ratos, a família CYP2C possui várias isoformas (CYP2C6, CYP2C7, CYP 2C11, CYP2C12, CYP2C13, CYP2C22 e CYP2C23), sendo que as diferenças na expressão destes CYPs se mostram relacionados ao sexo e são regulados pelo desenvolvimento de forma que se manifestam em animais adultos. O CYP2C12 é altamente expresso nos fígados de ratos adultos fêmeas, já o CYP2C11 é a isoforma predominante em ratos machos, compreendendo até 50% do teor total de CYP. Em humanos CYP2C8, CYP2C9 e CYP2C19 humanos são isoformas indutíveis por compostos conhecidos por ativar o receptor pregnano X (PXR), como rifampicina e dexametasona, ou o receptor androstano constitutivo (CAR), como o fenobarbital. Portanto, o CYP2C12 pode ter sido a isoforma que foi induzida durante o tratamento com RIF.

Breinholt e colaboradores (2002) utilizaram preparações microssomais extraídas de um *pool* de 4 fígados de camundongos fêmeas C57BL/6N induzidos com Aroclor-1254 (i.p.

500 mg/kg) durante 5 dias. Os autores estudaram o metabolismo dos flavonoides hesperetina (flavanona), tamarixetina (flavonol), kaempferol (flavonol), naringenina (flavanona) e apigenina (flavona), onde a concentração de proteína induzida utilizada durante a incubação foi de 1 mg/ml (tanto para a fração microsomal quanto para a CYP recombinante), tal qual usado nesta dissertação. Os autores demonstraram que a CYP1A2 recombinante foi capaz de metabolizar todos os flavonoides testados. Nesse mesmo estudo foi demonstrado a desmetilação da tamarixetina (flavonol, metoxilado na posição 4') pela CYP2C9, enquanto a CYP2D6 não interferiu no metabolismo dos flavonoides analisados. Portanto, em humanos, é possível, segundo os autores, que os flavonoides hesperetina, tamarixetina, kaempferol, naringenina e apigenina, presentes na dieta humana, sejam metabolizados principalmente pela CYP1A2.

Umathe e colaboradores (2008) se propuseram a avaliar o efeito da quercetina sobre o CYP3A, testando a hipótese de que a farmacocinética da pioglitazona poderia ser alterada na presença deste flavonoide, que é metabolizada via CYP3A4 em humanos. As investigações revelaram que a quercetina inibiu de forma dependente a atividade da enzima CYP3A.

Kimura e colaboradores (2010) utilizaram 60 polifenóis para avaliar atividades inibitorias na 6 β -hidroxilação da testosterona pela rhCYP3A4 e a 4'OH-DCF pela rhCYP2C9. A concentração testada para as substâncias fenólicas foi de 100 μ M e obtiveram forte atividade inibitória (>80%) para cumarinas, flavonas e flavonóis em ambas as enzimas. Todas as flavanonas, chalconas e isoflavonas demonstraram fraca atividade inibitória (<50%). Flavonoides glicosilados demonstraram fraca inibição para ambas as enzimas (<55%). Entre as antocianidinas e monoterpenos testados apresentaram uma pequena atividade da enzima rhCYP2C9.

Nesta dissertação testou-se os flavonoides rutina, hesperidina e quercetina e os ácidos fenólicos; ácidos cafeico, ferúlico, vanílico e *p*-cumárico, todos na concentração de 100 μ M para avaliar a atividade inibitória da CYP2C11/12 de microsomos de ratos Wistar, na reação de hidroxilação do DCF em 4'OH-DCF. Todos os flavonoides inibiram a conversão, porém a rutina se apresentou como o flavonoide mais ativo (21%). Os derivados do ácido cinâmico não inibiram a CYP2C11/12, exceto o ácido ferúlico, que demonstrou uma discreta inibição. A rutina é um flavonol glicosilado, portanto, o resultado alcançado está de acordo com o trabalho de Kimura e colaboradores (2010).

Zi e colaboradores (2010) utilizaram para estudo da cinética do DCF uma coluna Argilent Technologies C18 (250 mm x 4,6 mm i.d. x 5 μ m), com fase móvel de água ultrapura acidificada com ácido perclórico com 20% de ACN e metanol (70:30 v/v), fluxo de 0,8 mL/min e temperatura do forno em 40°C; espectro de absorção ultravioleta detectado em 280 nm do DCF, tempos de retenção de 14,5 e 18,5 min para o 4'OH0-DCF e DCF, respectivamente.

Outro estudo conduzido por Kimura e colaboradores (2010) utilizou coluna YMC-Pack ODS a-302 (150 mm x 4,6 mm i.d.), fluxo de 1,0 mL/min, temperatura do forno em 40°C e um sistema de gradiente de eluição usando na fase móvel (A) água, acetonitrila e ácido fórmico (69:30:1) e na fase móvel (B) metanol; com espectro de absorção ultravioleta detectado em 280 nm, para o DCF e um tempo total de análise de 20min.

Os melhores resultados para o método analítico desenvolvido neste estudo, foram alcançados com coluna Supelco Ascentis Express C18 (75 mm x 2,1 mm i.d. x 2,7 μ m), gradiente de eluição usando água ultrapura (Milli-Q-MiliREP) acidificada com ácido acético glacial (pH = 3.0), na fase móvel (A) e acetonitrila (ACN) na fase móvel (B), com um fluxo de 0,25 mL/min, temperatura do forno em 50°C e volume de injeção de 1,0 μ L para um tempo de análise total de 17 min. O método desenvolvido demonstrou excelente seletividade, simetria de sinal, resolução para separação do DCF e do 4'OH-DCF, linearidade, menor tempo de análise, a não necessidade do uso de metanol na fase móvel e, principalmente, menor consumo de fase móvel (cerca de 4 mL/corrída). Dessa forma, o método desenvolvido possui claras vantagens em relação aos métodos de análise do produto de hidroxilação do DCF publicados na literatura.

7- Conclusões

A utilização de rifampicina possibilitou a indução do CYP2C em ratas Wistar, conforme experimentos publicados anteriormente.

O modelo experimental bioquímico desenvolvido se mostrou eficiente para estudos de cinética enzimática com rhCYP2C9*1 e microsossomos. Foi possível estabelecer o método experimental com condições específicas para a concentração dos reagentes e substratos, temperatura e tempo de incubação. Assim, o protocolo desenvolvido apresenta-se como um novo método de experimentação *in vitro* para futuros estudos com CYPs e rhCYPs no LTA.

O método analítico desenvolvido e validado se mostrou eficaz para análises futuras com superssomos ou frações microsossomais hepáticas, já que possibilitou estudar um modelo de inibição enzimática na subfamília CYP2C.

Dentre os fenólicos testados, apenas a rutina apresentou inibição da CYP2C que pode ser considerado relevante. Este flavonoide pode ser encontrado em frutas, vegetais, medicamentos para tratamento de varizes e dores nas pernas. A co-injeção da rutina com outros fármacos metabolizados pelo CYP2C é um achado farmacocinético importante e que deve ser investigado melhor.

São necessários mais estudos com esse modelo de experimento para se determinar possíveis interações farmacocinéticas entre substâncias da dieta humana e fármacos que possam levar à ineficácia farmacológica ou surgimento de eventos indesejáveis.

REFERÊNCIAS

- Ahn, T.; Yun, C. - High-Level Expression of human Cytochrome P450 3A4 by Co-expression With Human Molecular Chaperone HDJ-1 (Hsp40). *Arch Pharm Res*, 2004 vol 27, n. 3, p. 319 – 323.
- Allis, J. W.; Robinson, B. L. - A Kinetic Assay for *p*-Nitrophenol Hydroxylase in Rat Liver Microsomes. *Anal Biochem*. 1994; 219: 49-52.
- Almeida, A. A.; Farah, A.; Silva, D. A.; Nunan, E. A.; Glória, M. B. - Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds Against Enterobacteria. *J. Agric. Food Chem*. 2006; 54, p. 8738–8743.
- Antônio, A. G.; Moraes, R. S.; Perrone, D.; Maia, L. C.; Santos, K. R. N.; Iório, N. L. P.; Farah, A. - Species, Roasting Degree and Decaffeination Influence the Antibacterial Activity of Coffee Against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem*. 2009 ;118 : p. 182-188.
- Atkins, W. M. - Current Views on the Fundamental Mechanisms of Cytochrome p450 allostereism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. Ago, 2006; 2(4): p.573-579.
- Avizou, E. I.; Voutsas, E. C. - Solubilities of *p*-Coumaric and Caffeic Acid in Ionic Liquids and Organic Solvents. *J. Chem. Thermodynamics*. 2013; 62: p. 69–78.
- Ayaz, F. A.; Hayirlioglu, S. A.; Gruz, O. N.; Strnads, M. - Separation, Characterization, and Quantitation of Phenolic Acids in a Little-Known Blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Fruit by HPLC-MS. *J. Agric. Food Chem*. Set, 2005; 53, p.8116-8122.
- Bassoli, B. K.; Cassolla, P.; Borba-Murad, G. R.; Constantin, J.; Salgueiro-Pagadigorria, C. L.; Bazotte, R. B.; Silva, R. S. S. F.; Souza, H. M. - Chlorogenic Acid Reduces the Plasma Glucose Peak in the Oral Glucose Tolerance Test: Effects on Hepatic Glucose Release and Glycaemia. *Cell Biochem Funct*. 2008; 26, p. 320–328.
- BD Biosciences - Cytochrome P450 Enzyme Mapping in Drug Discovery Using BD Supersomes Enzymes. Application Note #467; Dez, 2009.
- Berg-Candolfi, M.; Candolfi, E. - Depression of the *N*-demethylation of Erythromycin, Azithromycin, Clarithromycin and Clindamycin in Murine *Toxoplasma* Infection. *Int J Parasitol*. Nov, 1996; 26(11):1321-1323.
- Bradford, M. M. - A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal Biochem*. Mai, 1996; 72:248-54.
- Breinholt, V. M.; Offord, E. A.; Brouwer, C.; Nielsen, S. E.; Brøsen, K.; Friedberg, T. - *In vitro* Investigation of Cytochrome P450-Mediated Metabolism of Dietary Flavonoids. *Food and Chemical Toxicology* 40 (2002) p. 609–616.
- Cederbaum, A. I. - Methodology to Assay CYP2E1 Mixed Function Oxidase Catalytic Activity and Its Induction. *Redox Biology* 2 (2014) p.1048–1054.

Chavez, M. L.; Jordan, M. A.; Chavez, P. I. - Evidence-Based Drug–Herbal Interactions. *Life Sciences*. 2006; 78, p. 2146-2157.

Chen, L. G.; Wang, Z.; Zhu, Y.; Jian-Hua Xiong, J. H.; Sun, L. R.; Daí, D. P.; Jian-Ping Cai, J. P.; Hu, G. X. - *In vitro* Metabolism of Phenytoin in 36 CYP2C9 Variants found in the Chinese Population. *Chemico-Biological Interactions*. Mai, 2016; 253: p. 93- 99.

Chiang, Y. M.; Lo, C. P.; Chen, Y. P.; Wang, S. Y.; yang, N. S.; Kuo, Y. H.; Shyur, S. F. - Ethyl Caffeate Suppresses NF- κ B Activation and Its Downstream Inflammatory Mediators, iNOS, COX-2, and PGE2 *in vitro* or in Mouse Skin. *Br. J. Pharmacol.*, 2005; 146, p. 352–363.

Choi, E. H.; Lee, D. Y.; Kim, S.; Chung, J. O.; Choi, J. K.; Joo, K. M.; Jeong, H. W.; Kim, J. K.; Kim, W. G.; Shim, S. M. - Influence of flavonol-rich excipient food (onion peel and *Dendropanax morbifera*) on the bioavailability of green tea epicatechins *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct.*, 2017, 8, p. 3664–3674.

Ciolino, H. P.; Yeh, G. C. - The Flavonoid Galangin is an Inhibitor of CYP1A1 Activity and an Agonist/Antagonist of The Aryl Hydrocarbon Receptor. *Br J. Cancer*. 1999; 79:p. 1340-1346.

Czerniak R. Gender-Based Differences in Pharmacokinetics in Laboratory Animal Models. *Int J Toxicol*. 2001 May-Jun; 20(3): p.161-163.

De Saro, M. M.; Cassin, O. A.; Cuéllar, H. U.; Huerta, L. G.; Covarrubias, S. C. - Pharmacokinetics of Diclofenac in Healthy Controls With Wild-Type Phenotype for CYP2C9 Shows Metabolism Variability. 2017; *Rev Med Hosp Gen Méx*.

De-Oliveira, A. C. A. X.; Ribeiro-Pinto, L. F.; Paumgartten, F. J. R. - *In vitro* Inhibition of CYP2B1 Monooxygenase by Myrcene and Other Monoterpenoid Compounds. *Toxicol Lett*. 1997; 92:39-46.

Dorado, P.; Berecz, R.; Cáceres, M. C.; Conzález, I.; Llerena, A. - Reproducibility Over Time of the Urinary Diclofenac/4'-OH Diclofenac Ratio Among Different CYP2C9 Genotypes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. Jul- Set, 2003; 28(3): p. 213-5.

Duarte, G. S. ; Farah, A. - Effect of Simultaneous Consumption of Milk and Coffee on Chlorogenic Acids Bioavailability in Humans. *J. Agric. Food Chem*. 2011 ; 59 (14), p. 7925-7931.

Efosa, N. J.; Kleiner, W.; Kloas, W.; Hoffmann, F. - Diclofenac Can Exhibit Estrogenic Modes of Action in Male *Xenopus laevis*, and Affects the Hypothalamus-pituitary-gonad Axis and Mating Vocalizations. *Chemosphere*. Abr, 2017; 173: p. 69-77.

Espejo-Mojica, Á. J.; Alméjiga-Díaz, C. J.; Rodríguez, A.; Mosquera, Á.; Díaz, D.; Beltrán, L.; Díaz, S.; Pimentel, N.; Moreno, J.; Sánchez, J.; Sánchez, O. F.; Córdoba, H.; Poutou-Piñales, R. A.; Barrera, L. A. - Human Recombinant Lysosomal Enzymes Produced in Microorganisms. *Mol Genet Metab*. Set-Out, 2015; 116(1-2):p.13-23.

Farah, A. - Functional and speciality beverage technology. Institute of Nutraceuticals and Functional Foods. , 2009; 1º ed. 15: p.370-390.

Farah, A.; Donangelo, C. M. - Phenolic Compounds in Coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology. , 2006; 18(1), p. 23-26.

Farah, A.; Monteiro, M.; Donangelo, C. M.; Lafay, S. - Chlorogenic Acids From Green Coffee Extract are Righly Bioavailable in Humans. The J. of Nutr. 2008; 138:(12), p. 2309-2305.

Farah, A.; Paulis, T.; Trugo, L. C.; Martin, P. R. - Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. J. Agric. Food Chem. Out, 2005 53, 1505–1513.

Farah, A.; Trugo, L. C. Em: Proc. 21st International Conference in Coffee Science (Montpellier, France). ASIC (Paris), 2007.

Foti, R. S.; Wahlstrom, J. L. - CYP2C19 Inhibition: The Impact of Substrate Probe Selection on *in vitro* Inhibition Profiles. Drug Metab Dispos. 36(3):523-8. Mar, 2008.

Genser, D. - Food and drug interaction: Consequences for the Nutrition/Health Status. Ann. Nutr. Metab. 2008; 52 (supp 1), p. 29-32.

Gordon, M. M. H.; Wishart, K. J. - Effects of Chlorogenic Acid and Bovine Serum Albumin on the Oxidative Stability of Low Density Lipoproteins *in vitro*. Agric. Food Chem.2010; 58, p. 5828–5833.

Guengerich, F. P. - Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. Chem Res Toxicol. Jun, 2001; 14(6): p.611-650.

Haduch, A.; Wójcikowski, J.; Danie, A. W. - Effect of Neuroleptics on Cytochrome P450 2C11(CYP2C11) in Rat liver. Pharmacological Reports. 2011; 63 p. 1491 – 1499.

Higashi, M. K.; Veenstra, D. L.; Kondo, L. M.; Wittkowsky, A. K.; Srinouanprachanh, S. L.; Farin, F. M.; Rettie, A. E. - Association Between CYP2C9 Genetic Variants and Anticoagulation-Related Outcomes During Warfarin Therapy. JAMA; 2002; 287:p. 1690–1698.

Higdon, J. V.; Frei, B. - Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2006; 46(2), p. 101-123.

Hwang, Y. P.; Yun, H. J.; Chun, H. K.; Chung, Y. C.; Kim, H. K.; Jeong, M. H.; Yoon, T. R.; Jeong, H. G. - Protective Mechanisms of 3-caffeoyl, 4-dihydrocaffeoyl quinic acid from Salicornia Herbacea Against Tert-butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Damage. Chem. Biol. Interact. 2009; 181, p. 366–376.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. DOQ-CGCRE-008 - Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. Revisão 02, 2007.Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE8_02.pdf

Ishizaki, T. - CYP2C Pharmacogenetics and Tailor-Made Therapeutic Implications. International Congress Series. 2002; 1244, p. 1–9.

Isvoran, A.; Louet, M.; Vladoiu, D. L.; Craciun, D.; Lorient, M. A.; Villoutreix, B. O.; Miteva, M. A. - Pharmacogenomics of the Cytochrome P450 2C Family: Impacts of Amino Acid Variations on Drug Metabolism. Drug Discovery Today. Feb, 2017; vol. 22, n. 2.

Kenworthy, K. E.; Bloomer, J. C.; Clarke, S. E.; Houston, J. B. - CYP3A4 Drug Interactions: Correlation of 10 *in vitro* Probe Substrates. J. Clin Pharmacol. Nov, 1999; 48 (5): p.716-727.

Kim, S. N.; Seo, J. Y.; Jung, D. W.; Lee, M. Y.; Jung, Y. S.; Kim, Y. C. - Induction of Hepatic CYP2E1 by a Subtoxic Dose of Acetaminophen in Rats: Increase in Dichloromethane Metabolism and Carboxyhemoglobin Elevation. Drug Metabolism and Disposition, American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Jul, 2007; Vol. 35, No. 10; 35: p. 1754–1758.

Kimura, Y.; Ito, H.; Ohnishi, R.; Hatano, T. - Inhibitory Effects of Polyphenols on Human Cytochrome P450 3A4 and 2C9 Activity. Food Chem Toxicol. Jan, 2010; 48(1): p. 429-35.

Kitsati, N.; Mantzaris, M. D.; Galaris, D. - Hydroxytyrosol Inhibits Hydrogen Peroxide-Induced Apoptotic Signaling via Labile Iron Chelation. J. Agric. Food Chem. 2012; 60, p. 7873–7879.

Krishna, D.R.; Klotz, U. - Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. Clin Pharmacokinet. Feb, 1994; 26(2):p. 144-60.

Küblbeck J, Laitinen T, Jyrkkärinne J, Rousu T, Tolonen A, Abel T, Kortelainen T. - Use of Comprehensive Screening Methods to Detect Selective Human CAR Activators. Biochemical Pharmacology. 2011; 82, 1994–2007.

Kudugunti, S. K.; Vad, N. M.; Whiteside, A. J.; Naik, B. U.; Yusuf, M. A.; Srivenugopal, K. S.; Moridani, M. Y. - Biochemical Mechanism of Caffeic Acid Phenylethyl Ester (CAPE) Selective Toxicity towards Melanoma Cell Lines. Chem. Biol. Interact. 2010; 188, p. 1–14.

Kumar, V.; Wahlstrom, J. L.; Rock, D. A.; Warren, C. J.; Gorman, L. A.; Tracy, T. S. - CYP2C9 Inhibition: Impact of Probe Selection and Pharmacogenetics on *in vitro* Inhibition Profiles. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2006; 34:p. 1966–1975

Kweon, M. H.; JUNG, M. J.; SUNG, H. C. - Cytoprotective Effects of Heme Oxygenase-1 Induction by 3-O -Caffeoyl-1-Methylquinic Acid. Free Radic. Biol. Med. 2004; 36, p. 40–52.

Larrosa, M.; Luceri, C.; Vivoli, E.; Pagliuca, C.; Lodovici, M.; Moneti, G.; Dolara, P. - Polyphenol Metabolites From Colonic Microbiota Exert Anti-Inflammatory Activity on Different Inflammation Models. Mol. Nutr. Food Res. 2009; 53, p. 1044–1054.

- Lee, C. R.; Goldstein, J. A.; Pieper, J. A. - Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: A Comprehensive Review of the *in-vitro* and Human Data. *Pharmacogenetics*. 2002; 12:p. 251–263.
- Lee, E. S.; Park, S. H.; Kim, M. S.; Han, S. Y.; Kim, H. S.; Kang, Y. H. - Caffeic acid Disturbs Monocyte Adhesion Onto Cultured Endothelial Cells Stimulated by Adipokine Resistin. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60, p. 2730–2739.
- Liang, Y.; Zhou, T.; Chen, Y.; Lin, D.; Jing, X.; Peng, S.; Zheng, D.; Zeng, Z.; Lei, M.; Wu, X.; Huang, K.; Yang, L.; Xiao, S.; Liu, J.; Tao, E. - Rifampicin Inhibits Rotenone-Induced Microglial Inflammation via Enhancement of Autophagy. *Neurotoxicology*. Dez 2017; 63: p.137-145.
- Lopes, E. V.; Carvalho, R. B. N.; Freitas, R. M. - Análise das possíveis interações entre medicamentos e alimento/nutrientes em pacientes hospitalizados. *Einstein*. 2010; 8(3 Pt 1):p. 298-302.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, D.; Rémésy, C.; Jime'nez, L. - Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79(5): p. 727-47.
- McCarty, M. F. - A Chlorogenic Acid-Induced Increase in GLP-1 Production May Mediate the Impact of Heavy Coffee Consumption on Diabetes Risk. *Med Hypotheses*. 2005; 64: p. 848–53.
- Martignoni, M.; Groothuis, G. M. M.; Kanter, R. - Species Differences Between Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human CYP-mediated Drug Metabolism, Inhibition and Induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* (2006) 2:(6)
- Monteiro, M.; Farah, A.; Perrone, D.; Trugo, L. C.; Donangelo, C. - Chlorogenic Acid Compounds From Coffee are Differentially Absorbed and Metabolized in Humans. *The J. of Nutr.* 2007; 137: p.2196-2201.
- Morel, G.; Cossec, B.; Lambert, A. M.; Binet, S. - Evaluation of Rat Hepatic 2E1 Activity in Function of Age, Sex and Inducers: choice of an Experimental Model Capable of Testing the Hepatotoxicity of Low Molecular Weight Compounds. *Toxicology Letters* 106 (1999) P.171–180.
- Nakajima, M.; Nakamura, S.; Tokudome, S.; Shimada, N.; Yamazaki, H.; Yokoi, T. - Azelastine N-demethylation by Cytochrome P-450 (CYP) 3A4, CYP2D6, and CYP1A2 in Human Liver Microsomes: Evaluation of Approach to Predict the Contribution of Multiple CYPs. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1999; 27:(12), p. 1381-1391.
- Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F.; Scaccini, C. - Absorption of Phenolic Acids in Humans After Coffee Consumption. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(20): p.5735-5741.
- Nash, T. – The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch reaction. *J. Biochem. Out*, 1953; 55(3):416-21.

Oesch, F.; Arand, M.; Benedetti, M. S.; Castelli, M. G.; Dostert, P. - Inducing Properties of Rifampicin and Rifabutin for Selected Enzyme Activities of the Cytochrome P-450 and UDP-Glucuronosyltransferase Superfamilies in Female Rat liver. *J Antimicrob Chemother.* Jun, 1996; 37(6):1111-19.

Omar, M. H.; Mullen, W.; Stalmach, A.; Auger, C.; Rouanet, J. M.; Teissedre, P. L.; Caldwell, S. T.; Hartley, R. C.; Crozier, A. - Absorption, Disposition, Metabolism, and Excretion of [3-(14)C] Caffeic Acid in Rats. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: p. 5205–5214.

Ong, K. W.; Hsu, A.; Tan, B. K. H. - Anti-diabetic and Anti-lipidemic Effects of Chlorogenic Acid are Mediated by Ampk Activation. *Biochemical Pharmacology.* , 2013; 85: p.1341–1351.

Ong, K. W.; Tan, B. K. H. - chlorogenic Acid Stimulates Glucose Transport in Skeletal Muscle via Ampk Activation: a contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. *PLoS ONE.* 2012; 7(3), p. 32718.

Pelkonen, O.; Turpeinen, M.; Hakkola, J.; Honkakoski, P.; Hukkanen, J.; Raunio, H. - Inhibition and Induction of Human Cytochrome P450 enzymes: Current Status. *Arch. Toxicol.* 2008; 82: p. 667-715.

Peng, W. X.; Li, H. D.; Zhou, H. H. - Effect of Daidzein on CYP1A2 Activity and Pharmacokinetics of Theophylline in Healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* , 2003; 59: p. 237-241.

Prabhakar, P. K.; Doble, M. - Synergistic Effect of Phytochemicals in Combination with Hypoglycemic Drugs on Glucose Uptake in Myotubes. *Phytomedicine.* 2009; 16: p.1119–1126.

Pragasam, S. J.; Murunikkara, V.; Sabina, E. P.; Rasool, M. K. - Ameliorative Effect of *p*-Coumaric Acid, a Common Dietary Phenol, on Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *Rheumatol Int.* 2013; 33: p.325–334.

Prasad, R. N.; Karthikeyan, A.; Karthikeyan, S.; Reddy, B. V. - Inhibitory Effect of Caffeic Acid on Cancer Cell Proliferation by Oxidative Mechanism in Human HT-1080 Fibrosarcoma Cell Line. *Mol. Cell. Biochem.* 2011; 349: p.11–19.

Prince, S. M.; Roy, A. J. - *p*-Coumaric Acid Attenuates Apoptosis in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarcted Rats by Inhibiting Oxidative Stress. *International Journal of Cardiology.* 2013; 168: p. 3259–3266.

Prueksaritanont, T.; Li, C.; Tang, C.; Kuo, Y.; Strong-Basalyga, K.; Carr, B. - Rifampin Induces the *in vitro* Oxidative Metabolism, But Not the *in vivo* Clearance of Diclofenac in Rhesus Monkeys. *Drug Metab. Dispos.* Nov, 2006; 34(11):p.1806-1810.

Quell, P.; Hollender, J.; Schüürmann, J.; Brossette, T.; Maas, R.; Jose1, J. - Co-expression of Active Human Cytochrome P450 1A2 and Cytochrome P450 Reductase on the Cell Surface of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 15:26, 2016.

- Quintieri, L.; Bortolozzo, S.; Stragliotto, S.; Moro, S.; Pavenetto, M.; Nassi, A.; Palatini, P.; Floreani, M. - Flavonoids Diosmetin and Hesperetin are Potent Inhibitors of Cytochrome P450 2C9-mediated Drug Metabolism *in vitro*. *Drug Metab. Pharmacokinet.* Jul, 2010 25 (5): 466–476.
- Rechner, A. R.; Spencer, J. P. E.; Kuhnle, G.; Hahn, U.; Rice-Evans, C. A. - Novel Biomarkers of the Metabolism of caffeic Acid Derivatives *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine.* 2001; 30(11), p.1213-1222.
- Reinke L.A.; Moyer, M. J. - *p*-nitrophenol hydroxylation A Microsomal Oxidation Which is Highly Inducible by Ethanol. *Drug Metab Disp.* 1985; 13 (5):548-52.
- Renoulf, M.; Guy, P. A.; Marmet, C.; Fraering, A. L.; Longet, K.; Moulin, J.; Enslin, M.; Barron, D.; Dionisi, F.; Cavin, C.; Williamson, G.; Steiling, H. - Measurement of Caffeic and Ferulic Acid equivalents in Plasma After Coffee Consumption: Small Intestine and Colon are Key Sites for Coffee Metabolism. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2010; 54: p. 1-7.
- Rosengreen, A.; Dotevall, A.; Wilhelmsen, L.; Thelle, T.; Johansson, S. - Coffee and Incidence of Diabetes in Swedish Women: A Prospective 18-year Follow-up Study. *J. Intern. Med.* 2004; 255: (1), 89-95.
- Roy, A. J.; Prince, P. S. M. - Preventive Effects of *p*-Coumaric Acid on Lysosomal Dysfunction and Myocardial Infarct Size in Experimentally Induced myocardial Infarction. *European Journal of Pharmacology.* 2013; 699, p. 33–39.
- Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F. - A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 1998; 76: p. 270–276.
- Schroer, K.; Kittelmann, M.; Lutz, S. - Recombinant Human Cytochrome P450 Monooxygenases for Drug Metabolite Synthesis. *Biotechnology and Bioengineering.* Aug, 2010; vol. 106, No. 5, p. 699 – 706.
- Shearer, J.; Farah, A.; Paulis, T.; Bracy, D. P.; Pencek, R. R.; Graham, T. E.; Wasserman, D. H.- Quinides of Roasted Coffee Enhance Insulin Action in Conscious Rats. *J. of Nutr.* 2003; 133: (11), p. 3529-3532.
- Shiozawa, R.; Inoue, Y.; Murata, I.; Kanamoto, I. - Effect of Antioxidant Activity of Caffeic Acid With Cyclodextrins Using Ground Mixture Method. *Asian Journal of pharmaceutical Sciences* 13 (2018) p. 24–33.
- Shukla, A.; Gillam, E. M.; Mitchell, D. J.; Bernhardt, P. V. - Direct Electrochemistry of Enzymes from the Cytochrome P450 2C Family. *Electrochemistry Communications.* Mar, 2005; (7) p.437–442.
- Skaanild, M. T.; Mette, T.; Friis, C. - Analyses of CYP2C in Porcine Microsomes. *Journal compilation Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* Jun, 2008; 103, p. 487–492.

- Soares, S. E. - Ácidos fenólicos como antioxidantes Rev. Nutr., Campinas, jan./abr., 2002; 15(1), p.71-81.
- Sousa, M. C.; Braga, R. C.; Cintra, B. A. S.; Oliveira, V.; Andrade, C. H. - In Silico Metabolism Studies of Dietary Flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. Food Research International. 2013 50 p.102–110.
- Strolin-Benedetti, M.; Dostert, P. - Induction and Autoinduction Properties of Rifamycin Derivatives: A Review of Animal and Human Studies. Environmental Health Perspectives. Nov, 1994; Vol. 102, Supp 9.
- Sugiyama, E.; Kikuchi, A.; Inada, M.; Sato, H. - The Use of ¹³C-Erythromycin as an *in vivo* Probe to Evaluate CYP3A-Mediated Drug Interactions in Rats. Journal of Pharmaceutical Sciences. Set 2011;Vol. 100, nº. 9.
- Sun, H.; Scott, D. - Impact of Genetic Polymorphisms of Cytochrome P450 2C (CYP2C) Enzymes on the Drug Metabolism and Design of Antidiabetics. Chemico-Biological Interactions. Set, 2011 194, p.159–167.
- Tassaneeyakul, W.; Veronese, M. E.; Birkett, D. J.; Miners, J. O. - High-Performance Liquid Chromatographic Assay for 4-Nitrophenol Hydroxylation, a Putative Cytochrome P-4502E1 Activity, in Human Liver Microsomes. Journal of Chromatography. Mar, 1993; 616 p.73-78.
- Tatefugi, T.; Izumi, N.; Ohta, T.; Arai, S.; Ikeda, M.; Kurimoto, M. - Isolation and Identification of Compounds from Brazilian Propolis Which Enhance Macrophage Spreading and Mobility. Biol. Pharma. Bull. 1996; 19:(7), 966-970.
- Tsai, C. M.; Yen, G. C.; Sun, F. M.; Yang, S. F.; Weng, C. J. - Assessment of the Anti-Invasion Potential and Mechanism of Select Cinnamic Acid Derivatives on Human Lung Adenocarcinoma Cells. Mol. Pharmaceutics. 2013 ; 10, p. 1890–1900.
- Umathe, S. N.; Dixit, P. V.; kumar, V.; Kuldeep U. Bansod, K. U.; Wanjari, M. M. - Quercetin Pretreatment Increases the Bioavailability of Pioglitazone in Rats: Involvement of CYP3A Inhibition. biochemical pharmacology. Jan, 2008; 75 p. 1670–1676.
- Van Dam, R. M. - Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes, Cardiovascular Diseases, and Cancer. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2008; 33, p. 1269–1283.
- Virgili, F.; Pagana, G.; Bourne, L.; Rimbach, G.; Natella, F.; Rice-Evans, C.; Packer, L. Ferulic Acid Excretion as a Marker of Consumption of a French Maritime Pine (*pinus maritima*) Bark Extract. Free Radical Biol. Med. 2000; 28, p. 1249–1256.
- Wang, T.; Chen, L.; Wu, W.; Long, Y.; Wang, R. - Potential Cytoprotection: Antioxidant Defence by Caffeic Acid Phenethyl Ester Against Free Radical-Induced Damage of Lipids, DNA, and Proteins. Can. J. Physiol. Pharmacol. 2008; 86: 279–287.

Wang B, Wang J, Huang SQ, Su HH, Zhou SF. - Genetic Polymorphism of the Human Cytochrome P450 2C9 Gene and its Clinical Significance. *Curr Drug Metab.* 2009 Sep;10 (7): p. 781-834.

Wang, W.; He, X.; Ma, C. - Metabolism Schemes of Chlorogenic, Quinic and Caffeic Acid Derivatives in Rats Deduced by Molecular Fragments Detected With Optimized UPLC–APCI-MS/MS Conditions. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2013; 337: p. 34–42.

Wang, T. Y.; Li, Q.; Kai-Shun Bi, K. S. - Bioactive Flavonoids in Medicinal Plants: Structure, Activity and Biological Fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences:* 13 (2018) p. 12–23.

Williams, P. A.; Cosme, J.; Ward, A.; Angove, H. C.; Matak-Vinković, D.; Jhoti, H. - Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2C9 With Bound Warfarin. *Nature.* Jul, 2003; 24; 424 (6947): p. 464-468.

Wójcikowski, J.; Haduch, A.; Daniel, A. W. - Effect of Antidepressant Drugs on Cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in Rat Liver. *Pharmacological reports.* 2013. 65; p. 1247-1255.

Wu, Z. M.; Yu, Z. J.; Cui, Z. Q.; Peng, L. Y.; Li, H. R.; Zhang, C. L.; Shen, H. Q.; Yi, P. F.; Fu, B. D. - In Vitro Antiviral Efficacy of Caffeic Acid Against Canine Distemper Virus. *Microbial Pathogenesis* 110 (2017) p. 240-244.

Xi, Y. ; Jiao, W. ; Cao, J. ; Weibo Jiang, W. - Effects of Chlorogenic Acid on Capacity of Free Radicals Scavenging and Proteomic Changes in Postharvest Fruit of Nectarine. *J. PLOS ONE*; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182494>. Ago, 2017; p. 1 – 14.

Yamazaki, H.; Hiroki, S.; Urano, T.; Inoue, K.; Shimada, T. - Effects of Roxithromycin, Erythromycin and Troleandomycin on Their *N*-demethylation by Rat and Human Cytochrome P450 Enzymes. *Xenobiotica.* Nov, 1996; 26(11): p.1143-53.

Yue, J.; Peng, R. - Does CYP2E1 Play a Major Role in the Aggravation of Isoniazid Toxicity by Rifampicin in Human Hepatocytes? *Br J Pharmacol.* 2009; Jun;157 (3): p.331-33.

Zerilli, A.; Ratanasavanh, D.; Lucas, D.; Goasduff, T.; Dréano, Y.; Menard, C.; Picart, D.; Berthou, F. - Both Cytochromes P450 2E1 and 3A Are Involved in the *O*-Hydroxylation of *p*-Nitrophenol, a Catalytic Activity Known To Be Specific for P450 2E1. 1997, *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1205-1212.

Zhang, X. J.; Thomas, P. E. - Erythromycin as a Specific Substrate for Cytochrome P4503A Isozymes and Identification of a High-Affinity Erythromycin *N*-demethylase in Adult Female Rats. *Drug Metab Dispos.* Jan, 1996; 24 (1): p.23-27.

Zhang, J.; Cui, S.; Ding, Y.; Yang, X.; Guo, K.; Zhao, Jing-Tai - Two-Dimensional Mesoporous ZnCo₂O₄ Nanosheets as a Novel Electrocatalyst for Detection of *o*-Nitrophenol and *p*-Nitrophenol. *Biosensors and Bioelectronics* 112 (2018) p. 177–185.

Zheng, X.; Ping Fang, P.; Bao, S.; Lin, D.; Jian-ping Cai, J.; Hu, G. - Function of 38 Variants CYP2C9 Polymorphism on Ketamine Metabolism *in vitro*. *Journal of Pharmacological Sciences*. Set, 2017; 135 p. 8 – 13.

Zhou, P.; Ya Chen, Y.; Lu, Q.; Qin, H.; Ou, H.; He, B. ; Ye, J. - Cellular Metabolism Network of *Bacillus thuringiensis* Related to Erythromycin Stress and Degradation. ***Ecotoxicology and Environmental Safety* Vol. 160**, 30 September 2018, p. 328-341.

Zi, J.; Liu, D.; Ma, P.; Huang, H.; Zhu, J.; Wei, D.; Yang, J.; Chen, C. - Effects of CYP2C9*3 and CYP2C9*13 on Diclofenac Metabolism and Inhibition-based Drug-Drug Interactions. *Drug Metab. Pharmacokinet. Abr*, 2010 25 (4): 343–350.

ANEXO - PREPARO DAS SOLUÇÕES E ENSAIOS DE ATIVIDADE

1 - Ensaio de atividade da rhCYP2C9*1

Os ensaios de atividade com a rhCYP2C9*1 (BD SupersomesTM, catálogo nº 456258, tamanho 0,5 nmol) em tubo tipo *ependorff* de 1,5 mL para o volume final de reação de 250 µL.

Adicionar a cada tubo *ependorff* 1,5 mL em banho de gelo:

- Tampão TRIS 20 mM pH 7,5 – 153,75 µL
- DCF 0,4 mM – 62,5 µL
- rhCYP2C9*1 (75 picomoles/mL) – 18,75 µL

Levar ao banho-maria (modelo SBD50A CE 110 v) para pré incubação, sob agitação a 37°C por 3 min. Após isso, adicionar ao tubo 1,5 µL de uma solução de co-fatores (4,7 µL de β-NADP 20 mg/mL + 4,7 µL de G6P 20 mg/mL + 3,1 µL de MgCl₂ 13,3 mg/mL + 2,5 µL G6PD 40 U/mL) para iniciar a reação, após 10 minutos, a reação é parada com 50µL da solução de Acetonitrila (ACN) 94% + Ácido Acético Glacial (AAG) 6%. Levar ao banho de gelo, depois centrifugar a 12.000 x g por 10 minutos a 5°C, retirar o sobrenadante para análise em CLAE-DAD-UV.

2 - Quantificação de Proteínas da rhCYP2C9*1

Para a quantificação de proteínas, utilizar o método de Bradford que se baseia na ligação do corante à proteína provoca uma mudança da coloração à azul brilhante, no máximo de absorção do corante de 465 para 595 nm, e o aumento na absorção a 595 nm que é monitorado (Bradford, 1976). O BSA é utilizado como padrão em várias diluições (0,28 mg/mL, 0,56 mg/mL, 0,84 mg/mL e 1,4 mg/mL, além do branco) em triplicatas, analisadas em espectrofotômetro com leitor de micro-placa de 96 poços, adicionando-se a amostra a ser investigada (rhCYP2C9*1) também em triplicata.

Após análise das amostras em espectrofotômetro traçar a curva padrão e apartir da equação da reta ($y=a+bx$).

3 - Indução da CYP2C11/12 em Ratos Wistar por Rifampicina

3.1 - Preparo da suspensão da Rifampicina

A rifampicina (RIF) foi gentilmente cedida por Farmanguinhos/Fiocruz para o experimental, diariamente foi preparada a suspensão aquosa diluída em 0,5% de carboximetilcelulose e 0,4% de tween 40, onde as doses foram expressadas em mg/kg.

3.2 – Tratamento dos Animais

Para a indução da CYP2C11/12 em modelo animal, foram utilizadas 6 ratas wistar, 3 tratadas com RIF (identificadas como WR1, WR2 e WR3) e 3 controles (identificadas como WC1, WC2 e WC3) em idade adulta, pesando entre 190 a 210 gramas, preservando o suprimento de água, ração e overnight. As ratas tratadas receberam, por gavagem, durante 6 dias 300mg RIF/kg/dia, nos últimos 3 dias de tratamento a dose foi fracionada em 2 doses diárias de 150mg RIF/kg/dia. No décimo dia foi realizada a eutanásia dos 6 animais com CO₂, retirados seus fígados em banho de gelo, pesados, identificados e congelados em nitrogênio líquido (NL₂) até o dia do uso (adaptado de Oesh *et al.*, 1996).

4 - Determinação de Peso Relativo do Fígado dos Animais

Para determinar o peso relativo dos animais tratados com RIF e dos controles, utilizou-se como base o peso do órgão no dia da eutanásia. Os pesos foram os seguintes: 7,9 g, 7,5 g e 8,14 g, respectivamente dos animais controles (WC) WC1, WC2 e WC3; 7,12 g, 8,71 g e 8,95 g, respectivamente dos animais tratados (WR) WR1, WR2 e WR3. Foi realizado um cálculo, onde se dividia o peso de cada órgão pelo peso do animal correspondente no dia da eutanásia.

5 - Preparo da Fração Microssomal Hepática de Ratos

Fígados individuais de ratos foram retirados do reservatório de NL₂ e transferidos para placas de Petri em banho de gelo. Os órgãos foram pesados, lavados com solução de sacarose 250 mM gelada e transferidos para homogeneizador de vidro com capacidade de 50

mL, previamente imerso no gelo. Foi acrescentado um volume de solução TRIS 100 mM / KCl 150 mM pH 7,4 igual a 4x o peso do órgão, a homogeneização foi de 10x com pistilo de teflon adaptado ao homogeneizador de tecido, transferido para tubos de ultracentrífuga (2 tubos para cada animal, completado com TRIS 100 mM / KCl 150 mM pH 7,4 (solução gelada) para balancear os tubos) previamente gelados, feito a centrifugação a 11.500 rpm por 30 min a 4°C (modelo Beckman XL-90 (rotor 70.1 Ti do INCQS)). Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e filtrado em gase adaptada ao becker no gelo, depois o sobrenadante é filtrado e transferido para tubos de ultracentrífuga, previamente gelados, e completados com solução TRIS 100mM / KCl 150mM pH 7,4 (solução gelada) para balancear os tubos e ultracentrifugados a 38.200 rpm por 60 min a 4°C (modelo Beckman com rotor 70.1 Ti do INCQS), desprezar o sobrenadante e acrescentar aos tubos 4 mL de solução TRIS 100 mM / KCl 150 mM pH 7,4 (solução gelada), descolar os sedimentos com espátulas finas e transferidos para o homogeneizador de capacidade de 15 mL, homogeneizado 10x, transferir o homogeneizado para tubos de ultracentrífuga, acrescentar ao homogeneizador de capacidade de 15 mL, 2 mL de solução TRIS 100 mM / KCl 150 mM pH 7,4 (solução gelada) e homogeneizar 5x. Transferir o homogeneizado para tubos de ultracentrífuga e repetir o processo de ultracentrifugação para cada amostra. O sobrenadante foi desprezado e acrescentado ao tubo 1 mL de tampão Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4 (solução gelada), foi descolado o sedimento com espátulas finas e transferido para homogeneizador de capacidade de 5 mL, homogeneizado 10x, medir o volume produzido com pipeta e transferidos para tubos de ensaio previamente gelados. Pipetar o volume diferencial de tampão Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4 (solução gelada) para completar 2 mL e transferir ao homogeneizador de capacidade de 5 mL, homogeneizar 5x e transferir para o mesmo tubo de ensaio em banho de gelo. Transferir alíquotas de 300 μ L para tubos de criogenia, previamente em banho de gelo, identificados com caneta permanente e guardados em NL_2 até o momento do uso.

5.1 – Preparo das Soluções e Tampões da Fração Microssomal Hepática de Ratos

5.1.1 - Solução de sacarose 250 mM

No dia do uso pesar 21,4 g de Sacarose (ISO FAR - Ref. 741, Peso Molecular = 342,30 g/mol), solubilizar em água destilada e completar para 250 mL.

5.1.2- Solução Tris 1 M

Pesar 60,57 g de TRIS (Merck – ref. 1.08382.0500, Peso Molecular = 121,4 g/mol), solubilizar em água destilada, completar para 500 mL e guardado em geladeira até o momento do uso.

5.1.3 - Solução Tris 100 mM / KCl 150 mM pH 7,4

No dia do uso, pipetar 50 mL da solução TRIS 1 M para proveta de 500 mL, adicionado água destilada e 5,59 g de KCl (Merck – Ref. 1.04936.1000, Peso Molecular = 74,55 g/mol), solubilizar e completar para 450 mL, o pH ajustar para 7,4 com HCl 2 N e completado o volume para 500 mL, Manter em banho de gelo.

5.1.4 - Tampão Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4) 1 M

Pesar 87,09 g de Fosfato de Potássio dibásico (Merck – Ref. 1.05101.1000, Peso Molecular = 174,18 g/mol), solubilizar em água destilada, completado para 500 mL e guardar em geladeira até o momento do uso.

5.1.5 - Tampão Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4) 1 M

Pesar 34,02 g de Fosfato de Potássio monobásico (Merck – Ref 1.04873, Peso Molecular = 136,08 g/mol), solubilizado em água destilada, completado para 250 mL e guardado em geladeira até o momento do uso.

5.1.6 - Solução EDTA 100 mM

Pesar 0,74 g de EDTA (Sigma – Ref E5134-100, Peso Molecular = 372,24 g/mol), solubilizado em água destilada, completado para 20 mL e guardado em geladeira até o momento do uso.

5.1.7 - Tampão Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4) 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4

No momento do uso, pipetar 25 mL do Tampão Fosfato de Potássio dibásico (K_2HPO_4) 1M para uma proveta de 250 mL, adicionado 50mL de glicerol (Merck – Ref. 1.04092.1000, Peso Molecular = 92,10 g/mol) e 2,5mL da solução de EDTA 100 mM, completados para 200 mL e ajustado o pH para 7,4 com Tampão Fosfato de Potássio monobásico 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM, completado para 250 mL e mantido em banho de gelo.

5.1.8 - Tampão Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4) 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4

No momento do uso, pipetar 10 mL do tampão Fosfato de Potássio monobásico (KH_2PO_4) 1M para uma proveta de 100 mL, adicionados 20 mL de glicerol e 1 mL de solução EDTA 100 mM, completados para 100 mL e mantido em banho de gelo.

5.1.9 - Solução Tampão KH_2PO_4 50mM / $NaCl_2$ mM pH 7,2

No momento do uso, pesar em Becker 0,680 g de KH_2PO_4 e 0,876 g de $NaCl_2$ e solubilizar em 60 mL de água destilada. O pH foi ajustar para 7,2 com KOH 10% e avolumar para 100 mL.

6 – Quantificação de proteínas dos Microsossomos Hepáticos de Ratos

Foram realizadas várias diluições das amostras WC1 e WC1 em solução tampão de KH_2PO_4 50mM / NaCl_2 mM pH 7,2, para determinar a melhor condição a ser utilizada para a quantificação de proteínas, onde a diluição 1:20 que permitiu atribuir os valores de 33,83 mg ptn/mL para o WR1 e 30,62 mg ptn/mL para WC1, Através da curva padrão de BSA, pelo método de Bradford (1976) como descrito anteriormente.

6.1 – Condições para os Ensaio com Microsossomos

A melhor condição escolhida para os ensaios com microsossomos foi com a concentração de 1 mg/mL a 37°C por um tempo de reação de 20 min. Adicionou-se a cada tubo tipo *ependorff* de 1,5 mL:

- Tampão TRIS 20 mM pH 7,5 – 109,4 μL
- DCF 0,4 mM - 62,5 μL
- WR1/WC1 1 mg/mL - 62,5 μL
- Sol. de Cofatores - 15,6 μL

Para um volume final de reação de 250 μL . Após os 20 min de incubação em banho-maria, sob agitação, a reação foi parada com a adição de 50 μL de solução contendo ACN 94% + AAG 6%. Os tubos foram colocados em banho de gelo até a centrifugação a 12.000 x g a 5°C por 10 min, retirado o sobrenadante e congelados a -20°C até o momento da análise em **CLAE-DAD-UV**.

6.2 – Micro Ensaio da Atividade de Eritromicina-Desmetilase (ERMd)

A Eritromicina-Desmetilase (ERMd) em microsossomos é uma reação que mede a velocidade de formação de formaldeído. Esta reação funciona como um marcador seletivo para as reações enzimáticas catalisadas pelo CYP3A (Watkins *et al.*, 1985; Berg-Candolfi, 1996).

7 - Soluções:

7.1 – ETS

7.1.1 - β -NADP 0,4 mM ([] final) Sigma N0505 – Peso Molecular=765,40 g/mol

Preparo do β -NADP 25 mM em tubo *ependorff* de 2 mL (pesando 0,037 g β -NADP e acrescentar 2 mL de solução TRIS 50mM / KCl 150 mM pH 7,4, homogeneizar em vortex e guardar a -20°C (16 μ L p/poço).

7.1.2 – G6P 10 mM ([] final) Sigma G7250 – Peso Molecular=340,1 g/mol

Preparo do G6P 500 mM em tubo *ependorff* de 2mL (pesar 0,3 g G6P e acrescentar 2 mL de solução TRIS 50 mM/KCl 150 mM pH 7,4, homogeneizado no vortex e guardar a -20°C (20 μ L p/poço).

7.1.3 – G6PD 1U ([] final) Sigma Ref. G-6378

Preparar como 1U/10 μ L em tampão K_2HPO_4 100 mM pH 7,8, 10 μ L p/poço.

7.1.4 – $MgCl_2$ 10 mM ([] final) Merck Ref. 21561 – Peso Molecular=203,30 g/mol

Preparar $MgCl_2$ 1 M, pesar 1,015 g de $MgCl_2$ em Becker e completar para 5 mL com água mili-Q, 10 μ L p/poço.

7.1.5 – Tampão TRIS 50 mM/KCl 150 mM (TRIS Merck Art.8382 – Peso Molecular=121,14 g/mol

Preparo do TRIS 1 M, pesar 12,11 g para 100 mL, diluído de 1:20, retirado 5 mL de TRIS 1M acrescentando 1,12 g de KCl e completando para 10 mL com água mili-Q. O pH foi ajustado para 7,4 com HCl 2 N.

7.1.6 - Sulfato de Zinco 25% ($ZnSO_4$) Reagen Ref. 10151 – Peso Molecular=287,54 g/mol

Preparar em água mili-Q e mantido a 4°C.

7.1.7 – Hidróxido de Bário saturado ($Ba(OH)_2$) Merck Ref. 1.01737 – Peso Molecular=315,48 g/mol.

Ferver água mili-Q para remover o CO₂ dissolvido e acrescentar o hidróxido de bário em excesso, deixando ferver a mistura por alguns minutos, esfriar, filtrado em papel de filtro e estocado em recipiente bem fechado até o uso.

7.1.8 – Solução de Eritromicina 100 mM Fluka BioChemica Ref. 45673 – Peso Molecular=733,95 g/mol

Pesar 0,0734 g de Eritromicina em tubo tipo *ependorff* de 1,5 mL e acrescentado 1 mL de DMSO (solução 100 mM).

7.1.9 – Reagente de Nash (quantidade/volume por poço)

Acetato de Amônio 2 M Merck Ref 1.01116.1000 – Peso Molecular=77,08 g/mol – 0,046 g;

Ácido Acético Glacial 0,05M Merck – Peso Molecular=60,05 g/mol – Desnsdade=1,05 g/mL – 0,9 µL;

Acetilacetona 0,02 M Merck Ref. 1.09600.0100 – Peso molecular=100,12 g/mol – 0,6 µL

Preparar no momento do uso. O volume calculado necessário para o ensaio foi multiplicado por 0,3 mL (volume acrescentado a cada poço) pelo número de poços que foram preenchidos com a solução (0,3 mL/poço).

8 – Curva Padrão com Formaldeído

8.1 – Preparo da Solução de Formaldeído 1 mM (Formaldeído 37% Merck Ref. 1.04003.1000 – Peso Molecular=30,03 g/mol)

Pipetar 812 µL de formaldeído para um balão volumétrico de 100 mL e completado com água mili-Q até o nível demarcado = solução 100 mM. Foi realizada a diluição 1:100 para obter solução 1 mM (pipetados 1mL da solução de formaldeído 100mM em balão volumétrico de 100 mL e completado com água mili-Q até o nível demarcado), transferido 1 mL da solução 1 mM para tubo tipo *ependorff* de 1,5 mL e feitas diluições seriadas de 1:2 em água para 8 pontos de curva, tendo assim soluções 1mM, 0,5mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM, 0,03125 mM, 0,015625 mM e 0,0078125 mM. Cada ponto de curva padrão

consistiu de 100 μL de cada diluição e 900 μL de tampão TRIS 50 mM/KCl 150 mM pH 7,4, o branco foi com 100 μL de água e 900 μL do mesmo tampão.

A curva foi traçada a partir das seguintes concentrações de formaldeído: 0,1 mM (100 μM), 0,05 mM (50 μM), 0,025 mM (25 μM), 0,0125 mM (12,5 μM), 0,00625 mM (6,25 μM), 0,003125 mM (3,125 μM), 0,0015625 mM (1,5625 μM) e 0,00078125 mM (0,78125 μM), os pontos de curva (em μM) foram 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125. Foi adicionado aos tubos tipo *ependorf* 100 μL da solução de sulfato de zinco e 100 μL da solução de sulfato de bário (inclusive ao branco), levado ao vortex, depois levado a centrífuga a 13.000 rpm por 10 minutos para obter sobrenadante claro, transferir 700 μL do sobrenadante de cada diluição para outros *ependorfs* e acrescentado 300 μL do reagente de Nash recém preparado (0,3 mL por tubo - inclusive ao branco) Incubados a 50°C por 30 min em banho-maria (Fanen ultratermostático 116R). Transferiu-se 300 μL de cada diluição para o poço (3 para cada ponto) da microplaca de poliestireno (branca) de 96 poços e levado ao espectrofotômetro para leitura a 412 nm.

8.2 – Determinação da Atividade da N-Desmetilação da Eritromicina

Para o ensaio, foram colocados tubos tipo *ependorff* de 1,5 mL no banho de gelo e acrescentado o tampão tampão TRIS 50 mM / KCl 150 mM pH 7,4, adicionado a solução de eritromicina 100 mM a cada tubo (os ETs foram preparados em banho de gelo como solução única), os microssomos foram descongelados em banho de gelo e diluídos para obter 2 mg/mL de proteína. Após 1 min foi pré-incubado o primeiro tubo do primeiro animal no banho-maria, prosseguindo assim introduzindo os tubos seguidamente até que se completasse 3 min de pré-incubação para cada tubo.

Os ETs foram adicionados em intervalos de 60 segundos entre os tubos até o último, quando se completou 30 min do início da reação foi acrescentado 100 μL de ZnSO_4 25% para cessar a reação (inclusive ao branco), homogeneizado em vortex, acrescentado 100 μL de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturado e novamente levado ao vortex, centrifugado em centrífuga Minispin *ependorff* a 13.000 rpm/10 minutos para obter sobrenadante límpido. Foram retirados 0,7 mL do sobrenadante e transferidos para tubo tipo *ependorff* de 1,5 mL, acrescentado 0,3 mL de reagente de Nash a cada tubo e levado ao banho-maria a 50°C por 30 min, após o

esfriamento da solução foram transferidos 300 µL do branco, padrão e amostras para micro-placa de 96 poços (300 µL/poço) e feito a leitura a 412 nm de absorvância.

9 - Determinação da atividade de *p*-nitrofenol (PNP) hidroxilase

Allis e colaboradores (1994), descreveram a quantificação por espectrofotometria da atividade da *p*-nitrofenol hidroxilase. Essa reação já foi descrita como sendo marcadora da atividade de *CYP2E1*. O produto formado da reação da enzima (4-nitrocatecol) absorve luz com 480 nm de comprimento de onda, diferente do substrato da reação (*p*-nitrofenol).

No momento da análise foi determinado o espectro de absorção do *p*-nitrofenol, em cubetas de quartzo usando uma solução de *p*-nitrofenol 0,1 mM (Allis e Robinson, 1994). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601. A curva espectral foi lida, na faixa de 300 a 600 nm e registrado o valor do pico antes do início da reação.

9.1 - Preparação Microsomal do *p*-Nitrofenol (PNP) 2 mg/ml

Pesar 0,0028 g de PNP em *ependorf* de 2 mL e acrescentado solução tampão K_2HPO_4 100 mM (diluído de 1:10 K_2HPO_4 1M pH 6,8) foram adicionados a cubeta de plástico. A reação foi iniciada com adição de 25 µL para a cubeta do sistema regenerador de NADPH (70 µL de G6P 500 mM, 70 µL de β -NADP 25 mM, 70 µL de G6PD 1U/mL) a 37°C em banho-maria sob agitação, pré-incubada por 5 minutos, a atividade foi registrada, a 480 nm, durante 10 min. O coeficiente de extinção do 4-nitrocatecol (3,57 mM/cm) foi utilizado para o cálculo da concentração do produto formado.