Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo
produto natural (-)-grandisina utilizando microssomas
hepáticos de humanos**

MAÍSA DANIELA HABENSCHUS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP
2016

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo
produto natural (–)-grandisina utilizando microssomas
hepáticos de humanos**

Versão resumida e corrigida da Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no dia 20/05/16, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. A versão original encontra-se disponível na unidade que aloja o programa de pós-graduação em Química.

Área de Concentração: Química

Orientada: Maísa Daniela Habenschus

Orientador: Prof. Dr. Anderson R. M. de Oliveira

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU
ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE
CITADA A FONTE

FICHA CATALOGRÁFICA

Habenschus, Maísa Daniela

Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo
produto natural (–)-grandisina utilizando microsomas
hepáticos de humanos. Ribeirão Preto, 2016.

59 p. : il. ; 30 cm

Versão resumida e corrigida da Dissertação de Mestrado
apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de
Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Química – no dia
20/05/2016. A versão original encontra-se disponível na
Unidade que aloja o Programa de pós- graduação em Química.

Orientador: de Oliveira, Anderson Rodrigo Moraes

1. (–)-grandisina. 2. Metabolismo in vitro. 3. Inibição
enzimática. 4. Microsomas hepáticos de humanos. 5.
Citocromo P450

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAÍSA DANIELA HABENSCHUS

Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural (–)-grandisina utilizando microsomas hepáticos de humanos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de Concentração: Química

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades.
Lembraí-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”*

- Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira**, orientador sempre prestativo amigável e disponível. Agradeço a oportunidade de desenvolver esse projeto em seu laboratório e todo conhecimento que pude adquirir durante esse tempo.

A **minha família**, a quem devo grande parte das conquistas pessoais adquiridas até aqui. Agradeço especialmente **aos meus pais**, Maria Helena e Luiz Carlos, que fizeram muito esforço para que eu pudesse me dedicar aos estudos, e também ao meu irmão, **Lucas**.

A **Raíssa Ferrari**, amiga e parceira de todas as horas. Agradeço por ter me incentivado quando o desânimo aparecia e por sempre me mostrar um lado positivo em tudo o que acontece.

Aos meus amigos, **Renan Augusto, Júlia Martins, João Gonçalves e Camila Camarotti**, parceiros de graduação e de idas ao Marcão, agradeço os momentos de descontração e a amizade.

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Metabolismo in vitro e Técnicas de Separação (LABMETS), **Daniel, Fernando, Thiago Cavassani, Mariana, Nayara, Simone**, a agregada **Edna** e, em especial, a **Fernanda**, com quem realizei grande parte dos experimentos. Agradeço a amizade, a boa vontade em ajudar com os experimentos e com os problemas rotineiros, além das inúmeras discussões produtivas realizadas e conhecimentos científicos compartilhados.

Ao **Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes**, por ter fornecido a (–)-grandisina e também por permitir a utilização de equipamentos do seu laboratório.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto**, bem como a todos os **professores, técnicos e funcionários**, que de maneira direta ou indireta fizeram parte desses anos de Mestrado.

Às **Agências de Fomento**, Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa (CNPQ) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

HABENSCHUS, M. D. **Estudos de inibição das enzimas do citocromo P450 pelo produto natural (–)-grandisina utilizando microsomas hepáticos de humanos**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A (–)- grandisina (GRA) é um produto natural da classe das lignanas e é encontrada em muitas espécies de plantas das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Por apresentar diversas propriedades biológicas, como atividade tripanocida, anti-inflamatória, antinociceptiva, e principalmente atividade antileucêmica e antitumoral contra tumores de Ehrlich, a GRA pode ser considerada um potencial candidato a fármaco. Porém, para que a GRA se torne um fármaco são necessárias diversas etapas de estudos, incluindo estudos pré-clínicos de interações medicamentosas (DDI). As DDI ocorrem principalmente devido a inibições diretas e tempo-dependentes das enzimas do citocromo P450 (CYP450), uma superfamília de enzimas responsável por metabolizar cerca de 75% dos fármacos em uso. Os estudos pré-clínicos de DDI envolvem o conhecimento do potencial inibitório do candidato a fármaco sobre essas enzimas e esses estudos podem ser realizados empregando diversos modelos *in vitro*, como, por exemplo, microsomas hepáticos de humanos (HLM). Assim, nesse estudo foi avaliado o efeito inibitório da GRA sobre a atividade das principais isoformas do CYP450 e também foram determinadas as isoformas que contribuem para a formação dos metabólitos da GRA. Os resultados demonstraram que múltiplas isoformas participam da formação dos metabólitos da GRA, com destaque para a CYP2C9, que participa da formação de todos os metabólitos. Em relação aos estudos de inibição, foi possível concluir que a GRA é um inibidor fraco da CYP1A2 e CYP2D6, com valores de IC_{50} maiores do que 200 μM e 100 μM , respectivamente, e um inibidor moderado e competitivo da CYP2C9, com IC_{50} igual a 40,85 μM e K_i igual a 50,60 μM . Para a CYP3A4 o potencial inibitório da GRA foi avaliado utilizando dois substratos distintos. A GRA demonstrou ser tanto um inibidor dose-dependente moderado e competitivo dessa isoforma, quanto um inibidor tempo-dependente baseado em mecanismo com potencial de inativação equiparável ao do irinotecano, inibidor baseado em mecanismo clinicamente significativo. Utilizando a nifedipina como substrato os valores de IC_{50} e K_i foram 78,09 μM e 48,71 μM , respectivamente. Já os valores dos parâmetros cinéticos de inativação foram $K_i = 6,40 \mu M$, $k_{inact} = 0,037 \text{ min}^{-1}$ e $Cl_{inact} = 5,78 \text{ mL min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$. Para os ensaios empregando o midazolam os valores de IC_{50} e K_i foram 48,87 μM e 31,25 μM , respectivamente, e os valores dos parâmetros cinéticos de inativação foram $K_i = 31,53 \mu M$, $k_{inact} = 0,049 \text{ min}^{-1}$ e $Cl_{inact} = 1,55 \text{ mL min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$. Com relação a CYP2E1, por sua vez, foi possível observar que a GRA tem capacidade de aumentar a atividade dessa isoforma significativamente a partir da concentração de 4 μM . Portanto, conclui-se que não há risco da GRA apresentar interações medicamentosas com fármacos metabolizados pela CYP1A2 e CYP2D6, enquanto que para a CYP2C9, apesar da GRA ser um inibidor moderado dessa isoforma, o risco é baixo. Já para medicamentos metabolizados pela CYP2E1 e CYP3A4 o risco de DDI existe e isso deve ser cuidadosamente monitorado *in vivo*, principalmente porque a CYP3A4 é a isoforma responsável por catalisar o metabolismo da maioria dos fármacos.

Palavras-chave: (–)-grandisina, metabolismo *in vitro*, inibição enzimática, interações medicamentosas, microsomas hepáticos de humanos, Citocromo P450

ABSTRACT

HABENSCHUS, M. D. **Inhibition studies of cytochrome P450 enzymes by the natural product (–)-grandisin using human liver microsomes.** 2016. 59 f. Dissertation (Master's degree) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

(–)-grandisin (GRA) is a lignanic natural product found in many species of plants from North and Northeast of Brazil. This compound has several biological properties, such as trypanocide, anti-inflammatory, antinociceptive, antileukemia activity and antitumor activity against Ehrlich tumor. Because of these biological properties, GRA is considered a potential drug candidate, however, before becoming a new drug, GRA has to undergo various tests, including preclinical drug-drug interactions (DDI) studies. Most of the times, DDI occur because of direct and time-dependent inhibitions of cytochrome P450 (CYP450) enzymes, an enzyme superfamily responsible for metabolizing the vast majority of drugs administered. Preclinical drug-drug interactions studies involve the evaluation of the potential of a drug candidate to inhibit this superfamily of enzymes and these studies can be conducted using in vitro models, such as human liver microsomes (HLM). Therefore, in this project, the inhibitory effect of GRA on the activity of some CYP450 isoforms was evaluated and the isoforms that catalyze the formation of GRA's metabolites were also determined. Results showed that multiple CYP450 isoforms participate in the GRA's metabolites formation, highlighting CYP2C9, which catalyzes the formation of all metabolites. The inhibition studies showed that GRA is a weak inhibitor of CYP1A2 and CYP2D6, with IC_{50} values greater than 200 μ M and 100 μ M, respectively, and a moderate and competitive inhibitor of CYP2C9, with IC_{50} value equal to 40.85 μ M and K_i value equal to 50.60 μ M. The capability of GRA to inhibit CYP3A4 was evaluated using two different substrates. GRA showed to be a moderate and competitive dose- dependent inhibitor of this isoform and also a mechanism-based time-dependent inhibitor with potential of inactivation comparable to irinotecan, a clinically significant mechanism-based inhibitor. IC_{50} and K_i values obtained using nifedipine as substrate were 78.09 μ M and 48.71 μ M, respectively, and inactivation kinetics parameters were K_I = 6.40 μ M, k_{inact} = 0,037 min^{-1} e Cl_{inact} = 5.78 $\text{mL min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$. On the other hand, IC_{50} and K_i values using midazolam as substrate were 48.87 μ M and 31.25 μ M, respectively, and the values of inactivation kinetics parameters were K_I = 31.53 μ M, k_{inact} = 0,049 min^{-1} and Cl_{inact} = 1.55 $\text{mL min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$. With respect to CYP2E1, it was observed that GRA increases its activity significantly from a concentration of 4 μ M. Therefore, it is possible to conclude that there is no risk of DDI between GRA and drugs metabolized by CYP1A2 and CYP2D6, while for CYP2C9, although GRA is a moderate inhibitor of this isoform, the risk is low. Finally, for drugs metabolized by CYP3A4 and CYP2E1 there is risk of DDI and this should be carefully monitored in humans, mainly because CYP3A4 is an isoform responsible for catalyzing the metabolism of most drugs in use.

Keywords: (–)-grandisin, in vitro metabolism, Enzyme inhibition, drug-drug interactions, human liver microsomes, cytochrome P450

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da (–)-grandisina (SCIFINDER WEB, 2015).	3
Figura 2- Contribuição das principais enzimas humanas para o metabolismo de medicamentos, com destaque para as isoformas do citocromo P450. UGT, FMO, MAO e NAT são as siglas para as enzimas Uridina- Difosfato- Glicuronosil- Transferases, Flavina monooxigenases, Monoamina oxidases e N-acetiltransferases, respectivamente (adaptado de GUENGERICH, 2008).	6
Figura 3- Processo de obtenção dos microsomas hepáticos de humanos (adaptado de Corning® Tissue Fractions).	8
Figura 4- Diferentes perfis cinéticos encontrados para as reações catalisadas pelas enzimas do CYP450: A) Perfil hiperbólico de Michaelis- Menten, B) Perfil sigmoidal de Hill, C) Perfil bifásico e D) Perfil convexo de inibição pelo substrato.	17
Figura 5- Gráfico da porcentagem de atividade enzimática remanescente em função da concentração de inibidor. O valor de IC_{50} pode ser determinado graficamente como ilustrado (adaptado de COOPELAND, 2000).	18
Figura 6- Esquema para a inibição competitiva (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), sendo: K_s a constante de dissociação do ES em enzima livre e substrato e K_i a constante de dissociação do EI em enzima livre e inibidor.	21
Figura 7- Esquema para a inibição incompetitiva (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), sendo K_s a constante de dissociação do ES em enzima livre e substrato, K_i aparente a constante de dissociação do ESI em ES e inibidor.	22
Figura 8- Esquema para a inibição mista (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), sendo K_s a constante de dissociação do ES em enzima livre e substrato, αK_s a constante de dissociação do ESI em EI e substrato, K_i a constante de dissociação do EI em enzima livre e inibidor, αK_i a constante de dissociação do ESI em ES e inibidor e α o fator que reflete o efeito do inibidor na afinidade da enzima pelo substrato e também o efeito do substrato na afinidade da enzima pelo inibidor.	24
Figura 9- Esquema para a inibição não-competitiva (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), sendo K_s a constante de dissociação do ES em enzima livre e substrato ou do ESI em EI e substrato e K_i a constante de dissociação do EI em enzima livre e inibidor ou do ESI em ES e inibidor.	24

Figura 11- Gráfico de duplo-recíproco característico para **A)** inibição competitiva, **B)** inibição incompetitiva, **C)** inibição mista e **D)** inibição não-competitiva, adaptado de RING, WRIGHTON e MOHUTSKY, 2014, sendo v_0 a velocidade inicial da reação, **[Substrato]** a concentração de substrato e **[Inibidor]** a concentração de inibidor..... 27

Figura 12- Exemplo de gráfico secundário do gráfico de duplo-recíproco (adaptado de COPELAND, 2000). 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Importantes propriedades biológicas já relatadas da (–)-grandisina.	3
Tabela 2- Patentes relacionadas a (–)- grandisina.	5
Tabela 3- Inibidores seletivos das isoformas do citocromo P450 (U.S FDA, 2014).....	9
Tabela 4- Exemplos de interações medicamentosas comuns envolvendo inibição das enzimas do CYP450 (adaptado de LYNCH e PRICE, 2007).....	11
Tabela 5- Possíveis reações específicas catalisada pelas isoformas do CYP450 a serem monitoradas nos estudos in vitro de interações medicamentosas e os metabólitos formados (U.S FDA, 2014).	13
Tabela 6- Exemplos de inibidores seletivos das isoformas do citocromo P450 (U.S FDA, 2014).....	19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG	Cromatografia gasosa
CYP450	do inglês, <i>cytochrome P450</i> , citocromo P450
DAD	Detector de arranjo de diodos
[E]	Concentração de enzima
EM	Espectrômetro de massas
EI	Complexo enzima-inibidor
ELL	Extração líquido- líquido
ES	Complexo enzima-substrato
ESI	Complexo enzima-substrato-inibidor
EUA	Estados Unidos da América
[Inibidor]	Concentração de inibidor
IC ₅₀	Concentração de um composto que inibe em 50% a atividade de uma determinada enzima
DDI	do inglês, <i>drug-drug interactions</i> , interações medicamentosas
I.S	Inibidores seletivos das isoformas do citocromo P450
EMA	do inglês, <i>European Medicines Agency</i> , agência europeia de avaliação de produtos medicinais
FDA	Food and Drug Administration
GRA	(-)-grandisina
H	Coeficiente de Hill ou grau de cooperatividade
HPLC	do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
K _i	Constate de inibição reversível; constante de dissociação do complexo enzima- inibidor ou do complexo enzima-substrato-inibidor

K_i	Concentração de inibidor necessária para alcançar metade da velocidade máxima de inativação para inibição irreversível
k_{inact}	Velocidade máxima de inativação para a inibição irreversível
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_s	Constante de dissociação do complexo ES
HLM	do inglês, <i>Human liver microsomes</i> , microssomas hepáticos de humanos
m/z	Razão massa carga
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
P.N	Produto Natural
P.I	Padrão Interno
PP	Precipitação proteica
[S]	Concentração de Substrato
[Substrato]	Concentração de Substrato
v_0	Velocidade Inicial da reação
V_{max}	Velocidade Máxima da reação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PRODUTOS NATURAIS NA MEDICINA.....	1
1.2. LIGNANAS.....	2
1.3. (-)- GRANDISINA.....	2
1.4. AS ENZIMAS DO CITOCROMO P450 E O METABOLISMO DE FÁRMACOS.....	5
1.5. ESTUDOS DE FENOTIPAGEM.....	8
1.6. ESTUDOS IN VITRO DE INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS.....	10
1.6.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	14
1.6.2. CURVAS DE DOSE-RESPOSTA.....	17
1.6.3. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA REVERSÍVEL.....	20
<i>1.6.3.1. MECANISMOS REVERSÍVEIS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA</i>	<i>21</i>
<i>1.6.3.2. DETERMINAÇÃO GRÁFICA DO MECANISMO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO</i>	<i>25</i>
1.6.4. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA TEMPO-DEPENDENTE.....	28
<i>1.6.4.1. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA BASEADA EM MECANISMO</i>	<i>28</i>
2. CONCLUSÃO.....	31
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUTOS NATURAIS NA MEDICINA

Ao longo dos anos, os produtos naturais (P.N), que são compostos produzidos por plantas, animais e micro-organismos (DA SILVA; RODRIGUES, 2014), têm sido associados com significantes benefícios à saúde, como o tratamento e prevenção de várias doenças humanas, tais como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, Alzheimer e infecções patogênicas (MORA- PALE et al., 2014).

Esse amplo emprego dos P.N na medicina se deve, principalmente, ao fato de que estes produtos são fontes diretas de compostos bioativos, e também ao fato de que muitos P.N com propriedades biológicas comprovadas são o ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos (BAUER; BRONSTRUP, 2014), uma vez que suas estruturas químicas servem de base para o planejamento de rotas sintéticas que levam a produção de compostos que então são usados como fármacos (BOLZANI et al., 2012).

Nesse contexto e devido a necessidade de se descobrir novos medicamentos para o tratamento das mais diversas enfermidades que surgem constantemente, a exploração da biodiversidade em ambientes tropicais e equatoriais é uma importante ferramenta de obtenção de compostos biologicamente ativos que podem ser usados na medicina.

O Brasil, que possui diversos biomas importantes, tais como a Floresta Amazônica, a Mata Atlântica e o Cerrado, é considerado um ambiente de destaque para essa exploração (BOLZANI et al., 2012), uma vez que é fonte de importantes compostos, como o alcaloide tubocucarina, um composto isolado de uma planta brasileira (*Chondodendron tomentosum*) e que foi por muitos anos amplamente empregado como relaxante muscular, além de ter sido utilizado como modelo para a produção de medicamentos similares (DA SILVA; RODRIGUES, 2014).

Dessa forma, com base nas características e propriedades dos produtos naturais e também com base na ampla disponibilidade destes produtos na fauna e flora brasileira, fica evidente o potencial que compostos químicos provenientes de P.N de biomas brasileiros têm para se tornarem fármacos.

1.2. LIGNANAS

Uma importante classe de P.N é a classe da lignanas. As lignanas são metabólitos secundários relacionados bioquimicamente com o metabolismo da fenilalanina e que são obtidos a partir de derivados do ácido cinâmico (MOSS, 2000).

Esses compostos podem ser encontrados em diversas partes morfológicas de mais de 60 famílias de plantas vasculares (GORDALIZA et al., 2004), como o xilema, raízes, flores, folhas, caules, frutos, rizomas e sementes (ZHANG et al., 2014) e são produzidos quando estas partes sofrem lesões mecânicas ou o ataque de micro-organismos, acumulando-se em suas estruturas para atuar na sua defesa como agentes antimicrobianos e agentes antifúngicos (CARVALHO et al., 2010).

Plantas com grande quantidade de lignanas já vêm sendo utilizadas na medicina popular há muitos anos em países como China e Japão, e isso ocorre porque, além de atuarem na defesa dessas plantas, as lignanas apresentam numerosas atividades biológicas comprovadas, como propriedades anti-inflamatórias, hepatoprotetoras, anti-hipertensivas, sedativas, antioxidantes e antitumorais (CUNHA et al., 2012). Devido a essas propriedades, essa classe de compostos é atualmente alvo de pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos (ZHANG et al., 2014), e nesse quesito, a (–)-grandisina (GRA) merece destaque.

1.3. (–)- GRANDISINA

A (–)-grandisina (**Figura 1**) é uma lignana tetraidrofurânica encontrada em muitas espécies de plantas, como as espécies *Virola surinamensis*, *Kadsura longipedunculata*, *Virola mollissima* e *Piper solmsianum* (LOPES; KATO; YOSHIDA, 1999; PU et al., 2008; MORAIS et al., 2009; RAMOS; KATO, 2012).

Figura 1- Estrutura química da (–)-grandisina (SCIFINDER WEB, 2015).

Essas espécies de plantas apresentam histórico de serem utilizadas na medicina popular local para o tratamento de cólicas, inflamações, reumatismo, dispepsia e disfunções do fígado (CARVALHO et al., 2010) e, por isso, alguns estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar e comprovar as propriedades biológicas da GRA (Tabela 1).

Tabela 1- Importantes propriedades biológicas já relatadas da (–)-grandisina.

Atividade Biológica	Alvo	Referência
Tripanocida	<i>Trypanossoma cruzi</i>	LOPES et al., 1998
		MARTINS et al., 2003
		BERNARDES et al., 2006
		SCHMIDT et al., 2012
Larvicida	Larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	CABRAL et al., 2009
		LEITE et al., 2012
Antinociceptiva e Anti-inflamatória	Dor induzida em camundongos	CARVALHO et al., 2010
Antimalárica	<i>Plasmodium falciparum</i>	ZHANG et al., 2001
Citotóxica e antiangiogênica	Células de tumor de Ehrlich	VALADARES et al., 2009
Citotóxica e indutora de apoptose	Células eritroleucêmicas humanas da linhagem K-562 com fenótipo de resistência a fármacos	MENEZES, 2009
Quimioprotetora	Fragmentações cromossômicas provocadas pela ciclofosfamida	VALADARES et al., 2011

Em ensaios realizados por Lopes e colaboradores (1998), uma concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GRA provocou, após incubação por 24 horas, a lise total de células do parasita responsável pela doença de Chagas, doença que atualmente atinge, além de países da América Central e América do Sul, países da América do Norte, Europa e Ásia (COURA, 2015). Posteriormente, todas as amostras foram inoculadas em ratos saudáveis e não se observou o desenvolvimento de parasitemia, comprovando então a eficiência desse composto contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*, o que corrobora com os resultados obtidos por Bernardes et al. (2006).

Em 2012, Kato e colaboradores verificaram que a GRA provoca mudanças morfológicas e toxicidade em larvas do mosquito transmissor da dengue e atual transmissor do vírus Zika e da febre Chikungunya, o *Aedes aegypti*, comprovando a atividade larvicida que havia sido proposta por Cabral et al. (2009). Já Zhang e colaboradores, em 2001, comprovaram que a GRA apresenta, além de atividade larvicida, também atividade antimalarial moderada contra o *Plasmodium falciparum*.

Em 2009, por sua vez, Menezes comprovou que a GRA induz citotoxicidade e apoptose em células eritroleucêmicas humanas da linhagem K-562 com fenótipo de resistência a fármacos, indicando a capacidade que esse composto tem de combater a leucemia.

Além disso, também em 2009, Valadares e colaboradores concluíram, através de ensaios in vitro, que a GRA induz a citotoxicidade e efeitos antiangiogênicos em ratos portadores de tumores de Ehrlich, agindo contra o crescimento desses tumores e, consequentemente, prolongando a vida dos hospedeiros. Enquanto isso, em 2010, Carvalho e colaboradores comprovaram que a GRA diminuiu a dor induzida em camundongos devido a sua atividade anti-inflamatória.

Por fim, mais recentemente, estudos também empregando camundongos apontaram que a GRA possui, dependendo da dose, efeito quimioprotetor, uma vez que inibe fragmentações cromossômicas provocadas pela ciclofosfamida, um composto indutor de mutagenicidade. Este efeito pode estar associado, ao menos em partes, com a bioativação da GRA e com a sua atividade antioxidante, o que leva a uma inibição de danos oxidativos ao DNA. Tais danos estão fortemente relacionados com o surgimento de câncer (VALADARES et al., 2011), o que enaltece mais uma vez a propriedade antitumoral desse composto.

Devido a essas diversas propriedades biológicas, algumas patentes envolvendo o nome da GRA já foram solicitadas até o momento (**Tabela 2**), com destaque para a

patente intitulada “composição farmacêutica com propriedades antitumoral, citotóxica, indutora de apoptose, antimetastásica e antiangiogênica”, obtida pela Universidade Federal de Goiás em julho de 2010.

Tabela 2- Patentes relacionadas a (–)- grandisina.

Título	Titular	Data da Publicação	Número da Patente
Produção das lignanas tetraidrofurânicas veraguensina e grandisina e uso contra o <i>Trypanosoma cruzi</i>	Universidade de São Paulo (USP)	Abr/2001	BR9903472
Uso de um derivado de tetraidrofurano como repelente	Fundação Oswaldo Cruz, Brasil	Jul/2008	BR2006-4786
Composição farmacêutica com propriedades antitumoral, citotóxica, indutora de apoptose, antimetastásica e antiangiogênica	Universidade Federal de Goiás (UFG)	Jul/2010	BR2008004816

Logo, é evidente o potencial que a GRA apresenta para se tornar um novo fármaco, principalmente devido a sua atividade antitumoral. Entretanto, para que isso aconteça, a GRA tem que ser submetida a diversas etapas de estudos, incluindo estudos pré-clínicos que avaliem seu comportamento frente as enzimas do citocromo P450.

1.4. AS ENZIMAS DO CITOCROMO P450 E O METABOLISMO DE FÁRMACOS

A eliminação de um fármaco pelo corpo ocorre ou por excreção do medicamento sem que ocorram modificações, ou por processos de biotransformação catalisados por diversas famílias de enzimas e que levam a formação de um ou mais metabólitos (WIENKERS; STEVENS, 2003).

introduzido na molécula original, tornando-a mais polar, o que geralmente, porém nem sempre, termina sua ação farmacológica. As reações químicas mais comuns nessa fase são hidroxilação aromática, hidroxilação alifática, *N*-desalquilação oxidativa, *O*-desalquilação oxidativa, *S*-oxidação, redução e hidrólise. Já nas reações de fase II o produto obtido na fase I, ou o próprio substrato, é convertido em produtos mais polares por conjugação com grupos endógenos hidrofílicos tais como ácido glicurônico (CRETOL; PETROVIC; MURRAY, 2010).

Devido a relevância que as enzimas do CYP450 tem nas reações de fase I do metabolismo de fármacos, recomenda-se a realização de estudos *in vitro* que possibilitem conhecer o comportamento metabólico de candidatos a fármaco frente a essas enzimas.

Uma vez que o fígado é o principal órgão alvo para o metabolismo de fármacos e frações subcelulares hepáticas são relativamente fáceis de serem obtidas (WU; MCKOWN, 2004), diversos modelos experimentais *in vitro* podem ser empregados nesses estudos, tais como microssomas hepáticos, frações S9, frações citosólicas, hepatócitos e isoformas recombinantes do CYP450 (ASHA; VIDYAVATHI, 2010). Esses modelos permitem uma aproximação do metabolismo *in vivo* e tem diversas vantagens frente a estudos realizados com animais, tais como a simplicidade de execução do experimento, a utilização de pequenas quantidades da substância a ser avaliada e o custo relativamente razoável dos estudos. Além disso, um dos principais motivos para a utilização de modelos *in vitro* está relacionado com as razões éticas, pois esses modelos podem ser utilizados inicialmente para a avaliação de um candidato a fármaco e, com isso, diminuem sensivelmente a utilização de animais (STEPAN; MASCITTI, et al., 2013).

Dentre os modelos *in vitro* citados anteriormente os microssomas hepáticos de humanos (HLM) é o modelo mais empregado (ASHA; VIDYAVATHI, 2010), pois é rico em isoformas do CYP450 e contém todas as enzimas expressadas no fígado e que são responsáveis pelo metabolismo de fármacos. Além disso, a quantidade de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido-Citocromo P450 redutase (NADPH-CYP redutase) e de citocromo b5 nos microssomos hepáticos de humanos é a mesma encontrada em um fígado intacto, assim como os lipídios, que também são os mesmos (OGILVIE et al., 2008).

Esse modelo é composto de fragmentos do retículo endoplasmático liso de células hepáticas e é preparado através da homogeneização de pedaços do fígado de diversos doadores, seguido por etapas de centrifugação diferenciada (**Figura 3**) que têm como

objetivo remover membranas nucleares e celulares, bem como organelas celulares (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

Figura 3- Processo de obtenção dos microsossomas hepáticos de humanos (adaptado de Corning® Tissue Fractions).

Na primeira etapa de centrifugação, que é realizada em uma velocidade baixa, se obtém a fração S9, constituída tanto por enzimas de fase I, quanto por enzimas de fase II do metabolismo. Na segunda etapa de centrifugação, também realizada em velocidade baixa, se obtém a fração citosólica, constituída, por sua vez, por enzimas de fase II do metabolismo. Por fim, na última etapa de centrifugação, realizada em alta velocidade, se obtém, no precipitado, os pellets de microsossomas (COLEMAN, 2010).

Através do uso de HLM em estudos *in vitro* é possível, por exemplo, a identificação das isoformas do CYP450 envolvidas no metabolismo de um candidato a fármaco, denominado como estudo de fenotipagem, além de ser possível também a avaliação do potencial que esse composto tem de inibir as principais isoformas do CYP450 e, conseqüentemente, causar possíveis interações medicamentosas (GUNARATNA, 2000).

1.5. ESTUDOS DE FENOTIPAGEM

Fármacos cuja eliminação do organismo ocorre através do metabolismo estão sujeitos a provocar efeitos graves no paciente caso ocorram mudanças em uma determinada rota metabólica. Esses efeitos são ainda mais pronunciados se o metabolismo de um fármaco é catalisado por uma única enzima, uma vez que variabilidades genéticas interindividuais na expressão desta enzima levam a diferenças significativas na exposição

ao fármaco (WIENKERS; STEVENS, 2003). Devido a isso, estudos de fenotipagem, também chamados estudos de mapeamento enzimático, são muito importantes, pois visam identificar quais enzimas são responsáveis por catalisar as reações envolvidas no metabolismo de um fármaco (OGILVIE et al., 2008). A realização desses estudos é recomendada nas etapas iniciais de pesquisa e desenvolvimento de um medicamento, uma vez que através dos resultados se obtêm informações acerca da rota de eliminação desse composto e também acerca de possíveis interações com inibidores ou indutores dessa rota.(LI, 2008).

Os estudos de fenotipagem relacionados com as enzimas do CYP450 podem ser realizados empregando HLM e condições experimentais que inibam as rotas de biotransformação. Para isso, o composto em estudo é incubado, juntamente com HLM, na presença e na ausência de inibidores seletivos (I.S) das isoformas do CYP450. O composto em estudo é adicionado em uma concentração próxima ao valor de K_m de sua reação de degradação com o intuito de simular condições fisiológicas, em que a concentração utilizada in vivo dificilmente será acima do valor de K_m . Já os inibidores são adicionados em concentrações que garantam um potencial inibitório adequado, assim como uma especificidade de inibição da isoforma avaliada (OGILVIE et al., 2008).

Tabela 3- Inibidores seletivos das isoformas do citocromo P450 (*U.S FDA, 2014*).

Isoforma	Inibidor seletivo
CYP1A2	α -naftoflavona
CYP2A6	Tranilcipromina
CYP2C9	Sulfafenazol
CYP2C19	Ticlopidina
CYP2D6	Quinidina
CYP2E1	Dietilditiocarbamato
CYP3A4	Cetoconazol

Além disso, também deve-se adicionar ao meio de incubação nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), que é o cofator necessário para que as reações de fase I do metabolismo ocorram. Esse cofator é formado durante a etapa oxidativa da via das pentoses fosfato, em que a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase catalisa a reação de conversão da glicose 6-fosfato em ribose 5-fosfato, liberando hidrogênio e reduzindo a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato que estava na forma

oxidada (NADP^+) (NELSON; COX, 2002). O NADPH que se forma é então responsável por doar elétrons para que as reações aconteçam e, por ser um reagente limitante da reação, deve sempre ser adicionado em excesso.

Assim, nesses estudos, se o I.S inibe a reação de biotransformação do candidato a fármaco, pode-se concluir que a enzima responsável por catalisar tal reação está consequentemente envolvida no metabolismo do composto em análise. Por exemplo, se o cetoconazol, um inibidor potente e seletivo da CYP3A4, inibe a reação de biotransformação de um candidato a fármaco, conclui-se então que a CYP3A4 está envolvida no seu metabolismo (LI, 2008).

1.6. ESTUDOS IN VITRO DE INTERAÇÕES MEDICAMENTOSAS

O desenvolvimento de um novo agente terapêutico envolve muitas etapas de estudo, incluindo um estágio pré-clínico em que as principais propriedades do candidato a fármaco, tais como a farmacodinâmica, farmacocinética e propriedades toxicológicas são investigadas. Essas investigações são baseadas tanto em experimentos *in vitro*, quanto em experimentos *in vivo* utilizando diversas espécies de animais (ASHA; VIDYAVATHI, 2010).

O potencial que um medicamento tem de interagir com outros é um assunto de grande interesse da área da saúde, uma vez que as interações medicamentosas (DDI) são responsáveis por até 20% de todas as reações adversas a medicamentos e estão relacionadas com as propriedades toxicológicas do composto (BACHMANN; RING; WRIGHTON, 2003). Tais DDI ocorrem quando o efeito de um medicamento é alterado por outro e o risco de que elas ocorram está associado com a idade avançada do paciente, a prática de polifarmácia e o fato de que um único paciente é, na maioria das ocasiões, acompanhado por diversos médicos que desconhecem todos os medicamentos que este paciente faz uso (DECHANONT et al., 2014).

A grande maioria das DDI ocorrem, principalmente, devido a inibições diretas e inibições tempo-dependentes das enzimas do CYP450 (STEPAN et al., 2013). As inibições diretas ocorrem através de interações reversíveis entre a enzima e o inibidor, enquanto que as inibições tempo-dependentes envolvem interações irreversíveis ou quase-irreversíveis (OGILVIE et al., 2008).

Caso um composto que inibe significativamente as enzimas do CYP450 se torne um fármaco, ele pode modificar o metabolismo hepático de um outro medicamento que é metabolizado por essas enzimas, levando então ao acúmulo deste no organismo do paciente. Se o acúmulo ocorrer fora da janela terapêutica, que é o intervalo de concentração capaz de assegurar a eficácia do fármaco sem que haja efeitos tóxicos (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012), a toxicidade pode ser observada, sendo necessário, em alguns casos, retirar o medicamento do mercado (GUENGERICH, 2008), como foi o caso da Terfenadina (Seldane®), Mibefradil (Posicor®) e Cerivastatina (Baycol®), por exemplo, que foram retirados de mercado nos Estados Unidos em fevereiro de 1998, junho de 1998 e agosto de 2001, respectivamente (LYNCH; PRICE, 2007). Além desses casos, diversos outros exemplos de interações medicamentosas devido a inibições das enzimas do CYP450 já foram relatados (**Tabela 4**).

Tabela 4- Exemplos de interações medicamentosas comuns envolvendo inibição das enzimas do CYP450 (adaptado de LYNCH e PRICE, 2007).

Isoforma Afetada	Fármaco inibidor	Fármaco cujo metabolismo é afetado	Possível Efeito clínico
CYP3A4	Claritromicina	Verapamil	Hipotensão devido ao aumento da concentração de Verapamil no organismo
	Eritromicina		
	Telitromicina		
CYP3A4	Diltiazem	Prednisona	Imunossupressão devido ao aumento da concentração de Prednisona no organismo
CYP2D6	Paroxetina	Tramadol	Diminuição do efeito analgésico do Tramadol devido a diminuição da concentração de metabólitos ativos
CYP2C9	Metronidazol	Varfarina	Risco de hemorragia devido ao aumento da concentração de Varfarina no organismo
CYP2D6	Terbinafina	Amitriptilina	Boca seca, tontura e problemas cardíacos devido ao aumento da concentração de amitriptilina no organismo

Então, com o intuito de evitar que um medicamento provoque reações adversas e também com o intuito de evitar que muito dinheiro seja gasto na pesquisa de um medicamento que será reprovado nas últimas etapas de seu desenvolvimento, tornou-se muito importante e rotineiro realizar, nas etapas iniciais, estudos *in vitro* que avaliem o potencial que um candidato a fármaco tem de causar interações medicamentosas. Quanto mais cedo se identifica esse potencial, maior a probabilidade de serem feitas, por exemplo, modificações na molécula para eliminar a sua propriedade deletéria (OBACH; WALSKY; VENKATAKRISHNAN, 2006).

Esses estudos são recomendados por agências reguladoras, como a agência norte-americana, *Food and Drug Administration* (FDA), e a agência europeia de avaliação de produtos medicinais, *European Medicines Agency* (EMA), que enfatizam que estudos *in vitro* de interações medicamentosas nas fases iniciais de pesquisa de candidatos a fármaco são extremamente importantes (NASSAR; HOLLENBERG; SCATINA, 2000).

Os estudo *in vitro* de interações medicamentosas são realizados, basicamente, monitorando uma reação específica catalisada pelas isoformas do CYP450 que tenha parâmetros cinéticos bem definidos (Velocidade máxima da reação, V_{max} , e a constante de Michaelis-Menten, K_m). Isso é feito incubando, por um tempo pré-estabelecido, um substrato específico da isoforma estudada juntamente com o composto avaliado, HLM e NADPH. Esses substratos normalmente são escolhidos de acordo com sua seletividade, ou seja, se ele é predominantemente metabolizado pela isoforma estudada, e também de acordo com a disponibilidade de padrões analíticos puros no mercado tanto do substrato, quanto do metabólito formado (**Tabela 5**).

Quando a incubação é terminada, normalmente pela adição de solvente orgânico, monitora-se então a formação de um metabólito específico da reação utilizando técnicas analíticas, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (CG) acopladas ao espectrômetro de massas (EM), detector de arranjo de diodos (DAD) e detector de fluorescência, por exemplo.

Com os resultados obtidos verifica-se então o efeito que o composto em análise tem na atividade da enzima através da determinação de importantes parâmetros, tais como a concentração deste composto que inibe em 50% a atividade da isoforma estudada (IC_{50}), além dos mecanismos de inibição e das constantes de inibição.

Tabela 5- Possíveis reações específicas catalisada pelas isoformas do CYP450 a serem monitoradas nos estudos in vitro de interações medicamentosas e os metabólitos formados (*U.S FDA, 2014*).

Isoforma	Reação específica	Metabólito
CYP1A2	<i>O</i> -desetilação da Fenacetina	Acetaminofeno
	<i>N3</i> -desmetilação da Cafeína	Paraxantina
	<i>O</i> -desetilação da Etoxiresorufina	Resorufina
CYP2A6	7-hidroxilação da Cumarina	7-hidroxycumarina
	<i>C</i> -oxidação da nicotina	Cotina
CYP2B6	Hidroxilação da bupropiona	Hidroxibupropiona
	<i>N</i> -desmetilação da <i>S</i> -mefenitoína	Nirvanol
CYP2C8	6 α -hidroxilação do Paclitaxel	6 α - hidroxipaclitaxel
	<i>N</i> -desetilação da Almoaquina	<i>N</i> -desetilalmoaquina
	<i>p</i> -hidroxilação da Rosiglitazona	<i>p</i> -hidroxirosiglitazona
CYP2C9	Metil-hidroxilação da Tolbutamida	4-hidroxitolbutamina
	4'-hidroxilação do Diclofenaco	4'-hidroxiclofenaco
CYP2C19	4-hidroxilação da <i>S</i> -mefenitoína	4-hidroximefenitoína
	5-hidroxilação do Omeprazol	5-hidroxiomeprazol
CYP2D6	<i>O</i> -desmetilação do Dextrometorfano	Dextrorfano
	1'-hidroxilação do ($\pm$)-bufuralol	1'-hidroxibufuralol
CYP2E1	6-hidroxilação da Clorzoxazona	6-hidroxiclorzoxazona
	4-hidroxilação da Anilina	4-hidroxianilina
CYP3A4	1'-hidroxilação do Midazolam	1'-hidroximidazolam
	6 β -hidroxilação da Testosterona	6 β -hidroxitestosterona
	Oxidação da Nifedipina	Deidronifedipina

1.6.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para obter resultados válidos nos estudos in vitro de interações medicamentosas é necessário se ter, previamente, um entendimento da reação específica de biotransformação que será possivelmente inibida (**Tabela 5**) (BACHMANN; RING; WRIGHTON, 2003). Para se ter esse entendimento são determinados, inicialmente, os parâmetros cinéticos da reação que está sendo avaliada e então esses parâmetros são empregados nos posteriores estudos de inibição.

Define-se cinética enzimática como a área da bioquímica que estuda a velocidade das reações catalisadas por enzimas e como essa velocidade se altera em função de mudanças de parâmetros experimentais, tais como a concentração de substrato. Nesses estudos se mede a velocidade inicial da reação (v_0) quando a concentração de substrato ($[S]$) é muito maior do que a concentração de enzimas ($[E]$). Assim, se o tempo de reação for suficientemente curto, as mudanças na $[S]$ serão desprezíveis, e, portanto a $[S]$ pode ser considerada constante (NELSON; COX, 2002). Além disso, em condições que garantam o monitoramento de v_0 , a formação de um determinado produto será linear de acordo com o tempo de reação e a concentração de proteína empregada (ARGIKAR; NAGAR, 2014).

As reações catalisadas pelas enzimas do CYP450 seguem, na maioria das vezes, o modelo mais simples de cinética enzimática, que é o modelo cinético de estado estacionário desenvolvido por Michaelis e Menten em 1913. Nesse modelo, a reação é catalisada por uma enzima que tem um único sítio de ligação, ou múltiplos sítios de ligação independentes (**Equação 1**).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

em que, v – velocidade inicial da reação enzimática, V_{max} – velocidade máxima da reação enzimática, $[S]$ – concentração de substrato e K_m – constante de Michaelis-Menten.

Além disso, na cinética de Michaelis-Menten, assume-se que é estabelecido um equilíbrio rápido entre os reagentes ($E+S$) e o complexo enzima- substrato (ES), sendo as velocidades de formação e de consumo de ES rápidas e iguais. Em seguida, há uma conversão lenta de ES novamente em enzima livre e produto(s) (**Equação 2**) e essa etapa,

por ser a de menor velocidade, é considerada como limitante. Então, a velocidade da reação deve ser proporcional a concentração de ES.

em que, **E** – enzima, **S** – substrato, **ES** – complexo enzima-substrato e **P** – produto.

No modelo de Michaelis-Menten é característico que a velocidade da reação varie praticamente de forma linear com a concentração de substrato, em concentrações baixas, até que, em concentrações muito maiores do que o valor de K_m , a enzima atinge condições de saturação e, a partir daí, aumentos na concentração de substrato não provocam significantes aumentos na velocidade (SEIBERT; TRACY, 2014). Consequentemente, o perfil que expressa a relação entre $[S]$ e v_0 se aproxima de uma hipérbole retangular (**Figura 4A**), sendo V_{max} a velocidade máxima obtida durante a reação e K_m (constante de Michaelis-Menten) a concentração de substrato na qual v_0 é igual a metade de V_{max} .

Porém, as enzimas do CYP450 metabolizam uma grande variedade de substratos devido a necessidade que o corpo tem de biotransformar diferentes classes de compostos xenobióticos aos quais somos diariamente expostos, sendo cataliticamente menos efetivas do que outras enzimas (SEIBERT; TRACY, 2014). Além disso, as enzimas do CYP450 apresentam sítios-ativos maiores e menos específicos e, devido a isso, podem ocorrer ligações simultâneas de múltiplas moléculas de substrato nos sítios ativos dessas enzimas, ou então a ligação de moléculas de substrato em mais de um sítio, levando ao aparecimento de perfis cinéticos atípicos, tais como o perfil sigmoidal, bifásico e o perfil de inibição pelo substrato.

No perfil sigmoidal (**Figura 4B**), também chamado de cooperativismo homotrópico positivo (HUTZLER; TRACY, 2001), a ligação de uma molécula de substrato ao sítio ativo da enzima provoca mudanças conformacionais ou eletrônicas em sua estrutura. Essas mudanças fazem com que os demais sítios, também chamado de sítios alostéricos, apresentem uma maior afinidade pelo substrato, ou então se tornem ativos, sendo a ligação do substrato responsável por aumentar a atividade da enzima (auto ativação) (KORZEKWA, 2008).

Esse perfil foi explicado pela primeira vez por Hill (**Equação 3**), em 1910, através de um modelo em que S_{50} equivale a concentração de substrato na qual v_0 é metade de V_{max} , ou seja, é equivalente a K_m , e n é denominado grau de cooperatividade.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^n}{S_{50}^n + [S]^n} \quad (3)$$

em que v é a velocidade inicial da reação enzimática, V_{max} a velocidade máxima da reação enzimática, $[S]$ a concentração de substrato, S_{50} a concentração de substrato em que v_0 é metade de V_{max} e n é o grau de cooperatividade.

Já no perfil bifásico (**Equação 4**), por sua vez, as reações são catalisadas por mais de uma enzima, ou por enzimas com mais de um sítio de ligação. Em ambos os casos, há uma diferença de afinidade das enzimas ou dos sítios de ligação pelo substrato (SEIBERT; TRACY, 2014), ou seja, durante a reação há a contribuição de um componente de alta afinidade pelo substrato e de um componente de baixa afinidade pelo substrato.

$$v = \frac{V_{max1}[S]}{K_{m1} + [S]} + \frac{V_{max2}[S]}{K_{m2} + [S]} \quad (4)$$

em que v é a velocidade inicial da reação enzimática, V_{max1} a velocidade máxima da reação catalisada pela enzima ou sítio de ligação que tem alta afinidade pelo substrato, K_{m1} a constante de Michaelis-Menten relacionada a enzima ou sítio de ligação que tem alta afinidade pelo substrato, $[S]$ a concentração de substrato, V_{max2} a velocidade máxima da reação catalisada pela enzima ou sítio de ligação que tem baixa afinidade pelo substrato e K_{m2} a constante de Michaelis-Menten relacionada a enzima ou sítio de ligação que tem baixa afinidade pelo substrato

Nesse modelo (**Figura 4C**), inicialmente, o perfil cinético relacionado com a enzima, ou sítio de ligação, que tem alta afinidade pelo substrato é caracterizado por um aumento na velocidade da reação proporcional ao aumento da concentração de substrato, assim como no perfil cinético de Michaelis- Menten. Porém, em condições experimentais, na maioria das vezes não é possível atingir a saturação da enzima, ou do sítio de ligação, que tem baixa afinidade pelo substrato devido a limites de solubilidade. Então, até mesmo em concentrações elevadas de substrato, a velocidade da reação continua a variar de maneira linear e proporcional a concentração deste (HUTZLER; TRACY, 2001).

Por fim, o perfil cinético denominado inibição pelo substrato aparece quando a velocidade da reação passa a diminuir a medida que uma determinada concentração de substrato foi alcançada, resultando em um perfil convexo (**Figura 4D**) (HUTZLER; TRACY, 2001). Isso ocorre, provavelmente, porque a ligação de moléculas de substrato

em outros sítios de ligação, chamados de sítios inibitórios, provocam mudanças na estrutura da enzima que diminuem a taxa de conversão do substrato em produto (SEIBERT; TRACY, 2014).

Figura 4- Diferentes perfis cinéticos encontrados para as reações catalisadas pelas enzimas do CYP450: **A)** Perfil hiperbólico de Michaelis- Menten, **B)** Perfil sigmoidal de Hill, **C)** Perfil bifásico e **D)** Perfil convexo de inibição pelo substrato.

1.6.2. CURVAS DE DOSE-RESPOSTA

Frequentemente, nos estudos de inibição das enzimas do citocromo P450, determina-se inicialmente a concentração do candidato a fármaco necessária para inibir em 50% a atividade da enzima avaliada (IC_{50}), uma vez que esses ensaios são mais simples e tendem a servir de base para ensaios futuros (OGILVIE et al., 2008).

O valor de IC_{50} é obtido a partir de curvas de dose-resposta (**Figura 5**), que são gráficos que avaliam o efeito que mudanças na concentração de um composto provocam em um determinado sinal (COPELAND, 2000). Os dados para a construção desse gráfico

são obtidos incubando uma única concentração de substrato (geralmente equivalente ao valor de K_m para uma reação específica) com diversas concentrações do composto em estudo (LI, 2008).

Figura 5- Gráfico da porcentagem de atividade enzimática remanescente em função da concentração de inibidor. O valor de IC_{50} pode ser determinado graficamente como ilustrado (adaptado de COOPELAND, 2000).

Os valores de IC_{50} são utilizados para comparar o potencial que múltiplos compostos têm de inibir a mesma enzima em condições bem controladas. Diversos compostos já são conhecidos por inibir seletivamente e fortemente as enzimas do CYP450 (**Tabela 6**), portanto, através da determinação do IC_{50} pode-se ter uma ideia inicial do potencial inibitório de um candidato a fármaco ao comparar o resultado obtido para este composto com o resultado obtido para inibidores já bastante estudados e bem estabelecidos.

Tabela 6- Exemplos de inibidores seletivos das isoformas do citocromo P450 (U.S FDA, 2014).

Isoforma Inibida	Reação Específica Monitorada	Inibidor seletivo	IC₅₀ (μM)	Referência
CYP1A2	O-desetilação da Fenacetina	α-naftoflavona	0,01 - 0,27	DINGER; MEYER; MAURER, 2014
CYP2A6	7-hidroxilação da Coumarina	Tranilcipromina	0,30 - 0,99	DINGER; MEYER; MAURER, 2014
CYP2B6	4-hidroxilação da Bupropiona	Sertralina	3,20	DINGER; MEYER; MAURER, 2014
CYP2C8	6-hidroxilação Paclitaxel	Montelukaste	0,039	YAO; CAI; ZHU, 2012
CYP2C9	4'-hidroxilação do Diclofenaco	Sulfafenazol	0,3- 1,5	DINGER; MEYER; MAURER, 2014
CYP2C19	4'-hidroxilação da S-mefenitoína	Ticlopidina	6,00	RASTOGI; JANA, 2014
CYP2D6	1'-hidroxilação do Bufuralol	Quinidina	0,02- 0,22	TESTINO; PATONAY, 2003
CYP2E1	6-hidroxilação da clorzoxazona	Dietilditiocarbamato	9,8	EAGLING; TIJA; BACK, 1998
CYP3A4	1'-hidroxilação do midazolam	Cetoconazol	0,03	YAO; CAI; ZHU, 2012

Segundo Sppagiari e colaboradores (2014), caso o composto em estudo apresente IC₅₀ menor do que 10 μM ele pode ser classificado como um inibidor forte da isoforma avaliada, enquanto que compostos com valores de IC₅₀ compreendidos entre 10-100 μM são classificados como inibidores moderados e compostos com IC₅₀ maior do que 100 μM são classificados como inibidores fracos. Assim, para aquelas isoformas cuja inibição

for moderada ou forte, prosseguem-se os estudos para caracterização dos mecanismos de inibição, bem como determinação das constantes de inibição (OGILVIE et al., 2008).

1.6.3. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA REVERSÍVEL

A inibição de uma enzima responsável pelo metabolismo de um fármaco devido a interações reversíveis desta com um outro medicamento é a maior causa de interações medicamentosas clinicamente significativas (RING, WRIGHTON e MOHUTSKY, 2014). Esse tipo de inibição ocorre quando o inibidor se liga a enzima através de ligações não covalentes que, por serem mais instáveis, podem ser rompidas, e, devido a isso, as velocidades de associação e dissociação da enzima com o inibidor são rápidas (NELSON e COX, 2002).

Um importante parâmetro a ser determinado para os inibidores reversíveis é o parâmetro que define a afinidade com que o inibidor se liga a enzima. Esse parâmetro é denominado K_i , constante de inibição, e é definido como sendo a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (EI) (**Equação 5**),

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (5)$$

em que $[E]$ é a concentração de enzima, $[I]$ é a concentração de inibidor e $[EI]$ é a concentração do complexo enzima-inibidor.

Através do valor de K_i é possível avaliar o potencial que um candidato a fármaco tem de ser um inibidor reversível das isoformas do citocromo P450 clinicamente significativo, ou seja, quanto menor for o valor de K_i , maior a afinidade da enzima pelo inibidor, e consequentemente, maiores as chances deste ser um inibidor reversível clinicamente significativo (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014). Caso o candidato a fármaco iniba uma isoforma do CYP450 com valor de K_i maior do que 50 μM , isso indica que há um baixo risco de que ele apresente interações medicamentosas com fármacos metabolizados por essa isoforma, enquanto que para valores de K_i menores do que 1 μM há um risco elevado e valores de K_i entre 1 e 50 μM indicam que há um risco moderado e que o composto precisa de outros estudos para ser avaliado (BACHMANN; RING; WRIGHTON, 2003).

Outra importante informação a ser obtida sobre os inibidores reversíveis das isoformas do CYP450 está relacionada ao mecanismo de inibição. As inibições reversíveis são inibições diretas que podem ocorrer basicamente de duas maneiras: a primeira envolve a competição entre dois compostos que são metabolizados pela mesma isoforma do CYP450, que é o que ocorre, por exemplo, entre o omeprazol e o diazepam, que são metabolizados pela CYP2C19, e a segunda ocorre quando o inibidor não é substrato da isoforma afetada, que é o que ocorre entre o dextrometorfano e a quinidina, onde a quinidina, que é metabolizada pela CYP3A4, mesmo assim inibe o metabolismo do dextrometorfano pela CYP2D6 (OGILVIE et al., 2008). Tais interações entre a enzima e o inibidor resultam em quatro mecanismos reversíveis de inibição, sendo estes a inibição competitiva, inibição incompetitiva, inibição mista e inibição não-competitiva.

1.6.3.1. MECANISMOS REVERSÍVEIS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A inibição competitiva ocorre quando, no sítio ativo da enzima, se liga exclusivamente o substrato, formando o complexo enzima- substrato (ES), ou o inibidor, formando o complexo enzima- inibidor (EI). Então, os dois compostos competem entre si para se ligar a esse sítio (**Figura 6**) (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014).

Figura 6- Esquema para a inibição competitiva (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), sendo: K_s a constante de dissociação do ES em enzima livre e substrato e K_i a constante de dissociação do EI em enzima livre e inibidor.

Nesse mecanismo, quando o inibidor está presente em concentrações que não saturam a enzima, uma porção do total de enzimas se liga ao substrato (ES) e outra porção se liga ao inibidor (EI). As enzimas que se ligam ao substrato catalisam a reação na mesma

velocidade que catalisariam na ausência do inibidor e, devido a isso, a reação atinge a mesma velocidade máxima. Porém, a competição entre inibidor e substrato pelas enzimas livres terá como efeito o aumento da concentração de substrato necessária para alcançar metade da velocidade máxima. Logo, na inibição competitiva é característico um aumento no valor de K_m da reação e nenhuma mudança no valor da V_{max} . A **Equação 6** descreve essa relação. Além disso, outra característica para esse mecanismo de inibição é que o valor de K_i aparente tende a aumentar com o aumento da concentração de substrato e, caso a concentração de substrato seja muito maior do que a concentração de inibidor, a inibição pode ser anulada (COPELAND, 2000).

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (6)$$

em que v é a velocidade da reação enzimática, K_m é a constante de Michaelis- Menten, V_{max} é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração de substrato, K_i aparente é a constante de inibição e $[I]$ é a concentração de inibidor

A inibição incompetitiva, por sua vez, raramente ocorre com as enzimas do CYP450. Nesse mecanismo de inibição o inibidor não tem afinidade pela enzima livre, então ele se liga apenas ao ES (**Figura 7**) e essa ligação ocorre em um sítio de ligação diferente do sítio ativo, formando o complexo enzima-substrato-inibidor (ESI) (NELSON; COX, 2002)

Figura 7- Esquema para a inibição incompetitiva (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), sendo K_s a constante de dissociação do ES em enzima livre e substrato, K_i aparente a constante de dissociação do ESI em ES e inibidor.

Além disso, na inibição incompetitiva ocorre uma diminuição da concentração de ES devido a formação de ESI. Isso provoca uma diminuição aparente tanto na velocidade máxima da reação, quanto no valor de K_m , sendo que ocorre um deslocamento do equilíbrio no sentido de formação de mais ES, (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014). Essa relação existente na inibição incompetitiva pode ser descrita pela **Equação 7**.

$$v = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{K_m}{[S]}\right)} \quad (7)$$

em que v é a velocidade da reação enzimática, K_m é a constante de Michaelis- Menten, $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração de substrato, K_i aparente é a constante de inibição e $[I]$ é a concentração de inibidor

Outro mecanismo de inibição das enzimas do CYP450 também observado é a inibição mista. Inibidores mistos afetam tanto a ligação do substrato à enzima quanto a velocidade de catálise da reação, alterando, consequentemente, K_m e $V_{\max}$ (**Equação 8**).

$$v = \frac{V_{\max}}{\left(\frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right)\right)} \quad (8)$$

em que v é a velocidade da reação enzimática, K_m é a constante de Michaelis- Menten, $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração de substrato, K_i aparente é a constante de inibição, $[I]$ é a concentração de inibidor e α é o fator que reflete o efeito do inibidor na afinidade da enzima pelo substrato e também o efeito do substrato na afinidade da enzima pelo inibidor.

Nesse tipo de inibição, o inibidor se liga tanto a enzima livre, em um sítio diferente do sítio ativo, quanto ao ES, porém com afinidades diferentes (**Figura 8**). Esses dois equilíbrios fornecem então duas constantes de dissociação. A primeira, K_i , representa a constante de dissociação do complexo enzima- inibidor, e a segunda, αK_i , representa a constate de dissociação do complexo enzima- substrato- inibidor.

Figura 8- Esquema para a inibição mista (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), sendo K_s a constante de dissociação do ES em enzima livre e substrato, αK_s a constante de dissociação do ESI em EI e substrato, K_i a constante de dissociação do EI em enzima livre e inibidor, αK_i a constante de dissociação do ESI em ES e inibidor e α o fator que reflete o efeito do inibidor na afinidade da enzima pelo substrato e também o efeito do substrato na afinidade da enzima pelo inibidor.

Por fim, na inibição não-competitiva o inibidor também se liga tanto a enzima livre, em um sítio distinto do sítio ativo, quanto ao ES, porém com a mesma afinidade (**Figura 9**). Nesse mecanismo de inibição, o inibidor afeta a V_{max} mas não afeta K_m , uma vez que sua ligação à enzima não afeta a ligação do substrato (**Equação 9**). Então, o efeito de um inibidor não-competitivo é diminuir a quantidade de enzimas capazes de metabolizar o substrato.

Figura 9- Esquema para a inibição não-competitiva (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014), sendo K_s a constante de dissociação do ES em enzima livre e substrato ou do ESI em EI e substrato e K_i a constante de dissociação do EI em enzima livre e inibidor ou do ESI em ES e inibidor.

$$v = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (9)$$

em que v é a velocidade da reação enzimática, K_m é a constante de Michaelis- Menten, $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração de substrato, K_i aparente é a constante de inibição, $[I]$ é a concentração de inibidor.

1.6.3.2. DETERMINAÇÃO GRÁFICA DO MECANISMO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO

Os mecanismos de inibição enzimática podem ser determinados graficamente através de métodos de linearização dos parâmetros cinéticos. Dentre esses métodos, o mais empregado é o gráfico de duplo-recíproco, também chamado de gráfico de Lineweaver-Burk (COPELAND, 2000).

No gráfico do duplo-recíproco correlacionam-se $1/v_0$ vs $1/[S]$ e, como pode ser observado na **Equação 10**, o coeficiente angular de cada reta obtida corresponde a $K_m/V_{\max}$, enquanto que os interceptos no eixo y equivalem a $1/V_{\max}$ e os interceptos no eixo x equivalem a $-1/K_m$ (**Figura 10**).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (10)$$

em que v_0 é a velocidade inicial da reação, K_m é a constante de Michaelis- Menten, $V_{\max}$ é a velocidade máxima da reação e $[S]$ é a concentração de substrato

Figura 10- Exemplo de linearização dos parâmetros cinéticos empregando o gráfico de duplo-recíproco. Em **A)** tem-se o gráfico de Michaelis-Menten para a cinética enzimática e em **B)** tem-se o gráfico de duplo-recíproco (adaptado de COPELAND, 2000).

Para a inibição competitiva, no gráfico do duplo-recíproco, as retas obtidas empregando-se concentrações crescentes de inibidor tendem a interceptar o eixo y no mesmo ponto, confirmando então que não ocorrem mudanças aparentes na velocidade máxima da reação à medida que se aumenta a concentração de inibidor. Além disso, as retas tendem a interceptar o eixo x em diferentes pontos, corroborando com a característica de que na inibição competitiva um aumento da concentração de inibidor provoca aumentos aparentes no valor de K_m (**Figura 11A**).

Já para a inibição incompetitiva (**Figura 11B**) e inibição mista (**Figura 11C**), as retas do gráfico de duplo-recíproco tendem a interceptar o eixo x e o eixo y, em diferentes pontos. Porém, como já esperado, através dos gráficos é possível observar que, para o primeiro caso, o aumento da concentração de inibidor diminui a V_{max} e o valor de K_m , enquanto que, para o segundo caso, à medida que se aumenta a concentração de inibidor diminui-se a V_{max} e aumenta-se ou diminui-se o valor de K_m , dependendo do valor de α .

Para a inibição não-competitiva (**Figura 11D**), por sua vez, o gráfico de duplo-recíproco ilustra que aumentos na concentração de inibidor provocam aparente diminuição na V_{max} sem que ocorram mudanças no valor de K_m , uma vez que, para esse tipo de inibição, as retas do gráfico do duplo-recíproco interceptam o eixo y em diferentes pontos, enquanto que interceptam o eixo x no mesmo ponto (RING; WRIGHTON; MOHUTSKY, 2014).

Figura 11- Gráfico de duplo-recíproco característico para **A)** inibição competitiva, **B)** inibição incompetitiva, **C)** inibição mista e **D)** inibição não-competitiva, adaptado de RING, WRIGHTON e MOHUTSKY, 2014, sendo v_0 a velocidade inicial da reação, $[Substrato]$ a concentração de substrato e $[Inibidor]$ a concentração de inibidor.

Então, através do perfil obtido para as retas nesses gráficos é possível atribuir o mecanismo de inibição. Além disso, a partir dos valores dos coeficientes angulares das retas do gráfico de duplo-recíproco e das concentrações de inibidor avaliadas é possível determinar também o valor da constante de inibição (**Figura 12**) através de um gráfico secundário do gráfico de duplo-recíproco. Para isso, correlacionam-se graficamente ambos os parâmetros, coef. angular vs. $[I]$, sendo o valor do intercepto no eixo x equivalente a $-K_i$ aparente (QI et al., 2013).

Figura 12- Exemplo de gráfico secundário do gráfico de duplo-recíproco (adaptado de COPELAND, 2000).

1.6.4. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA TEMPO-DEPENDENTE

Nos últimos anos houve um aumento no número de relatos na literatura relacionados a interações medicamentosas clinicamente significativas que ocorrem devido a inibição tempo-dependente das enzimas do citocromo P450 (MOHOTSKY; HALL, 2014).

A inibição enzimática tempo-dependente ocorre quando o potencial inibitório de um composto aumenta com o aumento do tempo de interação entre este composto e a enzima (OGILVIE et al., 2008). Esse tipo de inibição pode ocorrer por diversos mecanismos, sendo o principal a inibição baseada em mecanismo (OGILVIE et al., 2008).

1.6.4.1. INIBIÇÃO ENZIMÁTICA BASEADA EM MECANISMO

A inibição enzimática baseada em mecanismo é uma inibição irreversível, ou seja, resulta em uma interação irreversível entre a enzima e o inibidor e, consequentemente, na inativação da enzima (MOHOTSKY; HALL, 2014). Esse tipo de inibição tem sido extensivamente caracterizado uma vez que aproximadamente metade dos inibidores fortes e moderados in vivo são inibidores irreversíveis (MOHOTSKY; HALL, 2014) e também porque esse tipo de inibição é particularmente muito comum para reações de biotransformação catalisadas pelas enzimas do CYP450, pois essas reações tendem a formar intermediários de alta energia (ZHANG; JONES; HALL, 2008).

Nesse tipo de inibição o composto é convertido, durante a reação, em um ou mais produtos que irreversivelmente inativam a enzima e não deixam o sítio ativo, impossibilitando que esta recupere a sua atividade catalítica em condições normais, sendo necessário então a síntese de uma nova enzima (OGILVIE et al., 2008). Um exemplo de inibidor irreversível bastante conhecido é a eritromicina, um antibiótico macrolídeo que inibe irreversivelmente a CYP3A4 devido a sua conversão, pela própria CYP3A4, em um metabólito que complexa com o grupo heme da enzima, inativando-a (ZHANG; JONES; HALL, 2008).

Assim, um inibidor baseado em mecanismo provoca uma inibição prolongada da enzima, que, muitas vezes, perdura até mesmo após a eliminação do composto em questão, podendo levar a interações medicamentosas indesejadas (LI, 2008). Tal inibição pode ocorrer basicamente de três maneiras: (i) através da coordenação quase-irreversível do metabólito formado com o ferro do grupo heme do sítio de ligação da enzima, levando a formação de um complexo intermediário metabólico (CIM); (ii) através da ligação covalente do metabólito com os átomos de nitrogênio do anel porfirínico do grupo heme, formando adutos; ou então (iii) através da formação de ligações covalentes entre o metabólito e os resíduos de aminoácido nucleofílicos do sítio ativo (MOHOTSKY; HALL, 2014).

Para identificar a inibição baseada em mecanismo é preciso que o inibidor provoque inibição tanto dose-dependente, quanto NADPH-dependente e tempo-dependente (OGILVIE et al., 2008). Além disso, é muito importante caracterizar o potencial inibitório do composto avaliado, e isso pode ser feito através da determinação dos parâmetros cinéticos de inativação (**Figura 13**), especificamente a velocidade máxima de inativação (k_{inact}) em condições de saturação, a concentração de inibidor necessária para atingir metade da velocidade máxima de inativação (K_I), e o clearance de inativação (Cl_{inact}), parâmetro que permite avaliar a significância clínica da inibição provocada pelo composto em estudo ao comparar o valor obtido com o valor de Cl_{inact} de inibidores baseados em mecanismo clinicamente significativos (BACHMANN; RING; WRIGHTON, 2003), como é o caso do irinotecano, um fármaco antitumoral que apresenta um Cl_{inact} de $2,50 \text{ mL min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$ (ZHOU et al., 2005).

Tanto k_{inact} quanto K_I podem ser relacionados através de uma função hiperbólica que descreve a velocidade de inativação da enzima, frequentemente associada com a tradicional função empregada para a cinética de Michaelis- Menten (MOHOTSKY e HALL, 2014) (**Equação 11**).

$$\text{Velocidade de inativação da enzima} = \frac{k_{\text{inact}} \cdot I}{K_I + I} \quad (11)$$

em que k_{inact} é a velocidade máxima de inativação em condições de saturação, I é a concentração de inibidor e K_I é a concentração de inibidor necessária para alcançar metade da velocidade máxima de inativação

Figura 13- Determinação de K_I e k_{inact} para um inibidor baseado em mecanismo. **A)** O composto sob investigação é incubado com a enzima e o cofator necessário para que a reação aconteça e o metabólito reativo seja formado. Em vários tempos, alíquotas dessa reação são retiradas e posteriormente a solução é diluída em um meio contendo excesso do substrato específico da isoforma do CYP450 a fim de determinar a atividade enzimática remanescente. **B)** Gráficos de $\ln$ da porcentagem de atividade enzimática remanescente vs. tempo de pré-incubação são plotados, obtendo-se as retas designadas como **a**, **b** e **c**. Os coeficientes angulares negativos de **a**, **b**, e **c** são equivalentes as velocidade de inativação (k_{obs}) para cada concentração de inibidor. **C)** os valores de k_{obs} são correlacionados com a concentração de inibidor $[I]$ através de regressão não-linear empregando o modelo de Michaelis-Menten, sendo k_{inact} equivalente a velocidade máxima da reação e K_I equivalente a K_m . Adaptado de GUENGERICH, 2009.

2. CONCLUSÃO

Através dos estudos empregando a (–)-grandisina e inibidores seletivos das isoformas do citocromo P450 foi possível determinar, pela primeira vez, que múltiplas isoformas presentes nos HLM são responsáveis pela formação dos metabólitos da GRA, com destaque para a CYP2C9, que participou da formação de todos os metabólitos. Já os estudos de inibição das enzimas do CYP450 pelo produto natural (–)-grandisina utilizando HLM comprovaram que a GRA pode inibir algumas isoformas, sendo um inibidor estritamente reversível e competitivo da CYP2C9, e um inibidor reversível e competitivo e baseado em mecanismo da CYP3A4.

Através dos resultados obtidos nesse trabalho é possível concluir que não há risco da GRA apresentar interação medicamentosa com fármacos metabolizados pela CYP1A2 e CYP2D6, enquanto que para a CYP2C9, apesar da GRA ser um inibidor moderado e competitivo dessa isoforma, o risco é baixo. Já para medicamentos metabolizados pela CYP2E1 e CYP3A4 o risco de interação medicamentosa existe e isso deve ser cuidadosamente monitorado in vivo, principalmente devido ao fato de que a CYP3A4 é a isoforma responsável por catalisar o metabolismo da maioria dos fármacos. Assim, caso a GRA seja administrada concomitantemente com medicamentos metabolizados pela CYP3A4 ela tende a provocar um aumento na concentração desse medicamento no organismo, e, dependendo da concentração, acarretar efeitos tóxicos. No caso da CYP2E1, pode ocorrer tanto uma diminuição da concentração do medicamento no organismo, quanto um aumento da concentração de um metabólito ativo formado. A diminuição da concentração do medicamento pode levar então a perda de sua eficácia e comprometimento do tratamento, enquanto que o aumento da concentração de um metabólito ativo pode provocar efeitos tóxicos.

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGIKAR, U. A.; NAGAR, S. Case Study 2. Practical Analytical Considerations for Conducting In Vitro Enzyme Kinetic Studies. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism- Fundamentals and Applications**. [S.l.]: Human Press, v. 1113, 2014. Cap. 19, p. 431- 439.

ASFAK, V. et al. Simultaneous Determination of Diclofenac Sodium and Rabeprazole Sodium in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form by LC. **Chromatographia**, New York, v. 66, p. 941- 943, 2007.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs—A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, p. 1699- 1722, 2010.

BACHMANN, K. A.; RING, B. J.; WRIGHTON, S. A. Drug-Drug Interactions and the Cytochromes P450. In: LEE, J. S.; OBACH, R. S.; FISHER, M. B. **Drug Metabolizing Enzymes- Cytochrome P450 and Other Enzymes in Drug Discovery and Development**. New York: CRC Press, 2003. Cap. 9, p. 311- 336.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte especial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679- 688, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, Editora ArtMed Ltda, Porto Alegre, 2001.

BARTH, T. et al. In vitro metabolism of the lignan (-)-grandisin, an anticancer drug candidate, by human liver microsomes. **Drug Testing and Analysis**, New Jersey, v. 7, p. 780- 786, 2015.

BAUER, A.; BRONSTRUP, M. Industrial Natural Products chemistry for drug discovery and development. **Natural Products Reports**, London, v. 31, p. 35- 60, 2014.

BERNARDES, L. S. C. et al. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 14, p. 7075- 7082, 2006.

BOLZANI, V. D. S. et al. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, Munich, v. 84, n. 9, p. 1837- 1846, 2012.

BORT, R. et al. Hepatic Metabolism of Diclofenac: Role of Human CYP in the Minor Oxidative Pathways. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 58, p. 787- 796, 1999.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman 's pharmacological basis of therapeutics**. 12^a. ed. New York: ARTMED, 2012.

CABRAL, M. M. O. et al. Larvicidal Activity of grandisin against *Aedes Aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 25, n. 1, p. 103- 105, 2009.

CAMPANERO, M. A. et al. Rapid liquid chromatographic assay for the determination of acetaminophen in plasma after propacetamol administration: application to pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 20, p. 327- 334, 1999.

CARVALHO, A. A. V. et al. Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of Grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytotherapy Research**, London, v. 24, p. 113- 118, 2010.

CHRISTIANSEN, A. et al. Effects of non-ionic surfactants on cytochrome P450-mediated metabolism in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 78, p. 166- 172, 2011.

CLARKE, S. E.; JONES, B. C. Human Cytochromes P450 and Their Role in Metabolism-Based Drug-Drug Interactions. In: RODRIGUES, A. D. **Drug- Drug Interactions**. 2^a. ed. New York: Informa Healthcare, v. 179, 2008. Cap. 3, p. 53- 85.

COLEMAN, M. D. **Human Drug Metabolism- An Introduction**. 2^a. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

COPELAND, R. A. **Enzymes- A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis**. 2^a. ed. New York: Wiley- VCH, 2000.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 277- 282, 2015.

CRETOL, S.; PETROVIC, N.; MURRAY, M. Pharmacogenetics of Phase I and Phase II Drug Metabolism. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 16, p. 204- 219, 2010.

CUNHA, W. R. et al. Lignans: Chemical and Biological Properties. In: RAO, V. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**. [S.l.]: Intech, 2012. p. 213- 234.

DA SILVA, V. C.; RODRIGUES, C. M. Natural products: an extraordinary source of value- added compounds from diverse biomasses in Brazil. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, p. 1- 14, 2014.

DE OLIVEIRA, R. B. et al. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 2, p. 169- 173, 2006.

DECHANONT, S. et al. Hospital admissions /visits associated with drug–drug interactions:a systematic review and meta-analysis. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, Chicester, v. 23, p. 489- 497, 2014.

DINGER, J.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Development of an in vitro cytochrome P450 cocktail inhibition assay for assessing the inhibition risk of drugs of abuse. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 1, p. 28- 35, 2014.

EAGLING, V. A.; TIJA, J. F.; BACK, D. J. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, p. 107- 114, 1998.

FILGUEIRA, G. C. D. O. et al. Analysis of nifedipine in human plasma and amniotic fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to clinical pharmacokinetics in hypertensive pregnant women. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 933- 934, p. 20- 25, 2015.

GELDERBLOM, H. et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 37, p. 1590- 1598, 2001.

GORDALIZA, M. et al. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. **Toxicon**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 441- 459, 2004.

GUENGERICH, F. P. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 21, p. 70- 83, 2008.

GUENGERICH, F. P. Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes. In: PEARSON, P. G.; WIENKERS, L. C. **Handbook of Drug Metabolism**. 2^a. ed. [S.l.]: Informa Healthcare USA, v. 186, 2009. Cap. 8, p. 203- 226.

GUNARATNA, C. Drug Metabolism & Pharmacokinetics in Drug Discovery: A primer for Bioanalytical Chemists, Part I. **Current Separations**, v. 19, p. 17- 23, 2000.

HE, F. et al. Rapid determination of six metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry: application to high-throughput inhibition screening of terpenoids. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 21, p. 635- 643, 2007.

HOUSTON, J. B.; KENWORTHY, K. E.; GALETIN, A. Typical and Atypical Enzyme Kinetics. In: LEE, J. S.; OBACH, R. S.; FISHER, M. B. **Drug Metabolizing Enzyme-**

Cytochrome P450 and Other Enzymes in Drug Discovery. [S.l.]: CRC Press, 2003. Cap. 7, p. 211- 254.

HUTZLER, J. M.; TRACY, T. S. Atypical Kinetic Profiles in Drug Metabolism Reactions. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 4^a, p. 355- 362, 2001.

JING, W.-H. et al. Identification of cytochrome P450 isoenzymes involved in metabolism of (+)-praeuraptorin A, a calcium channel blocker, by human liver microsomes using ultra high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 77, p. 175- 188, 2013.

KORZEKWA, K. R. In Vitro Enzyme Kinetics Applied to Drug- Metabolizing Enzyme. In: RODRIGUES , A. D. **Drug- Drug Interactions**. 2^a. ed. [S.l.]: Informa Healthcare, v. 179, 2008. Cap. 2, p. 31- 52.

KOZAKAI, K. et al. Cocktail-substrate Approach-based High-throughput Assay for Evaluation of Direct and Time-dependent Inhibition of Multiple Cytochrome P450 Isoforms. **Drug metabolism Pharmacokinetics**, Tokyo, v. 29, n. 2, p. 198- 207, 2014.

KRAUSZ, K. W. et al. Monoclonal Antibodies Specific and Inhibitory to Human Cytochromes P450 2C8, 2C9, and 2C19. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 11, p. 1410- 1423, 2001.

LAZAROU, J.; POMERANZ, B. H.; COREY, P. N. Incidence of Adverse Drug Reactions in Hospitalized Patients- A Meta-analysis of Prospective Studies. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 279, n. 15, p. 1200- 1205, 1998.

LEITE, A. C. C. F. et al. Grandisin caused morphological changes larval and toxicity on *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 517- 521, May/ Jun 2012.

LI, A. P. In Vitro Evaluation of Metabolic Drug–Drug Interactions: Concepts and Practice. In: LI, A. P. **Drug- Drug Interactions in Pharmaceutical Development**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2008. Cap. 1, p. 1- 26.

LI, G. et al. High-Throughput Cytochrome P450 Cocktail Inhibition Assay for Assessing Drug-Drug and Drug-Botanical Interactions. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 43, n. 11, p. 1670- 1678, 2015.

LIGIERO, C. B. P. et al. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de Química. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1338- 1341, 2009.

LIU, H. X. et al. CYP1A2 is the major isoform responsible for paeonol O-demethylation in human liver microsomes. **Xenobiotica**, London, v. 39, n. 9, p. 672- 679, 2009.

LOPES, N. P. et al. Flavonoids and Lignans from *Virola surinamensis* Twigs and their in vitro Activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, p. 667- 668, 1998.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 51, p. 29- 33, 1999.

LYNCH, T.; PRICE, A. The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. **American Family Physician**, v. 76, n. 3, p. 391- 396, 2007.

LYUBIMOV, A. V. **Encyclopedia of Drug metabolism and Interaction**. Nova Iorque: John Wiley and Sons, 2012.

MARTIN, P. et al. Mediation of in Vitro Cytochrome P450 Activity by Common Pharmaceutical Excipients. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 10, p. 2739- 2748, 2013.

MARTINS, R. C. C. et al. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 55, p. 843- 846, 2000.

MARTINS, R. C. C. et al. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 64, p. 667- 670, 2003.

MENEZES, E. G. P. Avaliação da atividade e indutora de apoptose da grandisina em células leucêmicas K-562 com fenótipo de resistência a fármacos. **Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás**. Goiânia, p. 6. 2009.

MINERS, J. O. et al. Cytochromes P450, 1A2, and 2C9 are responsible for the human hepatic O-demethylation of R- and S-naproxen. **Biochemical and Pharmacology**, New York, v. 51, n. 8, p. 1003- 1008, 1996.

MOHOTSKY, M.; HALL, S. D. Irreversible Enzyme Inhibition Kinetics and Drug–Drug Interactions. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism**. [S.l.]: Human Press, v. 1113, 2014. Cap. 5, p. 57- 92.

MOLDEN, E.; ASBERG, A.; CHRISTENSEN, H. CYP2D6 is involved in O-demethylation of diltiazem. An in vitro study with transfected human liver cells. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlim, v. 56, n. 8, p. 575- 579, 2000.

MORA- PALE, M. et al. Biochemical strategies for enhancing the in vivo production of natural products with pharmaceutical potential. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 25, p. 86- 94, 2014.

MORAIS, S. K. R. et al. Biological Activities of Lignoids from Amazon Myristicaceae Species: *Virola michelii*, *V. mollissima*, *V. pavonis* and *Iryanthera juruensi*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1110- 1118, 2009.

MOSS, G. P. Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 8, p. 1493- 1523, 2000.

NASSAR, A. F.; HOLLENBERG, P. F.; SCATINA, J. (Eds.). **Drug Metabolism Handbook- Concepts and Applications**. [S.l.]: Wiley, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**. 3ª. ed. [S.l.]: W.H. Feeman and Company, 2002.

NIWA, T. et al. Comparison of kinetic parameters for drug oxidation rates and substrate inhibition potential mediated by cytochrome P450 3A4 and 3A5. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 9, n. 1, p. 20- 33, 2008.

OBACH, R. S.; WALSKY, R. L.; VENKATAKRISHNAN, K. Mechanism-Based Inactivation of Human Cytochrome P450 Enzymes and the Prediction of Drug-Drug Interactions. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 2, p. 246- 255, 2006.

OGILVIE, B. W. et al. In vitro Approaches for Studying the Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes and Identifying the Drug- Metabolizing Enzymes Responsible for the Metabolism of Drugs (Reaction Phenotyping) with Emphasis on Cytochrome P450. In: RODRIGUES, A. D. **Drug- Drug Interactions**. 2ª. ed. [S.l.]: Informa Healthcare, 2008.

PATKI, K. C.; VON MOLTKE, L. L.; GREEBLATT, D. J. In vitro Metabolism of Midazolam, Triazolam, Nifedipine, and Testosterone by Human Liver Microsomes and Recombinant Cytochromes P450: Role of CYP23A4 and CYP3A5. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 7, p. 938- 944, 2003.

PEKTHONG, D. et al. Differential inhibition of rat and human hepatic cytochrome P450 by *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 115, p. 432- 440, 2008.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 171- 177, 2007.

PRATT-HYATT, M.; LIN, H.; HOLLENBERG, P. F. Mechanism-Based Inactivation of Human CYP2E1 by Diethyldithiocarbamate. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 12, p. 2286- 2292, 2010.

PU, J.- et al. Three New Compounds from *Kadsura longipedunculata*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 56, n. 8, p. 1143- 1146, 2008.

QI, X.-Y. et al. Inhibitory effects of sanguinarine on human liver cytochrome P450 enzymes. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 56, p. 392- 397, 2013.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68- 76, 2001.

RAMOS, C. S.; KATO, M. J. Secondary metabolites from Phloem of *Piper solmsianum* (Piperaceae) in the Honeydew of *Edessa meditabunda*. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 23, p. 604- 606, 2012.

RASTOGI, H.; JANA, S. Evaluation of Inhibitory Effects of Caffeic acid and Quercetin on Human Liver Cytochrome P450 Activities. **Phytoterapy Reserach**, London, v. 28, p. 1873- 1878, 2014.

RING, B.; WRIGHTON, S. A.; MOHUTSKY, M. Reversible Mechanisms of Enzyme Inhibition and Resulting Clinical Significance. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism- Fundamentals and Applications**. [S.l.]: Human Press, 2014. Cap. 4, p. 37- 57.

ROWLAND, M. Introducing Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Concepts. In: RODRIGUES, A. D. **Drug- Drug Interactions**. 2ª. ed. [S.l.]: Informa Healthcare, 2008.

SAAD, J. M. et al. (-)-Grandisin form *Cryptocarya crassinervia*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 54, n. 6, p. 1981- 1683, 1991.

SAKAEDA, T. et al. Effect of micafungin on cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance protein 1 activities, and its comparison with azole antifungal drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 57, p. 759- 764, 2005.

SAXENA, A. et al. In vitro metabolism of a novel antithrombotic compound, S002- 333, and its enantiomers: quantitative cytochrome P450 phenotyping, metabolic profiling and enzyme kinetic studies. **Xebobiotica**, London, v. 44, n. 4, p. 295- 308, 2014.

SCHMIDT, T. J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases- Part II. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 19, p. 2176- 2228, 2012.

SCIFINDER WEB. **SciFinder - Chemical Abstracts Service**, 2015. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 15 Dezembro 2015.

SEIBERT, E.; TRACY, T. S. Different Enzyme Kinetic Models. In: NAGAR, S.; ARGIKAR, U. A.; TWEEDIE, D. J. **Enzyme Kinetics in Drug Metabolism-Fundamentals and Applications**. [S.l.]: Human Press, 2014. Cap. 3, p. 23- 35.

SILVA FILHO, A. A. et al. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Laureaceae). **Phytochemistry Research**, London, v. 22, p. 1307- 1310, 2008.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, -L. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 35, p. 913- 920, 2004.

SPPAGIARI, D. et al. A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: An overview of current methodologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 101, p. 221- 237, 2014.

STEPAN, A. F. et al. Metabolism-guided drug design. **Medical Chemical Communications**, v. 4, p. 631- 652, 2013.

SUN, S.; LIU, G.; WANG, Y. Simultaneous Determination of Acetaminophen, Caffeine, and Chlorphenamine Maleate in Paracetamol and Chlorphenamine Maleate Granules. **Chromatographia**, Braunschweig, v. 64, p. 719- 724, 2006.

TASSANEYAKUL, W. et al. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes 1A1 and 1A2. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore v. 265, n. 1, p. 401- 407, 1992.

TESTINO, S. A.; PATONAY, G. High-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 1459- 1467, 2003.

THACKER, D. L. et al. Stereoselective Pharmacokinetics of Stable Isotope (+/-)-[13C]-Pantoprazole: Implications for a Rapid Screening Phenotype Test of CYP2C19 Activity. **Chirality**, New York, v. 23, p. 904- 909, 2011.

U.S FDA. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers, 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#inVito>>. Acesso em: 18 Janeiro 2016.

VALADARES, M. C. et al. Cytotoxicity and antiangiogenic activity of grandisin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 61, p. 1709- 1714, 2009.

VALADARES, M. C. et al. Chemoprotective effect of the tetrahydrofuran lignan grandisin in the in vivo rodent micronucleus assay. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 63, p. 447- 451, 2011.

VIEIRA, M. D. S. et al. In vitro basal cytotoxicity assay applied to estimate acute oral systemic toxicity of grandisin and its major metabolite. **Experimental and Toxicologic Pathology**, New York, v. 63, p. 505- 510, 2011.

WANG, B.; ZHOU, S. F. Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 16, n. 31, p. 4066- 4218, 2009.

WIENKERS, L. C.; STEVENS, J. C. Cytochrome P450 Reaction Phenotyping. In: LEE, J. S.; OBACH, R. S.; FISHER, M. B. **Drug Metabolizing Enzymes: Cytochrome P450 and Other Enzymes in Drug Discovery and Development**. [S.l.]: CRC Press, 2003. Cap. 8, p. 255- 310.

WILLIAMS, J. A. et al. Comparative Metabolic Capabilities of CYP3A4, CYP3A4, and CYP3A7. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 8, p. 883- 891, 2002.

WU, W.- ; MCKOWN, L. A. In Vitro Drug Metabolite Profiling Using Hepatic S9 and Human Liver Microsomes. In: YAN, Z.; CADWELL, G. W. **Methods in Pharmacology and Toxicology: Optimization in Drug Discovery- In Vitro Methods**. [S.l.]: Human Press, 2004. Cap. 11, p. 163- 184.

WUSTROW, I.; RIEDEL, K.-D.; MIKUS, G. In vitro identification of the cytochrome P450 isozymes involved in the N-demethylation of the active opioid metabolite nortilidine to bisnortilidine. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, Berlin, v. 385, p. 633- 639, 2012.

XIE, G. et al. Comparative in vitro metabolism of phospho-tyrosol-indomethacin by mice, rats and humans. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 85, n. 8, p. 1195- 1202, 2013.

YAO, M.; CAI, H.; ZHU, M. Fast and Reliable CYP inhibition Assays. In: ZHANG, D.; SURAPANENI, S. **ADME- Enabling Technologies in Drug Design And Development**. New Jersey: Wiley, 2012. Cap. 14, p. 213- 232.

YUAN, R. et al. Evaluation of Cytochrome P450 Probe Substrates Commonly Used by the Pharmaceutical Industry to Study in Vitro Drug Interactions. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 12, p. 1311- 1319, 2002.

ZEBOTHSEN, I.; KUNZE, T.; CLEMENT, B. Inhibitory Effects of Cytostatically Active 6-Aminobenzo[c]phenanthridines on Cytochrome P450 Enzymes in Human Hepatic Microsomes. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 99, p. 37- 43, 2006.

ZHANG, H.- et al. Antimalarial Compounds from *Rhaphidophora decursiva*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 64, p. 772- 777, 2001.

ZHANG, H. et al. Potent Mechanism-Based Inactivation of Cytochrome P450 2B4 by -Ethynylphenanthrene: Implications for Allosteric Modulation of Cytochrome P450 Catalysis. **Biochemistry- including biophysical chemistry & molecular biology**, Washington, v. 52, p. 355- 364, 2012.

ZHANG, J. et al. New Lignans and Their Biological Activities. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v. 11, p. 1- 54, 2014.

ZHANG, X.; JONES, D. R.; HALL, S. D. Mechanism-Based Inhibition of Human Cytochromes P450: In Vitro Kinetics and In Vitro–In Vivo Correlations. In: RODRIGUES , A. D. **Drug- Drug Interactions**. 2ª. ed. [S.l.]: Informa Healthcare, 2008. Cap. 11, p. 515- 544.

ZHAO, K. et al. In-vitro metabolism of glycyrrhetic acid by human and rat liver microsomes and its interactions with six CYP substrates. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 64, p. 1445- 1451, 2012.

ZHOU, S. et al. Clinical outcomes and management of mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4. **Therapeutic and Clinical Risk Management**, Albany, v. 1, n. 1, p. 3- 13, 2005.

ZHOU, S. et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 3, p. 279- 304, 2005.

ZHU, L. et al. Identification of human cytochrome P450 isozymes involved in the metabolism of naftodipil enantiomers in vitro. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1534- 1551, 2014.