

YURI YABU DE BARROS

AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE RECEPTOR PREGNANO X E
MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE INTERESSE AO SUS

Brasília, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

YURI YABU DE BARROS

AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE RECEPTOR PREGNANO X E
MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE INTERESSE AO SUS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Brasília

2017

YURI YABU DE BARROS

AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE RECEPTOR PREGNANO X E
MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE INTERESSE AO SUS

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 30 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Alberto Simeoni (presidente)

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Pérola Oliveira Magalhães

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Maria de Fátima Borin

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Dra. Dâmaris Silveira (suplente)

Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho à minha mãe,
Regina, por todo apoio, carinho e
incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter me contemplado em uma família de bem e ter me dado saúde para sempre prosseguir.

Ao meu maior exemplo, minha amada mãe, Regina, pelo amor, assistência, compreensão e crença em mim.

Ao meu irmão, Raphael, por sempre tornar meus dias mais leves e felizes.

Ao meu pai, Antônio, por entender essa árdua caminhada.

À minha orientadora, Yris Fonseca-Bazzo, pela oportunidade de realizar esse projeto e inserção no meio científico.

Ao meu coorientador, Luiz Simeoni, por toda orientação, disponibilidade e risadas.

Às professoras Pérola Magalhães e Dâmaris Silveira pelo apoio e disponibilidade em ajudar.

Às técnicas, Patrícia Marques e Julia Muller, pela paciência e carinho na convivência todos os dias no laboratório.

Aos queridos amigos de laboratório, Diegue Martins, Amanda Carneiro, Lorena Gomes, João Gomes, Samuel Cardoso, Roberto Barcellos, Larizza Matos, Marcela Freitas, Márcia Silva, Juliana Ferreira, Paula Souza e Manuel Mera por tornarem os dias difíceis mais leves, por serem um grupo que em nenhum outro lugar irei encontrar, por cada palavra de apoio e incentivo, por serem pessoas maravilhosas.

Aos meus amigos Ricardo Miranda, Dafny Matos, Ludmila Alvim, Bárbara Terra, Sarah Dobkowski por sempre estarem por perto, pelas palavras de incentivo e apoio incondicional.

Ao Matheus Pacheco pelo companheirismo e carinho nessa etapa final.

Às luizetes, Simone Batista, Cinthia Gabriel, Isadora Sampaio e Gleice Borges por me receberem de braços abertos e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À Flora Milton e Mariella por disponibilizarem de seu tempo para me ensinar técnicas e seus conhecimentos.

Ao Aduino e sua equipe de fitoterapia pelas energias positivas, pelo cuidado e por me reequilibrar nas horas mais difíceis.

À Edigrês por sempre estar disposta a ajudar e ter realizado meu processo de entrada na pós-graduação.

À CAPES, DECIT/SCTIE/MS, por intermédio do CNPq, FAPDF/SECTI e da SESDF pelo apoio financeiro.

“O que prevemos raramente ocorre, o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

O Ministério da Saúde implementou, nos últimos anos, doze medicamentos fitoterápicos no elenco básico da assistência farmacêutica no SUS. Foram implementadas também diversas ações públicas que subsidiaram a importância da fitoterapia e seu acesso seguro no âmbito da saúde. Diversos casos e relatos vêm sendo reportados de interação medicamentosa entre medicamentos convencionais e derivados de plantas, porém pouca atenção é dada a essas interações. Em virtude de aprofundar e contribuir com estudos sobre a segurança do uso de medicamentos fitoterápicos, foram selecionados quatro fitoterápicos do elenco básico da assistência farmacêutica: *Cynara scolymus*, *Mikania glomerata*, *Rhamnus purshiana* e *Uncaria tomentosa*, com o objetivo de avaliar a interação desses quatro medicamentos na ativação do receptor pregnano X (PXR) em modelo *in vitro*. O PXR é um importante receptor nuclear, regulador transcricional dos genes do citocromo P450, em especial a CYP3A4. A utilização concomitante de medicamentos fitoterápicos e fármacos que apresentam ação agonista no receptor nuclear pode interferir na terapêutica do segundo. Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade dos medicamentos pelo método colorimétrico MTT em células HeLa e seus respectivos extratos aquosos. O fitoterápico contendo *C. scolymus* e o extrato aquoso não apresentaram perfil de citotoxicidade similar. Já os fitoterápicos *M. glomerata* e *R. purshiana* apresentaram toxicidade similar a de extratos aquosos destas espécies. Devido à ausência de alcaloides oxindólicos no extrato de *U. tomentosa*, não foi possível sua comparação com o medicamento. Os medicamentos a base de *M. glomerata* (5,5 mg/mL) e *R. purshiana* (1,5 mg/mL) e *U. tomentosa* (2 mg/mL) evidenciaram ação agonista no receptor pregnano X. Em contrapartida, o medicamento *C. scolymus* (1,5 mg/mL) não estimulou este receptor. Desta forma, as interações observadas fornecem subsídios primários sobre a atuação do uso desses fitoterápicos e sugerem possíveis interações medicamentosas concomitantes com medicamentos convencionais de mesma rota metabólica.

Palavras-chave: Fitoterápico, *Cynara scolymus*; *Mikania glomerata*; *Rhamnus purshiana*; *Uncaria tomentosa*; receptor PXR; interação.

ABSTRACT

In recent years, Brazilian Health Ministry has implemented twelve herbal medicines in the basic pharmaceutical assistance list of SUS. Several public advances have also been implemented to support the importance of herbs medication and its safe access in health. A vary of case reports has been reported of herbal-drug interactions, but very little attention is given to it. In order to evaluate the interaction and contribute to the safety of the use of herbal medicines, four of the herbal medicines in the basic pharmaceutical assistance list were selected: *Cynara scolymus*, *Mikania glomerata*, *Rhamnus purshiana* and *Uncaria tomentosa*. Therefore, the aim of this study was to evaluate the interaction of those four herbal medicines in the activation *in vitro* model of pregnane X receptor (PXR). PXR is an important transcriptional nuclear regulatory receptor of the cytochrome P450 genes, especially CYP3A4. The concomitant consumption of herbs medicinal and conventional drugs, which can activate the nuclear receptor, can interfere on the outcome of the treatment. Initially, the herbal medicines and its aqueous extracts were evaluated by colorimetric cytotoxicity MTT assay in HeLa cell lines. The cytotoxicity effect of *C. scolymus* and its aqueous extract was not similar. The herbal medicines *M. glomerata* and *R. purshiana* showed similar toxicity to their aqueous extracts. Due to the absence of oxindolic alkaloid in the extract of *U. tomentosa*, it was not possible to compare it with the herbal medicine. The herbal medicines *M. glomerata* (5.5 mg/mL), *R. purshiana* (1.5 mg/mL) and *U. tomentosa* (2 mg/mL) showed agonist effect on PXR. On the other hand, *C. scolymus* (1.5 mg/mL) did not affect the receptor. In this way, the receptor interactions studied can provide primary subsidies on the use of those herbal medicines and guide possible drug-herb interactions of the same metabolic route.

Keywords: Herbal medicines; *Cynara scolymus*; *Mikania glomerata*; *Rhamnus purshiana*; *Uncaria tomentosa*; PXR receptor; interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de ácidos cafeoilquínicos presentes na <i>Cynara scolymus</i>	21
Figura 2. Estrutura química da cumarina presente em <i>Mikania glomerata</i>	23
Figura 3. Estrutura química de cascarosídeo A (A), cascarosídeo B (B), cascarosídeo C (C) e cascarosídeo D (D) presente em <i>Rhamnus purshiana</i>	24
Figura 4. Compostos alcaloides oxindólicos pentacíclicos de <i>Uncaria tomentosa</i>	26
Figura 5. Compostos alcaloides tetracíclicos de <i>Uncaria tomentosa</i>	26
Figura 6. Esquema representativo da metabolização de xenobiótico por PXR.	29
Figura 7. Perfil cromatográfico e espectros do medicamento fitoterápico <i>Cynara scolymus</i>	47
Figura 8. Perfil cromatográfico e espectros do extrato aquoso <i>Cynara scolymus</i>	48
Figura 9. Perfil cromatográfico do padrão ácido clorogênico.	49
Figura 10. Perfil cromatográfico e espectros do medicamento fitoterápico (A) e extrato aquoso (B) <i>Mikania glomerata</i>	51
Figura 11. Perfil cromatográfico do padrão cumarina.	52
Figura 12. Identificação do extrato padronizado (A), medicamento fitoterápico (B) e extrato aquoso (C) de <i>Rhamnus purshiana</i> por CCD.	53
Figura 13. Perfil cromatográfico do extrato padronizado <i>Uncaria tomentosa</i>	54
Figura 14. Perfil cromatográfico do medicamento fitoterápico <i>Uncaria tomentosa</i>	56
Figura 15. Perfil cromatográfico do padrão isopteropodina.	57
Figura 16. Perfil cromatográfico do extrato da <i>Uncaria tomentosa</i> por infusão (A) e decocção (B).	58
Figura 17. Avaliação da viabilidade celular do medicamento fitoterápico <i>Cynara scolymus</i>	62
Figura 18. Avaliação da viabilidade celular do extrato aquoso de <i>Cynara scolymus</i>	64
Figura 19. Avaliação da viabilidade celular do medicamento fitoterápico <i>Mikania glomerata</i>	66
Figura 20. Avaliação da viabilidade celular do extrato aquoso de <i>Mikania glomerata</i>	67

Figura 21. Avaliação da viabilidade celular do medicamento fitoterápico <i>Rhamnus purshiana</i>	69
Figura 22. Avaliação da viabilidade celular do extrato aquoso de <i>Rhamnus purshiana</i>	71
Figura 23. Avaliação da viabilidade celular do medicamento fitoterápico <i>Uncaria tomentosa</i>	73
Figura 24. Resposta dose-dependente dos controles positivos <i>Hypericum perforatum</i> (A) rifampicina (B) em PXR.....	76
Figura 25. Efeito do medicamento fitoterápico <i>Cynara scolymus</i> na atividade transcricional do receptor pregnano X.....	78
Figura 26. Efeito do medicamento fitoterápico <i>Mikania glomerata</i> na atividade transcricional do receptor pregnano X.....	82
Figura 27. Efeito do medicamento fitoterápico <i>Rhamnus purshiana</i> na atividade transcricional do receptor pregnano X.....	85
Figura 28. Efeito do medicamento fitoterápico <i>Uncaria tomentosa</i> na atividade transcricional do receptor pregnano X.....	87
Figura 29. Mecanismo de interação medicamentosa indireta pelo medicamento fitoterápico (MF) e efeitos no medicamento convencional (MC).....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos medicamentos fitoterápicos adquiridos de acordo com o fabricante.....	32
Tabela 2. Gradiente da fase móvel para a detecção de marcadores em amostras de <i>Cynara scolymus</i>	34
Tabela 3. Gradiente da fase móvel para a detecção de marcadores de <i>Uncaria tomentosa</i>	36
Tabela 4. Rendimento dos extratos aquosos	45
Tabela 5. Quantificação do ácido clorogênico nas amostras	50
Tabela 6. Quantificação de cumarina nas amostras	52
Tabela 7. Quantificação de alcaloides totais no medicamento fitoterápico <i>Uncaria tomentosa</i>	55
Tabela 8. Medicamentos fitoterápicos e ativação transcricional do receptor pregnano X.....	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATB – Antibiótico

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CYP450 – Citocromo P450

CYP3A4 - Citocromo P450 3A4

DAD – Detecção por arranjo de diodos

DBD – Domínio de ligação ao DNA

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

IC₅₀ – Concentração que inibe metade do efeito máximo

HeLa – Células de adenocarcinoma cervical humano

LB - Lauria-Bertani

LDB – Domínio de ligação ao ligante

MC- Medicamento convencional

MF – Medicamento fitoterápico

MTT - Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

OMS – Organização Mundial da Saúde

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF - Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapia

PXR – Receptor pregnano X

RENAME - Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RN – Receptor nuclear

RXR – Receptor retinoide X

SFB – Soro fetal bovino

SFB-ATB – Soro fetal bovino e antibiótico

SUS – Sistema Único de Saúde

USP – United States Pharmacopeia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CENÁRIO NACIONAL SOBRE FITOTERÁPICOS.....	16
1.2	MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	18
1.2.1	<i>Cynara scolymus</i> L. – Alcachofra	19
1.2.2	<i>Mikania glomerata</i> Spreng. – Guaco.....	22
1.2.3	<i>Rhamnus purshiana</i> DC. – Cáscara-sagrada.....	23
1.2.4	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) – Unha-de-gato.....	25
1.3	METABOLIZAÇÃO DE XENOBIÓTICOS.....	27
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	OBTENÇÃO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E EXTRATOS AQUOSOS VEGETAIS	32
3.2	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES FITOQUÍMICOS POR CLAE-DAD	33
3.2.1	<i>Cynara scolymus</i> L.	34
3.2.2	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	35
3.2.3	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult.).....	35
3.3	IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	37
3.4	CULTURA DE CÉLULAS HELA.....	38
3.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS FITOTERÁPICOS E EXTRATOS VEGETAIS EM CÉLULAS HELA	39
3.6	ENSAIO GENE REPÓRTER COM TRANSFEÇÃO PELO REAGENTE LIPOFECTAMINA	41
3.6.1	Transformação do DNA plasmideal em células competentes e purificação	41
3.6.2	Ensaio de gene repórter do receptor pregnano X em células HeLa	42
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS VEGETAIS	45

4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E EXTRATOS AQUOSOS VEGETAIS	45
4.2.1	<i>Cynara scolymus</i> L.	45
4.2.2	<i>Mikania glomerata</i> Spreng	50
4.2.3	<i>Rhamnus purshiana</i> DC	53
4.2.4	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult)	54
4.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS FITOTERÁPICOS E EXTRATOS AQUOSOS VEGETAIS EM CÉLULAS HELA	61
4.3.1	<i>Cynara scolymus</i> L.	61
4.3.2	<i>Mikania glomerata</i> Spreng	65
4.3.3	<i>Rhamnus purshiana</i> DC	69
4.3.4	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult)	73
4.4	ENSAIO GENE REPÓRTER COM TRANSFEÇÃO PELO REAGENTE LIPOFECTAMINA	75
4.4.1	Curva dose-resposta dos compostos rifampicina e <i>Hypericum perforatum</i>	75
4.4.2	<i>Cynara scolymus</i> L.	77
4.4.3	<i>Mikania glomerata</i> Spreng	81
4.4.4	<i>Rhamnus purshiana</i> DC	84
4.4.5	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult)	86
4.4.6	Análise geral de interação medicamentosa dos medicamentos fitoterápicos	89
5	CONCLUSÃO	94
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 CENÁRIO NACIONAL SOBRE FITOTERÁPICOS

No mundo a prática secular da utilização da medicina tradicional¹ pode ser reconhecida como complemento ou pilar principal do cuidado à saúde. Essas práticas, em processo gradativo de crescimento e expansão, são majoritariamente praticadas e consideradas fundamentais em países subdesenvolvidos que não oferecem acesso à saúde de qualidade. A disseminação e o uso crescente vêm criando desafios na saúde pública desde o ponto de vista político até a utilização racional pela população (1,2).

Em 1981, o Ministério da Saúde, após reconhecimento da utilização e valorização de plantas medicinais e práticas tradicionais no cuidado básico de saúde pela Declaração de Alma-Ata em 1978, definiu o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação pré-clínica e clínica no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (3). Em 1982 foi criado o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos com objetivo de promover a pesquisa científica nas potenciais propriedades terapêuticas das espécies vegetais utilizadas pela população com o intuito de desenvolvimento de fármacos e incluí-los na Relação Nacional de Medicamentos. Nos anos seguintes surgiram implementações mais efetivas da medicina tradicional, principalmente a fitoterapia (4,5).

Em 2000, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs a criação de políticas nacionais sobre medicina tradicional com objetivo de consolidar mecanismos normativos e legais para promover e manter uma base sólida da boa prática, segurança, qualidade, eficácia e acesso às terapias no sistema de saúde (1,2). O Brasil é um país potencial em promover e desenvolver na área da saúde o uso de plantas medicinais e fitoterápicos. Isso se deve à vasta diversidade de flora

¹ A medicina tradicional inclui práticas diversas, abordagens, conhecimentos e crenças que incorporam remédios de saúde a partir de plantas, animais e / ou fontes de minerais, terapias espirituais, técnicas manuais e exercícios, aplicados isoladamente ou em conjunto para manter o bem-estar, além de tratar, diagnosticar e prevenir doenças.

presente no território brasileiro, ao acervo precioso de tradição e uso de plantas medicinais da miscigenação cultural histórica e aos recursos tecnológicos disponíveis no país para validar cientificamente o emprego terapêutico das espécies vegetais (6,7).

No ano de 2003, o Ministério da Saúde afim de compreender as experiências existentes no SUS relacionadas à medicina tradicional chinesa e acupuntura, homeopatia, fitoterapia e medicina antroposófica, executou uma análise de diagnóstico situacional dessas práticas no SUS. Esse diagnóstico resultou na presença significativa dessas práticas em 232 municípios, sendo 19 capitais, em um total de 26 estados. Dentre as práticas complementares utilizadas, o uso da fitoterapia teve destaque em 116 municípios de 22 estados. Com isso, foi elaborado o plano da implementação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (8).

Visto o uso popular nacional da fitoterapia no SUS, em 2004, o Conselho Nacional de Saúde aprovou por meio da Resolução nº 338 a utilização das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. Este último confere embasamento científico respeitando os conhecimentos tradicionais incorporados, no processo de atenção à saúde. Em 2006, a PNPIC foi institucionalizada pela Portaria nº 971 com a finalidade de apoiar, incorporar e implementar os quatro eixos, Medicina Tradicional Chinesa e Acupuntura, Homeopatia, Fitoterapia, Medicina Antroposófica e Termalismo-crenoterapia, na rede pública de saúde, com objetivo de ser mais um passo para prevenção, promoção, manutenção e recuperação da saúde baseada no modelo de atenção humanizada e centrada na integralidade do indivíduo (8,9).

No mesmo ano de 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi implementada para estabelecer diretrizes e linhas prioritárias de caráter governamental, de acordo com orientações da Organização Mundial da Saúde. Essas orientações tinham como finalidade promover o uso racional e seguro de plantas medicinais presentes no bioma brasileiro, o desenvolvimento e planejamento de programas, projetos e atividades que norteiam o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país (5,8).

Para tornar as diretrizes concretas, em 2009, foi criado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). O programa tem como objetivo inserir com segurança, eficácia e qualidade plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionado à fitoterapia no âmbito do SUS (5,6).

Nesse contexto, é destacado a criação da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que direciona recursos e incentivos a pesquisas de estudos pré-clínicos e clínicos para o desenvolvimento do fitoterápico seguro e padronizado de 71 espécies vegetais com potencial terapêutico. Principalmente, as espécies vegetais nativas que possam atender às doenças comuns brasileiras com segurança e eficácia. Além disso, o Programa tem como objetivo promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais, com isso houve implementação, de forma gradativa, de medicamentos fitoterápicos no âmbito do SUS (5,8,10).

1.2 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Desde o reconhecimento e valorização de plantas medicinais no cuidado básico da saúde e criação de ações públicas que subsidiam a importância da fitoterapia no âmbito da saúde, houve mudanças no elenco básico da assistência farmacêutica. Os medicamentos fitoterápicos, entendidos como produtos derivados de plantas medicinais que possuem sua segurança e eficácia baseada em evidências científicas e caracterizados pela constância de sua qualidade, foram introduzidos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (11).

Em 2007, após um ano da implementação PNPMF, o Ministério da Saúde aprovou a inserção de dois medicamentos fitoterápicos a base de *Mikania glomerata* (guaco) e *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) no SUS pela Portaria nº 3.237 (11). Após 2 anos, houve a ampliação de mais seis medicamentos fitoterápicos, *Cynara scolymus* (alcachofra), *Glycine max* (Soja - isoflavona), *Harpagophyllum procumbens* (garra-do-diabo), *Rhamnus purshiana* (cáscara-sagrada), *Schinus*

terebinthifolius (aroeira-da-praia) e *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato), compondo o elenco de oito medicamentos fitoterápicos disponível para população (12) .

Em 2012, foram inseridos mais quatro medicamentos fitoterápicos, *Aloe vera* (Babosa), *Mentha x piperita* (Hortelã), *Plantago ovata* (Plantago), *Salix alba* (Salgueiro) (13). Atualmente, os doze medicamentos fitoterápicos compõem a RENAME 2014 (14). Com o objetivo de aprofundar e contribuir com estudos sobre a segurança do uso de medicamentos fitoterápicos, nesse estudo, *Cynara scolymus*, *Mikania glomerata*, *Rhamnus purshiana* e *Uncaria tomentosa* foram selecionados para ensaios pré-clínicos de maneira a investigar possíveis interações medicamentosas mediada pelo receptor nuclear PXR (receptor pregnano X).

1.2.1 *Cynara scolymus* L. – Alcachofra

Cynara scolymus L. é conhecida desde os tempos antigos por egípcios, gregos e romanos. No século 4 a.C. os gregos reportaram pela primeira vez na região de Sicília como fonte de força e coragem. Tem-se o conhecimento que desde o século XV a espécie é distribuída na Europa e está presente na dieta Mediterrânea. No século XVIII a disseminação desta planta para América foi importada pelos europeus imigrantes (15,16).

A alcachofra, alcachofra-hortense ou cachofra, popularmente conhecida no Brasil (17), é uma angiosperma pertencente à família *Asteraceae* possivelmente originada de uma espécie selvagem *Cynara cardunculus* (16,18). Apresenta porte herbáceo e distribuição na América: Estados Unidos, Colômbia e Equador (19). O uso tradicional no Brasil das folhas de *C. scolymus* é indicado para cálculos biliares (17,20), afecções hepáticas e renais (17,20,21), arteriosclerose (17,20), prisão de ventre (17), uricosúria (17), dislipidemia (20), diabetes mellitus (17) e diurético (21) administradas em formas de chás ou tinturas caseiras (17,20).

As partes comestíveis são inflorescências imaturas denominada capítulo ou “cabeça” composta por brácteas externa, brácteas internas e prato representando

cerca de 15-20% da biomassa total da planta. As folhas, haste, inflorescência imatura são importantes fontes nutracêuticas por apresentarem diversos compostos orgânicos com propriedades biológicas e terapêuticas (15). Um levantamento realizado por Falco *et al.* (2015) comparando os fitocompostos e estudos farmacológicos ressaltou que os polifenóis são os compostos mais reportados e estudados para a alcachofra, dentre os quais, os ácidos cafeoilquínicos e flavonoides estão em grande destaque. Esses compostos são os mais presentes nas folhas e parte comestível, órgãos vegetais mais estudados, porém não encontrados nas flores e raízes. As antocianinas e oligofrutanas são relatadas e estudadas em menor proporção e estão presentes em partes específicas da planta, distintamente dos sesquiterpenos e triterpenos que, apesar de apresentarem poucos estudos, são existentes em todos os órgãos da planta (15).

As folhas, droga vegetal utilizada para formulação do medicamento fitoterápico, são ricas em compostos fenólicos, principalmente polifenóis e flavonoides, porém pode ser destacada em menor quantidade sesquiterpenos glicosídeos, sesquiterpenos agliconas e triterpenos. Os compostos polifenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico apresentam uma variedade de estruturas, dentre eles, o ácido clorogênico, ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, ácido cafeico, cinarina (ácido 1,3-O-dicafeoilquínico), ácido 1,5-O-dicafeoilquínico, ácido 3,5-O-dicafeoilquínico dentre outros derivados que conferem atividade biológica importante (

Figura 1) (15,22).

As atividades biológicas antioxidante, colerética e colagoga são as mais relevantes e estabelecidas com evidência científica para esta planta (23–25). Estudos *in vitro* ressaltam ação protetiva contra estresse oxidativo induzido (23) por espécies reativas de oxigênio (ROS) em hepatócitos de ratos (23) e em leucócitos humanos (15,21); atividade antimicrobiana (26); atividade hepatoprotetora importante sem comprometer a atividade das transaminases hepáticas (27,28); hipolipemiante (29), inibidor moderado a forte da HMG-Coa redutase, enzima importante na biossíntese do colesterol (24,29).

	Nomenclatura	R ₁	R ₃	R ₄	R ₅
	Ácidos Monocafeoilquínico				
	Ácido 3-O-cafeoilquínico	H	X	H	H
	(ácido neoclorogênico)				
porção cafeoil	Ácido 4-O-cafeoilquínico	H	H	X	H
	(ácido criptoclorogênico)				
	Ácido 5-O-cafeoilquínico	H	H	H	X
	(ácido clorogênico)				
	Ácidos Dicafeoilquínico				
	Ácido 1,3-O-dicafeoilquínico	X	X	H	H
	(cinarina)				
	Ácido 1,5-O-dicafeoilquínico	X	H	H	X
	Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico	H	X	H	X
	(ácido isoclorogênico A)				

Figura 1. Estrutura química de ácidos cafeoilquínicos presentes na *Cynara scolymus*.

1.2.2 *Mikania glomerata* Spreng. – Guaco

Mikania glomerata Spreng., popularmente conhecida como guaco, erva-de-serpentes, guaco trepador (30,31), pertence à família *Asteraceae*, antiga *Compositae*, que compreende cerca de 1500 gêneros, dentre os quais, o gênero *Mikania*, que está distribuído nas regiões tropicais e subtropicais da América (32,33). No gênero, a espécie *M. glomerata* muitas vezes é dificilmente distinguida da espécie *Mikania laevigata*, ambas as espécies apresentam características química, morfológicas e organolépticas semelhantes, além de compartilharem o mesmo habitat (33).

O guaco é usado na medicina tradicional brasileira há séculos devido às propriedades das folhas que empregam ação contra estados gripais, febres, reumatismo, feridas, e inflamações ou afecções respiratórias como asma brônquica, bronquite e tosses. O modo de utilização e ingestão pela comunidade normalmente é em forma de chás por infusão das folhas frescas ou secas (30,31).

Em virtude da utilização e propriedades atribuídas a espécie, *M. glomerata* foi oficializada desde 1929 na Farmacopeia Brasileira primeira edição. Estudos científicos confirmaram boa parte da utilização etnofarmacológica, ação antiofídico (34,35), anti-inflamatória (35–37), analgésico (35) e ação contra afecções respiratórias, como broncodilatação (37) e inflamação gerada por hipersensibilidade (35, 38). Recentemente, Santana *et al.* (2014) evidenciaram em camundongos Swiss indícios de efeitos ansiolíticos pelo extrato etanólico de *M. glomerata* (39).

Em relação à composição fitoquímica, sesquiterpenos e diterpenos do tipo caurano (ácidos caurenico, grandiflórico, cinamoilgrandiflórico, caurenol), β -sitosterol, estigmasterol, taninos hidrolisáveis, flavonoides e saponinas podem estar presente no gênero *Mikania* (32,40). Na espécie *M. glomerata* foram identificadas a presença de cumarina e derivados como dihidrocumarina e ácido *o*-cumárico (33, 39–41), ácido *o*-cumárico, ácido caurenico (40,41), *o*-geranilscopoletina, estigmasterol e β -sitosterol (40, 42). A cumarina, (1,2-benzopirona), destaca-se

como o principal composto responsável que confere a atividade farmacológica de broncodilatação (37,39), (Figura 2).

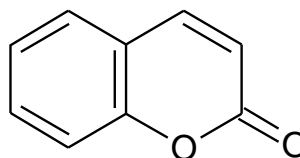


Figura 2. Estrutura química da cumarina presente em *Mikania glomerata*.

1.2.3 *Rhamnus purshiana* DC. – Cáscara-sagrada

Rhamnus purshiana DC. com sinónimas *Frangula purshiana* (DC.) A. Gray (43) e *Frangula purshiana* Cooper (44), angiosperma pertencente à família *Rhamnaceae*, que inclui o gênero *Rhamnus* com mais de 125 espécies. *Rhamnus purshiana* DC. ocorre normalmente em regiões temperadas e subtropicais do hemisfério Norte. Espécie vegetal não endêmica no Brasil, originária do sudoeste do Canadá e noroeste do Pacífico dos Estados Unidos da América, também podendo ser encontrada na Europa (45,46).

Rhamnus purshiana DC. são árvores de pequeno porte (45,47). No Brasil é popularmente conhecida como cáscara sagrada (45), têm suas cascas do caule e dos ramos como órgão vegetal utilizado (45,47). Há registros que esta espécie era utilizada por povos nativos norte-americanos como laxativo ou purgativo leve no tratamento de constipação (46). Na comunidade brasileira a espécie é indicada como purgativo, digestivo, ativador da função hepática e laxante (47,48).

O efeito laxativo desta espécie, categorizada como laxante irritante, deve-se à presença de compostos hidroxiantracênicos, em que se destacam os glicosídeos cascarosídeo A, cascarosídeo B, cascarosídeo C e cascarosídeo D como compostos prevalentes responsáveis pela atividade terapêutica, (Figura 3) (49,50). Outros

compostos são citados, como emodina, crisofanol e respectivos glicosídeos, aloe-emodina podem estar presentes na espécie (51), assim como, 10-hidroxicascarosídeo A e B, derivados de emodina oxantronas (50). Outras classes como naftalidas, taninos e flavonoides, também são encontrados no gênero, em menores proporções (46,52).

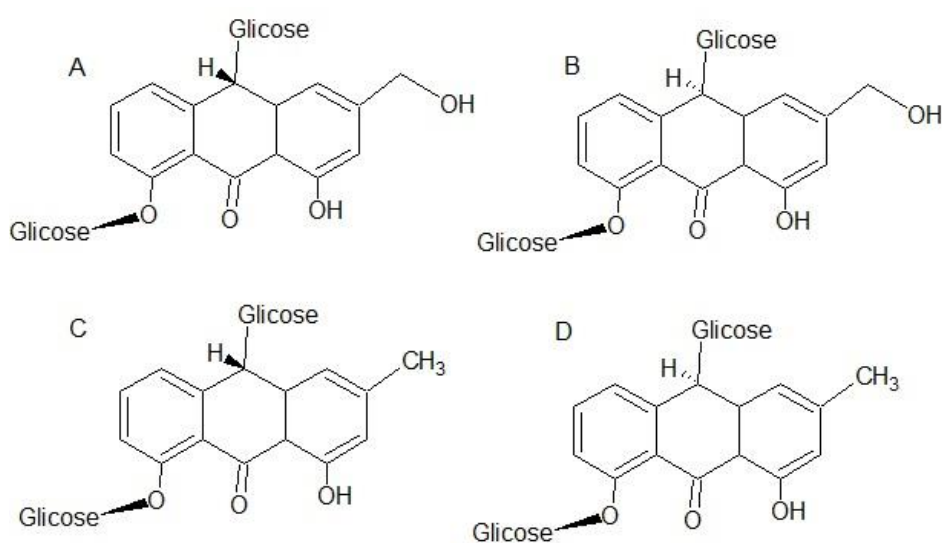


Figura 3. Estrutura química de cascarosídeo A (A), cascarosídeo B (B), cascarosídeo C (C) e cascarosídeo D (D) presente em *Rhamnus purshiana*.

No organismo humano, os glicosídeos atuam como pró-fármacos, ou seja, há a necessidade da metabolização dos compostos para sua forma ativa. Tendo isso em vista, no cólon os glicosídeos são metabolizados por bactérias metabolizadoras de glicose e com isso, o efeito laxativo ocorre quando a aglicona, antraquinona, está livre de um de seus açúcares. Os efeitos laxativos são observados após 6-12 horas da administração oral, tempo em que normalmente ocorre o transporte para o cólon e a metabolização (49,52). É importante ressaltar que a utilização da casca somente é viável, no mínimo, após um ano da coleta do material fresco. Esta precaução deve-se a prevalência do derivados de antronas, compostos altamente irritáveis à mucosa intestinal, que são oxidados em formas monoméricas e exibem efeitos laxativos mais brandos (46,49,50).

Em relação a efeitos nocivos causados pelo uso abusivo, é recomendado o uso por períodos curtos de no máximo 2 semanas, pois o uso crônico e abusivo de laxantes derivados de antraquinonas podem causar efeitos adversos preocupantes. Dentre os efeitos adversos são destacados a dor abdominal, diarreia, irritação da mucosa gástrica e o cólon pode se tornar atônico e dilatado, além de cólicas intestinais e possível dependência dos efeitos laxantes da espécie (45,46,49).

1.2.4 *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) – Unha-de-gato

Uncaria tomentosa (Willd. ex Roem. & Schult.) DC., pertence à família *Rubiaceae*. O gênero *Uncaria* contém aproximadamente 34 espécies que são distribuídos no sudeste da América do Sul, Ásia e África. A espécie *U. tomentosa* tem sua distribuição botânica predominante na América do Sul e América Central, principalmente na região da floresta Amazônica (53).

Uncaria tomentosa é conhecida popularmente no Brasil como unha-de-gato, principalmente. Nos países latino-americanos como *uña de gato* e internacionalmente como *cat's claw* (53–55). Há registros da utilização de *U. tomentosa* por tribos peruanas há mais de 2000 anos (54). Desde então, são utilizadas tradicionalmente em formas de chás para tratar úlceras gástricas, tumores, distúrbios gastrointestinais e, principalmente, reumatismos e inflamações. A infusão ou decocção das cascas, raízes ou folhas é utilizada tradicionalmente para o preparo dos chás terapêuticos (17,53–56). Os produtos de *U. tomentosa* são oferecidos mundialmente devido ao histórico de uso medicinal em preparações diversas, dentre os extratos aquosos e etanólico, um exemplo clássico na Europa é o C-MED100®, extrato aquoso vastamente comercializado (53).

Sabendo-se da ação importante anti-inflamatória da espécie, estudos iniciais atribuíram a eficiência da ação ao perfil e quantidade de alcaloides presente na espécie. Os alcaloides predominantes na espécie são os compostos do tipo oxindólicos pentacíclicos (especiofilina, uncarina F, mitrafilina, isomitrafilina,

pteropodina e isopteropodina) (Figura 4) e oxindólicos tetracíclicos (rincofilina e isorincofilina) (Figura 5), distribuídos majoritariamente nas cascas e raízes (53,56). Contudo, recentemente, alguns autores alegam que a presença minoritária dos alcaloides no extrato aquoso não confere a atividade anti-inflamatória. Esta atividade é conservada pela presença de outras classes de metabólitos secundários como flavonoides, proantocianidina e triterpenos (56–59). Outros metabólitos secundários podem ser encontrados na espécie como alcaloides indólicos e, devido ao gênero, flavonoides, terpenos e antocianinas (56,57,59) .

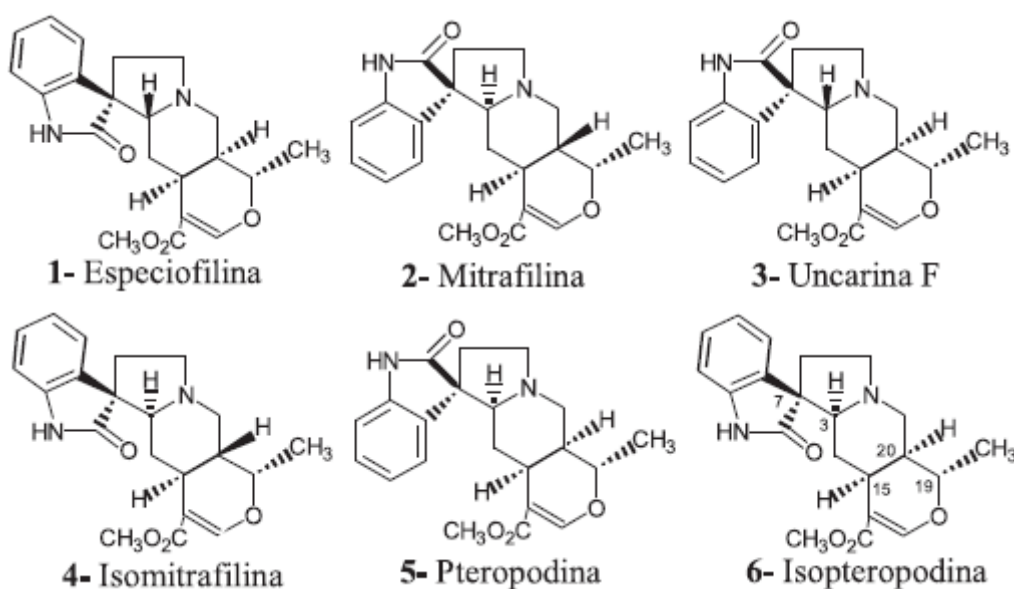


Figura 4. Compostos alcaloides oxindólicos pentacíclicos de *Uncaria tomentosa*.

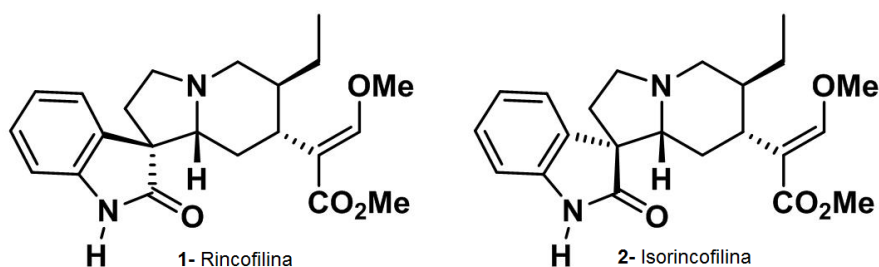


Figura 5. Compostos alcaloides tetracíclicos de *Uncaria tomentosa*.

Além disso, outras atividades importantes para essa espécie são relatadas: atividade antioxidante (59–61), redução de níveis glicêmicos em camundongos, atividade antimicrobiana, antirretroviral, e imunoestimulador (53,62). Estudos clínicos recentes relacionam o uso concomitante de comprimidos de *U. tomentosa* (presença de alcaloides oxindólicos) em pacientes com câncer como coadjuvante na melhoria da qualidade de vida, redução de fadiga e ausência de toxicidade pelo fitoterápico em pacientes em quimioterapia (63,64). A qualidade de vida pode estar relacionada à ação antinociceptiva dos alcaloides oxindólicos por meio do receptor serotoninérgico 5-HT₂ (65).

1.3 METABOLIZAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

O aumento do uso, infelizmente, da maior parte dos medicamentos fitoterápico e de plantas medicinais ocorre por automedicação ou prescrição médica indiscriminada (66). Diversos casos e relatos vêm sendo reportados de interação medicamentosa entre medicamento convencional e medicamentos derivados de plantas (67–71). A escassez de estudos farmacocinéticos, a pouca atenção às interações de medicamento fitoterápico com fármacos convencionais e o conceito enraizado de que “natural não faz mal”, induz a população a utilizar de forma excessiva produtos derivados de plantas, muitas vezes concomitantemente com medicamentos convencionais. Com isso, o aumento de uso de plantas medicinais muitas vezes está intimamente ligado ao aumento de relatos de casos de reações adversas (66,71).

Reações adversas podem ser consequência de interações farmacocinéticas e/ou farmacodinâmica. As interações farmacodinâmicas podem causar mudanças na resposta farmacológica por efeito antagônico (competitiva ou não competitiva), sinérgica ou aditiva. Enquanto interações farmacocinéticas compreendem a modificação do composto ingerido, mediadas por enzimas metabolizadoras ou proteínas de transporte, na absorção, distribuição, biotransformação e excreção pelo organismo. Considera-se que grande parte das interações medicamentosas que

resultam em reações adversas ou até a morte do paciente pode estar relacionada à farmacocinética (68,72).

Os xenobióticos - compostos estranhos ao organismo que inclui fármacos e medicamentos fitoterápicos -, ao serem ingeridos pelos humanos, induzem processos de biotransformação, repostas biológicas que converte os xenobióticos em metabólitos polares e menos ativos, este processo pode levar à alteração da biodisponibilidade e atividade biológica do ingerido ou este interferir na metabolização do segundo xenobiótico ingerido (73–75).

A biotransformação desses compostos é dividida em duas fases: fase I e fase II. A reação de fase I converte o precursor em metabólitos mais polares por meio de reações de oxidação, redução e hidrólise. A fase II, também denominada reações de conjugação, tem como objetivo aumentar a polaridade dos compostos por meio da combinação de substâncias endógenas que possibilitem o aumento da hidrossolubilidade dos xenobióticos. Alguns produtos da fase I, que não são eliminados rapidamente ou xenobióticos que já contenham grupo funcional que possa ser conjugado diretamente sofrem reações subsequentes de aumento da polaridade pela fase II, normalmente é a etapa final para serem excretados. Nessa etapa ocorre reações de conjugação ou reações sintéticas em que substratos endógenos (ácido glicurônico, sulfatos, acetato, aminoácidos, grupos acetil e grupos metil) interagem diretamente com o metabólito ou por meio de enzimas de transferência específica, transferases, para formar um conjugado altamente polar (72,73,76).

Na fase I, as reações químicas são mediadas por um grupo de enzimas monooxigenases pertencentes à superfamília citocromo P450 (CYP ou P450). Essas enzimas são localizadas no retículo endoplasmático liso, presente de forma abundante no fígado e outros tecidos extra-hepáticos, como o trato gastrointestinal, pulmões e rins. Diversas isoformas estão difundidas no corpo humano, porém as CYP1, CYP2 e CY3 são as mais abundantes no fígado e responsáveis por metabolizarem grande parte dos xenobióticos. Dentre elas, a isoforma CYP3A4 destaca-se pela prevalência e envolvimento no metabolismo de diversas classes terapêuticas (71,72).

Nos anos 90, a fim de realizar estudos para caracterização da região promotora da CYP3A4, foi observado por meio de clonagem da CYP3A4 a capacidade de resposta para dexametasona, rifampicina e pregnenolona. Devido à indução por dexametasona pensava-se que receptores de glicocorticoides poderiam estar envolvidos na regulação gênica, porém diversas linhas de estudos emergiram contrapondo essa suposição. Dentre os grandes achados, os elementos responsivos de DNA na região promotora da CYP3A, responsáveis pela resposta da dexametasona e rifampicina, eram mediadas pelo receptor pregnano X (PXR) (74,77).

O PXR é um importante regulador transcricional dos genes da CYP3A4 com capacidade de ativação promíscua de ligantes, ou seja, seu domínio de ligação ao ligante (LBD) caracteriza-se por acomodar ligantes com estrutura química diversa. Isto o torna um grande mediador da metabolização de xenobióticos, que forma heterodímero com o receptor retinoide X (RXR). No momento que um xenobiótico interage com o PXR dimeriza-se com RXR para interagir nos elementos responsivos (ER6 e DR3) da região promotora dos genes da CYP3A4, cofatores de repressão ou ativação são sinalizados e ocorre a inibição ou estimulação da transcrição da expressão dos genes CYP3A4 (Figura 6). Atualmente, PXR tem se mostrado um importante regulador nas CYP2B, CYP2C e CYP2A6, enzimas também metabolizadoras de xenobióticos pertencente a superfamília CYP450 (78,79).

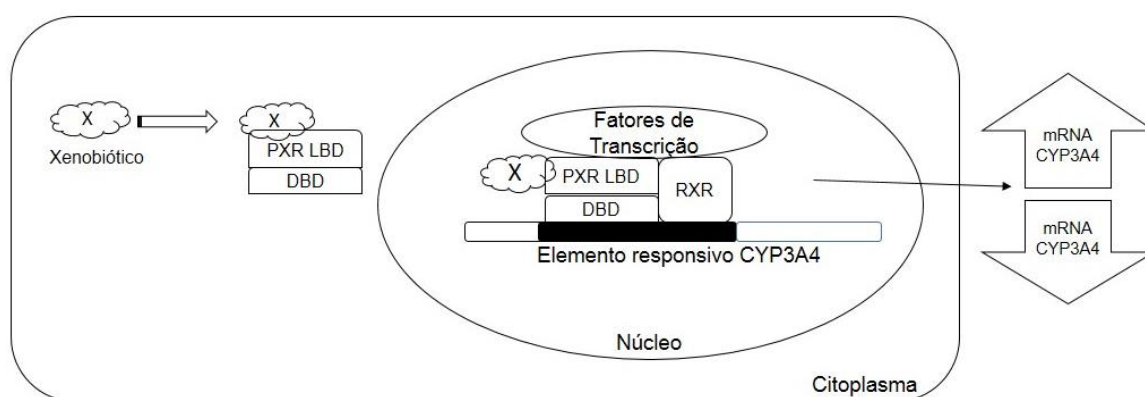


Figura 6. Esquema representativo da metabolização de xenobiótico por PXR.

Nesse conceito, ensaios celulares foram desenvolvidos para descobrir compostos que ativam o receptor nuclear. Esses ensaios utilizam plasmídeos que expressão o receptor nuclear e plasmídeo repórter, logo são co-transfectados para linhagem celular de interesse. O plasmídeo do receptor podem ser caracterizados na forma quimera, LBD do receptor humano e a região DBD corresponde a outra proteína (exemplo, fator de transcrição de levedura Gal4) acoplado a um gene repórter (luciferase ou cloranfenicol acetiltransferase), complementar a expressão do plasmídeo repórter. A vantagem desse sistema deve-se à eliminação de mensuração de receptores endógenos presentes na linhagem celular (79).

Diante do cenário exposto, os ensaios com receptores quiméricos são úteis para o desenvolvimento de prescrições mais seguras, a fim de prever indução ou inibição das enzimas do complexo citocromo P450. Dessa forma, os quatro medicamentos fitoterápicos já mencionados foram avaliados utilizando o modelo *in vitro* da fase I de metabolização em células HeLa. Este modelo visa relacionar a ação agonista no receptor pregnano X e possíveis interações medicamentosas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade dos medicamentos fitoterápicos Alcachofra (*Cynara scolymus* L.), Cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.), Guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) e Unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.) na ativação do receptor pregnano X em modelo *in vitro*.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Investigar a concentração ideal dos medicamentos fitoterápicos que forneçam $\geq 70\%$ de viabilidade celular em cultura de células HeLa pelo método de brometo de tetrazólio (MTT);
- b) Preparar os extratos aquosos da droga vegetal das espécies correspondente aos medicamentos fitoterápicos;
- c) Identificar e quantificar os marcadores fitoquímicos presentes nos medicamentos fitoterápicos e no extrato aquoso correspondente;
- d) Comparar a citotoxicidade celular do medicamento fitoterápico e o extrato aquoso da planta correspondente, normalizado às concentrações de estudo por um marcador fitoquímico;
- e) Investigar ação agonista ao receptor de pregnano X dos medicamentos fitoterápicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E EXTRATOS AQUOSOS VEGETAIS

Os medicamentos fitoterápicos foram obtidos em estabelecimento farmacêutico de Brasília, Distrito Federal, em formulações de xarope para *Mikania glomerata* Spreng. e cápsula para os demais medicamentos fitoterápicos (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos medicamentos fitoterápicos adquiridos de acordo com o fabricante

Medicamento fitoterápico	Quantidade de extrato seco	Concentração do marcador (valor rotulado)	Apresentação farmacêutica
<i>Cynara scolymus</i> L.	300 mg	1,5 mg cinarina	Cápsula
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	81,5 mg/mL	0,3 mg cumarina	Solução Oral
<i>Rhamnus Purshiana</i> DC.	75 mg	12 mg derivados hidroxiantracênicos	Cápsula
<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. Ex Roem. & Schult.)	100 mg	4,5-5,5 mg alcaloides totais	Cápsula

Dados obtidos da bula do medicamento fitoterápico

Os extratos aquosos brutos foram obtidos a partir do pulverizado da droga vegetal igual aos utilizados nos medicamentos fitoterápicos: folhas da *Cynara scolymus* L., folhas *Mikania glomerata* Spreng, casca *Rhamnus purshiana* DC. e casca *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) adquiridos do comércio farmacêutico local.

Todos os extratos foram produzidos por infusão de acordo com a Farmacopeia Brasileira 1ª edição em que 1 g da droga vegetal foi extraído por 10 mL de água destilada a 70°C, posteriormente congelados e liofilizados (SP Scientific Advantage Plus XL-70). Foi utilizado o método de extração por água devido à ausência de informação do método extrativo das espécies vegetais pelo fabricante dos medicamentos fitoterápicos.

A espécie *Uncaria tomentosa* foi submetida, além da extração aquosa por infusão, à extração aquosa por decocção conforme Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira 1ª edição. Foi utilizada a relação 500 mg da casca pulverizada : 150 mL de água destilada por 10 minutos em decocção, filtrado e posteriormente congelado e liofilizado (80).

3.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES FITOQUÍMICOS POR CLAE-DAD

Os medicamentos fitoterápicos e extratos aquosos foram submetidos à análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD) para quantificação dos seus principais marcadores fitoquímicos. Foi utilizado o cromatógrafo LaChrom Elite (Hitachi, Tokyo, Japan) equipado com detector L2455 DAD (Hitachi, Tokyo, Japan), injetor L2200, bomba L2130 e forno para coluna L2300. Os dados foram obtidos com o software EZChrom Elite version 3.3.2 (SP1 Scientific Software Inc.). Para cada medicamento fitoterápico foi usado um método para avaliação de seu marcador fitoquímico majoritário.

Todas as amostras (n=3) foram filtradas por membrana 0,45 µm (Millipore Merck®) e disposto para análises. Todos os solventes utilizados foram de grau CLAE da Tedia ou Sigma-Aldrich. A água ultrapura foi adquirida pelo sistema Milli-Q, Millipore, Merck.

Os teores dos compostos majoritários dos medicamentos e extratos aquosos foram obtidos por meio da relação entre a área do pico do padrão e a área do pico equivalente na amostra.

3.2.1 *Cynara scolymus* L.

O teor de ácido clorogênico de *Cynara scolymus* L. foi determinado segundo o método descrito na monografia para a droga vegetal da Farmacopeia Europeia 7ª edição com modificações segundo Carneiro *et al.* (2017), visto que não há monografia para a espécie na versão atual da Farmacopeia Brasileira. Foi utilizada a coluna PurospherStar RP C18e (250 x 4.6 mm, 5 mm, Merck) com temperatura mantida à 40°C, fluxo de 1,2 mL/min, volume de injeção de 25 µL e detecção à 330 nm. A fase móvel foi constituída por um gradiente de ácido fosfórico 0,5% em água ultrapura (canal A), ácido fosfórico 0,5% em acetonitrila (canal B) conforme tabela abaixo (81,82).

Tabela 2. Gradiente da fase móvel para a detecção de marcadores em amostras de *Cynara scolymus*

Tempo (min)	Canal A (%)	Canal B (%)
0 – 1	92	8
1 – 20	92 → 75	8 → 25
20 – 33	75	25
33 – 35	75 → 0	25 → 100
35 – 40	0 → 92	100 → 8

Para o preparo das amostras do medicamento foi pesado o equivalente a 100 mg de extrato seco de alcachofra da mistura de 20 cápsulas. A amostra foi diluída em água ultrapura na concentração de 4 mg/mL de extrato seco presente na formulação. O extrato aquoso preparado das folhas foi solubilizado a 5 mg/mL em

metanol:água ultrapura (3:7). O padrão de ácido clorogênico (ácido 3-O-cafeoilquínico) (Sigma-Aldrich®) foi preparado na concentração de 10 µg/mL em metanol (Tedia®).

3.2.2 *Mikania glomerata* Spreng.

O teor de cumarina de *Mikania glomerata* Spreng. foi determinado pelo método validado no Laboratório de Controle da Qualidade, Universidade de Brasília, Brasília – Distrito Federal (83) pelos seguintes parâmetros: detector 220 a 400 nm e cromatograma extraído em 276 nm. A temperatura mantida a 25°C e a coluna utilizada foi a PurospherStar RP C18e (150 x 4.6 mm, 5 µm, Merck) acoplada a pré-coluna (4 P 4; 5 mm particlesize, Merck). Em sistema de eluição isocrática, a fase móvel constituída de solução de 37% de ácido fosfórico 1% (Canal A) e 63% de acetonitrila (Canal C) com fluxo da fase móvel foi de 0,6 mL/min e o volume de injeção de 10 µL.

A amostra do xarope foi preparado na proporção de diluição 1:5 por meio de uma solução de 65% água ultrapura e 35% acetonitrila (xarope:solução de acetonitrila 35%), posteriormente centrifugado por cinco minutos a 25°C em 1200 rpm. O padrão de cumarina (Sigma-Aldrich®) foi preparado em metanol na concentração de 100 µg/mL. O extrato aquoso preparado das folhas foi solubilizado na concentração de 1 mg/mL em água ultrapura.

3.2.3 *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.)

O teor de alcaloides totais de *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) foi determinado segundo o método descrito na Farmacopeia dos Estados Unidos (United States Pharmacopeia - USP-39) com a coluna Nucleosil® C18 com partículas de 3 µm e dimensões de 10 cm x 4.6 mm. O volume de injeção foi de 10

μm em fluxo de 0,75 mL/min e o cromatograma foi extraído em 245 nm. A fase móvel foi constituída por um gradiente de tampão fosfato 10 mM com pH 7 (Canal A), acetonitrila (Canal B) e ácido acético glacial 1% em metanol (Canal C). O tampão fosfato 10 mM foi preparado misturando hidróxido de sódio 1 M, fosfato de potássio monobásico 1 M e água ultrapura na proporção de 3:5:492. O pH do tampão foi ajustado para 7 e filtrado em membrana 0,45 μm (Merck®) (84).

Tabela 3. Gradiente da fase móvel para a detecção de marcadores de *Uncaria tomentosa*

Tempo (min)	Canal A (%)	Canal B (%)	Canal C (%)
0 - 17	65	35	0
17 - 25	65 \rightarrow 50	35 \rightarrow 50	0
25 - 30	50	50	0
30 - 31	50 \rightarrow 0	50 \rightarrow 0	0 \rightarrow 100
31 - 36	0	0	100
36 -39	0 \rightarrow 65	0 \rightarrow 35	100 \rightarrow 0
39 - 49	65	35	0

Para o preparo das amostras do medicamento foi pesado o equivalente a 50 mg da quantidade declarada de alcaloides totais calculados como mitrafilina da mistura de 20 cápsulas. O conteúdo foi transferido para tubo tipo falcon, solubilizado com 10 mL de metanol e sonificado por 10 minutos. A solução foi centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm 25°C. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL. A extração metanólica foi feita mais 2 vezes com o decantado. As extrações foram combinadas no mesmo balão volumétrico de 50 mL e diluídas com metanol até volume final. Em tubos de ensaio contendo 300 mg de poliamida foram transferidos 3 mL da solução e agitados. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 μm . A primeira parte do filtrado foi descartado e a amostra foi analisada (84).

Os extratos aquosos preparados por infusão e decocção foram solubilizados em metanol a 8 mg/mL. O padrão de isopteropodina (USP *Reference Standard*) foi preparado na concentração de 0,1 mg/mL em metanol.

O teor dos alcaloides totais (especiofilina, uncarina F, mitrafilina, isomitrafalina, pteropodina, isopteropodina, rincofilina e à isorincofilina) foi calculado comparando a área do pico do padrão de isopteropodina, concentração conhecida, com a área do pico correspondente a cada marcador. A área do pico de cada marcador foi identificada de acordo com o certificado do extrato padronizado emitido pela USP *pharmacopeia*.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES FITOQUIMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Pela ausência de monografia na Farmacopeia Brasileira 5ª edição e dificuldades na reprodutibilidade no método de quantificação e identificação de cascarosídeos na espécie *Rhamnus purshiana* proposto pela Farmacopeia Europeia 7ª edição, os compostos presentes nesta espécie foram determinados por cromatografia em camada delgada (CCD).

Neste método foram utilizadas placas de alumínio recobertas de sílica gel (Sigma-Aldrich®). A determinação e identificação dos compostos majoritários foram realizadas de acordo com metodologia sugerida por Wagner e Bladt (85). O eluente foi composto por uma mistura de acetato de etila, metanol e água na proporção 39:7:4. A solução reveladora utilizada foi o reagente NP/PEG, constituído da solução metanólica de difenilboriloxietilamina 1% (NP) e solução etanólica de polietilenoglicol 4000 (PEG) a 5%, conforme descrito pelos autores (85).

A amostra do medicamento foi preparada em água ultrapura em uma concentração de 8 mg/mL de extrato seco declarada na formulação, disposto em sonicador por 40 minutos e filtrado em membrana de 0,45 µm. A mesma concentração foi usada para a amostra do extrato aquoso em água ultrapura e extrato padronizado (Casantranol - Sigma-Aldrich®). As amostras foram aplicadas na placa cromatográfica com auxílio de um tubo capilar e, após a aplicação, as placas foram colocadas em cuba saturada com a solução eluente. Finalizada a

eluição e volatilização do eluente da placa foi utilizada uma solução reveladora para elucidar a presença dos compostos.

A placa cromatográfica foi colocada em exposição à luz ultravioleta a 365 nm e o fator de retenção (Rf) de cada ponto foi calculado para comparação com os padrões referentes conforme descrito por Wagner e Bladt (1995).

3.4 CULTURA DE CÉLULAS HELA

Para o ensaio de citotoxicidade e gene repórter de luciferase foram utilizadas células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (lote 001419). Essas células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium pH 7,0 (DMEM, Thermo Fisher Scientific® -12100046) estéril enriquecido com 10% soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific® -12657029), 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma®), 100 UI/mL penicilina (Sigma®) e 100 µg/mL estreptomicina (Sigma®), denominado DMEM completo. As células somente foram usadas para os ensaios depois de três passagens após descongelamento.

A dissociação celular foi feita por meio da enzima proteolítica inespecífica, tripsina, a qual hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil sem comprometer ou danificar a superfície celular quando em contato por curto período de tempo (86). Após a remoção do meio antigo, foi adicionado 8 mL de solução salina tamponada (PBS) com fosfato pH 7 sobre as células para retirada de corpos celulares remanescentes. Depois de remover a solução salina, foram adicionados 4 mL solução de tripsina 0,5% e foram incubadas por 2 minutos. Em seguida, 8 mL de meio de cultivo celular DMEM completo foram adicionados. As células foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuscitado com meio de cultivo celular DMEM completo, frações dessa solução foram transferidas para garrafas de cultura 75 cm² para subcultivo.

O método de dissociação foi feito quando as células atingiram 80-90% de confluência, sendo frações dessas células transferidas para garrafas de cultura de forma a continuar o crescimento celular.

3.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS FITOTERÁPICOS E EXTRATOS VEGETAIS EM CÉLULAS HELA

O teste de citotoxicidade para células HeLa foi realizado segundo método colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT – SIGMA-ALDRICH®) (87,88), com adaptações, com intuito de saber a dose ideal máxima não nociva com viabilidade celular igual ou superior a 70%. Este método consiste em determinar a viabilidade celular por meio da redução do MTT que ocorre, principalmente, nas mitocôndrias pela ação da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH) (89), essa e demais enzimas microssomais produzem o formazan como produto final, cristal de difícil solubilidade de coloração azul. O MTT somente é reduzido em células vivas e metabolicamente ativas, ou seja, células com mitocôndrias funcionais que proporcionam a ação das oxidoredutases, portanto, considera-se que a quantidade de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de formazan produzida (87).

Em capela de fluxo laminar vertical (ESCO®) as células HeLa foram semeadas, 30.000 células por poço, exceto o controle do reagente MTT (branco), em meio de cultivo DMEM completo apresentando volume total final de 200 µL/poço em placa de 96 poços. Após 24 horas em incubadora (Panasonic®) a 37°C/5% CO₂ foi retirado o meio de cultura e adicionado o tratamento, medicamento fitoterápico ou extrato aquoso, em meio de cultura DMEM completo em concentrações afins de encontrar viabilidade ≥70% com volume total final de 200 µL/poço. O controle positivo foi constituído de meio DMEM completo e veículo (água ultrapura) das amostras teste.

A etapa de tratamento ocorreu por 24 horas em incubadora a 37°C/5% CO₂. Todas as amostras dos medicamentos fitoterápicos foram diluídas em água

ultrapura, disposto em sonificador por 40 minutos e filtrado através de membrana de 0,45 µm. As amostras dos extratos aquosos foram diluídos em água ultrapura e filtrados através membrana 0,45 µm.

Na etapa seguinte, o meio foi removido e adicionados 50 µL de solução MTT 1 mg/mL (Sigma-Aldrich®) dissolvida em DMEM sem fenol vermelho (Gibco® - 21063-029) e disposta em incubadora por 4 horas. Ao final, 150 µL de solução de isopropanol acidificado (ácido clorídrico 0,04 M) foi utilizado como solvente diluidor dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (Beckman Coulter® DTX 800) a 570 nm.

Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis tratadas pelo extrato aquoso ou medicamento fitoterápico em relação ao controle positivo (100%) e descontada a coloração interferente do reagente MTT (branco) conforme a equação abaixo. A concentração ideal selecionada para o teste de gene repórter luciferase foi aquela que apresentou viabilidade $\geq 70\%$.

$$\% \text{ viabilidade celular: } \frac{\text{Amostra-Branco}}{\text{Controle - Branco}} \times 100$$

Em que:

Amostra: Absorbância da amostra

Branco: Média das absorbância dos poços com MTT dissolvido em DMEM sem fenol vermelho e sem células.

Controle: Média da absorbância dos controles positivos, apenas células e tratado com DMEM.

A interferência do medicamento fitoterápico e extrato aquoso sobre o reagente MTT foi avaliado. A complexidade fitoquímica das espécies vegetais pode reduzir o reagente MTT em cristais de formazan diretamente, ao invés do reagente

MTT ser reduzido pela rota enzimática mitocondrial por células viáveis. Nenhuma espécie vegetal demonstrou ação redutora quando avaliado por 24 horas com reagente MTT.

3.6 ENSAIO GENE REPÓRTER COM TRANSFECCÃO PELO REAGENTE LIPOFECTAMINA

3.6.1 Transformação do DNA plasmideal em células competentes e purificação

Para a transfecção e ensaio de gene repórter de luciferase foram utilizados dois plasmídeos de expressão, sendo estes, plasmídeo quimérico contendo o domínio de ligação ao ligante (LBD) do PXR humano fusionado ao domínio de ligação do DNA (DBD) do fator de transcrição de levedura Gal-4 (hPXRLBD Gal-4), plasmídeo contendo o gene repórter, elemento responsivo, da luciferase (REGal4-Luc) e CMV-luc como controle positivo de transfecção, plasmídeo citomegalovírus fusionado ao gene que codifica a enzima luciferase que produz luciferase constitutivamente. Esses plasmídeos foram gentilmente cedidos pelas professoras Marie Togashi e Flora Milton do Laboratório de Farmacologia Molecular - UnB.

A replicação dos plasmídeos foi feita em células procarióticas *Escherichia coli* linhagem DH5 α , vetor de clonagem. Em meio estéril, foram utilizados 50 μ L do vetor de clonagem e 1 μ L do plasmídeo de interesse. Após incubação em gelo por 30 minutos, foi colocado em banho-maria 42°C por 90 segundos e imediatamente foi resfriado no gelo por 2 minutos, este choque térmico no vetor promove a abertura de poros de sua membrana para a passagem do DNA plasmideal e seu fechamento. A cultura foi incubada por 1 hora em incubadora a 37°C em 500 μ L de meio Lauria-Bertani (LB - extrato de levedura 5 g, triptona 10 g e NaCl 10 g em 1 L de água destilada) líquido sem antibiótico. Após o tempo estimado, foram colocados 30 μ L do incubado em placas de petri com meio LB sólido com ampicilina 0,1 mg/mL (triptona 10 g, extrato de levedura 5 g, NaCl 10 g, meio aguar 15 g em 1 L de água destilada)

por 12 horas em incubadora a 37°C/5% CO₂. Uma única colônia formada dessas células competentes foi submetida à amplificação em um tubo de ensaio com 5 mL de meio LB líquido e ampicilina 0,1 mg/mL. Incubou-se por 16 horas a 37°C/5% CO₂ em 250 rpm. Em seguida, o conteúdo foi transferido para 300 mL do meio LB líquido com ampicilina a 0,1 mg/mL sob mesmas condições 16 horas, em condições estéril.

O processo de purificação foi iniciado ao término da amplificação das células competentes em 300 mL. Para esse processo foi usado o protocolo e kit de purificação da Quiagen Plasmid Maxi Kit®. O conteúdo de cada erlenmeyer foi centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi dissolvido sequencialmente em tampão de acordo com o protocolo Quiagen Plasmid Maxi Kit®.

3.6.2 Ensaio de gene repórter do receptor pregnano X em células HeLa

O ensaio de gene repórter consiste em identificar ligantes para receptores nucleares de interesse, sendo esse acompanhado previamente do ensaio de transfecção, o qual consiste na inserção do plasmídeo repórter e do plasmídeo de expressão do receptor nuclear no núcleo da célula HeLa. A inserção dos plasmídeos foi feita por meio do reagente Lipofectamine® 2000 transfection reagent (Thermo Fisher® - 11668027) – lipofectamina segundo protocolo do fabricante com adaptações.

As células HeLa foram coletadas após o método de dissociação enzimática por centrifugação a 2000 rpm por 3 minutos e ressuspensas em meio DMEM 10% com soro fetal bovino (SFB) e sem solução de antibiótico (ATB). Foram semeadas 50.000 células por poço em meio de cultivo DMEM 10% SFB sem ATB apresentando volume total final de 250 µL/poço em placa de 48 poços. Após adesão das células *overnight*, foi feito o procedimento de transfecção, o qual consiste em inserir os plasmídeos hPXRLBD Gal-4 e REGal4-Luc por meio do reagente de lipofectamina. O homogenato dos plasmídeos contendo 60 ng de receptor nuclear (hPXRLBD Gal-4) e 240 ng do elemento responsivo (REGal4-Luc) por poço foram

preparados com meio DMEM sem SFB-ATB em quantidade suficiente para 25 µL. Em paralelo, o reagente lipofectamina (0,5 µL/poço) em DMEM não enriquecido com SFB-ATB foi preparado em quantidade suficiente para 75 µL/poço. Após 5 minutos de estabilização do reagente lipofectamina no meio de cultivo, foi feita a inserção do homogenato de plasmídeos na solução de lipofectamina para formação de lipossomos. Após 20 minutos de formação e estabilização dos lipossomos, 100 µL dessa solução foram adicionados em cada poço. Após 6 horas de transfecção, todo conteúdo por poço foi retirado e iniciou o ensaio de gene repórter de luciferase.

Em seguida, o tratamento foi iniciado com volume total de 250 µL por poço com DMEM não enriquecido com SFB-ATB. A quantidade de meio DMEM não enriquecido com SFB-ATB foi padronizado para todas as amostras. Para esse ensaio foram utilizados dois controles positivos: rifampicina (Sigma® - R3501) e *Hypericum perforatum* (Sigma - Y0001050). O tratamento permaneceu por 22 horas em incubadora a 37°C/ 5% CO₂. Em seguida, o tratamento foi retirado e realizado o rompimento das células remanescentes com o tampão de lise celular (50 µL) conforme o kit Luciferase Assay Systems® (Promega - E4530). O lisado celular (10 µL) foi misturado com 20 µL do substrato para a enzima luciferase (luciferina) presente no kit Luciferase Assay Systems® (Promega - E4530), a emissão da luz resultante da reação enzimática entre luciferina e luciferase foi quantificada em luminômetro (Turner Designs Inst. Mod TD-20/20). O ensaio foi realizado em três experimentos independentes composto por três replicatas.

A partir dessa emissão de luz é calculada a taxa de transcrição do ligante, de acordo com a equação abaixo. A taxa de ativação é a razão entre a emissão de luz das células tratadas e o ligante (controle positivo, medicamento fitoterápico) sobre a emissão de luz das células tratadas com veículo – DMSO: etanol (2:1).

$$\text{Taxa de ativação} = \frac{\text{Emissão de luz do ligante}}{\text{Emissão de luz do veículo}}$$

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foram usados os softwares Microsoft Office Excel® 2013 e GraphPad Prism® versão 5.0. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade foram expressos por média \pm erro padrão em porcentagem realizados com quatro replicatas em três experimentos independentes. Os ensaios de gene repórter foram expressos em taxa de ativação por média \pm erro padrão com ao menos três experimentos independentes em três replicatas. Para evidência de diferença estatística foi feita a aplicação de *One-way analysis of variance* (One-way ANOVA) com pós-teste Tukey para os resultados com distribuição paramétrico e Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn's para os resultados com distribuição não paramétrico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Perspectivas Políticas sobre medicamentos de la OMS - Medicina Tradicional – Necesidades Crecientes y Potencial. Ginebra; 2002.
2. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2013. 72 p.
3. Brasil. Portaria n.º 212, de 11 de setembro de 1981. Define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação em saúde. Brasília, Brasil; 1981.
4. Brasil. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. 148 p.
5. Brasil. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. 60 p.
6. Brasil. Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. 136 p.
7. Dias JE, Laureano LC. Farmacopéia popular do Cerrado. Goiás: Articulação Pacari (Associação Pacari); 2009.
8. Brasil. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS - PNPIC-SUS. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº.971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União; 2006.
10. Brasil. Cadernos de atenção básica Práticas integrativas e complementares Plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Ministério da Saúde, organizador. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília; 2012. 156 p.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.237 de 24 de dezembro de 2007. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. Diário Oficial da União; 2007.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.982 de 26 de novembro de 2009. Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. Diário Oficial da União; 2009.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 533 de 28 março de 2012. Estabelece

- o elenco de medicamentos e insumos de Relação Nacional de Medicamentos (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial da União; 2012.
14. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2014. 9º ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.
 15. Falco B, Incerti G, Amato M, Lanzotti V. Artichoke: botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochem Rev*. Springer Netherlands; 2015;14(6):993–1018.
 16. Kraft K. Artichoke leaf extract - Recent findings reflecting effects on lipid metabolism, liver and gastrointestinal tracts. *Phytomedicine*. 1997;4(4):369–78.
 17. Silva AG, Lameira APN, Amorim ACL, Lameira CN, Alcântara DA, Oliveira ECP, et al. Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. Lameira OA, Pinto JEBP, organizadores. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; 2008. 93-205 p.
 18. Carreira RC. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente; 2007.
 19. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden [Internet]. 2016 [citado 7 de novembro de 2016]. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/2700661>
 20. Panizza S. Plantas que curam: cheiro de mato. 27º ed. São Paulo: IBRASA; 1997. 22-24 p.
 21. Salem M Ben, Affes H, Ksouda K, Dhouibi R, Sahnoun Z, Hammami S, et al. Pharmacological Studies of Artichoke Leaf Extract and Their Health Benefits. *Plant Foods Hum Nutr*. 2015;70(4):441–53.
 22. Lattanzio V, Kroon PA, Linsalata V, Cardinali A, Pagano I, Piccinelli AL, et al. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. *J Funct Foods*. 2009;90(3):331–4.
 23. Gebhardt R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997;144(2):279–86.
 24. Fritsche J, Beindorff CM, Dachtler M, Zhang H, Lammers JG. Isolation,

- characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *Eur Food Res Technol.* 2002;215(2):149–57.
25. Magielse J, Verlaet A, Breynaert A, Keenoy BMY, Apers S, Pieters L, et al. Investigation of the in vivo antioxidative activity of *Cynara scolymus* (artichoke) leaf extract in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58(1):211–5.
 26. Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem.* 2004;52(24):7272–8.
 27. Adzet T, Camarasa J, Laguna JC. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* L. against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *J Nat Prod.* 1987;50(4):612–7.
 28. Colak E, Ustuner MC, Tekin N, Colak E, Burukoglu D, Degirmenci I, et al. The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats. Springerplus. Springer International Publishing; 2016;5(1):216.
 29. Gebhardt R. Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286(3):1122–8.
 30. Panizza S. Plantas que curam: cheiro de mato. 27^o ed. São Paulo: IBRASA; 1997. 117-118 p.
 31. Silva AG, Lameira APN, Amorim ACL, Lameira CN, Alcântara DA, Oliveira ECP, et al. Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. 1^o ed. Lameira OA, Pinto JEBP, organizadores. Belém: Embrapa Amazônia Oriental; 2008. 129-130 p.
 32. Czelusniak KE, Brocco A, Pereira DF, Freitas GBL. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: Revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Rev Bras Plantas Med.* 2012;14(2):400–9.
 33. Gasparetto JC, Campos, Francinete R, Budel, Jane M, Pontarolo R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. *Brazilian J*

- Pharmacogn. 2010;20(4):627–40.
34. Maiorano VA, Marcussi S, Daher MAF, Oliveira CZ, Couto LB, Gomes OA, et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol.* 2005;102(3):364–70.
 35. Ruppelt BM, Pereira EF, Gonçalves LC, Pereira NA. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom - I. analgesic and anti-inflammatory activities. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1991. p. 203–5.
 36. Suyenaga ES, Reche E, Farias FM, Schapoval EES, Chaves CGM, Henriques AT. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. *Phyther Res.* 2002;16(6):519–23.
 37. Moura RS de, Costa SS, Jansen JM, Silva CA, Lopes CS, Bernardo-Filho M, et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54(2):249–56.
 38. Fierro IM, Borges Da Silva AC, Da Silva Lopes C, Soares De Moura R, Barja-Fidalgo C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol.* 1999;66(1):19–24.
 39. Santana LCLR, Brito MRM, Oliveira GLS, Citó AMGL, Alves CQ, David JP, et al. *Mikania glomerata*: phytochemical, pharmacological and neurochemical study. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2014;2014.
 40. Rufatto LC, Finimundy TC, Roesch-Ely M, Moura S. *Mikania laevigata*: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. *Phytomedicine.* 2013. p. 883–9.
 41. Gasparetto JC, Peccinini RG, De Francisco TMG, Cerqueira LB, Campos FR, Pontarolo R. A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans. *PLoS One.* 2015;10(3):1–23.
 42. Veneziani RCS, Camilo D, Oliveira R De. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. *Biochem Syst Ecol.* 1999;27(1):99–102.
 43. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden [Internet]. 2017 [citado 6 de junho de 2017]. Recuperado de: <http://www.tropicos.org/Name/27500188>
 44. The Plant List. The Plant List [Internet]. 2013. 2017 [citado 6 de junho de 2017]. Recuperado de: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2522773>

45. Ministério da Saúde. Monografia da espécie *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada). Brasília; 2014.
46. Lôbo CR. Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshiana*): Uma Revisão de Literatura. Rev Divulg Científica Sena Aires. 2012;(2):171–8.
47. Panizza S. Plantas que curam: cheiro de mato. 27^o ed. São Paulo: IBRASA; 1997.
48. Botsanris AS. As fórmulas mágicas das plantas. Rio de Janeiro: Nova Era; 1997.
49. Cirillo C, Capasso R. Constipation and botanical medicines: An overview. Phyther Res. 2015;29(10):1488–93.
50. Demarque DP, Pinho DR, Callejon DR, de Oliveira GG, Silva DB, Carollo CA, et al. New cascarosides from *Rhamnus purshiana* and fragmentation studies of the class by IT-MS. Rapid Commun Mass Spectrom. 2017;
51. Fairbairn JW, SIMIC S. Estimation of C-glycosides and O-glycosides in cascara (*Rhamnus purshiana* DC., bark) and cascara extract. J Pharm Pharmacol. 1964;16:450–4.
52. Bartnik M, Facey PC. Glycosides. Pharmacognosy. 2017. 101-161 p.
53. Zhang Q, Zhao JJ, Xu J, Feng F, Qu W. Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus *Uncaria*. J Ethnopharmacol. 2015;173:48–80.
54. Deni B. Encyclopedia of herbs. Nova York: DK Publishing; 2001.
55. Setty AR, Sigal LH. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: Mechanisms of action, efficacy, and side effects. Semin Arthritis Rheum. 2005;34(6):773–84.
56. Valente LMM. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: Um Panorama Sobre seus Aspectos mais Relevantes. Rev Fitos. 2006;2(1):48–58.
57. Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J, Angeles FM, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. Phytomedicine. 2002;9(4):325–37.
58. Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, Plaza A, Bauer R, Reininger E, et al. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). J Ethnopharmacol. 2002;81(2):271–6.

59. Gonçalves C, Dinis T, Batista MT. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: A mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*. 2005;66(1):89–98.
60. Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Ávila TV, Soley B da S, Rivero AJ, Aguilar JL, et al. Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. *J Ethnopharmacol*. 2010;130(1):127–33.
61. Pilarski R, Zieliński H, Ciesiołka D, Gulewicz K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol*. 2006;104(1–2):18–23.
62. Erowele GI, Kalejaiye AO. Pharmacology and therapeutic uses of cat's claw. *Am J Heal Pharm*. 2009;66(11):992–5.
63. de Paula LCL, Fonseca F, Perazzo F, Cruz FM, Cubero D, Trufelli DC, et al. *Uncaria tomentosa* (cat's Claw) Improves Quality of Life in Patients with Advanced Solid Tumors. *J Altern Complement Med*. 2015;21(1):22–30.
64. Schetinger MRC, Farias ILG, Araújo MCS, Farias JG, Rossato L V., Elsenbach LI, et al. *Uncaria tomentosa* for reducing side effects caused by chemotherapy in CRC patients: Clinical trial. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2012;2012.
65. Jurgensen S, DalBó S, Angers P, Soares Santos AR, Ribeiro-do-Valle RM. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;81(3):466–77.
66. Silveira PF, Bandeira MAM, Arrais PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: Uma realidade. *Brazilian J Pharmacogn*. 2008;18(4):618–26.
67. Galera RML, Pascuet ER, Mur JIE, Ronsano JBM, Giménez JCJ. Interaction between cat's claw and protease inhibitors atazanavir, ritonavir and saquinavir. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(12):1235–6.
68. Fukumasu H, Latorre AO, Bracci N, Górnjak SL, Dagli MLZ. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. *Rev Bras Toxicol*. 2008;21(2):49.
69. Fasinu PS, Bouic PJ, Rosenkranz B. An overview of the evidence and mechanisms of herb-drug interactions. *Front Pharmacol*. 2012;3:1–19.

70. Colalto C. Herbal interactions on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment. *Pharmacol Res.* 2010;62(3):207–27.
71. Mazzari ALDA, Prieto JM. Herbal medicines in Brazil: Pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. *Front Pharmacol.* 2014;5(July):1–12.
72. Oga EF, Sekine S, Shitara Y, Horie T. Pharmacokinetic herb-drug interactions: Insight into mechanisms and consequences. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2016;41(2):93–108.
73. Katzung BG. *Farmacologia Básica e Clínica.* 10º ed. Porto Alegre: AMGH; 2010. 45-56 p.
74. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor: A key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev.* 2002;23(5):687–702.
75. Tari L, Anwar S, Liang S, Cai J, Baral C. Discovering drug-drug interactions: A text-mining and reasoning approach based on properties of drug metabolism. *Bioinformatics.* 2010;26(18):547–53.
76. Zhou SF, Zhou ZW, Li CG, Chen X, Yu X, Xue CC, et al. Identification of drugs that interact with herbs in drug development. *Drug Discov Today.* 2007;12(15–16):664–73.
77. Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest.* 1998;102(5):1016–23.
78. Tolson AH, Wang H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(13):1238–49.
79. Moore JT, Kliewer SA. Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. 2000;153:1–10.
80. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira.* 1º ed. Brasília: ANVISA; 2016.
81. European Directorate for the Quality of Medicines. *Artichoke leaf monograph.* Strasbourg: European Pharmacopeia; 2011. p. 1056–8.
82. Carneiro ADA, Barros YY De, Freitas MM De, Alberto L, Magalhães PO, Silveira D, et al. Identification and quantification of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L . tablets and capsules. *African J Pharm Pharmacol.* 2017;11(6):94–102.

83. Bandeira F, Gomes LF, Barros YY, Martins DH, Magalhães PO, Silveira D, et al. Validação de método anaquítico para determinação de cumarina em xarope contendo *Mikania glomerata*. Brasília: 20º Congresso de Iniciação Científica da UnB; 2014.
84. United States Pharmacopeial Convention. Dietary supplements: Cat's claw. The United States Pharmacopeial Convention; 2016. p. 6538–40.
85. Wagner H, Baldt S. Plant Drug Analysis. 2º ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1995. 65-66 p.
86. Molinaro EM. Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde: volume 2. Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR, organizadores. Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; 2010. 1-254 p.
87. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55–63.
88. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*. 1989;119(2):203–10.
89. Michael V, Berridge M, Tan A, McCoy K, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 1996;(4):14–9.
90. Pandino G, Lombardo S, Mauromicale G. Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. *Ind Crops Prod*. 2013;44:44–9.
91. Pilarski R, Filip B, Wietrzyk J, Kura M, Gulewicz K. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine*. 2010;17:1133–9.
92. Rojas-Duran R, González-Aspajo G, Ruiz-Martel C, Bourdy G, Doroteo-Ortega VH, Alban-Castillo J, et al. Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. *J Ethnopharmacol*. 2012;143(3):801–4.
93. Liang N, Xue W, Kennepohl P, Kitts DD. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. *Food Chem*. 2016;213:251–9.
94. Li Y, Wang Q, Yao X, Li Y. Induction of CYP3A4 and MDR1 gene expression

- by baicalin, baicalein, chlorogenic acid, and ginsenoside Rf through constitutive androstane receptor- and pregnane X receptor-mediated pathways. *Eur J Pharmacol.* 2010;640(1–3):46–54.
95. Miccadei S, Venere D Di, Cardinali A, Romano F, Durazzo A, Foddai MS, et al. Antioxidative and Apoptotic Properties of Polyphenolic Extracts from Edible Part of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) on Cultured Rat Hepatocytes and on Human Hepatoma Cells. *Nutr Cancer.* 2008;60(2):276–83.
 96. Sarojini S, Senthilkumaar P, Ramesh V. Impact of ethanolic extract of *Mikania glomerata* on human breast cancer (MCF 7) cell line. *Int J Adv Sci Res.* 2016;2(4):094–103.
 97. Álvarez-Delgado C, Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Mendoza-Rodríguez CA, Quintero-Ruiz A, Solano J, et al. Coumarin A/AA induces apoptosis-like cell death in HeLa cells mediated by the release of apoptosis-inducing factor. *J Biochem Mol Toxicol.* 2009;23(4):263–72.
 98. Lin LT, Liu LT, Chiang LC, Lin CC. In vitro anti-hepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phyther Res.* 2002;16(5):440–4.
 99. Lombardi VRM, Carrera I, Cacabelos R. In Vitro Screening for Cytotoxic Activity of Herbal Extracts. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2017;2017.
 100. Boussahel S, Speciale A, Dahamna S, Amar Y, Bonaccorsi I, Cacciola F, et al. Flavonoid profile, antioxidant and cytotoxic activity of different extracts from Algerian *Rhamnus alaternus* L. bark. *Pharmacogn Mag.* 2015;11(Suppl 1):S102-9.
 101. Brkanac SR, Gerić M, Gajski G, Vujčić V, Garaj-Vrhovac V, Kremer D, et al. Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin. *Regul Toxicol Pharmacol.* Elsevier Ltd; 2015;73(3):923–9.
 102. Panigrahi GK, Suthar MK, Verma N, Asthana S, Tripathi A, Gupta SK, et al. Investigation of the interaction of anthraquinones of *Cassia occidentalis* seeds with bovine serum albumin by molecular docking and spectroscopic analysis: Correlation to their in vitro cytotoxic potential. *Food Res Int.* Elsevier B.V.; 2015;77:368–77.
 103. Aviello G, Rowland I, Gill CI, Acquaviva AM, Capasso F, McCann M, et al. Anti-proliferative effect of rhein, an anthraquinone isolated from *Cassia* species, on

- Caco-2 human adenocarcinoma cells. *J Cell Mol Med*. 2010;14(7):2006–14.
104. Ni C-H, Chen P-Y, Lu H-F, Yang J-S, Huang H-Y, Wu S-H, et al. Chrysophanol-induced necrotic-like cell death through an impaired mitochondrial ATP synthesis in Hep3B human liver cancer cells. *Arch Pharm Res*. 2012;35(5):887–95.
105. Gurrola-Díaz CM, García-López PM, Gulewicz K, Pilarski R, Dihlmann S. Inhibitory mechanisms of two *Uncaria tomentosa* extracts affecting the Wnt-signaling pathway. *Phytomedicine*. 2011;18(8–9):683–90.
106. Santa Maria A, Lopez A, Diaz MM, Albán J, Galán De Mera A, Vicente Orellana JA, et al. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays in vitro. *J Ethnopharmacol*. 1997;57(3):183–7.
107. Pavsek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab*. 2008;9(2):129–43.
108. Chang TKH, Waxman DJ. Synthetic Drugs and Natural Products as Modulators of Constitutive Androstane Receptor (Car) and Pregnane X Receptor (PXR). *Drug Metab Rev*. 2006;38(1–2):51–73.
109. Goodwin B, Hodgson E, Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol*. 1999;56(6):1329–39.
110. Markowitz JS, Donovan JL, Devane CL, Taylor RM. Effect of St John ' s Wort on Drug Metabolism by Induction of Cytochrome P450 3A4 Enzyme. 2003;290(11):1–16.
111. Moore LB, Goodwin B, Jones S a, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, et al. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:7500–2.
112. Teel RW, Huynh H. Modulation by phytochemicals of cytochrome P450-linked enzyme activity. *Cancer Lett*. 1998;133(2):135–41.
113. WANG J, WANG H, PENG Y, WANG GJ, HAO HP. Isochlorogenic acid A affects P450 and UGT enzymes in vitro and in vivo. *Chin J Nat Med*. 2016;14(11):865–70.
114. Pang C, Sheng Y, Jiang P, Wei H, Ji L. Chlorogenic acid prevents acetaminophen-induced liver injury: The involvement of CYP450 metabolic

- enzymes and some antioxidant signals. *J Zhejiang Univ B*. 2015;16(7):602–10.
115. Löhr G, Deters A, Hensel A. In vitro investigations of *Cynara scolymus* L. extract on cell physiology of HepG2 liver cells. *Brazilian J Pharm Sci*. 2009;45(2):201–8.
 116. Zhuo X, Gu J, Zhang QY, Spink DC, Kaminsky LS, Ding X. Biotransformation of coumarin by rodent and human cytochromes P-450: metabolic basis of tissue-selective toxicity in olfactory mucosa of rats and mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288(2):463–71.
 117. Born SL, Caudill D, Fliter KL, Purdon MP. Identification of the cytochromes P450 that catalyze coumarin 3,4-epoxidation and 3-hydroxylation. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(5):483–7.
 118. Lewis DF V, Ito Y, Lake BG. Metabolism of coumarin by human P450s: A molecular modelling study. *Toxicol Vitro*. 2006;20(2):256–64.
 119. Immanuel C, Jayasankar K, Narayana ASL, Sarma GR. Self-induction of rifampicina metabolism in man. *Indian J Med Res*. 1985;82:381–7.
 120. Witte P de. Metabolism and Pharmacokinetics of Anthranoids. *Pharmacology*. 1993. p. 86–97.
 121. Budzinski JW, Foster BC, Vandenhoeck S, Arnason JT. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine*. 2000;7(4):273–82.
 122. Foster BC, Vandenhoeck S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, et al. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine*. 2003;10(4):334–42.
 123. Quílez AM, Saenz MT, García Giménez MD. *Uncaria tomentosa* (Willd. ex. Roem. & Schult.) DC. and *Eucalyptus globulus* Labill. interactions when administered with diazepam. *Phyther Res*. 2012;26(3):458–61.
 124. Zhou S-F, Lai X. An update on clinical drug interactions with the herbal antidepressant *St. John's wort*. *Curr Drug Metab*. 2008;9(5):394–409.