

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Influência do EPP-AF<sup>®</sup> na atividade da glicoproteína P e do citocromo P450 em voluntários sadios usando coquetel de marcadores**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

**Área de Concentração:** Toxicologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Barbosa Coelho  
**Orientado:** Diego Alberto Ciscato Cusinato

**Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 24/08/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.**

Ribeirão Preto  
2017

## RESUMO

CUSINATO, D. A. C **Influência do EPP-AF<sup>®</sup> na atividade da glicoproteína P e do citocromo P450 em voluntários sadios usando coquetel de marcadores.** 2017. 143f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O EPP-AF<sup>®</sup> é um extrato padronizado de própolis quimicamente caracterizado e com eficácia e segurança pré-clínica estabelecidas. O objetivo principal deste trabalho foi realizar um ensaio clínico de segurança para avaliar a influência do EPP-AF<sup>®</sup> na atividade da P-gp e das principais isoformas CYP, através de um teste *in vivo* tipo coquetel de fármacos marcadores administrados em doses subterapêuticas. Foram investigados 16 voluntários adultos sadios antes e após a exposição a 375 mg de EPP-AF<sup>®</sup> por via oral durante 15 dias. As amostras seriadas de sangue foram colhidas até 12 h após a administração do coquetel contendo midazolam (0,2 mg), cafeína (10 mg), omeprazol (2 mg), metoprolol (10 mg), losartana (2 mg) e fexofenadina (10 mg). Foram desenvolvidos e validados três métodos analíticos empregando LC-MS/MS para quantificar as concentrações plasmáticas de fexofenadina, losartana, E-3174 (método 1), omeprazol, 5-OH-omeprazol, midazolam, metoprolol,  $\alpha$ -OH-metoprolol (método 2) e cafeína (método 3). Os métodos não apresentaram efeito matriz ou efeito residual e mostraram-se lineares para os analitos nos intervalos de 0,05-20 ng/mL (fexofenadina); 0,03 – 5 ng/mL (losartana e E31-74); 0,1 – 50 ng/mL (omeprazol), 0,3 – 50 ng/mL (5-OH-omeprazol), 0,01 – 10 ng/mL (midazolam), 0,05 – 50 ng/mL (metoprolol e  $\alpha$ -OH-metoprolol) e 5 – 1000 ng/mL (cafeína). Os parâmetros farmacocinéticos dos compostos foram calculados com base nas curvas de concentração plasmática *versus* tempo (AUC) empregando o programa Phoenix<sup>®</sup> WinNonlin<sup>®</sup>. Os valores das razões das AUC<sup>0-t</sup> e C<sub>max</sub> após e antes da exposição ao EPP-AF<sup>®</sup>, apresentados como média geométrica (IC90%) foram de 0,74 (0,62 – 0,89) e 0,90 (0,76 – 1,07) para fexofenadina; 0,88 (0,80 - 0,97) e 0,86 (0,76 - 0,98) para losartana; 0,96 (0,83 - 1,11) e 0,91 (0,79 - 1,04) para E-3174; 1,18 (0,91 - 1,54) e 1,21 (0,87- 1,70) para omeprazol; 1,12 (0,95 - 1,31) e 1,22 (0,95 - 1,67) para 5-OH-omeprazol; 1,14 (1,03 - 1,28) e 1,21 (1,00 - 1,46) para o midazolam; 1,04 (0,92 - 1,18) e 0,94 (0,80 - 1,12) para o metoprolol; 1,05 (0,99 - 1,12) e 0,99 (0,88 - 1,12) para  $\alpha$ -OH-metoprolol; 0,97 (0,77 - 1,21) e 0,87 (0,69 - 1,11) para a cafeína. Quando observadas as razões metabólicas das AUC<sup>0-t</sup> E3174/losartana, 5-OH-omeprazol/omeprazol e  $\alpha$ -OH-metoprolol/metoprolol encontramos, respectivamente, 1,11 (0,98 - 1,25); 0,94 (0,81 - 1,10) e 1,01 (0,88 - 1,16), indicando que, com exceção do CYP2D6, a administração de EPP-AF<sup>®</sup> nas condições estudadas apresenta potencial para inibição das isoformas CYP2C19 e CYP3A4 e indução das enzimas CYP1A2, CYP2C9 e do transportador de efluxo P-gp, embora as suas magnitudes encontram-se abaixo dos limites definidos pelos órgãos reguladores e portanto não apresentam relevância clínica.

**Palavras-chaves:** Própolis. CYP. P-gp. Coquetel de marcadores. Interação. Farmacocinética. Metabolismo. Doses subterapêuticas. LC-MS/MS

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Produtos Naturais e ensaios de segurança

Segundo definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através de sua RDC nº de 26 de maio de 2014, os fitoterápicos são “produtos obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal” (ANVISA, 2014). São conhecidas hoje mais de 11.000 espécies de plantas medicinais, sendo que aproximadamente 200 são comumente comercializadas no mundo, em especial nos países em desenvolvimento e orientais, onde mais de 80% da população depende da chamada medicina tradicional como principal fonte de promoção da saúde e manejo de enfermidades comuns como resfriados, doenças inflamatórias, diabetes, doenças do sistema nervoso central, entre outras (CHOI; CHIN; KIM, 2011; NA et al., 2011). No entanto, embora haja um elevado número de trabalhos publicados relacionados a propriedades farmacológicas dos fitoterápicos, há uma enorme escassez de dados relativos a efeitos adversos, desvantagens e toxicidade desses produtos (QURESHI et al., 2012).

Em função da complexa natureza dos produtos derivados de plantas medicinais, o estudo da farmacocinética desses compostos apresenta extrema importância. Cantelliforti et al. (1994) mostraram que a elucidação das vias metabólicas e a avaliação farmacocinética dos produtos fitoterápicos é fundamental na determinação dos benefícios e possíveis efeitos tóxicos, visto que suas interações com as enzimas do citocromo P450 (CYP) podem alterar a cinética e a biodisponibilidade de outros fármacos associados ao tratamento (CANTELLIFORTI et al., 1994).

Recentemente houve um aumento no interesse dos estudos farmacocinéticos relacionados a medicamentos fitoterápicos. Revisões publicadas nos últimos anos mostraram a interação de diferentes fitoterápicos tais como, Erva de São João (*Hypericum Perforatum*), Cardo Mariano (*Silybum marianum*), Gingko biloba (*Gingko biloba L.*), Ginseng (*Panax ginseng L.*), Valeriana (*Valeriana officinalis L.*) e Kava Kava (*Piper methysticum*), dentre outros, com enzimas CYP, atenuando ou potencializando o efeito de fármacos substratos dessas isoformas (como por exemplo, digoxina, agentes hipoglicemiantes orais, fenitoína, teofilina e varfarina). Logo, um bom entendimento dos mecanismos envolvidos nas interações

dos medicamentos fitoterápicos com medicamentos convencionais é essencial para avaliar e minimizar os riscos do uso concomitante dos mesmos (IZZO; ERNST, 2009; CHOI; CHIN; KIM, 2011; VAN DEN BERG et al., 2011; GURLEY, 2012; HERMANN; VON RICHTER, 2012; POSADZKI; WATSON; ERNST, 2012; QURESHI et al., 2012; SHI; KLOTZ, 2012; ZADOYAN; FUHR, 2012). Ressalta-se que um estudo realizado nos EUA, mostrou que 15% dos pacientes recebendo farmacoterapia convencional também faziam uso de produtos fitoterápicos e, em 40% deles foi observado algum tipo de interação fármaco-fitoterápico (BUSH et al., 2007).

Em 2010, o EMEA (*European Medicines Agency*) publicou um guia fornecendo recomendações sobre como avaliar o potencial para interações de medicamentos e interações medicamento-alimento para produtos medicinais, incluindo fitoterápicos, seguindo a tendência americana publicada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 2006 e revisada em 2012, cujas recomendações incluem o desenvolvimento de estudos *in vivo* e *in vitro* com relação ao metabolismo e transporte de fármacos, tendo como foco principal a interação farmacocinética. Entre outros estudos, estes guias sugerem que a investigação das interações entre os fármacos candidatos e outros medicamentos deve ser definida ainda na fase de desenvolvimento, de maneira a avaliar sua segurança e eficácia, identificando potenciais interações, devendo incluir ainda a avaliação da indução/inibição das principais enzimas CYP e do transportador de efluxo P-gp (EMEA, 2010; FDA, 2006, 2012).

## **1.2. Própolis**

Embora seja classificada como opoterápico, e não como fitoterápico, por apresentar em sua composição secreções da abelha, a própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exudatos de árvores adicionados das secreções salivares e enzimas das abelhas (FRANCO et al., 2000; PEREIRA et al., 2002), apresentando produtos naturais provenientes das plantas entre seus principais ativos. Em função disso, a própolis encontra-se incluída na RDC nº 24 de 14 de junho de 2011 que estabelece os requisitos para o registro e a renovação de registro de medicamentos específicos, elaborada pela Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos – CATEF da ANVISA (Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis, ANVISA 2005; RDC n° 24, 2011).

A própolis vem se destacando na literatura por apresentar várias propriedades biológicas e farmacológicas, entre elas propriedades imunomodulatórias, antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antiparasitárias

(BURDOCK, 1998; SFORCIN et al., 2000; MARCUCCI et al., 2001; GEKKER et al., 2005; ORSI, R.O. et al., 2005; FREITAS et al., 2006; ORSI, R. D. et al., 2006; ORSI, R. O. et al., 2006; BUFALO, CANDEIAS, et al., 2009; BUFALO, FIGUEIREDO, et al., 2009).

Uma revisão publicada por Pereira et al. (2002) mostrou um crescimento no interesse mundial pela própolis, refletido no aumento, da ordem 660% em países como Japão, no número de publicações científicas relacionadas ao composto. Interesse esse que se justifica pelas inúmeras atividades biológicas atribuídas ao este e também ao alto valor agregado que o produto apresenta, podendo chegar a custar 150 reais um frasco de extrato alcoólico vendido em Tóquio (PEREIRA et al., 2002).

As primeiras análises detalhadas da própolis brasileira revelaram um perfil químico muito particular. Compostos fenilpropanóides prenilados foram encontrados em grande quantidade, sendo considerados os constituintes mais comuns, especialmente na própolis encontrada na região sudeste do Brasil (SALATINO et al., 2005). Park, Alencar e Aguiar (2002), após a realização da análise química da própolis verde e comparação com a análise fitoquímica da *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como vassourinha-do-campo ou alecrim-do-campo, comprovaram que essa planta é a principal fonte botânica utilizada na elaboração da própolis verde. Adicionalmente, estes autores ainda identificaram a presença de compostos fenólicos, com destaque para a alta proporção de artepellin C e outros derivados do ácido cinâmico, caracterizando a própolis verde brasileira como a única no mundo a apresentar este perfil químico e tornando-a desta forma um insumo de elevado interesse para a indústria farmacêutica (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002).

Embora inúmeros estudos já tenham sido publicados com vários tipos de própolis existentes tanto com relação às atividades biológicas (KOO et al., 2000; BORRELLI et al., 2002; SIMOES et al., 2004; DE BARROS et al., 2007; DE CASTRO et al., 2011) quanto em relação à segurança (BURDOCK, 1998; TAVARES et al., 2007), ainda não é possível utilizar estes dados na geração de um produto farmacêutico, uma vez que a origem, composição e processo de extração podem alterar o extrato obtido e, conseqüentemente alterar algumas das atividades biológicas do produto (BERRETTA et al., 2012). Em relação a própolis verde especificamente, não há muitas informações sobre a farmacocinética e o perfil toxicológico. Estudos *in vitro* com células humanas (CACO-2 e HEP2) mostram que os flavonóides presentes na própolis verde são absorvidos pelas células intestinais e incorporados pelas células hepáticas (SHIMIZU et al., 2004). No único estudo realizado avaliando a absorção do artepellin C em ratos, Kimoto et al. (2000) mostraram que o mesmo é parcialmente absorvido

no estômago, sofre metabolização e excreção 48 horas após a administração oral de uma dose de 100 mg (50% propilenoglicol/óleo de oliva). Os autores, no entanto, não observaram níveis detectáveis de artepelin C no sangue, mas relataram picos de concentração no fígado e rins, em torno de 12h após a administração (KIMOTO et al., 2000).

### **1.3. Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF<sup>®</sup>)**

Após um amplo estudo desenvolvido ao longo dos anos e em função da necessidade de atenção e controle das concentrações dos princípios ativos e/ou marcadores químicos, um grupo de pesquisadores da empresa Apis Flora<sup>®</sup> em colaboração com universidades brasileiras desenvolveram um extrato padronizado de própolis (EPP-AF<sup>®</sup>), cujos estudos resultaram no depósito de um pedido de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) (PI0405483-0) (APIS FLORA<sup>®</sup>, 2006).

A composição da mistura tem como componente majoritário a própolis verde originária da *B. dracunculifolia*, uma planta conhecida popularmente por vassourinha-do-campo, muito encontrada na região sudeste do Brasil, e caracterizada por possuir o artepelin C como marcador químico. A partir disso, o extrato de própolis (EPP-AF<sup>®</sup>) foi padronizado e demonstrada a possibilidade de se obter extratos de própolis reproduzíveis lote-a-lote frente aos marcadores ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido cinâmico, aromadendrina, isossakuranetina e artepelin C (DE SOUSA et al., 2007; DE CASTRO et al., 2011; BERRETTA et al., 2012), fato inédito, e parâmetro essencial para se propor o desenvolvimento de um medicamento (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Além da reprodutibilidade, o mesmo demonstrou em modelos experimentais atividade antiinflamatória (REIS et al., 2000), antiúlcera (DE BARROS et al., 2007), antimicrobiana (REZENDE; PIMENTA; COSTA, 2006), antioxidante (SIMOES et al., 2004) e antifúngica (DE CASTRO et al., 2011), além de não ser um produto citotóxico nem apresentar potencial mutagênico (TAVARES et al., 2007).

Em estudos pré-clínicos Sforcin et al. (2000), avaliaram alguns parâmetros bioquímicos de animais tratados com amostras de própolis obtidas de diversas regiões com o objetivo de avaliar a segurança de uso do produto e também se as variações regionais poderiam interferir nos resultados, não tendo sido evidenciados parâmetros considerados fora dos padrões normais, tampouco influência da variação regional (SFORCIN et al., 2000). Reis et al. (2000) demonstraram a segurança do produto através da administração de EPP-AF<sup>®</sup> por via oral, determinando que a DL50 é maior que 3000 mg/kg via oral e não havendo ocorrências de sinais de intoxicação em doses abaixo destas. Quando utilizada uma dose 650 mg/kg

administrada via oral, não foram observadas alterações no consumo de ração e água, nos parâmetros bioquímicos e hematológicos e nos exames microscópicos dos tecidos estomacais, esofágico, intestino grosso, pulmonar, baço e cardíaco (REIS et al., 2000).

O conjunto de dados obtidos, ou seja, um insumo de origem natural caracterizado quimicamente, com eficácia e segurança pré-clínica estabelecida, demonstra que o insumo em questão é promissor para a geração de um medicamento, fato não observado até o momento na literatura.

Dessa forma, considerando os dados previamente obtidos, bem como a necessidade de atender as legislações brasileira (RDC nº 24 de 14 de junho de 2011 e Instrução Normativa nº de 18 de junho de 2014), europeia (EMA, 2010) e americana (FDA, 2006, 2012) para registro de novos medicamentos, o objetivo principal deste trabalho foi a realização de um ensaio clínico de segurança, analisando a influência do EPP-AF<sup>®</sup> na atividade do transportador P-gp e nas principais enzimas CYP e para atingir tal objetivo, foi utilizado um teste *in vivo* tipo coquetel de fármacos marcadores do CYP, de acordo com o protocolo do FDA (2006, 2012) para desenvolvimento de insumos farmacêuticos.

#### **1.4. Fármacos marcadores**

As enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 representam mais de 90% do conteúdo enzimático hepático total (SHIMADA et al., 1994; YUAN et al., 2002) e são responsáveis por 70% do metabolismo de todos os fármacos disponíveis na clínica (WILLIAMS et al., 2004; PREISSNER et al., 2013), por isso são as principais enzimas investigadas nos estágios iniciais de desenvolvimento dos fármacos.

A determinação da atividade dessas enzimas pode ser realizada através da fenotipagem, isto é, administração de fármacos, escolhidos com base na seletividade pela enzima CYP a ser avaliada, tolerância e disponibilidade, e posterior determinação dos parâmetros farmacocinéticos que refletem suas atividades, entre eles a razão metabólica do metabólito sobre o fármaco inalterado no plasma ou na urina, o *clearance* do fármaco inalterado ou *clearance* parcial de uma via metabólica específica, dependendo do substrato avaliado (FUHR et al., 2007). O guia do EMA de 2010, por sua vez, requer a determinação dos valores das áreas sob as curvas de concentração plasmática *versus* tempo (AUC) dos fármacos marcadores, requisitando no mínimo 8 a 10 diferentes tempos de coleta e desencorajando o uso de determinações de concentrações individuais ou razões metabólicas, visto que essas determinações podem não fornecer informações precisas sobre a extensão das alterações na

atividade das enzimas CYP (EMEA, 2012; MA; NAFZIGER; BERTINO, 2012; ZADOYAN; FUHR, 2012).

Em termos farmacocinéticos, o *clearance* de um marcador ideal deveria ser diretamente correlacionado com o *clearance* intrínseco da enzima estudada, não devendo ser afetado por outros fatores como variações nas ligações plasmáticas, fluxo hepático e *clearance* mediado por um outro sistema enzimático. Tipicamente fármacos com baixa razão de extração hepática (E) e baixo índice de ligação a proteínas plasmáticas se encaixam nesse perfil, uma vez que o *clearance* de fármacos altamente ligados a proteínas pode ser afetado pela mudança na concentração plasmática destas e alterações metabólicas podem alterar a fração ligada, assim como o *clearance* de fármacos com alta razão de extração hepática são dependentes do fluxo sanguíneo hepático que está sujeito a variação dependente de diversos fatores como sexo e idade (KIRWAN; MACPHEE; PHILIPS, 2010).

Apesar dos inúmeros anos de pesquisa nessa área, ainda não há um consenso sobre os marcadores ideais para serem utilizados. O fármaco ideal deve preencher uma série de requisitos, incluindo alta especificidade para a enzima, ausência de efeitos adversos em qualquer dose utilizada, baixa variação intraindividual, farmacocinética linear em uma ampla faixa de dose, facilidade de administração e disponibilidade comercial. Uma ampla variedade de substâncias tem sido testada, mas com exceção do CYP1A2, cuja atividade está bem caracterizada em todos os coquetéis já publicados, vários compostos são usados como marcadores para as outras isoformas do CYP mais comuns, cada um apresentando suas vantagens e desvantagens (FRYE, 2004; WOHLFARTH et al., 2012).

#### **1.4.1. Marcadores CYP1A2**

A família CYP1A é uma das maiores famílias do sistema P450, totalizando aproximadamente 13% do conteúdo total de enzimas CYP no fígado, sendo a enzima CYP1A2 responsável pelo metabolismo de 8,2% dos fármacos disponíveis atualmente, além de estar envolvida na bioativação e detoxificação de vários carcinógenos (FABER; JETTER; FUHR et al., 2005; HAKOOZ, 2009; PERERA; GROSS; MCLACHLAN, 2012).

Mais de 40 variantes do gene CYP1A2 já foram identificadas. No entanto, quando comparados com outras enzimas CYP observa-se que existem poucos estudos farmacogenéticos envolvendo essa enzima, e diferentemente das outras enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas, poucas variantes puderam ser claramente relacionadas a alterações fenotípicas. Os polimorfismos (SNP) mais importantes e estudados são: (1) uma substituição da citosina (C) por adenina (A) na posição -163 (rs762551) dando origem a



variante CYP1A2\*1F e (2) a substituição na posição -3860 de guanina (G) por A (rs2069514) originando a variante CYP1A2\*1C. Estudos mostram que ambas as variantes levam a uma redução no metabolismo da cafeína, mas somente quando na presença de indutores enzimáticos, como cigarro ou elevado consumo de café, sugerindo a necessidade da realização de estudos mais detalhados para se avaliar melhor a distinção entre os efeitos das variantes genéticas e dos indutores enzimáticos (THORN et al., 2012).

Vários marcadores têm sido estudados para avaliação da atividade da enzima CYP1A2, incluindo teofilina, melatonina, fenacetina, tizanidina e cafeína. Este último é o mais amplamente aceito, pois além de ser quase completamente metabolizado por esta enzima (KALOW; TANG, 1993), é um fármaco amplamente consumido; de fácil administração; perfil de segurança bem definido; absorção rápida e completa ( $C_{max}$  de aproximadamente 1 hora); baixo metabolismo de primeira passagem, biodisponibilidade em torno de 100%; alto volume de distribuição após administração oral (0,6 L/kg); baixo índice de ligação à proteínas plasmáticas (em torno de 30 a 40% de ligação a albumina); meia-vida de eliminação curta (3 - 7 h em adultos); baixa eliminação renal e biotransformação quase exclusivamente hepática (PERERA; GROSS; MCLACHLAN, 2012).

A cafeína (137X) possui um complexo metabolismo, sendo quase completamente metabolizada em 16 metabólitos após uma série de reações de desmetilação e hidroxilação, cujos principais metabólitos são paraxantina (17X), teobromina (37X) e teofilina (13X) (GRANT et al., 1983). O CYP1A2 desempenha um papel quase que exclusivo na formação de paraxantina, sendo responsável por mais 95% do metabolismo de cafeína em paraxantina (CAMPBELL et al., 1987; GU et al., 1992; THORN et al., 2012). Alguns estudos sugerem a participação de outras enzimas CYP no metabolismo da cafeína, como por exemplo CYP1A1, CYP2D6 e CYP2E1, especialmente quando ingerida em elevadas concentrações (BERTHOU et al., 1991; GU et al., 1992; EUGSTER et al., 1993), contudo, acredita-se que a participação destas enzimas seja mínima em condições de usuais de consumo (SCHWEIKL et al., 1993; MINERS; BIRKETT, 1996). Devido à complexidade do seu metabolismo, a utilização de um parâmetro de avaliação da atividade enzimática baseado em uma única via metabólica, como por exemplo, a formação de paraxantina a partir da cafeína, é considerado o parâmetro ideal (PERERA; GROSS; MCLACHLAN, 2012).

Diversas matrizes biológicas foram propostas para utilização da cafeína na fenotipagem da enzima CYP1A2, incluindo urina, ar expirado, plasma, soro e saliva, cada uma apresentando ao menos um parâmetro para avaliação da atividade enzimática. Considerando que o CYP1A2 é responsável por mais de 95% do metabolismo da cafeína em paraxantina, o

parâmetro considerado ideal para fenotipagem desta enzima é o cálculo do *clearance* sistêmico subsequente a administração de uma dose conhecida de cafeína, no entanto, devida sua rápida e completa absorção, considera-se o *clearance* aparente, seguido da administração oral de cafeína um parâmetro bastante aceito na determinação da atividade enzimática. Outro parâmetro amplamente utilizado e considerado “padrão ouro” é cálculo  $AUC^{0-24}$  da paraxantina/ $AUC^{0-24}$  da cafeína (PERERA et al., 2012). As razões metabólicas urinárias devem ser evitadas, devido à elevada inespecificidade, dependência do fluxo urinário e do fluxo sanguíneo renal, embora seja considerada uma matriz não invasiva e conveniente (FUHR et al., 2007; RYU et al., 2007).

Em estudos que correlacionam os parâmetros de avaliação de atividade do CYP1A2 com *clearance* aparente da cafeína utilizam um período de abstinência de metilxantina para garantir que o *clearance* seja adequadamente calculado, pois a dose inicial de cafeína precisa ser conhecida ( $clearance = dose/AUC^{0-\infty}$ ). Além disso, a fórmula do cálculo do *clearance* assume uma cinética linear, de primeira ordem, portanto o período de abstinência de metilxantinas é também farmacologicamente importante para evitar a potencial interferência dos metabólitos da cafeína e saturação desta enzima, que resultaria em uma farmacocinética não linear (PERERA; GROSS; MCLACHLAN, 2012). Diversos estudos utilizando a cafeína como marcador da atividade do CYP1A2 utilizaram voluntários com diferentes períodos de abstinência variando entre 6 e 72 horas (SIMON et al., 2001; VAN TROOSTWIJK; KOOPMANS; GUCHELAAR, 2003). No entanto, Perera et al. (2011) em estudos comparando um período de 24 h de abstinência de cafeína com período sem abstinência e Van Troostwijk, Koopmaans e Guchelaar (2013) comparando períodos de 10 h e 48h de abstinência de cafeína com períodos sem abstinência, não encontraram diferenças significativas nos parâmetros de avaliação da atividade da enzima CYP1A2, sugerindo que independentemente do consumo de cafeína antes da realização dos estudos, a farmacocinética da cafeína se mantém linear em concentrações de consumo usuais (VAN TROOSTWIJK; KOOPMANS; GUCHELAAR, 2003; PERERA et al., 2011).

#### **1.4.2. Marcadores CYP2C9**

CYP2C9 é a segunda mais frequente isoforma CYP expressa quantitativamente, principalmente no fígado, somente atrás do CYP3A5. É responsável por aproximadamente 15% do metabolismo dos fármacos clinicamente importantes, incluindo os anti-inflamatórios não esteroidais, anticoagulantes e agentes hipoglicemiantes orais (RETTIE; JONES, 2005; PREISSNER et al., 2013; SAMER et al., 2013).

O gene que codifica a enzima CYP2C9 é altamente polimórfico, possuindo variantes de grande importância farmacogenética. Diversos trabalhos mostraram uma elevada frequência das variantes CYP2C9\*2 e CYP2C9\*3 na população caucasiana (11% e 7%, respectivamente), que estimularam o desenvolvimento de diversos estudos para avaliar a importância clínica dessas variantes mostrando serem responsáveis pela redução na atividade desta enzima e consequente redução do *clearance* dos fármacos substratos (KIRCHHEINER; BROCKMOLLER, 2005; RETTIE; JONES, 2005; FUHR et al., 2007). Indivíduos portadores dessas variantes apresentam risco elevado de sangramento quando em tratamento com varfarina (AITHAL et al., 1999; HIGASHI et al., 2002), alta possibilidade de redução dos níveis glicêmicos durante o tratamento com glipizida e tolbutamida (KIDD et al., 1999), e frequentes sintomas de overdoses atribuído ao uso de fenitoína (NINOMIYA et al., 2000; TATE et al., 2005).

Os principais fármacos marcadores utilizados na determinação da atividade da enzima CYP2C9 são a tolbutamida (o mais estudado deles), a varfarina, a losartana e, em alguns casos, o diclofenaco. Em função da disponibilidade comercial, o uso da tolbutamida tem sido substituído como fármaco marcador. O uso da varfarina, por sua vez, tendo sido questionado devido a segurança do uso, extenso tempo de coleta (pelo menos 72 horas) e complexidade do método analítico que exige separação do enantiômeros (FUHR et al., 2007).

A losartana, por sua vez, é rapidamente absorvida, atingindo concentrações plasmáticas máxima entre 1 e 2 horas após administração oral, passando por extenso metabolismo de primeira passagem, com biodisponibilidade em torno de 33% (AL-MAJED et al., 2015). Seu metabolismo é mediado pela enzima CYP2C9, com uma pequena contribuição do CYP3A4 (STEARNS et al., 1995), com aproximadamente 14% da dose administrada oralmente sendo oxidada no metabólito farmacologicamente ativo E-3174, que é entre 10 e 40 vezes mais potente do que o fármaco mãe, atinge  $C_{max}$  entre 3 e 4 horas após a dose oral e apresenta meia-vida estimada entre 6 e 9 h. A farmacocinética da losartana e seu metabólito ativo são lineares, dose-proporcionais e não foram relatadas variações clinicamente significantes relativas a idade, sexo ou etnia (AL-MAJED et al., 2015). Os efeitos das variantes genéticas do CYP2C9 no metabolismo da losartana foram investigados em diversos estudos que encontraram uma moderada redução na taxa de oxidação da losartana em indivíduos portadores do alelo CYP2C9\*2 e heterozigotos para o alelo CYP2C9\*3, e uma acentuada redução nos indivíduos homozigotos para o alelo CYP2C9\*3 (MCCREA et al., 1999; YASAR et al., 2001; KIRCHHEINER; BROCKMOLLER, 2005; BAE et al., 2011).

Quando comparado com a tolbutamida e varfarina, a losartana apresenta dados relativos à sua utilização como fármaco marcador menos evidentes. Pelo fato de existir uma mínima participação da enzima CYP3A4 no metabolismo da losartana, existem controvérsias quanto a sua utilização como fármaco marcador da atividade do CYP2C9, no entanto, diversos coquetéis a tem incluído entre os marcadores, utilizando como métrica a razão urinária losartana/E-3174 nas primeiras 8 horas após a administração do fármaco (CHRISTENSEN et al., 2003; RYU et al., 2007). Esses e outros estudos mostraram existir uma boa correlação entre a razão da  $AUC^{0-12h}$  da losartana/E-3174 com a métrica urinária (SANDWALL et al., 1999; YASAR et al., 2002; DONZELLI et al., 2014).

### 1.4.3. Marcadores CYP2C19

A enzima CYP2C19 é um dos membros da superfamília CYP que contribui para o metabolismo de importantes fármacos, como os inibidores da bomba de prótons e fármacos psicoativos, como a venlafaxina e citalopram. Assim como outros genes do CYP450, a isoforma CYP2C19 apresenta importantes variações genéticas que resultam em variável expressão hepática e contribui para a variabilidade fenotípica no metabolismo dos substratos dessa enzima (SCOTT et al., 2013).

Até o momento, ao menos 35 variantes alélicas, sendo as variantes \*2 e \*3 as de maior importância, presentes em 15% e 0,5% da população caucasiana, respectivamente e responsáveis pela perda na função desta enzima que permite classificar os indivíduos em metabolizadores rápidos (\*1/\*1), intermediários (\*1/\*2, \*1/\*3) e lentos (\*2/\*2, \*3/\*3). A variante CYP2C19\*17 encontrada em aproximadamente 21% da população caucasiana, por sua vez, promove um aumento na atividade enzimática, e os indivíduos homocigotos (\*17/\*17) são classificados como metabolizadores ultrarrápidos (SANTOS et al., 2011; SAMER et al., 2013; SCOTT et al., 2013).

Tradicionalmente, o antiepilético mefenitoína é usado como marcador de referência da atividade da enzima CYP2C19, utilizando como parâmetro a fração de dose eliminada como 4'-OH-mefenitoína na urina até 12 horas após a administração do fármaco (FUHR et al., 2007). No entanto, depois que a sua disponibilidade comercial se tornou limitada e questões relativa a estabilidade do fármaco a longo prazo passaram a ser abordadas, seu uso como marcador de escolha desta enzima perdeu espaço para o omeprazol que passou a ser frequentemente utilizado (GHASSABIAN et al., 2009).

Quando administrado em dose única oral, o omeprazol é rapidamente absorvido, atingindo a  $C_{max}$  em aproximadamente 0,5 h. No entanto, o fármaco possui um extenso

metabolismo de primeira passagem, apresentando biodisponibilidade em torno de 50%. Após a absorção, o omeprazol é rapidamente eliminado do plasma, com meia-vida menor que 1 h e com isso, na maioria dos indivíduos, depois de 3 a 4 h é completamente eliminado do plasma (CEDERBERG; ANDERSSON; SKANBERG, 1989). É um fármaco extensivamente metabolizado no fígado em grande parte pela enzima CYP2C19 a 5-OH-omeprazol (em torno de 70%) e, em aproximadamente 30%, pela enzima CYP3A4, a sulfona de omeprazol (NAZIR et al., 2015). Embora em alguns casos seja inibidor ou indutor do CYP1A2 e provável inibidor do CYP2C19, o uso de doses únicas, em baixas dosagens (menores que 5 mg) tornam essa interação improvável (ANDERSSON et al., 1991; GHASSABIAN et al., 2009; BOSILKOVSKA et al., 2014b).

O omeprazol se adequa na maioria dos critérios propostos para validar os marcadores enzimáticos (ZHANG et al., 2006) e tem sido utilizado como fármaco marcador da atividade da enzima CYP2C19 em função da correlação entre seu índice de hidroxilação e a hidroxilação da S-mefenitoína (CHANG et al., 1995). Como parâmetros de avaliação da atividade enzimática, o índice metabólico (RM) refere-se a razão das concentrações plasmáticas do omeprazol pelo 5-OH-omeprazol, ao passo que o índice de hidroxilação (IH) refere-se a razão dos logaritmos das concentrações plasmáticas do omeprazol pelo 5-OH-omeprazol. Ambos demonstram uma boa correlação com a razão S/R-mefenitoína entre 2 e 3 h após a administração do fármaco (FUHR et al., 2007), assim como razões das concentrações plasmáticas do omeprazol pelo 5-OH-omeprazol medidas 3, 4, 5 e 6 h após a administração do fármaco correlacionam-se com as razões de AUC do fármaco pelo metabólito (RYU et al., 2007).

#### **1.4.4. Marcadores CYP2D6**

Embora represente apenas 1-5% do conteúdo hepático total das enzimas CYP, as enzimas CYP2D6 são responsáveis pela oxidação de mais de 25% dos fármacos comumente prescritos, entre eles os antidepressivos, antipsicóticos, antiarrítmicos e opióides (SAMER et al., 2013).

O CYP2D6 é codificado por um gene altamente polimórfico, com mais de 130 variantes alélicas já tendo sido descritas. Baseado no número de alelos funcionais, o efeito na atividade enzimática pode variar da completa deficiência ao metabolismo ultrarrápido, resultando em toxicidade medicamentosa ou falha terapêutica (SISTONEN et al., 2007). Desse modo, os indivíduos podem ser divididos em quatro grupos distintos: (1) metabolizadores lentos (PMs) apresentam ausência de atividade enzimática por possuírem dois alelos não funcionais (\*3,

\*4, \*5 e \*6) e representam entre 5 e 10% da população caucasiana; (2) metabolizadores intermediários (IMs) são portadores de um alelo não funcional ou dois alelos deficientes (\*9, \*10, \*17 e \*41) e estão presentes em 10 a 15% da população caucasiana; (3) metabolizadores ultrarrápidos (UMs) possuem mais que dois alelos funcionais, com frequência de aparecimento entre 1 a 10% dos caucasianos; (4) metabolizadores extensivos (EM) possuem atividade enzimática normal com prevalência de 60 a 85% na população caucasiana (SAMER et al., 2013). No entanto, mesmo os polimorfismos do CYP2D6 representando um excelente exemplo de potenciais implicações clínicas, a maioria dos efeitos dos fármacos e desfecho dos tratamentos são determinados pela interação de múltiplos genes e, portanto, a fenotipagem dos indivíduos baseado no *clearance* dos fármacos substratos dessa enzima constituem a melhor maneira de caracterização desses indivíduos (SISTONEN et al., 2007).

Os principais e mais estudados marcadores utilizados para avaliação da atividade da enzima CYP2D6 são a debrisoquina, esparteína, metoprolol e dextrometorfano. Debrisoquina e esparteína foram os primeiros fármacos utilizados com essa finalidade, sendo inseridos como marcadores no final dos anos 70 e, embora ainda comercialmente disponíveis, seu uso tem sido limitado e não mais aprovados para uso terapêutico em muitos países (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

O metoprolol é um fármaco bloqueador  $\beta_1$ -seletivo utilizado no tratamento de doenças coronarianas, hipertensão e angina (BAE et al., 2014). É rapidamente absorvido após ingestão oral, atingindo  $C_{max}$  entre 1 e 3 horas após a ingestão de um comprimido comum, mas que, no entanto, apresenta biodisponibilidade em torno de 50% devido ao metabolismo pré-sistêmico. Após a absorção, o fármaco é rapidamente distribuído por vários tecidos, apresentando um volume de distribuição no estado de equilíbrio de 3,2 L/kg, baixa ligação as proteínas plasmáticas (12%) e meia-vida de eliminação variando entre 2,5 e 5 h em indivíduos adultos e saudáveis (JOHNSON; BURLEW, 1996).

O metabolismo do metoprolol é mediado pela enzima CYP2D6 em três vias oxidativas principais - O-desmetilação, N-dealquilação e  $\alpha$ -hidroxilação – sendo esta última responsável por 70 – 80% do metabolismo do fármaco e exclusivamente mediada pelo CYP2D6. Como essa via metabólica torna-se saturada a doses relativamente baixas dos substratos, é possível utilizar doses baixas de marcadores específicos que, ainda contribui para a redução no aparecimento de efeitos adversos (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

O marcador mais apropriado para avaliação da atividade enzimática seria o *clearance* de um fármaco metabolizado exclusivamente pelo CYP2D6, contudo, em geral, outras enzimas e a eliminação renal contribuem para a eliminação do fármaco. Portanto, o “padrão ouro” para

avaliar com precisão a atividade de uma enzima seria o *clearance* parcial de um fármaco metabolizado exclusivamente pelo CYP2D6 a seu respectivo metabólito, como é o caso da  $\alpha$ -hidroxilação do metoprolol a  $\alpha$ -OH-metoprolol. No entanto, devido à complexidade que envolve estudos de avaliação do *clearance* total ou parcial, incluindo múltiplas coletas, estudos tem demonstrado uma boa correlação entre as razões metabólicas metoprolol/ $\alpha$ -OH-metoprolol obtidas através da  $AUC_{0-12h}$  e as razões metabólicas obtidas de coletas de plasma realizadas 3 horas após a ingestão do fármaco (FRANK; JAEHDE; FUHR, 2007).

#### 1.4.5. Marcadores CYP3A4

CYP3A são as enzimas mais abundantes do complexo enzimático CYP, representando 40% do conteúdo hepático e 82% do conteúdo intestinal, responsável pelo metabolismo de diversas classes de agentes terapêuticos (PAINE et al., 2006). Em adultos é representado, principalmente, pela sua isoforma CYP3A4, e em menor grau pela isoforma expressa polimorficamente CYP3A5, que juntos são responsáveis pelo metabolismo de mais de 50% dos fármacos usados clinicamente, incluindo bloqueadores de canal de cálcio, antibióticos macrolídeos, fármacos quimioterápicos e benzodiazepínicos (KIRWAN; MACPHEE; PHILIPS, 2010). Após a administração intravenosa de substratos desta enzima, o conteúdo hepático destas enzimas parece ser o principal responsável pelo metabolismo, ao passo que, após a administração oral, parece haver uma contribuição também das enzimas CYP3A intestinais no metabolismo sistêmico e pré-sistêmico dos substratos (THUMMEL; WILKINSON, 1998). Aproximadamente 38 alelos foram descritos para o CYP3A4, contudo nenhuma dessas variantes resultaram em alterações *in vivo* da atividade desta enzima (WESTLIND-JOHNSSON et al., 2006).

Midazolam pertence a uma classe de fármacos benzodiazepínicos caracterizados por seu rápido início e curta duração dos efeitos farmacológicos, sendo rapidamente eliminado do corpo quase exclusivamente através de processos metabólicos, apresentando meia vida de eliminação após infusão intravenosa entre 1 e 3 h (HEIZMANN et al., 1983). É um fármaco altamente ligado à proteínas plasmáticas (94 a 96%), com volume de distribuição entre 1,2 e 2,7 L/Kg, que sofre significativo metabolismo pré-sistêmico, sendo seletivamente hidroxilado pelo CYP3A4 ao metabólito principal  $\alpha$ -OH-midazolam e, em menor parte a outros metabólitos inativos, apresentando *clearance* entre 4,4 – 11,1 mL/ Kg/min, que é influenciado pela idade, obesidade e doenças pré-existentes (KIRWAN; MACPHEE; PHILIPS, 2010). Além disso, é um fármaco quimicamente estável, de fácil mensuração no plasma e completamente absorvido no trato gastrointestinal (HEIZMANN et al., 1983), que aliado as

demais características, o tornam um fármaco adequado para utilização como marcador da atividade do CYP3A (LIN et al., 2001).

Em 1994, Watkins propôs uma série de critérios para avaliar a validade de marcadores da atividade hepática do CYP3A; entre eles o perfil de segurança, a taxa de ligação à proteínas plasmáticas, a razão de extração hepática e o metabolismo exclusivo pelo CYP3A, concluindo que o midazolam preenchia todos os critérios avaliados (WATKINS, 1994). A essas características somam-se as vantagens do midazolam não ser substrato de transportadores, possuir um excelente perfil de segurança e versatilidade na administração, podendo ser adaptado a diferentes situações clínicas (KIRWAN; MACPHEE; PHILIPS, 2010), o que o tornaram o marcador recomendado pelo EMEA e FDA nos estudos de avaliação *in vivo* da atividade do CYP3A (EMEA, 2010; FDA, 2012).

Estudos mostraram que midazolam exibem uma ampla faixa na qual sua dose apresenta farmacocinética linear, podendo variar em 30.000 vezes, possibilitando que microdoses sejam utilizadas para avaliar possíveis interações com fortes inibidores do CYP3A (HALAMA et al., 2013).

A maioria dos parâmetros de avaliação da atividade enzimática do CYP3A não faz distinção entre as isoformas CYP3A4 e CYP3A5, entretanto, a farmacocinética do midazolam não depende muito do CYP3A5 (FUHR et al., 2007). Após a administração de uma dose oral, o midazolam sofre hidroxilação pelas enzimas CYP3A4 intestinais e hepáticas, enquanto quando administrado por via intravenosa há um predomínio do metabolismo hepático, sendo o cálculo do *clearance* sistêmico (Cl/F) uma das métricas validadas mais confiáveis (ZHOU; TONG; MCLEOD, 2004; FUHR et al., 2007). Em uma de revisão publicada por Streetman, Bertino e Nafziger (2000), os autores indicaram haver vários estudos mostrando que o *clearance* total do midazolam correlaciona-se com atividade do CYP3A (STREETMAN; BERTINO; NAFZIGER, 2000).

#### **1.4.6. Marcadores da P-gp**

Transportadores estão presentes em uma variedade de tecidos e células, envolvendo –se no influxo e efluxo dos xenobióticos que impactam diretamente na disposição dos fármacos, afetando a dose administrada, o uso de medicação associada e eficácia de diversas medicações, incluindo os fitoterápicos (MA et al., 2010). Tais características tornam os transportadores especialmente relevantes em estudos de interações, tanto que EMEA e FDA recentemente incluíram metodologias de avaliação de interações fármacos – transportadores em seu guia de condução de estudos de interação medicamentosa (EMEA, 2010; FDA, 2012).



Estudos de interação fármaco-transportadores, assim como os estudos de interação com as enzimas CYP, utilizam um fármaco marcador que é substrato específico do transportador em questão. Após a administração do marcador e do agente investigacional, alterações na farmacocinética e/ou de um parâmetro de fenotipagem predefinido refletem alterações na atividade do transportador estudado. Embora diversos transportadores já tenham sido descobertos e estudados (OATS, OATPs, OCTs, MRPs, BCRP), a maioria dos estudos de fenotipagem tem como foco o transportador de efluxo glicoproteína P (P-gp) (MA et al., 2010).

A P-gp é uma proteína expressa na barreira hematoencefálica, fígado, rins, intestino delgado, placenta, glândulas adrenais, pâncreas e testículos que atua como uma barreira protetiva que limita a distribuição e a aumenta a eliminação de xenobióticos do ambiente intracelular para o espaço extracelular. É codificada pelo gene ABCB1 que apresenta significativa variação na expressão interindividual devido a existência de polimorfismos genéticos. Mais de cinquenta polimorfismos já foram descritos para esse gene, sendo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) 1236C>T, 2677G>T /A e 3435C>T os mais comumente investigados em estudos farmacogenéticos (MA et al., 2010; MIURA; UNO, 2010).

Os relatos, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* existentes na literatura sobre a importância clínica desses polimorfismos ainda são conflitantes e específicos dos fármacos substratos (SORTICA et al., 2012; CUSINATO et al., 2014). Dickes et al. (2013), concluíram que os principais polimorfismos da P-gp (1236C > T, 2677G > T, 3435C > T) não exibiram diferenças no transporte de digoxina e imitimabe (DICKENS et al., 2013).

A maioria dos estudos envolvendo a interação fármacos- P-gp utiliza como marcadores digoxina, fexofenadina, talinolol e quinidina (MA et al., 2010).

Fexofenadina é um fármaco anti-histamínico, antagonista H1, não sedativo, utilizado no tratamento de rinite alérgica e urticária idiopática crônica que não sofre metabolismo significativo, sendo 95% da dose administrada excretada de forma inalterada nas fezes e na urina, fato este que associado à sua segurança, disponibilidade comercial e utilização de métodos analíticos bem estabelecidos a tornam um fármaco de escolha para avaliação da atividade da P-gp (MIURA et al., 2007).

É um fármaco rapidamente absorvido, atingindo picos de concentração plasmática ( $t_{max}$ ) entre 1 e 3 h após administração oral, com valores de  $C_{max}$  de 200 mg/mL e AUC de 1000 ng.h/mL após a administração de uma dose de 60 mg e com meia-vida ampla variando entre 3h e 17h. Possui baixa ligação a proteínas plasmáticas, variando entre 60 -70%, volume de

distribuição aparente ( $V_d/F$ ) em 5 – 6 L/kg, embora o verdadeiro  $V_d$  possa ser considerado ainda menor, em torno de 1,5 L/Kg, em parte devido a sua relativamente baixa biodisponibilidade oral foi relatada ser aproximadamente 30% (CHEN, 2007; SMITH; GUMS, 2009; LAPPIN et al., 2010). Estudos de avaliação do perfil farmacocinético da fexofenadina utilizando microdoses (100  $\mu$ g) mostraram um perfil similar aos estudos conduzidos utilizando doses terapêuticas (60 mg), indicando a possibilidade da utilização de microdoses em estudos envolvendo a farmacocinética da fexofenadina (YAMANE et al., 2007; YAMAZAKI et al., 2010)

A maioria dos estudos utilizando a fexofenadina como marcador realiza amostragens de plasma e urina por um período de no mínimo 24 horas após a administração do fármaco, no entanto alguns estudos empregam coletas até 8 horas após a administração do fármaco utilizando como parâmetro para avaliação de sua atividade a  $AUC_{0-8}$  (MA et al., 2010).

#### **1.4.7. Coquetel de fármacos**

A condução de estudos de interação entre diversos fármacos demanda grande tempo e custo. Visando redução de custo e melhorar a celeridade na condução desses estudos, foram desenvolvidos os estudos de interação utilizando coquetéis de fármacos, nos quais inúmeros substratos seletivos para as mais relevantes isoformas do CYP são administrados concomitantemente com o objetivo de se caracterizar os potenciais de indução ou inibição que os compostos em desenvolvimento apresentam sobre as principais enzimas metabolizadoras e, dessa forma, obter informações completas sobre o potencial de interação *in vivo* em um único ensaio (FRYE et al., 1997; CHRISTENSEN et al., 2003; SHARMA et al., 2004; FUHR et al., 2007; WOHLFARTH et al., 2012; DONZELLI et al., 2014).

A estratégia dos coquetéis teve início nos anos 90 com Breimer e Schellens (1990) e atualmente com os avanços nos métodos cromatográficos, aumento na sensibilidade dos espectrômetros de massas e melhor compreensão sobre os marcadores das isoformas do CYP clinicamente relevantes, sua utilização tem se tornado bastante utilizada (BREIMER; SCHELLENS, 1990; ZIENTEK; YODIM, 2013)

Vários coquetéis foram desenvolvidos nos últimos anos, como por exemplo o “*Coquetel Cooperstown 5 + 1*”, “*Coquetel Karolinska*”, “*Coquetel INJE*”, além do primeiro deles, o “*Coquetel Pittsburg*” (FRYE et al., 1997; CHAINUVATI et al., 2003; CHRISTENSEN et al., 2003; RYU et al., 2007). No entanto, a utilização de alguns desses coquetéis tem sido limitada pela indisponibilidade comercial de alguns dos marcadores (mefenitoína e debrisoquina) e

risco de aparecimento de efeitos adversos quando utilizados em doses terapêuticas (PEDERSEN et al., 2013; BOSILKOVSKA et al., 2014a)

Visando minimizar os riscos de aparecimento de efeitos adversos aos voluntários resultantes da associação de diversos fármacos marcadores, foram introduzidos na prática clínica os coquetéis utilizando microdoses, onde doses subterapêuticas, não superiores a 100 µg, são utilizadas (INGS, 2010; OH et al., 2012). Recentemente, Donzelli et al. (2014) validaram um coquetel para determinação simultânea dos fenótipos do CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4, utilizando doses convencionais dos fármacos marcadores cafeína, efavirenz, losartana, omeprazol, metoprolol e midazolam, denominando-o *Basel Coquetel* (DONZELLI et al., 2014). Em outro trabalho, Oh et al. (2012) desenvolveram um método para a quantificação simultânea de microdoses dos cinco marcadores cafeína (10 mg), losartana (2 mg), omeprazol (200 µg), dextrometorfano (2 mg) e midazolam (100 µg), além de seus respectivos metabólitos em plasma humano (OH et al., 2012).

Com o objetivo principal de obter dados clínicos que permitam avaliar a segurança do uso do EPP-AF<sup>®</sup> como medicamento anti-inflamatório por via oral, este trabalho visa desenvolver e validar um método analítico para a quantificação e análise simultânea de doses subterapêuticas dos marcadores - cafeína; da losartana e seu metabólito ácido carboxílico (E-3174); metoprolol e metabólito  $\alpha$ -OH-metoprolol; omeprazol e seu metabólito 5-OH-omeprazol; midazolam e fexofenadina – marcadores das enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e do transportador de efluxo P-gp.

Todos os fármacos incluídos nesse trabalho, com exceção da losartana, encontram-se na lista de marcadores do guia de condução de estudos de interação medicamentosa recomendada pelo EMEA e FDA (EMEA, 2010; FDA, 2012).

## 7. CONCLUSÕES

1. Os métodos de análise da fexofenadina, losartana e seu metabólito E-3174, omeprazol e seu metabólito 5-OH-omeprazol, midazolam, metoprolol e seu metabólito  $\alpha$ -OH-metoprolol e cafeína em plasma empregando LC-MS/MS permitiram a aplicação em estudo de farmacocinética após administração de dose única do coquetel de fármacos marcadores nas doses subterapêuticas de 10 mg (fexofenadina, metoprolol e cafeína), 2 mg (losartana e omeprazol) e 0,2 mg (midazolam);
2. As doses administradas possibilitaram administração do coquetel de fármacos com excelente perfil de segurança e demonstraram ampla faixa de linearidade farmacocinética dos marcadores;
3. O coquetel de fármacos utilizado mostrou diversas vantagens:
  - a. É um método eficiente, robusto e sensível de *screening* de potenciais interações entre produtos naturais e medicamentos dependentes de isoformas CYP e/ou transportador P-gp;
  - b. Minimiza a influência de variações intra e interindividuais ao longo do tempo, visto que pode ser utilizado para avaliar diversas isoformas CYP ao mesmo tempo;
  - c. Pode ser utilizado para avaliação de interações *in vivo* quando as avaliações *in vitro* são complexas e de difícil previsão, como no caso dos produtos naturais;
4. A avaliação dos parâmetros farmacocinéticos ( $AUC^{0-\infty}$ ,  $AUC^{0-t}$ ,  $C_{max}$  e  $Cl/F$ ) mostrou que o EPP-AF<sup>®</sup> administrado oralmente na dose de 375 mg/dia durante 15 dias modifica de forma discreta a atividade do transportador P-gp e das enzimas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4;
5. As magnitudes destas modificações se encontram abaixo dos limites considerados de importância clínica definidos pelos órgãos reguladores, portanto, sem relevância clínica;
6. A isoforma CYP2D6 não foi afetada pela presença do extrato padronizado de própolis (EPP - AF<sup>®</sup>).

## 8. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **RDC nº 24 de 14 de junho de 2011**. Estabelece os requisitos para o registro e a renovação de registro de medicamentos específicos, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução RDC n.º 27, de 17 de maio de 2012**, Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **RDC nº 26 de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Instrução Normativa nº de 18 de junho de 2014**. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico, 2014.

AITHAL, G. P. et al. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. **Lancet**, v. 353, n. 9154, p. 717-9, Feb 27 1999.

AL-MAJED, A. R. et al. Losartan: Comprehensive Profile. **Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol**, v. 40, p. 159-94, 2015.

ANDERSSON, T. et al. Omeprazole treatment does not affect the metabolism of caffeine. **Gastroenterology**, v. 101, n. 4, p. 943-947, Oct 1991.

APIS FLORA INDL. COML. LTDA (BR/SP). Processo de obtenção de extrato padronizado de própolis, extrato assim obtido, suas formulações, produtos e usos. **PI 0405483-0 A**, 02 dec. 2004, 11 Jul. 2006

ARMANI, S. et al. Drug Interaction Potential of Osilodrostat (LCI699) Based on Its Effect on the Pharmacokinetics of Probe Drugs of Cytochrome P450 Enzymes in Healthy Adults. **Clin Drug Investig**, v. 37, n. 5, p. 465-472, May 2017.

BAE, J. W. et al. Frequency of CYP2C9 alleles in Koreans and their effects on losartan pharmacokinetics. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 10, p. 1303-1308, Oct 2011.

BAE, S. H. et al. Simultaneous determination of metoprolol and its metabolites, alpha-hydroxymetoprolol and O-desmethylnmetoprolol, in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to the pharmacokinetics of metoprolol associated with CYP2D6 genotypes. **J Sep Sci**, v. 37, n. 11, p. 1256-64, Jun 2014.

BERRETTA, A. A. et al. Propolis standardized extract (EPP-AF(R)), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 4, p. 512-21, 2012.

BERTHOU, F. et al. Evidence for the involvement of several cytochromes P-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. **Drug Metab Dispos**, v. 19, n. 3, p. 561-7, May-Jun 1991.

BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73 Suppl 1, p. S53-63, Nov 2002.

BOSILKOVSKA, M. et al. Simultaneous LC-MS/MS quantification of P-glycoprotein and cytochrome P450 probe substrates and their metabolites in DBS and plasma. **Bioanalysis**, v. 6, n. 2, p. 151-164, Jan 2014 (a).

BOSILKOVSKA, M. et al. Geneva Cocktail for Cytochrome P450 and P-Glycoprotein Activity Assessment Using Dried Blood Spots. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 3, p. 349-359, Sep 2014 (b).

BRASIL CNS. Resolução CNS 196/96 - Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. **Diário Oficial da União**; 1996. p. 21082-5.

BRASIL CNS. Resolução CNS 466/12 - Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. **Diário Oficial da União**; 2012.

BREIMER, D. D.; SCHELLENS, J. H. A 'cocktail' strategy to assess in vivo oxidative drug metabolism in humans. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 6, p. 223-5, Jun 1990.

BUFALO, M. C. et al. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **J Appl Microbiol**, v. 107, n. 5, p. 1669-80, Nov 2009.

BUFALO, M. C.; CANDEIAS, J. M.; SFORCIN, J. M. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 6, n. 4, p. 483-7, Dec 2009.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem Toxicol**, v. 36, n. 4, p. 347-63, Apr 1998.

BUSH, T. M. et al. Adverse interactions between herbal and dietary substances and prescription medications: a clinical survey. **Altern Ther Health Med**, v. 13, n. 2, p. 30-5, Mar-Apr 2007.

CAMPBELL, M. E. et al. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine by polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible cytochrome(s) P-450 in human-liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 15, n. 2, p. 237-249, Mar-Apr 1987.

CANTELLIFORTI, G. et al. Interaction of licorice on glycyrrhizin pharmacokinetics. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 65-68, Nov 1994.

CEDERBERG, C.; ANDERSSON, T.; SKANBERG, I. Omeprazole - pharmacokinetics and metabolism in man. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 24, p. 33-42, 1989.

CHAINUVATI, S. et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". **Clin Pharmacol Ther**, v. 74, n. 5, p. 437-47, Nov 2003.

CHANG, M. et al. Use of omeprazole as a probe drug for CYP2C19 phenotype in Swedish Caucasians: Comparison with S-mephenytoin hydroxylation phenotype and CYP2C19 genotype. **Pharmacogenetics**, v. 5, n. 6, p. 358-363, Dec 1995.

CHEN, C. Some pharmacokinetic aspects of the lipophilic terfenadine and zwitterionic fexofenadine in humans. **Drugs R D**, v. 8, n. 5, p. 301-14, 2007.

CHOI, Y. H.; CHIN, Y. W.; KIM, Y. G. Herb-drug interactions: focus on metabolic enzymes and transporters. **Arch Pharm Res**, v. 34, n. 11, p. 1843-63, Nov 2011.

CHRISTENSEN, M. et al. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 73, n. 6, p. 517-528, Jun 2003.

CROFT, M. et al. Predicting Drug Candidate Victims of Drug-Drug Interactions, using Microdosing. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 51, n. 4, p. 237-246, 2012 2012.

CUSINATO, D.A.C. et al. Relationship of *CYP3A5* genotype and *ABCB1* diplotype to tacrolimus disposition in Brazilian kidney transplant patients. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.78, n.2, p.364-372, Aug 2014.

DE ANDRES, F.; SOSA-MACIAS, M.; LLERENA, A. A rapid and simple LC-MS/MS method for the simultaneous evaluation of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 hydroxylation capacity. **Bioanalysis**, v. 6, n. 5, p. 683-696, Mar 2014.

DE BARROS, M. P. et al. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 110, n. 3, p. 567-71, Apr 4 2007.

DE CASTRO, P. A. et al. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 3, p. 398-411, Mar 2011.

DE SOUSA, J. P. et al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **J Sep Sci**, v. 30, n. 16, p. 2656-65, Nov 2007.

DICKENS, D. et al. ABCB1 single nucleotide polymorphisms (1236C>T, 2677G>T, and 3435C>T) do not affect transport activity of human P-glycoprotein. **Pharmacogenet Genomics**, v. 23, n. 6, p. 314-23, Jun 2013.

DONZELLI, M. et al. The Basel Cocktail for Simultaneous Phenotyping of Human Cytochrome P450 Isoforms in Plasma, Saliva and Dried Blood Spots. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, n. 3, p. 271-282, Mar 2014.

DOROSHYENKO, O. et al. Drug Cocktail Interaction Study on the Effect of the Orally Administered Lavender Oil Preparation Silexan on Cytochrome P450 Enzymes in Healthy Volunteers. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 5, p. 987-993, May 2013.

DRESSER, G. K. et al. Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects. **Clin Pharmacol Ther**, v. 73, n. 1, p. 41-50, Jan 2003.

EAP, C. B. et al. Oral administration of a low dose of midazolam (75 microg) as an in vivo probe for CYP3A activity. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 60, n. 4, p. 237-46, Jun 2004.

EUGSTER, H. P. et al. Caffeine, estradiol, and progesterone interact with human CYP1A1 and CYP1A2 - evidence from cDNA-directed expression in *saccharomyces-cerevisiae*. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 21, n. 1, p. 43-49, Jan-Feb 1993.



EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) - Guideline on the Investigation of Drug Interactions EMA/CHMP/EWP/125211/2010. Disponível em: <  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/07/WC500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf)>

FABER, M. S.; JETTER, A.; FUHR, U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: Why, how, and when? **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 97, n. 3, p. 125-134, Sep 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA): Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. Disponível em:  
<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm292362.pdf>>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA): Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers, Exploratory IND Studies. U.S. **Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**, January 2006. Disponível em: < <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>

FRANCO, S. L. et al. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 9-10, n. 1, p. 1-10, 00/2000 2000.

FRANK, D.; JAEHDE, U.; FUHR, U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 63, n. 4, p. 321-333, Apr 2007.

FREITAS, S. F. et al. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 170-5, Feb 2006.

FRIEDRICH, D C. et al. Distribution of *CYP2D6* Alleles and Phenotypes in the Brazilian Population. **PLoS ONE** 9.10, June 2014.

FRYE, R. E. Probing the world of cytochrome P450 enzymes. **Molecular Interventions**, v. 4, n. 3, p. 157-162, Jun 2004.

FRYE, R. F. et al. Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 4, p. 365-376, Oct 1997

FUHR, U.; JETTER, A.; KIRCHHEINER, J. Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the "cocktail" approach. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 81, n. 2, p. 270-283, Feb 2007.

GEKKER, G. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. **J Ethnopharmacol**, v. 102, n. 2, p. 158-63, Nov 14 2005.

GHASSABIAN, S. et al. A High-Throughput Assay Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous In Vivo Phenotyping of 5 Major Cytochrome P450 Enzymes in Patients. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 31, n. 2, p. 239-246, Apr 2009.

GONZALEZ, H. M. et al. CYP2C19- and CYP3A4-dependent omeprazole metabolism in West Mexicans. **J Clin Pharmacol**, v. 43, n. 11, p. 1211-5, Nov 2003

GRANGEON, A. et al. Highly sensitive LC-MS/MS methods for the determination of seven human CYP450 activities using small oral doses of probe-drugs in human. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 1040, p. 144-158, Jan 01 2017.

GRANT, D. M.; TANG, B. K.; KALOW, W. VARIABILITY IN CAFFEINE METABOLISM. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 33, n. 5, p. 591-602, 1983

GU, L. et al. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine and theophylline by cDNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. **Pharmacogenetics**, v. 2, n. 2, p. 73-77, Apr 1992.

GURLEY, B. J. Pharmacokinetic Herb-Drug Interactions (Part 1): Origins, Mechanisms, and the Impact of Botanical Dietary Supplements. **Planta Medica**, v. 78, n. 13, p. 1478-1489, Sep 2012.

HAKOOZ, N. M. K. Caffeine Metabolic Ratios for the In Vivo Evaluation of CYP1A2, N-acetyltransferase 2, Xanthine Oxidase and CYP2A6 Enzymatic Activities. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 4, p. 329-338, May 2009.

HALAMA, B. et al. A Nanogram Dose of the CYP3A Probe Substrate Midazolam to Evaluate Drug Interactions. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 6, p. 564-571, Jun 2013.

HAN, Y. et al. Effect of silymarin on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite E-3174 in healthy Chinese volunteers. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 65, n. 6, p. 585-91, Jun 2009.

HEIZMANN, P.; ECKERT, M.; ZIEGLER, W. H. Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 16, p. S43-S49, 1983.

HERMANN, R.; VON RICHTER, O. Clinical Evidence of Herbal Drugs As Perpetrators of Pharmacokinetic Drug Interactions. **Planta Medica**, v. 78, n. 13, p. 1458-1477, Sep 2012.

HIGASHI, M. K. et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 13, p. 1690-1698, Apr 2002.

INGELMAN-SUNDBERG, M. et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 116, n. 3, p. 496-526, Dec 2007.

INGS, R. M. J. Welcome to 'Microdosing'. **Bioanalysis**, v. 2, n. 3, p. 371-372, Mar 2010.

IZZO, A. A.; ERNST, E. Interactions Between Herbal Medicines and Prescribed Drugs An Updated Systematic Review. **Drugs**, v. 69, n. 13, p. 1777-1798, 2009.

JIN, S. K. et al. Influence of CYP2D6\*10 on the pharmacokinetics of metoprolol in healthy Korean volunteers. **J Clin Pharm Ther**, v. 33, n. 5, p. 567-73, Oct 2008.

JOHNSON, J. A.; BURLEW, B. S. Metoprolol metabolism via cytochrome P4502D6 in ethnic populations. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 24, n. 3, p. 350-355, Mar 1996.

KALOW, W.; TANG, B. K. The use of caffeine for enzyme assays - a critical-appraisal. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 53, n. 5, p. 503-514, May 1993.

KIDD, R. S. et al. Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9\*3 allele. **Pharmacogenetics**, v. 9, n. 1, p. 71-80, Feb 1999.

KIM, D. S. et al. Effect of Red Ginseng on cytochrome P450 and P-glycoprotein activities in healthy volunteers. **J Ginseng Res**, v. 40, n. 4, p. 375-381, Oct 2016.

KIMOTO, T. et al. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. **Pathol Int**, v. 50, n. 9, p. 679-89, Sep 2000.

KIRCHHEINER, J.; BROCKMOLLER, J. Clinical consequences of cytochrome P450C9 polymorphisms. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 77, n. 1, p. 1-16, Jan 2005.

KIRWAN, C.; MACPHEE, I.; PHILIPS, B. Using drug probes to monitor hepatic drug metabolism in critically ill patients: midazolam, a flawed but useful tool for clinical investigation of CYP3A activity? **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 6, n. 6, p. 761-771, Jun 2010.

KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. **Arch Oral Biol**, v. 45, n. 2, p. 141-8, Feb 2000.

LAPPIN, G. et al. Use of microdosing to predict pharmacokinetics at the therapeutic dose: Experience with 5 drugs. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 3, p. 203-215, Sep 2006.

LAPPIN, G. et al. Pharmacokinetics of fexofenadine: Evaluation of a microdose and assessment of absolute oral bioavailability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 125-131, May 12 2010.

LAPPIN, G.; NOVECK, R.; BURT, T. Microdosing and drug development: past, present and future. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 9, n. 7, p. 817-34, Jul 2013.

LENUZZA, N. et al. Safety and pharmacokinetics of the CIME combination of drugs and their metabolites after a single oral dosing in healthy volunteers. **Eur J Drug Metab Pharmacokin**, Dec 3 2014.

LIN, W. et al. Evaluation of the effect of TM208 on the activity of five cytochrome P450 enzymes using on-line solid-phase extraction HPLC-DAD: A cocktail approach. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 923, p. 29-36, Apr 1 2013.

LIN, Y. S. et al. In-vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. **Pharmacogenetics**, v. 11, n. 9, p. 781-791, Dec 2001.

MA, J. D. et al. Evaluation of In Vivo P-Glycoprotein Phenotyping Probes A Need for Validation. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 49, n. 4, p. 223-237, 2010 2010.

MA, J. D.; NAFZIGER, A. N.; BERTINO, J. S., JR. Validating Phenotyping Cocktails: More Work Needs to Be Done. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 11, p. 1772-1773, Nov 2012.

MAHAJAN R; PARVEZ A; K., G. Microdosing vs. Therapeutic Dosing for Evaluation of Pharmacokinetic Data: A Comparative Study. **4**, v. 1 p. 301-305, 2014-03-19 2009.

MALATI, C. Y. et al. Influence of Panax ginseng on cytochrome P450 (CYP)3A and P-glycoprotein (P-gp) activity in healthy participants. **J Clin Pharmacol**, v. 52, n. 6, p. 932-9, Jun 2012.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**, v. 74, n. 2, p. 105-12, Feb 2001.

MATSUSHIMA, S. et al. Investigation of the inhibitory effects of various drugs on the hepatic uptake of fexofenadine in humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 4, p. 663-669, Apr 2008.

MCCREA, J. B. et al. Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite E-3174. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 65, n. 3, p. 348-352, Mar 1999.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 3, p. 1215, Feb 11 1988.

MINERS, J. O.; BIRKETT, D. J. The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. **General Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 245-249, Mar 1996. ISSN 0306-3623.

MIURA, M. et al. Pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers in healthy subjects. **Chirality**, v. 19, n. 3, p. 223-227, Mar 2007.

MIURA, M.; UNO, T. Clinical pharmacokinetics of fexofenadine enantiomers. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 69-74, Jan 2010.

NA, D. H. et al. Evaluation of metabolism-mediated herb-drug interactions. **Arch Pharm Res**, v. 34, n. 11, p. 1829-42, Nov 2011.

- NAZIR, S. et al. Pharmacokinetics of omeprazole and its metabolites in three phases of menstrual cycle. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 40, n. 1, p. 13-22, Mar 2015.
- NI, J. et al. Microdosing assessment to evaluate pharmacokinetics and drug metabolism in rats using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Pharm Res**, v. 25, n. 7, p. 1572-82, Jul 2008.
- NINOMIYA, H. et al. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and excessive serum phenytoin concentration with central nervous system intoxication. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 22, n. 2, p. 230-232, Apr 2000.
- OH, K. S. et al. High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 895, p. 56-64, May 2012.
- ORSI, R. D. et al. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the Salmonella typhi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 108-112, Apr-Jun 2006.
- ORSI, R. O. et al.. Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 109-116, 2005.
- ORSI, R. O. et al. Radionuclides in honeybee propolis (Apis mellifera L.). **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 76, n. 4, p. 637-40, Apr 2006.
- PAINE, M. F. et al. The human intestinal cytochrome P450 "pie";. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 5, p. 880-886, May 2006.
- PARK, G. J. et al. Drug-drug interaction of microdose and regular-dose omeprazole with a CYP2C19 inhibitor and inducer. **Drug Des Devel Ther**, v. 11, p. 1043-1053, 2017.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 9, p. 2502-6, Apr 24 2002.
- PEDERSEN, R. S. et al. A cytochrome P450 phenotyping cocktail causing unexpected adverse reactions in female volunteers. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1997-1999, Dec 2013.

PELKONEN, O. et al. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 10, p. 667-715, Oct 2008.

PEREIRA, A. D. S. et al. Propolis: 100 years of research and future perspectives. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 05/2002 2002.

PERERA, V. et al. Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 9, p. 1161-1168, Sep 2011.

PERERA, V.; GROSS, A. S.; MCLACHLAN, A. J. Measurement of CYP1A2 Activity: A Focus on Caffeine as a Probe. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 667-678, Jun 2012.

POSADZKI, P.; WATSON, L.; ERNST, E. Herb-drug interactions: an overview of systematic reviews. **Br J Clin Pharmacol**, Jun 1 2012.

PREISSNER, S. C. et al. Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy. **Plos One**, v. 8, n. 12, Dec 10 2013.

PRUEKSARITANONT, T. et al. Drug-drug interaction studies: regulatory guidance and an industry perspective. **Aaps j**, v. 15, n. 3, p. 629-45, Jul 2013.

QURESHI, S. et al. **Negative aspects of beneficial herbs: An Overview**. India: Journal of Herbal Medicine and Toxicology. 6: 1 - 14 p. 2012.

REFARGEN. Rede nacional de farmacogenética. **Polimorfismos do CYP2C9 para a população brasileira**. Disponível em [http://www.refargen.org.br/article.php3?id\\_article=47](http://www.refargen.org.br/article.php3?id_article=47). Acesso em 22 de maio de 2017 (a)

REFARGEN. Rede nacional de farmacogenética. **Polimorfismos do CYP2C19 para a população brasileira**. Disponível em [http://www.refargen.org.br/article.php3?id\\_article=48](http://www.refargen.org.br/article.php3?id_article=48). Acesso em 22 de maio de 2017(b)

REFARGEN. Rede nacional de farmacogenética. **Polimorfismos do CYP2D6 para a população brasileira**. Disponível em [http://www.refargen.org.br/article.php3?id\\_article=80](http://www.refargen.org.br/article.php3?id_article=80). Acesso em 22 de maio de 2017 (c)

REIS, C. M. F. et al. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 9-10, n. 1, p. 43-52, 2000.

RETTIE, A. E.; JONES, J. P. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: Drug-drug interactions and pharmacogenetics. In: (Ed.). **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. Palo Alto: Annual Reviews, v.45, 2005. p.477-494.

REZENDE, G. P. S. R.; PIMENTA, F. C.; COSTA, L. R. R. S. Antimicrobial activity of two brazilian commercial propolis extracts. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 5, n. 16, p. 967-970, 2006.

ROBERTSON, S. M. et al. Effect of Ginkgo biloba extract on lopinavir, midazolam and fexofenadine pharmacokinetics in healthy subjects. **Curr Med Res Opin**, v. 24, n. 2, p. 591-9, Feb 2008.

RYU, J. Y. et al. Development of the "Inje cocktail" for high-throughput evaluation of five human cytochrome p450 Isoforms in vivo. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 5, p. 531-540, Nov 2007.

SALATINO, A. et al. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2, n. 1, p. 33-38, Mar 2005.

SAMER, C. F. et al. Applications of CYP450 Testing in the Clinical Setting. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 17, n. 3, p. 165-184, 2013 2013.

SANDWALL, P. et al. Lack of polymorphism of the conversion of losartan to its active metabolite E-3174 in extensive and poor metabolizers of debrisoquine (cytochrome P450 2D6) and mephenytoin (cytochrome P4502C19). **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 279-283, Jun 1999.

SANTOS, P. et al. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. **Bmc Medical Genetics**, v. 12, Jan 2011.

SCHWEIKL, H. et al. Expression of cyp1a1 and cyp1a2 genes in human liver. **Pharmacogenetics**, v. 3, n. 5, p. 239-249, Oct 1993.

SCOTT, S. A. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 Update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 94, n. 3, p. 317-323, Sep 2013.



SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v. 73, n. 1-2, p. 243-9, Nov 2000.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **J Ethnopharmacol**, v. 133, n. 2, p. 253-60, Jan 27, 2011.

SHARMA, A. et al. A convenient five-drug cocktail for the assessment of major drug metabolizing enzymes: a pilot study. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 288-297, Sep 2004.

SHI, S.; KLOTZ, U. Drug interactions with herbal medicines. **Clin Pharmacokinet**, v. 51, n. 2, p. 77-104, Feb 1 2012.

SHIMADA, T. et al. Interindividual variations in human liver cytochrome-P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic-chemicals - studies with liver-microsomes of 30 japanese and 30 caucasians. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 270, n. 1, p. 414-423, Jul 1994.

SHIMIZU, K. et al. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Arch Biochem Biophys**, v. 424, n. 2, p. 181-8, Apr 15 2004.

SIMOES, L. M. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J Ethnopharmacol**, v. 94, n. 1, p. 59-65, Sep 2004.

SIMON, T. et al. Variability of cytochrome P450 1A2 activity over time in young and elderly healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 5, p. 601-604, Nov 2001.

SISTONEN, J. et al. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 17, n. 2, p. 93-101, Feb 2007.

SMITH, S. M.; GUMS, J. G. Fexofenadine: biochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and its unique role in allergic disorders. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 5, n. 7, p. 813-822, Jul 2009.

SORTICA, V. D. A. et al. Influence of Genomic Ancestry on the Distribution of SLCO1B1, SLCO1B3 and ABCB1 Gene Polymorphisms among Brazilians. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 5, p. 460-468, May 2012.

SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 4, p. 913-920, Jun 29 2004.

STEARNS, R. A. et al. Biotransformation of losartan to its active carboxylic-acid metabolite in human liver-microsomes - role of cytochrome P450C and 3A subfamily members. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 23, n. 2, p. 207-215, Feb 1995.

STREETMAN, D. S.; BERTINO, J. S.; NAFZIGER, A. N. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. **Pharmacogenetics**, v. 10, n. 3, p. 187-216, Apr 2000.

TANAKA, S. et al. Simultaneous LC-MS/MS Analysis of the Plasma Concentrations of a Cocktail of 5 Cytochrome P450 Substrate Drugs and Their Metabolites. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 18-25, Jan 2014.

TATE, S. K. et al. Genetic predictors of the maximum doses patients receive during clinical use of the anti-epileptic drugs carbamazepine and phenytoin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 15, p. 5507-5512, Apr 2005.

TAVARES, D. C. et al. Effects of propolis crude hydroalcoholic extract on chromosomal aberrations induced by doxorubicin in rats. **Planta Med**, v. 73, n. 15, p. 1531-6, Dec 2007.

THORN, C. F. et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP1A2. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 22, n. 1, p. 73-77, Jan 2012.

THUMMEL, K. E.; WILKINSON, G. R. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 389-430, 1998.

TURPAULT, S. et al. Pharmacokinetic assessment of a five-probe cocktail for CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 928-935, Dec 2009.

VAN DEN BERG, S. J. et al. Safety assessment of plant food supplements (PFS). **Food Funct**, v. 2, n. 12, p. 760-8, Dec 2011.

VAN TROOSTWIJK, L.; KOOPMANS, R. P.; GUCHELAAR, H. J. Two novel methods for the determination of CYP1A2 activity using the paraxanthine/caffeine ratio. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, n. 3, p. 355-362, Jun 2003.

VIDEAU, O. et al. Biochemical and analytical development of the CIME cocktail for drug fate assessment in humans. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 16, p. 2407-2419, Aug 2010.

WANG, L. S. et al. St John's wort induces both cytochrome P450 3A4-catalyzed sulfoxidation and 2C19-dependent hydroxylation of omeprazole. **Clin Pharmacol Ther**, v. 75, n. 3, p. 191-7, Mar 2004.

WATKINS, P. B. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. **Pharmacogenetics**, v. 4, n. 4, p. 171-184, Aug 1994.

WESTLIND-JOHNSSON, A. et al. Identification and characterization of CYP3A4\*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. **Clin Pharmacol Ther**, v. 79, n. 4, p. 339-49, Apr 2006.

WILLIAMS, D. et al. Use of a cocktail probe to assess potential drug interactions with cytochrome P450 after administration of belatacept, a costimulatory immunomodulator. **Br J Clin Pharmacol**, v. 83, n. 2, p. 370-380, Feb 2017.

WILLIAMS, J. A. et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 11, p. 1201-8, Nov 2004.

WOHLFARTH, A. et al. Cocktail Approach for In Vivo Phenotyping of 5 Major CYP450 Isoenzymes: Development of an Effective Sampling, Extraction, and Analytical Procedure and Pilot Study With Comparative Genotyping. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 8, p. 1200-1214, Aug 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. **Report of a World Health Organization Consultation**. Geneva: World Health Organization, 2000. p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284.

XIE, R. et al. CYP3A and P-glycoprotein activity induction with St. John's Wort in healthy volunteers from 6 ethnic populations. **J Clin Pharmacol**, v. 45, n. 3, p. 352-6, Mar 2005.

YAMANE, N. et al. Microdose clinical trial: Quantitative determination of fexofenadine in human plasma using liquid chromatography/electro spray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 858, n. 1-2, p. 118-128, Oct 15 2007.

YAMAZAKI, A. et al. Microdose study of a P-glycoprotein substrate, fexofenadine, using a non-radioisotope-labelled drug and LC/MS/MS. **J Clin Pharm Ther**, v. 35, n. 2, p. 169-75, Apr 2010.

YASAR, U. et al.. Role of CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 7, p. 1051-1056, Jul 2001.

YASAR, U. et al. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. **Clin Pharmacol Ther**, v. 71, n. 1, p. 89-98, Jan 2002.

YI, S. et al. Effects of Angelicae tenuissima radix, Angelicae dahuricae radix and Scutellariae radix Extracts on Cytochrome P450 Activities in Healthy Volunteers. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 105, n. 4, p. 249-256, Oct 2009.

YIN, O. Q. et al. Pharmacogenetics and herb-drug interactions: experience with Ginkgo biloba and omeprazole. **Pharmacogenetics**, v. 14, n. 12, p. 841-50, Dec 2004.

YIN, O. Q. P. et al. Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 23, p. 2921-2933, 2004.

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, Dec 2002

ZADOYAN, G.; FUHR, U. Phenotyping Studies to Assess the Effects of Phytopharmaceuticals on In Vivo Activity of Main Human Cytochrome P450 Enzymes. **Planta Medica**, v. 78, n. 13, p. 1428-1457, Sep 2012.

ZANGER, U. M. et al. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. **Anal Bioanal Chem**, v. 392, n. 6, p. 1093-108, Nov 2008.

ZHANG, L.; SPARREBOOM, A. Predicting transporter-mediated drug interactions: Commentary on: "Pharmacokinetic evaluation of a drug transporter cocktail consisting of digoxin, furosemide, metformin and rosuvastatin" and "Validation of a microdose probe drug cocktail for clinical drug interaction assessments for drug transporters and CYP3A". **Clin Pharmacol Ther**, v. 101, n. 4, p. 447-449, Apr 2017.

ZHANG, Y. H. et al. Use of omeprazole as a CYP3A probe drug: Effect of sex and menstrual cycle phase on CYP3A activity in healthy Caucasian adults. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 345-352, Mar 2006.

ZHOU, H. H.; TONG, Z.; MCLEOD, J. F. "Cocktail"; approaches and strategies in drug development: Valuable tool or flawed science? **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 120-134, Feb 2004.

ZIENTEK, M.; YOUDIM, K. Simultaneous determination of multiple CYP inhibition constants using a cocktail-probe approach. **Methods Mol Biol**, v. 987, p. 11-23, 2013.