



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Avaliação do potencial de interacção entre o *Fucus vesiculosus* e a amiodarona no rato

João Miguel Guerra Paiva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientador: Prof. Doutor Gilberto Alves

Covilhã, Outubro de 2011

Agradecimentos

Apesar de um agradecimento através de palavras não espelhar a minha gratidão por todos aqueles que me ajudaram a elaborar esta dissertação, deixarei registado nesta página o reconhecimento pela valiosa cooperação e auxílio.

Em primeiro lugar, a minha gratidão é para o Professor Doutor Gilberto Alves, por ter aceitado desenvolver este tema, e me ter apoiado e guiado na execução da dissertação durante os últimos meses.

Agradeço ao Mestre Márcio Rodrigues, que esteve presente durante a execução de todo o trabalho prático, e me ajudou em alguns momentos complicados. As críticas que foi fazendo ao trabalho e o conhecimento na área do HPLC foram fundamentais.

À Ana Luísa, companheira de trabalho, demonstro o meu reconhecimento por se ter sempre mostrado disponível para me apoiar e me acalmar nos momentos de maior ansiedade. As suas opiniões frequentes e produtivas estão englobadas neste documento.

Reconheço o apoio e incentivo que vários dos grandes amigos me proporcionaram, ao longo destes meses e, especialmente, ao Daniel Viegas, amigo de longa data, que fez as críticas e sugestões finais; a ele, e a todos os restantes, agradeço e desejo as maiores felicidades para o futuro que se aproxima.

Sempre disponível para ajudar, e com simpatia, o pessoal do Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde contribuiu para a realização desta dissertação, com o apoio logístico necessário aos estudos.

Não poderei esquecer os meus pais, que não deixaram de ler e reler a dissertação, comentando e fazendo críticas construtivas, no que consideravam necessário.

Resumo

Ao longo das últimas décadas tem-se registado um aumento do consumo de suplementos alimentares à base de plantas. Muitos destes produtos têm demonstrado interagir com medicamentos, alguns deles com margem terapêutica estreita. Este trabalho experimental pretendeu estudar o potencial de interacção entre o extracto de *Fucus vesiculosus* e a amiodarona, ambos administrados pela via oral, no rato.

Para avaliar o potencial de interacção foram desenhados 2 estudos experimentais: um de administração única e concomitante de extracto de *Fucus vesiculosus* e amiodarona, e o segundo que envolveu a administração do extracto aos ratos durante 14 dias e a administração de amiodarona no 15º dia. A amostra compreendeu 20 ratos Wistar. Foram recolhidas amostras de plasma e de órgãos (coração, fígado e pulmão), as quais após processamento mediante extracção liquido-liquido (LLE) foram analisadas através de HPLC-DAD.

Os resultados indicam que o extracto de *Fucus vesiculosus* administrado por via oral, em simultâneo e em dose única com amiodarona, influencia a velocidade e extensão de exposição sistémica ao fármaco, possivelmente por interferência na absorção ao nível do tracto gastrointestinal. Tanto a C_{max} , como a AUC_{0-t} e a $AUC_{0-\infty}$ sofreram uma diminuição considerável quando a amiodarona foi administrada com o extracto de *Fucus vesiculosus*, em comparação com o respectivo grupo controlo (amiodarona + veículo do extracto). Por outro lado, não foram detectadas diferenças importantes na cinética plasmática da amiodarona no estudo em que se administrou o extracto de *Fucus vesiculosus* em dose múltipla durante 14 dias e a amiodarona ao 15º dia. A concentração de amiodarona, ou do seu metabolito mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA), nos órgãos, não parece ser significativamente afectada pela administração do extracto de *Fucus vesiculosus*, mesmo após a administração concomitante de *Fucus vesiculosus* e amiodarona, apesar das alterações registadas nos níveis plasmáticos.

Em conclusão, estes dados demonstram algum potencial de interacção entre o extracto de *Fucus vesiculosus* e a amiodarona, um fármaco de margem terapêutica estreita, quando administrados concomitantemente ao rato. Mas, apesar de tal ocorrer, parece não haver uma correlação entre esta interacção e as concentrações de amiodarona e MDEA nos órgãos, nomeadamente no coração, o órgão-alvo deste fármaco.

Palavras-chave

Amiodarona, *Fucus vesiculosus*, interacção, rato

Abstract

Over the past decades there has been an increased consumption of herbal dietary supplements. Many of these products have been shown to interact with medications, some of them with a narrow therapeutic index. This experimental work sought to study a potential interaction between a *Fucus vesiculosus* extract and amiodarone, both administered orally to rats.

To ascertain the potential of interactions, 2 experimental studies were designed: a single administration study with concomitant administration of a *Fucus vesiculosus* extract and amiodarone, and the second involving the administration of the extract to rats for 14 days, and amiodarone on the 15th day. The sample included 20 Wistar rats. Plasma and organ samples (heart, liver and lung) were collected, processed by liquid-liquid extraction (LLE), and analysed by HPLC-DAD.

The *Fucus vesiculosus* extract administered orally, simultaneously and in a single-dose with amiodarone, influences the rate and extension of systemic drug exposure, possibly derived from interference in the gastrointestinal tract absorption. Both C_{max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ suffered a considerable decrease when amiodarone was administered with the extract of *Fucus vesiculosus*, compared with the respective control group (amiodarone + vehicle of the extract). On the other hand, no significant differences in the amiodarone plasma kinetics were detected, in the multiple dose study, which comprised the administration of the *Fucus vesiculosus* extract for 14 days and the administration of amiodarone on the 15th day of the study. The concentrations of amiodarone, or its metabolite mono-*N*-desethylamiodarone (MDEA), in the organs, did not appear to be significantly affected by the extract of *Fucus vesiculosus*, even after the administration, at the same time, of the *Fucus vesiculosus* extract and amiodarone, despite the changes recorded in the plasma levels.

In conclusion, the results show some potential for an interaction between the *Fucus vesiculosus* extract and amiodarone, a drug with a narrow therapeutic index, when these are administered to rats, at the same time. But, despite this occurs, it seems there isn't a correlation between the interaction and the concentrations of amiodarone and MDEA in the organs. The amiodarone and MDEA concentrations in the heart, the target-organ for these molecules, are not affected by the *Fucus vesiculosus* extract.

Keywords

Amiodarone, *Fucus vesiculosus*, interactions, rats

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 - As plantas medicinais ao longo da história	2
1.1.1 - Do passado ao presente	2
1.1.2 - A nova relação da sociedade com as plantas medicinais	3
1.2 - Riscos conscientes e inconscientes associados à comercialização de fitoterapêuticos	5
1.2.1 - Identificação das espécies botânicas	5
1.2.2 - Adulteração da matéria vegetal utilizada para fins medicinais	5
1.2.3 - Regulamentação de produtos fitoterapêuticos.....	6
1.3 - As plantas como agentes moduladores e/ou modificadores de processos fisiológicos e farmacológicos	7
1.3.1 - Alterações nocivas provocadas pelas plantas no organismo humano....	7
1.3.2 - Interações entre as plantas e os medicamentos.....	8
1.3.3 - Alterações no metabolismo e transporte de fármacos como causa de interações farmacológicas.....	10
1.3.4 - Outros mecanismos envolvidos nas interações entre plantas e fármacos	13
1.4 - Estratégias aplicadas na detecção de interações farmacológicas: ensaios <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i>	15
1.5 - <i>Fucus vesiculosus</i>	17
1.6 - Amiodarona.....	20
1.6.1 - Caracterização química	20
1.6.2 - Caracterização farmacocinética	21
1.6.2.1 - Comparação de alguns parâmetros farmacocinéticos, entre o Homem e o rato.....	24
1.6.3 - Acção e efeitos farmacológicos	24
1.6.4 - Interações entre a amiodarona e outros fármacos ou suplementos alimentares	25
1.6.5 - Toxicidade	26

1.6.5.1 - Tiróide	26
1.6.5.2 - Pulmão	27
1.6.5.3 - Fígado	27
1.6.5.4 - Coração	28
1.6.5.5 - Toxicidade da amiodarona sobre outros órgãos e sistemas	28
1.7 - O potencial de interacção entre <i>Fucus vesiculosus</i> e a amiodarona	29
Capítulo 2 - Objectivo da Dissertação	31
Capítulo 3 - Material e Métodos	33
3.1 - Animais	33
3.2 - Fármaco e matéria vegetal	34
3.3 - Doses	34
3.4 - Preparação dos compostos a administrar	36
3.4.1 - Veículo	36
3.4.2 - Extracto de <i>Fucus vesiculosus</i>	36
3.4.3 - Solução de amiodarona	36
3.5 - Execução do estudo experimental	37
3.6 - Tratamento e análise das amostras sanguíneas	40
Capítulo 4 - Resultados	43
4.1 - Perfis farmacocinéticos da amiodarona e da mono- <i>N</i> -desetilamiodarona, no rato	43
4.1.1 - Perfis e parâmetros farmacocinéticos plasmáticos da amiodarona em ratos pré-tratados com o extracto de <i>Fucus vesiculosus</i> , em DM	43
4.1.2 - Perfis e parâmetros farmacocinéticos plasmáticos da amiodarona em ratos tratados concomitantemente com o extracto de <i>Fucus vesiculosus</i> , em DU	50
4.1.3 - Análise estatística dos valores das concentrações plasmáticas de amiodarona dos ensaios em DM e em DU	56
4.1.4 - Análise da razão entre alguns parâmetros farmacocinéticos do ensaio em DM e do ensaio em DU	57

4.2 - Concentrações tecidulares de amiodarona e de mono- <i>N</i> -desetilamiodarona, no rato	59
4.2.1 - Valores das concentrações de amiodarona e MDEA em tecidos de órgãos de rato, pertencentes aos ensaios em DM e em DU	59
4.2.2 - Análise estatística dos valores das concentrações de amiodarona e MDEA em tecidos de órgãos de rato, pertencentes aos ensaios em DM e em DU	63
Capítulo 5 - Discussão	65
Capítulo 6 - Conclusão	73
Bibliografia	75
Anexos.....	87
Anexo 1 - Cromatogramas obtidos através de análise por HPLC (exemplo)	87
Anexo 2 - Gráfico com a representação da variação da massa dos ratos em estudo (ensaio em DM)	89

Lista de Figuras

Figura 1: Representação gráfica da percentagem total de fibras contidas em alguns produtos utilizados na alimentação ocidental.....	14
Figura 2: Estrutura química do fucoidano, presente no <i>Fucus vesiculosus</i>	18
Figura 3: Estrutura química representando a amiodarona.	20
Figura 4: Estruturas químicas representando alguns metabolitos da amiodarona.	22
Figura 5: Comparação da toxicidade pulmonar entre a amiodarona e os seus metabolitos....	27
Figura 6: Procedimento experimental aplicado nos animais do estudo, com o objectivo de recolher amostras biológicas.	39
Figura 7: Procedimento aplicado para preparar as amostras de plasma e de órgãos para a análise cromatográfica.....	41
Figura 8: Representação gráfica dos valores plasmáticos médios de amiodarona (AM) e de mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) correspondentes ao ensaio em DM, ao longo de 24 horas.. ..	46
Figura 9: Gráfico com escala semi-logarítmica, que representa as concentrações de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) recolhidas ao longo das 24h correspondentes ao estudo em DM.. ..	46
Figura 10: Representação gráfica dos valores plasmáticos médios de amiodarona (AM) e de mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA), nos GE/DU e GC/DU, ao longo de 24 horas.	53
Figura 11: Gráfico com escala semi-logarítmica, que representa as concentrações de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) recolhidas ao longo das 24h correspondentes ao estudo em DU.. ..	53
Figura 12: Representação das razões entre os valores do GE e do GC, do ensaio em DM, para C_{max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$	57
Figura 13: Representação das razões entre os valores do GE e do GC, do ensaio em DU, para C_{max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$	57

Figura 14: Representação das concentrações de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) obtidas no ensaio em DM, em órgãos de rato. Comparação da concentração dos compostos entre os vários órgãos.....	61
Figura 15: Representação das concentrações de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) obtidas no ensaio em DU, em órgãos de rato. Comparação da concentração dos compostos entre os vários órgãos.....	61
Figura 16: Cromatograma obtido através da análise das amostras de plasma de rato (correspondente à colheita da amostra, 6 horas pos-dose de amiodarona), por HPLC (exemplo)..	87
Figura 17: Cromatogramas obtidos através da análise das amostras de tecidos de rato, por HPLC (exemplo)..	88
Figura 18: Gráfico representando a variação de massa, dos animais do ensaio em DM (GE e GC), durante os 15 dias em que decorreu o estudo..	89

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros cinéticos da amiodarona, no Homem e no rato.	23
Tabela 2: Interacção entre a amiodarona e outros fármacos, e efeito registado nestes..	25
Tabela 3: Interacções importantes que alteram as concentrações plasmáticas de amiodarona..	25
Tabela 4: Distribuição dos animais pelos grupos de estudo e controlo, dos ensaios em DU e em DM.	33
Tabela 5: Demonstração das doses de extracto a administrar, através de sonda intragástrica, aos animais, considerando a massa corporal dos ratos imediatamente antes da administração. Aplicação da equação (2).....	35
Tabela 6: Concentrações plasmáticas de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) em ratos Wistar previamente tratados, durante 14 dias, com extracto de <i>Fucus vesiculosus</i> (575 mg/kg; <i>per os</i>), após a administração oral de uma dose única de amiodarona (50 mg/kg) no 15º dia. Ensaio correspondente ao GE/DM.	44
Tabela 7: Concentrações plasmáticas de amiodarona e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) em ratos Wistar previamente tratados, durante 14 dias, com o veículo do extracto de <i>Fucus vesiculosus</i> (CMC 0,5%; <i>per os</i>), após a administração oral de uma dose única de amiodarona (50 mg/kg) no 15º dia. Ensaio correspondente ao GC/DM.	45
Tabela 8: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao GE/DM.	48
Tabela 9: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao GC/DM.	49
Tabela 10: Análise estatística dos parâmetros cinéticos da amiodarona correspondentes ao ensaio em DM. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por <i>t-student</i> ($p < 0,05$).	50
Tabela 11: Concentrações plasmáticas de amiodarona e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) em ratos Wistar após administração oral simultânea de uma dose única de amiodarona (50 mg/kg) e extracto de <i>Fucus vesiculosus</i> (575 mg/kg). Ensaio correspondente ao GE/DU.	51
Tabela 12: Concentrações plasmáticas de amiodarona e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) em ratos Wistar após administração oral simultânea de uma dose única de amiodarona (50 mg/kg) e veículo do extracto <i>Fucus vesiculosus</i> (CMC 0,5%; <i>per os</i>). Valores correspondentes ao GC/DU.	52

Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao GE/DU.....	54
Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao GC/DU.....	55
Tabela 15: Análise estatística dos parâmetros cinéticos da amiodarona correspondentes ao ensaio em DU. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por <i>t-student</i> ($p<0,05$).	56
Tabela 16: Análise estatística dos valores de concentração de amiodarona correspondentes aos ensaios em DU e em DM. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por <i>t-student</i> ($p<0,05$).	56
Tabela 17: Representação dos valores de concentração de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) nos tecidos de órgãos de rato, pertencentes ao estudo GE/DM.	59
Tabela 18: Representação dos valores de concentração de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) nos tecidos de órgãos de rato, pertencentes ao estudo GC/DM.	59
Tabela 19: Representação dos valores de concentração de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) nos tecidos de órgãos de rato, pertencentes ao estudo GE/DU.	60
Tabela 20: Representação dos valores de concentração de amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) nos tecidos de órgãos de rato, pertencentes ao estudo GC/DU.	60
Tabela 21: Análise estatística das concentrações da amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) correspondentes ao ensaio em DM. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por <i>t-student</i> ($p<0,05$).	63
Tabela 22: Análise estatística das concentrações da amiodarona (AM) e mono- <i>N</i> -desetilamiodarona (MDEA) correspondentes ao ensaio em DU. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por <i>t-student</i> ($p<0,05$).	63

Lista de Acrónimos

Amiodarona-O-EtOH	Amiodarona-Etanol
ATP	Adenosina trifosfato
AUC _{0-∞}	Área sob a curva entre o intervalo 0 horas e ∞ horas
AUC _{0-t}	Área sob a curva entre o intervalo 0 horas e x horas
C _{max}	Concentração máxima
CMC	Carboximetilcelulose
CYP	Citocromo P450
DDEA	Di- <i>N</i> -desetilamiodarona
DL ₅₀	Dose letal para 50% da população submetida ao composto estudado
DM	Dose múltipla
DU	Dose única
E.U.A.	Estados Unidos da América
GC/DM	Grupo de controlo do ensaio de dose múltipla
GC/DU	Grupo de controlo do ensaio de dose única
GE/DM	Grupo de estudo do ensaio em dose múltipla
GE/DU	Grupo de estudo do ensaio em dose única
gp-P	Glicoproteína-P
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I.V.	Intravenosa
MDEA	Mono- <i>N</i> -desetilamiodarona
O.M.S.	Organização Mundial de Saúde
OATP	<i>Organic anion-transporting polypeptide</i>
RE	Receptor de estrogénio
t _{1/2}	Tempo de semi-vida de eliminação
V	Volume
V _D	Volume aparente de distribuição

Capítulo 1

Introdução

As plantas são um recurso disponibilizado pela Natureza, que há milhares de anos tem sido utilizado pelo ser humano com o intuito de auxiliar os processos de cura ou prevenir a doença. Actualmente, apesar de diversas plantas serem utilizadas regularmente nas medicinas tradicionais e alopática, são os medicamentos de síntese que dominam o mercado. De forma a evitar efeitos prejudiciais na saúde dos doentes, é necessário conhecer quais as interacções relevantes entre plantas e medicamentos, e a probabilidade destas ocorrerem. Seguidamente, introduzir-se-á o tema desta dissertação, enquadrando-o historicamente e, posteriormente, abordar-se-ão algumas preocupações da actualidade relacionadas com a problemática das interacções entre fitoquímicos e medicamentos. Através da revisão bibliográfica, informar-se-á com maior detalhe diversos aspectos relativos aos dois elementos principais da dissertação, o *Fucus vesiculosus* e a amiodarona. Abordar-se-á, finalmente, o estado do conhecimento acerca das interacções farmacológicas que envolvam o *Fucus vesiculosus* e/ou a amiodarona.

1.1 - As plantas medicinais ao longo da História

1.1.1 - Do passado ao presente

O uso de plantas como auxiliares dos processos de cura remonta há dezenas de milhares de anos [1]. Os primeiros registos da utilização de matéria vegetal com fins medicinais remontam às civilizações do Crescente Fértil, nomeadamente a Mesopotâmica e a Egípcia [2, 3]. Deste período são conhecidos diversos papiros e placas de argila com informação médica sobre plantas e anatomia, datando os mais antigos de cerca de 3000 a.C. [4, 5]. Os egípcios já conheciam, por exemplo, as propriedades curativas das folhas de salgueiro¹, utilizadas para diminuir a inflamação [4]. Diversas foram as contribuições de outras civilizações, nomeadamente a Chinesa, a Árabe, a Grega e a Romana, para o enriquecimento do conhecimento acerca das plantas e suas propriedades. Dioscórides de Anazarbus, um médico grego, é considerado um marco na história da Medicina e da Farmácia. Procurou extensivamente as substâncias medicinais usadas nos diversos territórios do império romano, desde plantas a animais e minerais e, entre 50 a 70 d.C, escreveu a sua obra mais conhecida, *De Materia Medica*, que se tornou fundamental tanto na Europa como no Médio Oriente, por cerca de 600 anos [6]. Avicena, que viveu entre 980 e 1037 d.C, foi o responsável pela redacção de *Shifa* (“O Livro da Cura”) e *Al Qanun fi Tibb* (O Cânone da Medicina). Nestes livros, catalogou e descreveu centenas de plantas que eram usadas com propósitos medicinais na sua época, de uma forma extremamente detalhada [7, 8]. Durante a Idade Média, as plantas foram um importante meio de combate à doença. Relatos datados deste período referem a mandrágora (*Mandragora officinarum*), uma planta que contém atropina e escopolamina nos seus constituintes, como um remédio para o alívio da dor [9]. O meimendo, a cicuta e o ópio eram também utilizados para curar ou anestésiar os doentes [10]. A Farmacologia moderna surge no século XVI com Paracelso (1493-1541), o grande impulsionador dos fármacos de origem química e o responsável pela afirmação de que as propriedades das plantas medicinais advêm dos seus princípios activos e não da totalidade dos seus compostos [1]. No século XIX e XX, o uso de plantas na medicina foi decrescendo em detrimento do aumento do consumo de medicamentos de síntese [1]. As plantas propriamente ditas foram remetidas para um segundo plano, mais tradicional. Contudo, na última década do século XX e no início do século XXI o aumento da procura por remédios de origem vegetal, principalmente no Ocidente, acentuou-se [1].

¹ As folhas de salgueiro contêm ácido salicílico [4]

1.1.2 - A nova relação da sociedade com as plantas medicinais

Actualmente os remédios à base de plantas estão disponíveis em pequenos comércios, supermercados, farmácias, lojas *online* e outros espaços comerciais, sob diversas formas farmacêuticas. A disponibilidade imediata destes produtos, o marketing aplicado e o crescente interesse das populações por produtos naturais traduziu-se num aumento de vendas, entre 1990 e 1997, de 380% [11, 12]. Em 1997 cerca de 12% da população norte-americana afirmava usar um remédio à base de plantas [12]. O Health Canada's Natural Health Products Directorate (NHPD) refere que 71% dos canadianos usa produtos naturais. Em 2005, foram gastos 3,6 mil milhões de dólares nestes produtos, sendo que os mais populares foram os derivados de plantas [13]². A Organização Mundial de Saúde (O.M.S.) indica que a utilização de medicina tradicional pelas populações rondava, em 2002, os 48% na Austrália, 42% nos Estados Unidos da América (E.U.A.), 38% na Bélgica e 75% na França. As receitas do mercado global de fitoterapêuticos neste ano aproximaram-se dos 60 mil milhões de dólares. [14].

O fenómeno de crescimento das vendas dos produtos à base de plantas [15, 16] poderá resultar de algumas preocupações acerca dos efeitos adversos inerentes aos fármacos de síntese química, de questões que se levantam acerca das abordagens que a medicina alopática faz nalgumas situações clínicas, e a um maior acesso das populações à informação sobre saúde. Por outro lado, o aumento da esperança média de vida pode ser outro factor. Com a idade, doenças tais como a diabetes, problemas cardíacos e perturbações psicológicas podem surgir. Alguns utentes utilizam as medicinas alternativas e os remédios à base de plantas, numa tentativa de gerir o aparecimento ou o avanço de doenças, em vez de recorrerem à medicina alopática [14]. Aspectos de natureza estética corporal são factores que também têm contribuído para o aumento da utilização de produtos fitoterapêuticos, nomeadamente os suplementos para emagrecimento [17].

Alguns estudos epidemiológicos já evidenciaram a ligação entre o consumo de derivados das plantas e uma panóplia de benefícios para a saúde [18]. Diversas pesquisas científicas suportam a actividade biológica de muitos destes compostos, e alguns são inclusivamente utilizados em medicamentos hospitalares, tais como o paclitaxel (composto presente na casca do *Taxus brevifolia*) [19-22].

² A definição de produto natural pode diferir entre os países. No Canadá consideram-se as vitaminas e minerais, remédios à base de plantas, medicina homeopática, medicina tradicional Chinesa e Ayurvedic, probióticos, e outros produtos como os aminoácidos e ácidos gordos como naturais. Lembrar que produtos usados diariamente como pastas de dentes, champôs, e outros são considerados produtos naturais se tiverem na sua constituição componentes que os classifiquem como tal [13].

Os farmacêuticos têm-se apercebido do aumento do consumo de fitoterapêuticos, já que, cada vez mais, há utentes a questionarem estes profissionais de saúde acerca dos produtos à base de plantas. Cabe aos farmacêuticos e aos médicos a responsabilidade profissional de esclarecer e aconselhar os utentes que, por vezes, não possuem informação suficiente [15, 23]. Os sítios da internet (*websites*) que vendem produtos naturais, ou derivados, devem também empenhar-se em referenciar as contra-indicações ou efeitos adversos dos tratamentos, factores importantes para uma utilização segura dos produtos [24, 25].

1.2 - Riscos conscientes e inconscientes associados à comercialização de fitoterapêuticos

1.2.1 - Identificação das espécies botânicas

A identificação botânica correcta das plantas é imprescindível [26]. Trocar as espécies vegetais não é invulgar. Por exemplo, o tanaceto (*Tanacetum vulgare*) é regularmente confundido com milefólio (*Achillea millefolium* L.), cujas propriedades farmacológicas são bastante diferentes. O consumo de milefólio irá provocar efeitos indesejados e inesperados para o consumidor [27]. Contudo, há formas de identificar correctamente as plantas recorrendo a farmacopeias, ou a diversos sítios na internet, de consulta fácil e rápida, como o *The Plants Database*, pertencente ao U.S. Department of Agriculture. Assim, actualmente, temos à nossa disposição informação suficiente que nos elucida sobre as características das plantas, minimizando os problemas que advêm da troca destas. Mas existem adulterações nos produtos naturais, não só por troca ou mistura de espécies vegetais, mas também por adição de fármacos ou drogas, facto que pode ter consequências nefastas na saúde das populações.

1.2.2 - Adulteração da matéria vegetal utilizada para fins medicinais

Diversa documentação alerta-nos para a regularidade com que se verificam modificações nos remédios à base de plantas. Entre os adulterantes identificam-se fármacos como a fenilbutazona, fenitoína, corticosteróides e glibenclamida, que provocam efeitos preocupantes nas populações consumidoras. Num artigo de revisão datado de 2002, Ernst relatou que 27% das amostras recolhidas em Taiwan e 7% das recolhidas nos E.U.A. estavam contaminadas com medicamentos [28]. Chen et al [29] analisou 105 suplementos dietéticos à base de plantas, dos quais 35 eram adulterados com 23 fármacos diferentes, tais como glibenclamida, hidrocloreto de sibutramina e sildenafil. Estas adulterações podem provocar graves problemas de saúde à população consumidora, para além de aumentarem o risco de desenvolvimento de interacções farmacológicas.

De forma a garantirem a qualidade dos produtos comercializados, alguns produtores têm considerado o recurso a determinados índices de padronização, tais como concentrações fixas de alguns constituintes. Assim, tentam garantir a confiança de empresas e da comunidade, que conhecem a origem e os processos usados no cultivo, colheita e tratamento dos elementos botânicos [11].

A O.M.S. reconhece que existem problemas relacionados com a segurança das plantas medicinais comercializadas [14]. Esta entidade sublinha as lacunas em aspectos relevantes, nomeadamente na regulamentação de produtos fitoterapêuticos [14].

1.2.3 - Regulamentação de produtos fitoterapêuticos

Em diversos países, a regulamentação dos produtos à base de plantas é ainda confusa. Estes podem ser definidos como alimentos, suplementos alimentares ou medicamentos à base de plantas. A disparidade na regulamentação tem consequências, nomeadamente a nível da qualidade [14, 30]. Alguns governos têm respondido ao crescente uso das medicações que usam, ou se baseiam, em fitoterapia. Enquanto em 1994 apenas 52 países regulavam os fitoterapêuticos, actualmente mais de 100 possuem legislação referente ao assunto [30]. Em Portugal, os produtos à base de plantas podem incluir-se em legislação diferente, segundo as suas características; o Decreto-Lei nº 136/2003 para suplementos alimentares, na alçada do Ministério da Agricultura, e o Decreto-Lei nº 176/2006, que contempla os medicamentos.

A União Europeia tem considerado este *dossier* importante, e é responsável pelo desenvolvimento de várias acções que pretendem colmatar as falhas apresentadas pelo sistema regulatório. Com esta finalidade, apresentou a Directiva 2001/83/EC e, posteriormente, a Directiva 2004/24/EC, transposta para o Decreto-Lei nº 176/2006 [31, 32]. O Action Plan for Herbal Medicines 2010-2011, elaborado pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) traça uma série de objectivos a cumprir, de forma a incutir melhorias no sector da saúde [33].

1.3 - As plantas como agentes moduladores e/ou modificadores de processos fisiológicos e farmacológicos

As plantas são organismos vivos complexos constituídos por diversas estruturas celulares. Representam um arsenal químico e farmacológico vasto, do qual apenas se conhece aproximadamente um terço. São matérias-primas de grande potencial, e uma fonte para novos fármacos, que podem ser fabricados com um custo inferior aos de síntese química [1].

A fitoterapia utiliza as matrizes vegetais que constituem as plantas inteiras, partes destas, tais como as folhas ou as raízes, e ainda produtos resultantes de tratamento directo com solventes, ou outras técnicas. O tratamento com solventes origina os extractos vegetais. Das plantas é obtido um conjunto de compostos químicos, o qual denominamos de fitocomplexo, que englobam não só substâncias activas como também outros elementos que actuam em conjunto e originam um efeito farmacológico específico [1]. Os fitoquímicos biologicamente activos presentes no fitocomplexo são capazes de modular alguns processos fisiológicos do ser humano e contribuir para as propriedades terapêuticas ou tóxicas das plantas [9].

Ao longo dos últimos anos gerou-se a crença de que as plantas são seguras e, pelo menos, tão eficazes como os fármacos de síntese correspondentes, e que têm a vantagem de não possuir os efeitos adversos associados a esses mesmos fármacos [9]. Alguns utilizadores descaram, assim, o potencial nocivo e não informam os médicos ou outros profissionais de saúde acerca do seu uso [9, 34]. Tal facto pode implicar atrasos no diagnóstico correcto de algumas doenças, dificuldades na interpretação de resultados analíticos ou de sintomas, e atrasar o início de tratamentos adequados [34].

1.3.1 - Alterações nocivas provocadas pelas plantas no organismo humano

Diversos problemas derivados do consumo de plantas foram já descritos. Por exemplo, o hipericão (*Hypericum perforatum*), também denominado de pericão, milfurada e erva de S. João, é uma planta existente na Europa, e utilizada em patologias, tal como a depressão [35]. Alergias, problemas gastrointestinais, confusão, sedação, e reacções de fotossensibilidade foram alguns dos efeitos indesejados descritos, relacionados com o hipericão [34]. O sene (*Cassia senna* - sene-de-cartum - ou *Cassia Augustifolia* - sene-da-Índia), subarbusto perene nativo da Arábia e da África Oriental, bastante usado como laxante ou purgante na obstipação ocasional, é uma das plantas mais usadas em automedicação; provoca habituação, destruição dos plexos nervosos intramurais do cólon produzindo um intestino grosso atónico, podendo ainda originar *melanosis coli*³ e condições pré-malignas que conduzam ao aparecimento de

³ Pigmentação pronunciada da membrana mucosa do cólon. Condição benigna.

tumores colo-rectais; a contra-indicação na gravidez deriva da possibilidade de induzir contracções uterinas [36]. A *Ephedra sinica* é utilizada em remédios tradicionais chineses usados como tratamento para diversas patologias tais como a asma, doenças respiratórias superiores e alergias sazonais. Foi uma planta bastante utilizada há cerca de uma década por desportistas e como adjuvante para a perda de peso [37]. O uso em problemas de obesidade deve-se à sua capacidade para suprimir o apetite e aumentar o metabolismo, o que provoca perda de massa corporal [38]. Diversos eventos associados à *ephedra* foram registados e divulgados; entre eles enumeram-se os acidentes vasculares cerebrais isquémicos, problemas cardíacos, aumento da pressão arterial e do débito cardíaco devido, em parte, ao efeito vasoconstritor que alguns constituintes da planta exercem [37, 39]. O *Fucus vesiculosus*, uma alga presente nas costas portuguesas, foi também relacionado com algumas anomalias fisiológicas; os elevados níveis de iodo que a alga possui podem induzir tirotoxicose, principalmente em doentes com problemas associados à tiróide [40].

Apesar de muitos estudos científicos serem realizados anualmente, assiste-se, hoje em dia, ao uso regular da fitoterapia como uma forma complementar de cura na qual o empirismo da terapia ainda se sobrepõe, muitas vezes, à evidência científica [1]. A quantidade e qualidade dos estudos não têm acompanhado o crescimento do uso de medicinas alternativas que usam fitoterapêuticos como adjuvantes nos processos de cura, ou como paliativos [14].

1.3.2 - Interações entre as plantas e os medicamentos

A população consumidora de produtos de origem vegetal é muito heterogénea em idade, género, hábitos de consumo e patologias associadas. Uma das grandes preocupações inerente aos fitoterapêuticos é a possibilidade destes alterarem os perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos de fármacos convencionais. Várias interações entre os fitoterapêuticos e os fármacos podem ser clinicamente importantes, podendo alterar significativamente a sua biodisponibilidade, nomeadamente após administração oral. Alguns registos que evidenciam interações entre fármacos e plantas/extractos datam de 1970, e mostram, a título de exemplo, que o consumo de vegetais crucíferos resulta na diminuição das concentrações plasmáticas de diversos analgésicos, tais como a fenacetina (fármaco pouco usado actualmente, devido aos efeitos adversos provocados) [9]. O sumo de toranja também demonstrou inúmeras interações com fármacos; diminui o metabolismo pré-sistémico através da inibição de isoenzimas do citocromo P450 (CYP), nomeadamente a CYP 3A4 da parede intestinal, e também inibe a glicoproteína-P (gp-P), a *multidrug resistance protein 2* e o *organic anion-transporting polypeptide* (OATP). Os flavonóides e os furanocumarinos são os principais elementos envolvidos nestas interações farmacocinéticas [9, 41]. Os antagonistas dos canais de cálcio, benzodiazepinas, inibidores da hidroximetilglutaril-Coenzima A

reductase e a ciclosporina são dos fármacos mais afectados [42]. Um outro exemplo relevante é a varfarina. Este fármaco liga-se extensamente às proteínas plasmáticas e pode sofrer interacções preocupantes, já que uma ligeira alteração nas concentrações livre e ligada do fármaco a estas proteínas pode afectar drasticamente a resposta do organismo à varfarina e propiciar o aparecimento de hemorragias [9]. A equinácea (*Echinacea purpurea*) reduz as concentrações plasmáticas do enantiómero S da varfarina, mas não afecta a farmacodinâmica, os níveis de agregação plaquetar ou a coagulação [43]. Contudo tem-se discutido a possibilidade do mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.) poder alterar a farmacodinamia deste fármaco, pois demonstrou potencial para aumentar os seus efeitos anticoagulantes [44]. A ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) diminui as concentrações plasmáticas de midazolam [45]. A kava (*Piper methysicum*) aumenta a *clearance* de clorzoxazona (substrato do CYP 2E1). O alho (*Allium sativum*) interage com o ritonavir e a varfarina [46, 47]. O uso concomitante de alguns medicamentos com o hipericão resulta numa diminuição da eficácia destes, devido ao aumento da expressão da isoenzima CYP 3A4 no fígado e no intestino, e da gp-P intestinal. Existem fármacos cujo metabolismo é mais rápido devido ao hipericão, tais como os inibidores da protease indinavir e nevirapina, e os antidepressivos tricíclicos (ex. amitriptilina) [9]. A interacção entre o hipericão e os contraceptivos orais foi estudada por diversos autores. A bibliografia demonstra que a planta afecta de forma diferente os diversos contraceptivos orais existentes. Pfrunder et al [48] não encontrou evidência de ovulação durante o estudo de interacção entre o hipericão e etinilestradiol 0.02 mg/desogestrel 0.150 mg, com duração de 8 meses, mas aconselha prudência ao tomar hipericão com contraceptivos orais. Murphy et al [49] avaliou a interacção entre o hipericão e noretindrona/etinilestradiol; o tratamento foi associado com a redução de 13 a 15% na exposição à dose de contraceptivo, aconselhando, os autores, a ter precaução ao tomar contraceptivos e hipericão. Fogle et al [50] testou uma pílula com etinilestradiol/noretisterona, e concluiu que o hipericão parece não interferir com os contraceptivos orais.

A partir desta descrição de interacções planta-fármaco, pouco representativa em relação à totalidade de casos conhecidos, evidencia-se a importância deste tema. É necessário ter em conta a problemática das interacções durante a prática clínica, de modo a evitar efeitos adversos indesejáveis ou alterações nos perfis sanguíneos dos fármacos, com consequente perda do efeito farmacológico, ou toxicidade.

Alguns estudos acerca deste tema foram realizados a nível hospitalar. Constatou-se que 22% dos doentes avaliados em pré-operatório consumiam remédios à base de plantas, no ano 2000 [51]. Num outro estudo, Kaye et al [52] demonstrou que 32% dos doentes em cirurgia de ambulatório admitiram usar remédios à base de plantas. Os medicamentos como a amiodarona e os anestésicos, que possuem uma margem terapêutica estreita e que são propícios a diversos efeitos adversos, são problemáticos. Muedra et al [53] apresentou um estudo que pretendeu avaliar o conhecimento por parte dos médicos (cirurgiões e anestesistas), acerca do risco pré-operatório para doentes que consomem plantas medicinais.

Foram incluídos *Allium sativum*, *Ephedra sinica*, *Echinacea purpúrea*, *Gingko biloba*, *Panax ginseng*, *Hypericum perforatum*, *Glycyrrhiza glabra* e *Valeriana officinalis*. Globalmente, 78% dos médicos não perguntaram aos doentes se tomavam plantas medicinais; 3% dos médicos conheciam as interações de algumas das plantas mencionadas e 7% sabiam que o uso destas deve ser suspenso antes das cirurgias.

Uma maior sensibilização da população e dos profissionais de saúde acerca da problemática das interações entre plantas e medicamentos é necessária, assim como a continuação dos estudos para as identificar [54]. Vivemos numa sociedade com população polimedicada e com acesso a diversos fitoterapêuticos. Muitas vezes, estes são usados concomitantemente com medicamentos para doenças graves, como o cancro, pelo que a supervisão e aconselhamento dos doentes por parte dos médicos e farmacêuticos deve ser parte integrante dos cuidados de saúde [55].

1.3.3 - Alterações no metabolismo e transporte de fármacos como causa de interações farmacológicas

A biodisponibilidade dos xenobióticos, administrados pela via oral, é influenciada por diversos factores que condicionam as concentrações destes na circulação sistémica e, conseqüentemente, no local de acção. A extensão e velocidade dos processos de absorção, distribuição, eliminação, acumulação nos tecidos ou mediante ligação às proteínas plasmáticas, e as interações com proteínas transportadoras afectam a biodisponibilidade [56]. A permeabilidade da parede intestinal, o metabolismo de primeira passagem, a estrutura molecular, a lipofilicidade e a capacidade de estabelecimento de ligações de hidrogénio são mais alguns destes factores [57, 58]. Quando são administradas formulações sólidas, tais como comprimidos e cápsulas, há que considerar ainda a necessidade de libertação do fármaco da formulação, a dissolução, e a estabilidade deste nos diversos locais do sistema digestivo [57].

Para além dos elementos intrínsecos que modulam a biodisponibilidade dos fármacos, a administração concomitante de alimentos, suplementos alimentares, outros fármacos ou xenobióticos é também responsável. Algumas substâncias consumidas, nomeadamente em sumos de frutas, mostraram inibir processos bioquímicos no intestino, alterando a farmacocinética e, potencialmente, a farmacodinâmica de fármacos, mas nem todos os resultados de testes realizados *in vitro* se traduziram totalmente nos ensaios *in vivo* [59].

As enzimas possuem um papel bastante relevante nos processos metabólicos. As mais conhecidas são, talvez, as pertencentes ao CYP, com maior expressão no fígado, o órgão responsável por cerca de 75% do metabolismo dos fármacos [57, 60, 61]. Existem 57 genes e mais de 59 pseudogenes, divididos em 18 famílias de genes CYP, sendo os principais o CYP 1,

CYP 2 e CYP 3 [60, 61]. As enzimas localizadas na mucosa do intestino podem também afectar significativamente a quantidade de fármaco absorvido para a circulação sistémica [56].

Sabe-se que os compostos químicos, naturais ou sintéticos, modulam a expressão hepática e extra-hepática⁴ de enzimas do CYP [9]. A inibição ou indução da actividade das enzimas do CYP pode originar um aumento ou diminuição das concentrações plasmáticas de alguns compostos, levando à ocorrência de efeitos indesejados por parte destes, e a reacções adversas. Na inibição normalmente estão envolvidos processos competitivos, em que outros elementos se ligam ao local activo das enzimas metabolizadoras do composto de interesse. Como consequência, há diminuição do metabolismo deste último, resultando em concentrações plasmáticas mais elevadas, comparativamente à situação em que a interacção não ocorre. Geralmente a inibição competitiva é dependente da dose e inicia-se num intervalo de até 24 horas após a ingestão do composto inibidor. Quando o inibidor deixa de estar presente no organismo, a inibição cessa [62]. A indução das enzimas do CYP poderá alterar a eficácia de uma parte dos fármacos (no caso dos pro-fármacos, poderá aumentar a fracção farmacologicamente activa do medicamento administrado) [9]. Os chás verde e preto aumentam a expressão de enzimas do CYP devido ao conteúdo em cafeína⁵ que possuem [9, 63]. Neste caso, os efeitos podem não ocorrer nas primeiras horas ou dias, sendo frequentemente necessário que haja uma administração continuada de um determinado xenobiótico indutor (desde alguns dias até várias semanas). Isto deve-se à necessidade de, em várias situações, o organismo sintetizar novas enzimas. Consideramos, assim, este processo como dependente do tempo e, eventualmente, da dose. A importância da indução reflecte-se, principalmente, no facto de poder diminuir as concentrações plasmáticas do composto de interesse, até ao ponto de não se registar eficácia clínica [62].

Alterações farmacocinéticas relevantes decorrem, frequentemente, da interacção entre fármacos de margem terapêutica estreita, como a amiodarona, em que participe como interactuante um inibidor ou indutor da via metabólica principal desse mesmo fármaco [62].

Contudo, nem todas as moléculas são substratos, ou possuem potencial para alterar as enzimas do CYP. Ser um substrato para determinadas enzimas apenas aumenta a probabilidade de haver um metabolismo maior. Mas este facto não é sempre problemático [57, 64].

Para além dos sistemas enzimáticos, as proteínas transportadoras também apresentam um papel importante na farmacocinética e biodisponibilidade dos fármacos.

Os transportadores de influxo medeiam diversos processos de absorção. Por exemplo, o OATP1B1 é expresso nas membranas sinusoidais dos hepatócitos e medeia a captação hepática de diversos compostos endógenos e xenobióticos. Há fármacos inibidores deste polipéptido, tais como a ciclosporina, o que poderá alterar os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de outros fármacos ou suplementos administrados pelos doentes [65].

⁴ Apesar de a expressão de enzimas do CYP ser muito maior no fígado, estas também existem em grande parte do organismo, nomeadamente nos pulmões, epitélio nasal e tracto gastrointestinal [9].

⁵ A cafeína induz as enzimas do CYP 1A2 [64].

A gp-P é uma glicoproteína fosforilada pertencente à superfamília dos transportadores membranares de efluxo Adenosina Trifosfato (ATP)-*binding cassette*. É a proteína transportadora de efluxo mais estudada cientificamente [57, 66]. É codificada pelo gene *Multi Drug Resistance-1* e detém um peso molecular de 170 kDa [66]. Esta proteína é responsável pela disposição sistémica de diversos fármacos estruturalmente e farmacologicamente diferentes, carcinogéneos, toxinas e outros xenobióticos, e está presente em diversos órgãos tais como o intestino, o fígado, os rins e o cérebro [66]. Tal como as diversas enzimas do CYP, a gp-P é vulnerável a processos de activação, indução ou inibição. A curcumina, os ginsenosídeos, a piperina, algumas catequinas do chá verde, e a silimarina do cardo de leite são inibidores da gp-P. Muitos dos constituintes vegetais, tais como os flavonóides, interagem directamente com o local de ligação do ATP, o local de ligação a esteróides, ou o local de ligação do substrato. A capacidade de alguns compostos para modelar a actividade da gp-P resulta na alteração da farmacocinética e, consequentemente, da biodisponibilidade dos fármacos que são substratos desta glicoproteína. A biodisponibilidade de fármacos como a fenitoína e a rifampicina é aumentada pela piperina [66]. A capsantina e a capsorubina, que são carotenóides isolados da paprica, já foram identificadas como potentes inibidores da gp-P. O licopeno, a luteína, a anteraxantina e a violaxantina são inibidores moderados [67]. Hellum et al [68] testou, *in vitro*, o potencial da *Rhodiola rosea* para inibir tanto a CYP 3A4 como a gp-P, e constatou que esta planta é um potente inibidor, tal como o hipericão. A determinação da actividade destas proteínas transportadoras para alguns substratos de interesse clínico e científico tem, deste modo, uma grande importância [69]. Assim, a gp-P é uma barreira fisiológica que impede ou diminui a entrada de algumas substâncias tóxicas e de xenobióticos no organismo, ou nas células. A gp-P poderá, também, ser importante na regulação da absorção gastrointestinal [57].

Pensa-se que poderá haver uma relação entre a gp-P e as enzimas do CYP. Darwich et al [57] afirma que uma alta afinidade para a gp-P aumentará a exposição do fármaco ao CYP 3A através de ciclos repetidos de difusão passiva e efluxo, diminuindo a fracção de fármaco que escapa ao metabolismo de primeira passagem. A presença da gp-P na parede intestinal e a alta afinidade de alguns substratos do CYP 3A para este transportador reduz o potencial de saturação das enzimas e aumenta o metabolismo de primeira passagem dos compostos, que doutra forma, saturariam as enzimas do CYP 3A.

As alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas provocadas por interacções planta-fármaco ou fármaco-fármaco podem, assim, alterar os perfis de segurança e eficácia dos intervenientes, ou dos seus metabolitos activos. Este problema é mais grave quando estão envolvidos fármacos de margem terapêutica estreita, como a amiodarona. Assim, o conhecimento dos fármacos metabolizados pelo CYP, ou que sofrem alterações farmacocinéticas mediadas pelas proteínas de efluxo, influxo ou outras, e o conhecimento dos potenciais de interacção, podem ajudar a minimizar a possibilidade de reacções adversas e interacções indesejadas [58, 70].

Tal como diversas plantas alteram a actividade das enzimas do CYP, e da gp-P, também o *Fucus vesiculosus* poderá ser responsável por modificações relevantes, com consequências farmacotológicas. Parys et al [71] já registaram inibição do CYP 1A pelos trifucodifloretol A e trifucotrifloretol A, compostos extraídos de *Fucus vesiculosus*.

1.3.4 - Outros mecanismos envolvidos nas interacções entre plantas e fármacos

Apesar de muitas plantas induzirem interacções farmacológicas através da modulação da actividade enzimática e de proteínas transportadoras, outros mecanismos poderão também ser responsáveis. Colalto et al [72] refere, num artigo de revisão, diversos mecanismos de interacção entre plantas e fármacos, tal como as consequências que daí advêm. Nesta subsecção abordar-se-ão 3 situações que poderão influenciar os perfis farmacocinéticos e a farmacodinamia de alguns medicamentos de margem terapêutica estreita.

Os medicamentos são administrados, diversas vezes, concomitantemente com os alimentos. Esta acção pode influenciar os processos absorptivos, contribuindo para o aumento, diminuição ou atraso na absorção dos fármacos. O maior volume sanguíneo esplâncnico tende a aumentar a absorção, que no intestino depende da corrente sanguínea no local onde ocorre essa mesma absorção. O decréscimo na absorção mediado pelos alimentos também pode acontecer devido a mecanismos subjacentes, tais como o aumento do peritaltismo ou alterações na circulação entero-hepática. Para além destas hipóteses, os alimentos também podem funcionar como barreiras físicas que impedem o fármaco de interagir com a superfície absorptiva da mucosa intestinal [73].

Alguns alimentos e suplementos podem alterar a absorção de fármacos através de componentes específicos pertencentes à sua constituição físico-química, tais como as fibras dietéticas. As fibras são comumente utilizadas como reguladores do trânsito intestinal. Para além desta conhecida utilização, também reduzem a glicémia pós-prandial e a hipercolesterolemia [72, 73]. Contudo, também podem estar na origem de diversas interacções farmacológicas, tais como a diminuição do efeito terapêutico da lovastatina, da digoxina e da fenoximetilpenicilina [72]. Vários casos associados à interacção de fibras com medicamentos estão descritos, e provocam alterações nos perfis cinéticos dos fármacos, que se repercutem em respostas atenuadas ou exageradas aos medicamentos, nos indivíduos em que ocorre a interacção [73]. O *Fucus vesiculosus* é uma alga castanha rica em polissacáridos não digeríveis pelas enzimas gastrointestinais. O conteúdo em fibras do *Fucus vesiculosus* é superior ao de muitos produtos considerados ricos em fibras dietéticas, tais como a maçã e o farelo de trigo [74]. O gráfico abaixo permite comparar a percentagem de fibras do *Fucus vesiculosus* em relação a alimentos conhecidos pelo seu elevado teor nestes compostos.

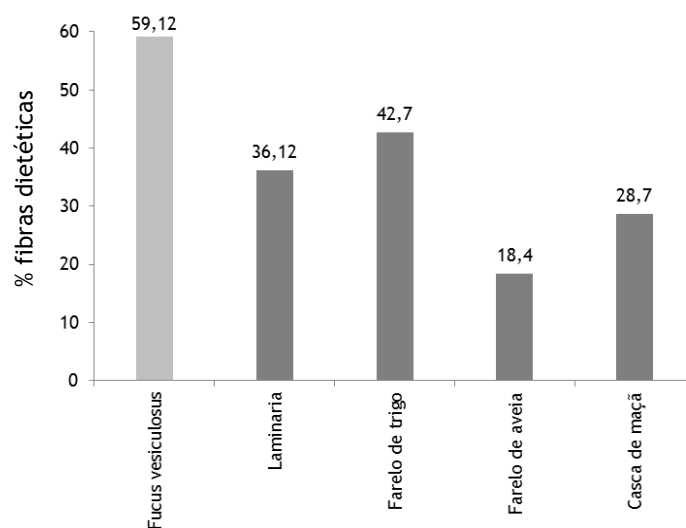


Figura 1: Representação gráfica da percentagem total de fibras contidas em alguns produtos utilizados na alimentação ocidental. Adaptado de [74].

Outros mecanismos envolvidos em interacções entre plantas e fármacos poderão estar relacionados com polimorfismos genéticos. A farmacogenética pode, num futuro próximo, ajudar a elucidar as razões da variabilidade interindividual observada e a explicar algumas interacções farmacológicas.

1.4 - Estratégias aplicadas na detecção de interacções farmacológicas: ensaios *in vitro* versus *in vivo*

Ao longo dos anos, vários métodos têm sido desenvolvidos com a finalidade de prever interacções farmacológicas e alterações farmacocinéticas, principalmente com vista à avaliação de interacções fármaco-fármaco [75].

Os ensaios *in vitro* tornaram-se muito importantes neste âmbito. Sendo bem executados, têm utilidade como ferramenta de *screening* e permitem avaliar a necessidade de executar testes *in vivo*, potencialmente mais robustos e geralmente com maior poder de extrapolação [75]. São usados comumente no estudo dos efeitos de diversos compostos sobre as enzimas do CYP, e da gp-P, entre outras enzimas e/ou transportadores [75]. Contudo, apesar dos avanços feitos nesta área de investigação, nomeadamente na melhor compreensão da relação entre as interacções *in vitro* e *in vivo*, e a capacidade para prever as segundas a partir das primeiras, interacções farmacológicas inesperadas ainda ocorrem. Isto deve-se a várias variáveis que, diversas vezes, não são conhecidas ou não podem ser controladas *in vitro*. Entre estas encontram-se as interacções farmacodinâmicas ou farmacocinéticas envolvidas em mecanismos desconhecidos, tais como vias metabólicas pouco comuns. Outros casos são devidos à multiplicidade de enzimas e transportadores envolvidos na disposição do fármaco ou outro xenobiótico [75]. O estudo farmacocinético de misturas complexas administradas por via oral é um problema associado aos ensaios *in vitro*. Após a ingestão, nem todos os componentes se mantêm estáveis, ou vão ser absorvidos do lúmen do tracto gastrointestinal para a corrente sanguínea; o tamanho das moléculas, o grau de ionização e outros factores relevantes vão influenciar a absorção. Assim, apenas uma parte do total ingerido irá realmente atingir o sangue. Ao alcançarem a corrente sanguínea, as moléculas sofrem, ainda, inúmeras alterações. Alguns elementos são eliminados com grande eficácia pelo fígado, através do metabolismo pré-sistémico, ou por outros órgãos, tendo como consequência uma diminuição acentuada da concentração destes compostos na corrente sanguínea; a biodisponibilidade é, deste modo, reduzida [56].

Actualmente ainda não estão disponíveis sistemas *in vitro* com capacidade para mimetizar a totalidade da cadeia de processos que ocorrem no organismo, após a ingestão ou injeção de fármacos ou fitoquímicos no corpo. Para além deste facto, os ensaios *in vitro* são normalmente direccionados para processos específicos, usando células ou membranas que são responsáveis por uma pequena parte de todo o processo farmacocinético. Assim, quando a investigação pretende incidir sobre a generalidade dos processos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos do organismo, é necessário usar sistemas vivos [76, 77]. Seguem-se 2 exemplos que permitem verificar a importância dos ensaios *in vivo* em detrimento dos *in vitro*. Fuksa et al [78] estudou a interacção de metotrexato co-administrado com amiodarona, num estudo *in vivo*. Tal permitiu ao autor recolher diversos dados farmacocinéticos impossíveis de obter através de condições *in vitro*, e concluir que a amiodarona influencia a

clearance de metotrexato, diminuindo-a 27%, e aumenta as concentrações plasmáticas deste. Um outro caso bastante conhecido acerca da importância da realização de estudos *in vivo* foi a constatação de que o hipericão era um potente indutor de enzimas do CYP, enquanto estudos *in vitro* tinham demonstrado que esta planta era um inibidor [77]. A falta de modelos *in vitro* que mimetizem o ambiente fisiológico é um dos factos que limita a capacidade de previsão, principalmente quando vários fármacos ou suplementos alimentares são administrados concomitantemente [75]. Outros problemas associados com os modelos *in vitro* são a frequente incapacidade de definir a concentração do composto de interesse no local a estudar, a dificuldade de caracterizar os metabolitos dos fitoquímicos e a variabilidade existente entre produtos naturais devido à falta de padronização e, também, por causa dos perfis fitoquímicos complexos [77].

Os modelos *in vivo* mimetizam de forma mais fidedigna os processos fisiológicos e a resposta farmacológica do ser humano. Para isso usam-se frequentemente modelos animais tais como os ratos, os murganhos, os hamsters, entre outros [76, 79]. Um dos grandes objectivos dos ensaios *in vivo* é garantir que a avaliação farmacocinética pré-clínica é fiável e que pode ser extrapolável ao ser humano. Para além disso, permitem economizar tempo e recursos que poderão ser aplicados noutras fases de investigação. Após a realização de ensaios com um número reduzido de animais, e da confirmação de que há alterações farmacocinéticas, poder-se-á estudá-las aprofundadamente através de ensaios *in vitro* direccionados para hipóteses específicas. Estudos de indução ou inibição enzimáticas, e de ligação a proteínas plasmáticas são alguns dos exemplos possíveis [80].

Apesar dos métodos *in vitro* serem bastante usados para prever interacções entre produtos à base de plantas e fármacos, poucas foram as interacções farmacológicas relevantes identificadas. Muita da pesquisa efectuada conduziu a ensaios clínicos que não mostraram correlação com os resultados *in vitro*, provavelmente devido às discrepâncias entre estes dois métodos [77]. Segundo Markowitz et al [77], é necessário avaliar cuidadosamente as vantagens de usar ensaios *in vitro* para rastrear compostos fitoquímicos e olhar de forma crítica para os resultados que daí advêm, devido às muitas limitações presentes.

1.5 - *Fucus vesiculosus*

O género *Fucus* evoluiu a partir de um ancestral que terá habitado a Terra entre 5,5 e 5,3 milhões de anos atrás. Durante a última era glacial, o gelo existente no oceano, desde o Polo Norte até ao actual Reino Unido (Europa), obrigou esta e outras espécies a deslocarem os seus *habitats* para sul, até à Península Ibérica, onde as camadas de gelo eram escassas ou inexistentes [81]. Neste processo, sofreram diversas alterações na constituição genética, dando origem a espécies distintas. O *Fucus vesiculosus* pertence à 2ª linhagem, de 2 reconhecidas no género *Fucus* (a primeira que compreende o *Fucus serratus* e o *Fucus distichus sensu lato*, e a segunda que integra o *Fucus vesiculosus*, *Fucus spiralis*, *Fucus radicans*, *Fucus ceranoides* e *Fucus virsoides*) [82]. É uma alga dióica⁶ que foi colonizando sequencialmente vários territórios, e que se disseminou por todo o Oceano Atlântico. Nesta massa aquática, o *Fucus vesiculosus* habita as zonas rochosas das costas marítimas, desde a Noruega até Marrocos [82]. Também se encontra no Mar Báltico e no Mar Branco [82]. Bastante presente nas costas europeias, tem a sua distribuição geográfica limitada por interacções fisiológicas e biológicas, devido à competitividade das várias espécies que interactivam nas zonas rochosas, substrato natural desta alga. Em Portugal, esta distribuição parece ser apenas afectada pela existência, ou não, dessas mesmas zonas rochosas [82]. Na América do Norte, a alga está difundida desde o norte do Canadá até à Carolina do Norte (E.U.A). O crescimento depende de factores como o substrato, a exposição ao gelo e às ondas, salinidade, correntes marítimas e disponibilidade de luz solar [74].

O *Fucus vesiculosus* é conhecido popularmente por uma infinidade de nomes, tais como sargaço-vesiculoso, alga-vesiculosa, bodelha, botelho, carvalhinho do mar, carvalho-marinho e fucus [84, 85]. Alface do Mar, cavalo marinho, cavalinho do mar, alga vesiculosa, lechuga de mar são outras denominações [86]. Podemos encontrar publicações estrangeiras através dos nomes *bladderwrack*, *seawrack*, *kelpware*, *bladder fucus* e *cutweed* [87, 88].

Na constituição desta alga estão presentes polissacarídeos mucilaginosos, tais como o ácido algínico, a laminarina e a fucoídina (60% do total destes polissacarídeos), polifenóis, manitol, glucosíldiacilglicerídeos, vitaminas e pró-vitaminas A e D, e sais minerais dos quais se destacam o potássio, o bromo, o cloro, o magnésio, o fósforo, o cálcio, o ferro e quantidades significativas de iodo [86]. Os polifenóis constituem cerca de 15% da alga e, destes, 25% são polímeros de alto peso molecular. Os florotaninos, oligómeros e polímeros de floglicinol (1,3-trihidroxibenzeno), são o maior grupo polifenólico encontrado no *Fucus vesiculosus*, e vários têm toxicidade comprovada. São usados pela alga como um meio

⁶ Numa espécie dióica os gâmetas femininos e os gâmetas masculinos são produzidos por indivíduos distintos [83].

defensivo contra predadores naturais [82, 89]; para além deste facto, protegem a alga da radiação ultravioleta (UV) e de organismos patogénicos [71].

O uso de algas marinhas é particularmente acentuado em muitos países asiáticos, como por exemplo o Japão. Contudo, nos últimos anos, o interesse ocidental em derivados de algas tem aumentado, tanto na indústria alimentar, como na indústria farmacêutica.

Várias propriedades inerentes ao *Fucus vesiculosus*, com aplicações em diversas áreas de negócio, têm sido descobertas nos últimos anos: os polissacáridos presentes nesta alga apresentam adesividade elevada; os efeitos de adsorção destes polissacáridos nas membranas mucosas humanas podem contribuir para o efeito terapêutico no tratamento de membranas bucais irritadas [90]. O fucoidano, polissacárido sulfatado presente no *Fucus vesiculosus*, com uma estrutura formada por unidades de L-fucopiranosose interligadas com ligações glicosídicas, mostrou promover a contracção dos geles de colagénio; em experiências feitas por Fujimura et al [91, 92] foram investigados os efeitos da aplicação tópica de um extracto aquoso de *Fucus vesiculosus* na espessura e na modificação das propriedades mecânicas da pele humana. Verificaram-se melhorias significativas na elasticidade, indicando que esta alga poderá, possivelmente, ter aplicação em cosmética, em produtos *anti-aging*.

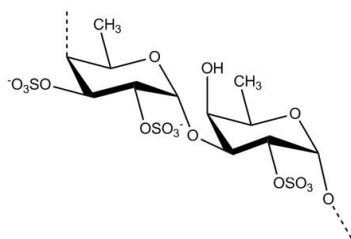


Figura 2: Estrutura química do fucoidano, presente no *Fucus vesiculosus*.

Alguns mucopolissacáridos extraídos de *Fucus vesiculosus* também mostraram aglutinar células de *Candida guilliermondii*; efeitos tóxicos foram registados em estirpes de *Escherichia coli* e *Neisseria meningitidis* [93].

A espécie *Fucus* demonstrou ser um bom biomarcador de contaminação ambiental através da família de enzimas glutationa-S-transferase; este é um mecanismo de destoxificação por catalisar a conjugação de vários xenobióticos com a glutationa. Através destas algas, é possível discriminar áreas com diferentes níveis de poluição [82].

Alguns estudos *in vivo* foram já realizados. Em 24 ratos fêmea adultos, comprovou-se o efeito do *Fucus vesiculosus* na modulação de hormonas endócrinas. A administração durante 4 semanas reduziu os níveis de 17-β-estradiol em 18-33%, e impediu que o estradiol se ligasse aos receptores de estrogénios (RE) α e β; o *Fucus vesiculosus* pode agir como um antagonista do estradiol ao diminuir a afinidade dos RE α e RE β para os seus ligandos. A administração da alga, numa dose de 350 mg/kg/dia, resultou no aumento do ciclo estrogénico do rato em 37% [89]. De forma a avaliar qual o efeito do *Fucus vesiculosus* na duração do ciclo menstrual e sob o estado hormonal, Skibola [89] conduziu um estudo em mulheres, em fase de pré-

menopausa. Apesar dos sujeitos em estudo serem em número reduzido, verificou-se um prolongamento do ciclo menstrual e um efeito anti-estrogénico nas mulheres. Também já foi provado o efeito do *Fucus vesiculosus* sobre o metabolismo do colesterol, reduzindo significativamente os níveis deste, devido às fibras que a alga contém [89, 94, 95]. A actividade anti-viral, nomeadamente contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1, também já foi descrita [96, 97]. Estas informações comprovam que compostos presentes no *Fucus vesiculosus* poderão ter aplicação em diversas situações clínicas e virem a ser bastante mais usados num futuro próximo [89]. A nível popular, o *Fucus vesiculosus* é aclamado como eficaz em processos de emagrecimento, como laxante e no tratamento de hipotiroidismo [86, 98, 99]. O seu uso na perda de peso deriva, em boa parte, do conteúdo em iodo [100], mas também do teor em fibras.

As fibras dietéticas presentes nesta alga são constituídas por fucanos, alginatos, laminaranos e celulose. Podem ser divididas em solúveis (10% massa seca) e insolúveis (49% massa seca), perfazendo cerca de 59% do total do *Fucus vesiculosus* pulverizado [74]. Os polissacáridos presentes não sofrem acção enzimática no sistema gastrointestinal, sendo bons agentes dietéticos [74].

1.6 - Amiodarona

A amiodarona é um fármaco antiarrítmico de classe III aplicado principalmente no tratamento de arritmias ventriculares e supraventriculares, tal como na prevenção da fibrilação auricular. Foi descoberta em 1962, na Bélgica, tendo sido desenvolvida originalmente como um agente anti-anginoso. O seu uso difundiu-se na Europa, e só em 1985 foi introduzida no mercado norte-americano. Nas páginas seguintes abordar-se-ão temas essenciais relacionados com este fármaco. Actualmente, a amiodarona é um dos fármacos mais usados para o controlo de arritmias cardíacas [101].

1.6.1 - Caracterização química

A amiodarona ($C_{25}H_{29}I_2NO_3$), denominada 2-*n*-butil-3-(3,5 diiodo-4-dietilaminoetoxi-benzoil)-benzofurano [102, 103] pela IUPAC é um fármaco de síntese química, derivado dos benzofuranos⁷, que possui um peso molecular de 645,3116 g/mol [104]. A amiodarona é um análogo estrutural das hormonas da tiróide, e é composta por uma parte benzofurano com um grupo lateral butil (A), uma parte diiodobenzoil altamente lipofílica (B), e pela parte dietilamino- β -etoxi (C) (figura 2). Na sua estrutura estão presentes 2 átomos de iodo, ligados ao mesmo anel benzénico, os quais compreendem 37% do peso total da molécula [104]. A lipofilicidade que caracteriza a molécula de amiodarona é preponderante para os seus efeitos toxicológicos e farmacológicos.

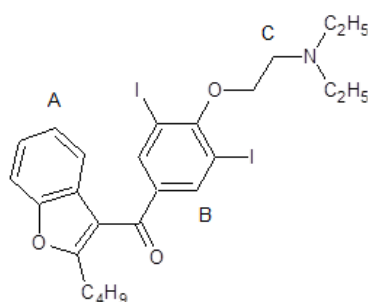


Figura 3: Estrutura química representando a amiodarona.

⁷ O benzofurano é um composto heterocíclico onde os anéis benzeno e furano estão fundidos. Na molécula de amiodarona apresentada na figura 3, evidencia-se o benzofurano na parte esquerda da molécula.

1.6.2 - Caracterização farmacocinética

Apesar da eficácia reconhecida e do uso disseminado da amiodarona, este fármaco apresenta alguns problemas relacionados com a farmacocinética peculiar que o caracteriza. A absorção de amiodarona demonstrou ser muito variável e lenta, se administrada por via oral, oscilando entre 20% a 80%, e sendo afectada pelos alimentos [105, 106]. As concentrações plasmáticas de amiodarona devem situar-se dentro de um pequeno intervalo (1 a 2,5 µg/mL) [107].

O modelo tricompartmental é o que melhor exemplifica a cinética da amiodarona, apesar de alguns autores terem afirmado que o modelo bicompartimental também demonstra resultados satisfatórios [101, 108, 109].

Após a administração, os níveis plasmáticos de amiodarona aumentam rapidamente. No entanto, após a fase de distribuição inicial, é no compartimento periférico profundo (tecido adiposo, pulmões e nódulos linfáticos) que se registam as maiores concentrações do fármaco e do metabolito principal, a mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) [106, 110]; enquanto o compartimento periférico superficial (cérebro, músculos e tiróide) apresenta concentrações mais reduzidas. Os tecidos que acumulam mais amiodarona são o fígado, músculo esquelético, pulmões, pâncreas, tecido adiposo, glândula tiróide, rins, coração, pele, glândulas adrenais, testículos e nódulos linfáticos [105].

A amiodarona liga-se extensamente às proteínas plasmáticas albumina (predominante) e lipoproteína-B [110].

Após atingir a corrente sanguínea, o fármaco sofre metabolismo de primeira passagem, no fígado, originando os diversos metabolitos. O principal é a MDEA, formada através de um mecanismo de desalquilação do grupo dietilaminoetoxi mediado pelo CYP, nomeadamente os CYP 3A4 e CYP 2C8, no humano [104]. Outros dos passos envolvidos no metabolismo da amiodarona englobam *N*-desalquilações, desidodações, *O*-desalquilações, hidroxilações e desaminações [110]. A clearance biliar de amiodarona poderá estar relacionada com a glucoronidação da molécula [110]. Deng et al [111], identificou 33 metabolitos na biliar humana, sendo que os presentes em maior percentagem foram a MDEA e a amiodarona- ω -carboxilada (4'-carboxilamiodarona).

A MDEA é um metabolito activo farmacologicamente, possuindo propriedades antiarrítmicas. Pode ser posteriormente hidroxilada (3'-OH-mono-*N*-desetilamiodarona ou *n*-3'-hidroxibutil-*N*-desetilamiodarona) e *N*-desalquilada (di-*N*-desetilamiodarona (DDEA)). [105, 112]. Os metabolitos MDEA, DDEA e amiodarona-*O*-Etanol (Amiodarona-*O*-EtOH) (derivada da desaminação da amiodarona) são formados *in vivo* através de modificações sequenciais no grupo dietilaminoetoxi, que lhes conferem menor lipofilicidade em relação à amiodarona, mas ainda não se compreendeu totalmente a relevância da acção destes compostos nas células [105].

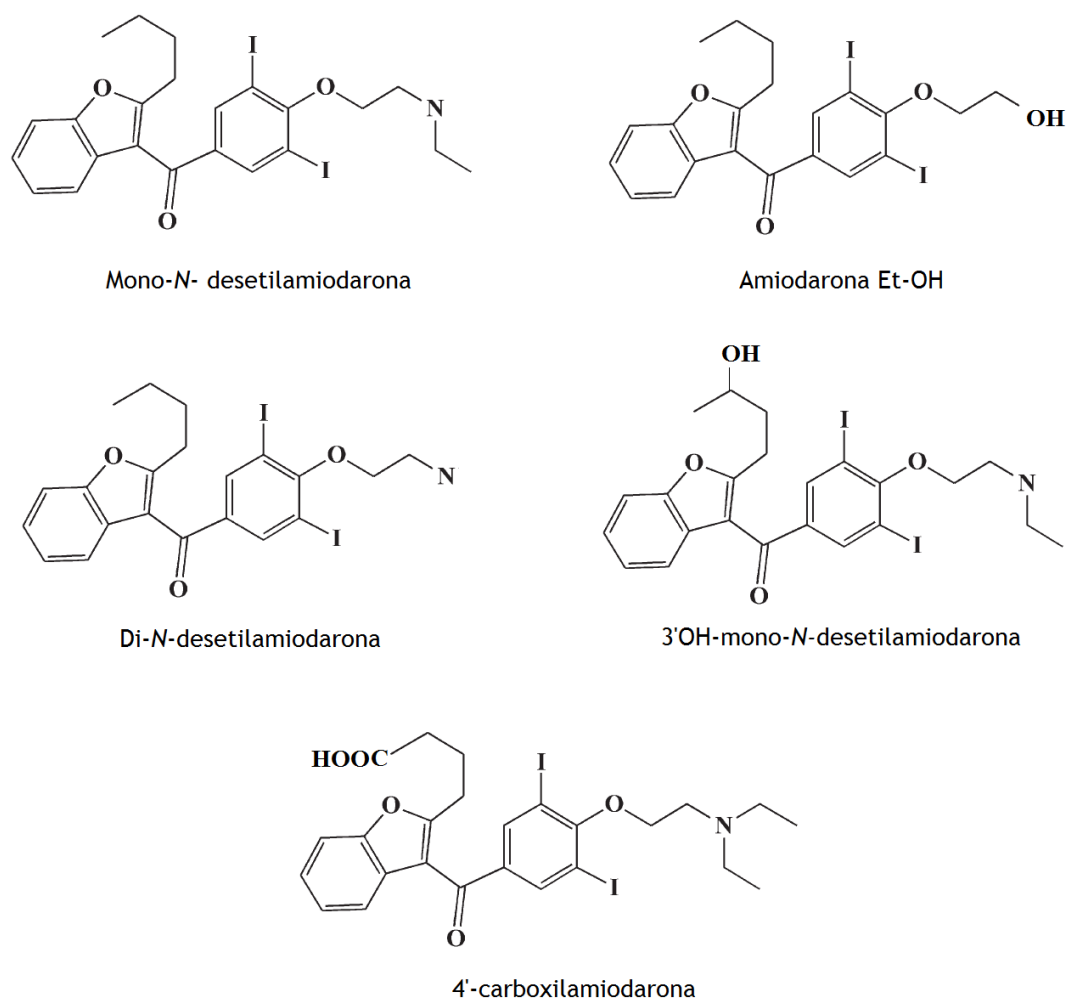


Figura 4: Estruturas químicas representando alguns metabolitos da amiodarona. Adaptado de [111, 112].

Como o fígado é o principal órgão de metabolismo da amiodarona, através das enzimas do CYP, é necessário ter cuidados redobrados ao administrar este fármaco a indivíduos com insuficiência hepática, ou até mesmo evitá-lo. Isto deve-se ao facto de as concentrações hepáticas de amiodarona poderem permanecer muito elevadas, em relação ao expectável clinicamente, e à possibilidade de danificar o órgão [104]. O fígado pode sofrer graves danos, pois tem tendência a acumular amiodarona até 500 vezes a concentração sérica do fármaco [113].

A eliminação terminal da amiodarona, a partir do compartimento periférico, é muito lenta e ocorre numa relação linear entre a quantidade administrada e os níveis plasmáticos em *steady state*, quando são administradas doses múltiplas. Com a diminuição das concentrações de amiodarona no soro, devido à cessação das administrações de fármaco ou à redução das doses, a amiodarona acumulada nos tecidos regressa parcialmente ao plasma, resultando deste mecanismo um tempo de semi-vida de eliminação ($t_{1/2}$) muito elevado [105].

A eliminação completa do fármaco requer um período superior a 50 dias, após administrações múltiplas [109]. Shiga et al [114] registou um $t_{1/2}$ de 14 dias, para doses únicas

de fármaco. Num outro estudo, com 107 doentes que apresentaram diversas arritmias, e com 7 indivíduos saudáveis, foram registados parâmetros farmacocinéticos referentes à amiodarona, usando como método de quantificação a técnica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Após uma dose única de 400 mg por via intravenosa (I.V.) verificou-se que o $t_{1/2}$ do fármaco foi de 34,5 horas; a biodisponibilidade oral do fármaco foi de $31 \pm 26\%$, em parte devido ao efeito de primeira passagem. Em dose única, o metabolito principal da amiodarona, MDEA, foi registado em muito baixas concentrações, tanto para a dose oral como para a I.V.; contudo, o consumo regular de amiodarona aumentou as concentrações plasmáticas de MDEA até se atingir o *steady state* [115]. Pollak et al [109] registou uma meia vida de distribuição de 17 horas. Seguidamente apresenta-se uma tabela com os principais parâmetros farmacocinéticos relativos à amiodarona, no Homem e no rato.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos da amiodarona, no Homem e no rato.

Parâmetro	Homem	Ref.	Rato	Ref.
Biodisponibilidade	50,4-87,8% 20-80%	[116] [105]	17-60%	[117]
C_{max} (após dose oral)				
50 mg/kg			0,723 µg/mL	[118]
7 mg/kg	0,37±0,22 µg/mL	[115]	-	
t_{max} (após dose oral)				
50 mg/kg			5,93 h	[118]
10 mg/kg	3,25±0,46 h	[116]	-	
7 mg/kg	4,8±1,5 h	[115]		
Ligação às proteínas plasmáticas	96-99%	[110]	-	
$t_{1/2}$				
50 mg/kg oral			32,2 h	[118]
10 mg/kg oral	7,53±0,96 h	[116]	-	
V_D <i>steady state</i>	4836±3290 L 5152±1652 L	[104] [114]	- -	
Clearance	4,25±0,73 mL/kg/min	[116]	-	

C_{max} - Concentração máxima; t_{max} - Tempo ao qual a C_{max} ocorreu; $t_{1/2}$ - Tempo de meia vida de eliminação plasmática; V_D *steady state* - Volume aparente de distribuição em *steady state*; Ref. - Referências bibliográficas; h - hora(s)

Um outro efeito da amiodarona no corpo humano é a inibição da gp-P, o que implica alterações da absorção de outras substâncias necessárias ao organismo, ou de fármacos que sejam substratos para esta proteína transportadora, tais como a digoxina. Também é um potente inibidor do CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2D6 e CYP 3A4 [119].

1.6.2.1 Comparação de alguns parâmetros farmacocinéticos, entre o Homem e o rato.

Os perfis farmacocinéticos nos humanos e nos ratos são idênticos em vários aspectos. O metabolito principal nas duas espécies é a MDEA. O rato possui uma capacidade de extracção hepática superior, e metaboliza a amiodarona a MDEA através da CYP 3A1, CYP 3A2, CYP 1A1, CYP 2C11 e CYP 2D1. Nos humanos a CYP 3A4, CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2D6 e CYP 2C8 são as vias mais importantes [104, 120].

Shayeganpour et al [121] sugere que a amiodarona possa sofrer um metabolismo de primeira passagem a MDEA, de forma acentuada, no rato. Esta suposição deve-se aos valores registados pelos autores, os quais indicam que uma dose oral de amiodarona produziu 4,5 vezes mais MDEA que a administração I.V. do mesmo fármaco. A fracção de amiodarona convertida a MDEA, no rato, após uma injeção I.V. do fármaco, é de cerca de 14%. O volume de distribuição aparente (V_D) e o $t_{1/2}$ não diferem significativamente entre o rato e o ser humano. A clearance de MDEA é 50% mais elevada no rato [121].

A amiodarona é excretada maioritariamente pela via biliar, tanto no humano como no rato, encontrando-se apenas vestígios na urina (<1%), facto que ocorre também com a MDEA [122].

1.6.3 - Acção e efeitos farmacológicos

A amiodarona possui uma panóplia de efeitos farmacologicamente relevantes. Actua nos canais de sódio, bloqueando-os, nos receptores adrenérgicos α e β através de inibição não competitiva, e nos canais de cálcio, diminuindo a velocidade de condução dos impulsos eléctricos. [101]. Prolonga o período refractário em todos os tecidos cardíacos, bloqueia os canais de sódio, e prolonga a repolarização levando ao bloqueio dos canais de potássio miocárdicos, diminuindo a condução eléctrica. Assim, a amiodarona consegue anular as arritmias cardíacas, e prolongar a duração dos potenciais de acção [123].

O INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., refere no *Prontuário Terapêutico online*, publicação deste organismo, várias indicações para a amiodarona, tais como fibrilação e *flutter* auriculares; taquicardia supraventricular; síndrome de Wolff-Parkinson-White; prevenção da recorrência da taquicardia e fibrilação ventriculares

[124]. A amiodarona pode ser usada profilaticamente em doentes que irão ser submetidos a cirurgias torácicas tais como a substituição de válvulas cardíacas ou revascularização coronária [125].

1.6.4 - Interacções entre a amiodarona e outros fármacos ou suplementos alimentares

A amiodarona pode interagir com vários fármacos e suplementos. A interacção mais relevante envolve a varfarina, cuja dose deve ser reduzida; o Índice Internacional Normalizado deve ser cuidadosamente vigiado durante vários meses [126]. Nas tabelas seguintes estão demonstradas algumas interacções farmacológicas que envolvem a amiodarona.

Tabela 2: Interacção entre a amiodarona e outros fármacos, e efeito registado nestes. Adaptado de Vassallo et al [126] e Siddoway et al [127].

Fármaco	Interacção registada
Digoxina	↑ concentrações plasmáticas
Antidepressivos	↑ concentrações plasmáticas
Ciclosporina	↑ concentrações plasmáticas
Sinvastatina	↑ do risco de miopatia e rabdomiólise
Lovastatina	↑ do risco de miopatia e rabdomiólise
Varfarina	↑ do tempo de protrombina
β-bloqueadores	Depressão auriculoventricular
Bloqueadores dos canais de cálcio	Depressão auriculoventricular
Azóis (antifúngicos)	Prolongamento do intervalo QT
Fentanilo	Bradycardia, hipotensão

Tabela 3: Interacções importantes que alteram as concentrações plasmáticas de amiodarona. Adaptado de Vassallo et al [126].

Fármaco	Interacção
Cimetidina	↑ dos níveis de amiodarona
Colestiramina	↓ dos níveis de amiodarona
Inibidores da protease	↑ dos níveis de amiodarona
Rifampicina	↓ dos níveis de amiodarona
Hiperiçã	↓ dos níveis de amiodarona

1.6.5 - Toxicidade

A toxicidade é um reconhecido problema associado à amiodarona, e vários são os avisos e recomendações que os fabricantes e agências reguladoras publicam, de modo a minimizar o risco de desenvolvimento de casos devidos ao fármaco [128]. É dose e tempo dependente, sendo mais provável desenvolver-se toxicidade associada a amiodarona quanto maiores forem as concentrações plasmáticas deste fármaco [129]. Há factores relacionados com o desenvolvimento de complicações, nomeadamente a idade, a duração do tratamento, a dose acumulada, altos níveis de MDEA, uso de compostos iodados para além da amiodarona, e doenças pulmonares [130].

Alguns dos efeitos adversos registados, nos vários anos em que a amiodarona foi utilizada na prática clínica, deveram-se à composição química da molécula deste fármaco, e a alguns componentes que se formam durante o metabolismo [119]. A toxicidade da amiodarona pode afectar vários órgãos e sistemas tais como o cardiovascular, gastrointestinal, pulmonar, neurológico, oftalmológico e dermatológico, e a tiróide. Esta toxicidade pode ser directa, com libertação de radicais livres de oxigénio e de componentes como o iodo, mas também indirecta ou imunológica, tal como indica Campos [106].

1.6.5.1 - Tiróide

A regulação intrínseca dos órgãos, como é o caso da tiróide, normalmente previne que o iodo interfira em mecanismos fisiológicos. Mas, segundo Campos [106], 14 a 18% dos indivíduos tratados com amiodarona desenvolvem disfunção tiroideia, que pode evidenciar-se como hípér ou hipotiroidismo. Na biotransformação da amiodarona, no corpo humano, átomos de iodo são libertados e, muitas vezes, reutilizados pelo organismo. Uma formulação de 200 mg de amiodarona, em comprimido, contém 75 mg de iodo; no caso de uma solução I.V., a concentração de iodo é de 18,7 mg/mL. Da quantidade total, aproximadamente 10% do iodo da formulação oral será libertado para o sistema circulatório [131]. Quando a quantidade deste mineral atinge concentrações críticas no interior da tiróide, o transporte de iodo e a síntese de hormonas são inibidos temporariamente (na maioria dos casos, por alguns dias), até que o iodo intratiroideio volte a atingir os níveis fisiológicos normais. O fenómeno denomina-se efeito Wolff-Chaikoff. No caso de o indivíduo ter uma doença auto-imune da tiróide, não conseguirá evadir-se do efeito, tendo este facto um resultado alarmante, evidenciado pelo aparecimento de bócio ou, no caso de o sujeito ter doença de Hashimoto, de hipotiroidismo [104].

1.6.5.2 - Pulmão

A toxicidade pulmonar é a mais preocupante, já que pode ter efeitos irreversíveis ou ser mesmo fatal, para além de ocorrer com qualquer dose. Os efeitos adversos afectam 1% a 10% dos doentes tratados com amiodarona, e principalmente os indivíduos do sexo masculino [130]. A idade é, também, preponderante no risco de toxicidade pulmonar [132]. Os efeitos adversos pulmonares podem evidenciar-se dias após o início da administração, ou vários anos depois. Sabe-se, ainda, que os doentes com insuficiência auricular que usam amiodarona têm cerca de 50% maior probabilidade de desenvolver toxicidade pulmonar [130]. A forma de manifestação de toxicidade pulmonar mais comum é a pneumonite subaguda, tipicamente com infiltrados visíveis a raio-X ou em tomografia computadorizada [122]. A tosse e infiltrados pulmonares, tal como a exclusão de infecção ou outros problemas pulmonares, são alguns elementos para diagnóstico. A toxicidade da MDEA sobre os macrófagos alveolares é maior que a exercida pela amiodarona; se considerarmos a formação de corpos de inclusão e a degradação da proteína surfactante-A, a toxicidade é equivalente. O metabolismo da MDEA a DDEA reduz a toxicidade, que é ainda mais reduzida pela desaminação da DDEA a Amiodarona-O-EtOH (figuras 4 e 5) [105]. A mortalidade varia entre os 9% (para quem desenvolve pneumonias crónicas) e os 50% (para quem desenvolve Síndrome Respiratório Agudo). Parar de tomar o fármaco, controlar os factores de risco e usar corticosteróides pode ajudar a resolver alguns problemas relacionados com a toxicidade da amiodarona [122, 133].

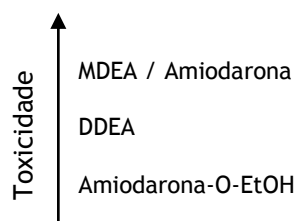


Figura 5: Comparação da toxicidade pulmonar entre a amiodarona e os seus metabolitos.

1.6.5.3 - Fígado

A toxicidade hepática da amiodarona manifesta-se pela elevação dos níveis das transaminases do fígado e aminotransferases séricas, e ocorre principalmente nos indivíduos que fazem tratamento com amiodarona a longo prazo. Os efeitos adversos ocorrem em 0,6% da população, anualmente. Normalmente o doente não demonstra sintomas de toxicidade, pelo que a execução regular de testes analíticos hepáticos é recomendada [127, 134]. A descontinuação da toma de amiodarona deve ser considerada em todos os doentes com alterações nas funções hepáticas ou hepatomegália [134].

A hepatotoxicidade da amiodarona provoca diversas alterações histopatológicas, regularmente referidas como idênticas à hepatite alcoólica [134, 135].

A amiodarona e os seus análogos, nomeadamente a MDEA e DDEA mostraram um padrão de toxicidade semelhante sobre as mitocôndrias hepáticas, inibindo a cadeia respiratória, e limitando a β -oxidação e a fosforilação oxidativa. A MDEA e a DDEA estão associadas à produção de espécies reactivas de oxigénio, o que pode ser uma consequência da inibição da cadeia respiratória [103].

1.6.5.4 - Coração

Alguns casos de efeitos adversos relacionados com a amiodarona foram registados em ensaios clínicos e noutros estudos científicos [136, 137]. A bradicardia e o bloqueio cardíaco ocorrem em 1 a 3% dos doentes que recebem amiodarona. As arritmias induzidas pelo fármaco ocorrem em menos de 1% da população [127]. Contudo, os estudos não evidenciam uma preocupação séria em relação a estes problemas, tendo cada caso de ser analisado isoladamente de forma a verificar a relação risco-benefício de se tomar amiodarona [127, 136, 137].

1.6.5.5 - Toxicidade da amiodarona sobre outros órgãos e sistemas

A toxicidade da amiodarona pode afectar outros órgãos ou sistemas. Os doentes tratados com amiodarona têm tendência a desenvolver microdepósitos na córnea, que podem afectar a visão mas não são uma causa plausível para descontinuar o fármaco. A neuropatia e neurite oculares também podem ocorrer, e evoluir até à cegueira. A nível dermatológico, a fotossensibilidade é comum, tornando a pele azulada. Também o sistema neurológico pode ser afectado. A ataxia, parestesias e tremores são relacionados frequentemente com a dose. A neuropatia periférica ocorre em 0,3% da população, anualmente [127].

O consumo de alimentos ou suplementos ricos em iodo, que aumentam a concentração deste elemento nos tecidos e plasma do doente medicado com amiodarona, pode ser problemático. O *Fucus vesiculosus*, a alga usada na execução deste estudo, contém níveis elevados de iodo, que também poderão interferir com alguns dos processos fisiológicos.

1.7 - O potencial de interacção entre *Fucus vesiculosus* e a amiodarona

Anteriormente abordou-se a importância do conhecimento das interacções planta-fármaco para a prática clínica. Estas são explicadas através de diversos mecanismos, tais como a indução ou inibição enzimáticas, alterações provocadas na actividade da gp-P, modificações no processo de absorção e eliminação de fármacos. Podem ser divididas em interacções farmacodinâmicas e farmacocinéticas. As farmacodinâmicas implicam a ocorrência de antagonismo ou sinergismo, com a consequente alteração dos efeitos farmacológicos. As farmacocinéticas incluem interferências do xenobiótico na absorção, distribuição, metabolismo e/ou eliminação do fármaco objecto [119].

Sendo a amiodarona usada por uma percentagem significativa da população, principalmente os idosos, é necessário conhecer as suas interacções, as margens terapêuticas e os efeitos adversos deste fármaco [119]. Pode, assim, salvaguardar-se a saúde e o bem-estar do doente, evitando provocar-lhe danos que advenham do uso de medicamentos, ou outros compostos, que interajam entre si, e que alterem processos farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos [133].

O *Fucus vesiculosus* é uma alga para a qual os estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos são reduzidos, mas que apresenta potencial de interacção com enzimas do CYP e que contém elevada percentagem em fibras dietéticas. No Pubmed® não há estudos científicos que abordem as seguintes temáticas: interacção entre *Fucus vesiculosus* e alimentos ou fármacos; alterações farmacocinéticas provocadas pelo *Fucus vesiculosus* sobre alimentos ou fármacos.

Capítulo 2 - Objectivo da Dissertação

As algas são uma matéria-prima utilizada no fabrico de suplementos alimentares, muitos deles presentes no mercado há várias décadas. O *Fucus vesiculosus* é uma alga com diversas aplicabilidades, que tem demonstrado resultados satisfatórios em muitos estudos realizados. É aclamado como eficaz no tratamento da obstipação, hipotireoidismo, e também é usado como adjuvante no emagrecimento. Já demonstrou reduzir o colesterol e possuir efeitos anti-estrogénicos. O consumo desta alga pela população medicada com amiodarona é susceptível de ter diversas consequências, ainda desconhecidas, tanto a nível farmacocinético como farmacodinâmico.

Esta dissertação de mestrado tem como **objectivo geral**:

- Identificar possíveis interacções farmacocinéticas entre o extracto de *Fucus vesiculosus* e a amiodarona, em ratos.

Os **objectivos específicos** são:

- Estudar os perfis farmacocinéticos plasmáticos da amiodarona e MDEA em ratos tratados com o extracto de *Fucus vesiculosus*, administrado em dose múltipla (DM) e dose única (DU);
- Estudar as alterações nas concentrações de amiodarona e MDEA, em alguns órgãos (coração, pulmão e fígado) de ratos tratados com o extracto de *Fucus vesiculosus*, administrado em dose múltipla (DM) e dose única (DU).

Capítulo 3 - Material e Métodos

Este capítulo contém diversos tópicos, nos quais se apresenta o material utilizado nas experiências e os métodos aplicados. O desenho do estudo é composto por dois procedimentos experimentais distintos: um estudo que compreende 16 dias (ensaio em DM), e outro de 3 dias (ensaio em DU). Pretende-se, com o estudo de maior duração, identificar alterações nos processos fisiológicos do organismo, nomeadamente a indução ou inibição de enzimas, que possam alterar os parâmetros farmacocinéticos da amiodarona. O segundo estudo (ensaio em DU) permitirá perceber se a alga administrada provoca alterações a nível da absorção de amiodarona.

3.1 - Animais

Este estudo utilizou uma população de 20 ratos Wistar, machos, adultos, com 3 meses de idade. Foram colocados aos pares, em gaiolas de policarbonato, e mantidos a temperatura e humidade controladas, no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, antes e durante o estudo. Foram submetidos a um ciclo dia/noite de 12 horas desde o nascimento. Tiveram acesso *ad libitum* a água e a alimento, até à colocação dos catéteres para a recolha de sangue. Para se proceder aos ensaios (em DM ou em DU), os ratos foram divididos em grupos controlo (GC) e de estudo (GE), evidenciados na tabela 4. A partir do momento da colocação de cateteres, os ratos permaneceram individualmente em gaiolas. Este estudo foi autorizado pela Direcção Geral de Veterinária e seguiu a Directiva Europeia (86/609/EEC) para a protecção dos animais utilizados para fins experimentais ou outros fins científicos.

Tabela 4: Distribuição dos animais pelos grupos de estudo e controlo, dos ensaios em DU e em DM.

Grupo/Ensaio	Número de ratos utilizados
GE/DM	5
GC/DM	5
GE/DU	5
GC/DU	5

GE/DM - grupo de estudo do ensaio em dose múltipla;
GC/DM - grupo de controlo do ensaio em dose múltipla;
GE/DU - grupo de estudo do ensaio em dose única;
GC/DU - grupo de controlo do ensaio em dose única.

3.2 - Fármaco e matéria vegetal

Para realizar os estudos foi necessário adquirir a alga pretendida, *Fucus vesiculosus*, garantido que esta era de elevada qualidade, e que estava devidamente padronizada e caracterizada físico-quimicamente. Assim, o extracto seco de *Fucus vesiculosus* foi comprado ao EPO Istituto Farmochimico Fitoterapico s.r.l. Apresenta-se sobre a forma de pó higroscópico, de cor castanho-clara, é parcialmente hidrossolúvel, e possui um odor característico. O conteúdo em iodo deste extracto era de 0,11% m/m. O extracto foi armazenado ao abrigo da luz, acondicionado num recipiente fechado de forma a impedir a degradação físico-química, e mantido à temperatura ambiente do laboratório.

Foram usadas ampolas de amiodarona Hikma®, de 3mL, com uma concentração de 50mg/mL.

3.3 - Doses

A dose de extracto de *Fucus vesiculosus* foi calculada a partir de uma equação (1) apresentada na *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Julho de 2005.

$$\text{DHE} = \text{Dose para o animal (mg/kg)} \times \left(\frac{\text{massa do animal (kg)}}{\text{massa do ser humano (kg)}} \right)^{0,33} \quad (1)$$

$m_{\text{humano}} = 70 \text{ kg}$; $m_{\text{animal}} = 0,350 \text{ kg}$; Dose humana equivalente (DHE) = 10 mg/kg; Dose calculada para o animal = 57,5 mg/kg.

A dose humana equivalente usada foi baseada nos estudos de Skibola [89, 138] e em doses recomendadas em diversos *sites* que comercializam *Fucus vesiculosus* [86, 139, 140]. A massa do animal (kg) corresponde a um valor médio da massa de ratos Wistar, com 3 meses de idade, do Biotério do Centro de Investigação em Ciências da Saúde.

O cálculo da dose equivalente de *Fucus vesiculosus* a administrar ao animal, a partir de doses utilizadas no Homem, permite aproximar o estudo à realidade do consumo humano.

O rato consegue metabolizar mais rapidamente a amiodarona e possui uma maior capacidade de extracção hepática que o ser humano. Sendo este um estudo de *screening* de interacções farmacocinéticas relevantes, e também devido às duas razões mencionadas na frase anterior, acrescentou-se um factor multiplicador de 10 à dose calculada para o animal. Com uma dose maior, aumenta a probabilidade de as interacções farmacocinéticas entre o

Fucus vesiculosus e a amiodarona serem evidenciadas. Estas poderiam não ser perceptíveis com a utilização de doses inferiores de extracto.

Assim, a dose a administrar, por dia e por kg de rato, foi de 575 mg, um valor aceitável, segundo a bibliografia; Zaragoza et al [141] utilizou doses de extracto de *Fucus vesiculosus* entre as 200 e as 750 mg/kg, em ratos Sprague-Dawley. Na adequação da dose foi tida em consideração a dose letal (DL₅₀) de *Fucus vesiculosus*, administrado por via oral, em ratos Suiços e Sprague-Dawley [141]. Não foram encontrados estudos que contemplassem DL₅₀ especificamente para ratos Wistar. Os valores usados neste estudo não se aproximaram da DL₅₀, que varia entre as 1000 e as 2000 mg/kg de peso corporal animal.

A concentração da suspensão de extracto de *Fucus vesiculosus* foi calculada com base na dose a administrar ao animal (575 mg/kg), e noutros factores relevantes:

- o volume do estômago dos ratos é de aproximadamente 3,4 mL;
- a capacidade do tracto gastrointestinal do rato varia entre os 3,2±1,8 mL (após ingestão de alimentos) e os 7,8±1,6 mL (em jejum) [142, 143];
- a dose oral máxima, a administrar ao rato com massa corporal superior a 0,25 kg, é de 5,0 mL [153].

No cálculo da concentração da suspensão de extracto de *Fucus vesiculosus* a administrar aos ratos, é necessário considerar os parâmetros anteriores. A ingestão de um volume excessivo de extracto pode originar dor, irritação, problemas no balanço de electrólitos, aumento da pressão arterial e alterações nos processos absorptivos. A concentração da suspensão deve permitir administrar a quantidade estipulada de extracto (575 mg/kg), sem prejudicar o bem-estar do animal e, conseqüentemente, o estudo. Por isso, o volume máximo administrado ao rato deve ser inferior a 5,0 mL [153].

Estipulou-se que a concentração da suspensão de extracto de *Fucus vesiculosus*, a administrar aos animais, fosse de 57,5 mg/mL. Tal permite que os ratos em estudo ingiram um volume aceitável de extracto e, nesse mesmo volume, recebam a dose diária estipulada, tal como se exemplifica na tabela 5.

Tabela 5: Demonstração das doses de extracto a administrar, através de sonda intragástrica, aos animais, considerando a massa corporal dos ratos imediatamente antes da administração. Aplicação da equação (2).

Massa corporal do rato (kg)	Volume a administrar (mL)	Dose de extracto (mg)
0,300	3,0	172,5
0,325	3,2	186,9
0,350	3,5	201,25

Assim, procedeu-se ao cálculo do volume a administrar, segundo a equação (2).

$$[\text{massa do rato (kg)} \times 10 \text{ mL}] = V_{\text{extracto a administrar}} \text{ (2)}$$

A dose de amiodarona, de 50mg/kg, foi administrada aos ratos, através de uma sonda intragástrica.

3.4 - Preparação dos compostos a administrar

3.4.1 - Veículo

A solução aquosa de carboximetilcelulose (CMC) a 0,5% foi usada como veículo da amiodarona e do extracto de *Fucus vesiculosus*.

3.4.2 - Extracto de *Fucus vesiculosus*

O extracto de *Fucus vesiculosus* foi preparado diariamente, nos laboratórios do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, antes do início da administração aos ratos. Assim, pretendeu-se evitar potenciais erros devidos a degradação físico-química dos componentes vegetais, e a contaminação bacteriana. A massa de 1,725 g de extracto seco era pesada e diluída em 30,0 mL de CMC a 0,5%, obtendo-se uma suspensão com a concentração de 57,5 mg/mL. Foi usado um homogeneizador Ystral® D-79282, com o propósito de eliminar partículas de diâmetro elevado que pudessem entupir a sonda utilizada para a administração oral. O procedimento era realizado à temperatura e humidade ambiente. De forma a minimizar a degradação pela acção da luz, os recipientes onde foi preparado o extracto eram protegidos externamente com papel de alumínio. Esta suspensão era administrada aos grupos de estudo (GE/DM e GE/DU). Os grupos controlo (GC/DM e GC/DU) recebiam as quantidades correspondentes de veículo (CMC 0,5%).

3.4.3 - Solução de amiodarona

A solução de amiodarona em CMC 0,5%, na concentração de 12,5mg/mL, foi constituída com 2 ampolas de amiodarona Hikma® (50mg/mL) e soro glucosado (18 mL).

3.5 - Execução do estudo experimental

O trabalho experimental efectuado para elaborar esta dissertação envolveu animais e, por este motivo, foram realizadas as diligências possíveis de forma a melhorar a qualidade de vida destes. Procedeu-se à promoção das condições de temperatura e humidade ideais, limpeza e manutenção frequente das gaiolas e ao manuseamento cuidadoso dos ratos.

O estudo envolveu 2 etapas diferentes, a fim de detectar alterações relevantes nas concentrações de amiodarona e MDEA, e tentar compreender com maior clareza os processos que estão envolvidos. Os ratos, machos e adultos, foram divididos em 4 grupos de 5 animais (n=5) (tabela 4).

Aos ratos do GE/DM foi administrado o extracto de *Fucus vesiculosus*, intragastricamente, durante 14 dias. Ao GC/DM foi administrado volume equivalente do veículo, durante 14 dias. No 15º dia foi administrada amiodarona tanto ao GE como ao GC do ensaio em DM.

Aos ratos do GE/DU, foi administrado o extracto de *Fucus vesiculosus*, intragastricamente, em dose única, e ao GC/DU foi administrado o volume equivalente do veículo. A amiodarona foi administrada no tracto gastrointestinal dos ratos logo após o extracto de *Fucus vesiculosus*, no GE, e o veículo, no GC.

Os animais foram pesados, diariamente, antes da administração do extracto ou do veículo. A pesagem foi realizada numa balança de laboratório, pertencente ao biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior. Imediatamente após a pesagem de cada animal, a dose a administrar foi calculada através da aplicação da equação (2). Uma sonda em aço inoxidável foi utilizada para injectar a dose no tracto gastrointestinal, tendo como meio de medição do volume a administrar, uma seringa. Na véspera da administração de amiodarona, para ambos os ensaios (DM e DU) procedeu-se à anestesia dos animais com uma mistura de quetamina/xilazina na proporção 1:2. Posteriormente introduziu-se um cateter intravenoso periférico Introcán® Certo de 0,9x25mm, da B. Braun, na veia lateral da cauda dos ratos, para permitir a colheita de amostras sanguíneas. Durante a noite os ratos foram mantidos em jejum, com acesso a água. As colheitas de amostras de sangue ($\cong 400 \mu\text{L}$) foram sujeitas a um horário específico, que se iniciou imediatamente após a administração de amiodarona: 0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 12 h; 24 h. As amostras de sangue foram recolhidas em tubos heparinizados e colocadas em gelo. Antes da colheita das 24 h, os ratos foram sacrificados e o sangue terminal foi recolhido. Após cada colheita, as amostras sanguíneas eram centrifugadas. Para se proceder à quantificação do fármaco e do seu metabolito (MDEA), em órgãos, foram recolhidos o fígado, os pulmões e o coração. Colocaram-se num recipiente frio apropriado, durante a colheita. Seguidamente, foram congelados a -20°C , para posteriormente serem analisados por HPLC.

No final, todos os cadáveres dos animais foram acondicionados devidamente e congelados a -20°C .

Durante a execução do ensaio em DM, perdeu-se um rato do GE, pelo que este grupo tem apenas 4 animais.

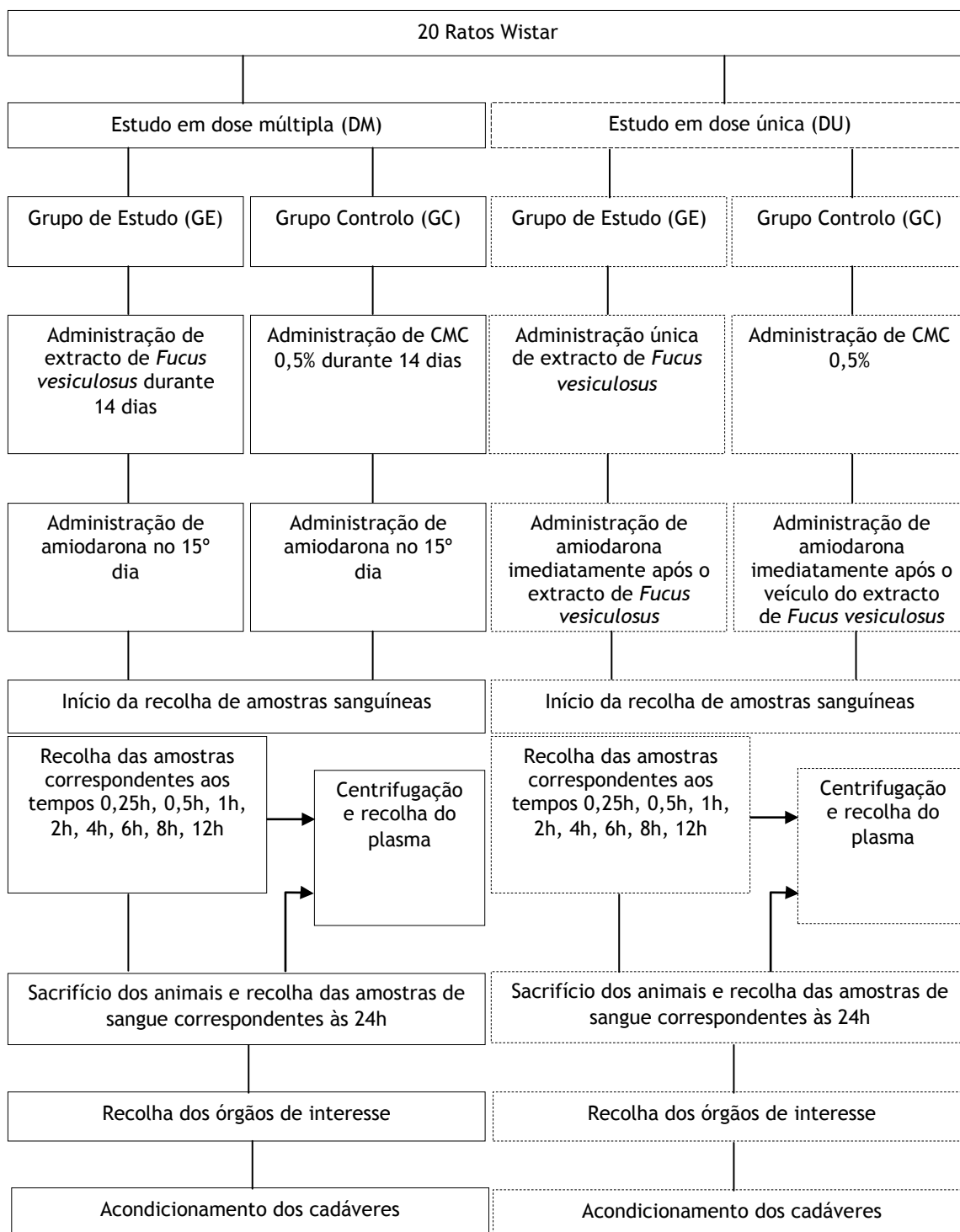


Figura 6: Procedimento experimental aplicado nos animais do estudo, com o objectivo de recolher amostras biológicas.

3.6 - Tratamento e análise das amostras sanguíneas

Após a colheita de sangue dos ratos, para tubos heparinizados, este foi imediatamente colocado no frio e, posteriormente, centrifugado. Tal procedimento permitiu diminuir a hemólise e a degradação de outros componentes sanguíneos e dos compostos de interesse. Usou-se uma centrífuga Heraeus Multifuge 15-R da Thermo Electron Corporation; as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos, a 4000 rotações por minuto, e a 4°C. O plasma foi, assim, separado dos restantes elementos celulares, e acondicionado num tubo *ependorf*. Congelaram-se os tubos a -20°C até se iniciarem os procedimentos necessários à análise cromatográfica.

Os métodos de HPLC utilizados para a quantificação da amiodarona e MDEA, nas amostras, foram desenvolvidos e validados previamente por Rodrigues et al [144, 145].

Seguidamente apresenta-se o procedimento aplicado na análise das amostras de plasma e de órgãos (figura 7).

A análise cromatográfica foi realizada num sistema Waters HPLC, (Milford, MA, E.U.A.) equipado com um desgaseificador em linha, uma bomba quaternária com controlador (modelo 600), um injector manual (Rheodyne 7725i) e um detector *diode array* (DAD-2996). Utilizou-se o *software* Empower da Waters Corporation. Foi utilizado um volume de injeção de 20,0 µL. A separação cromatográfica da amiodarona e MDEA foi conseguida através do uso de uma coluna de fase-reversa LiChroCART Purospher® Star (C₁₈, 3 µm, 55 mm x 4 mm). A eluição foi isocrática, a 1,2 mL/min, e a fase móvel usada consistiu em tampão fosfato 50mM com 0,1% de ácido fórmico (pH 3,1), metanol e acetonitrilo (45:5:50, v/v/v). O comprimento de onda seleccionado foi de 254 nm. A separação total dos compostos demorou aproximadamente 5 minutos.

Os métodos mostraram linearidade na gama de concentrações 0,1-15 µg/mL para a amiodarona e MDEA. O coeficiente de regressão (r^2) apresentou valores superiores a 0,995 para os métodos cromatográficos usados em homogeneizado de coração, fígado e pulmão, e plasma. Em ambos os métodos analíticos a recuperação dos compostos amiodarona e MDEA é bastante considerável.

Em anexo a esta dissertação (figuras 16 e 17), encontram-se alguns exemplos dos cromatogramas obtidos, tanto para tecidos como para plasma de rato.

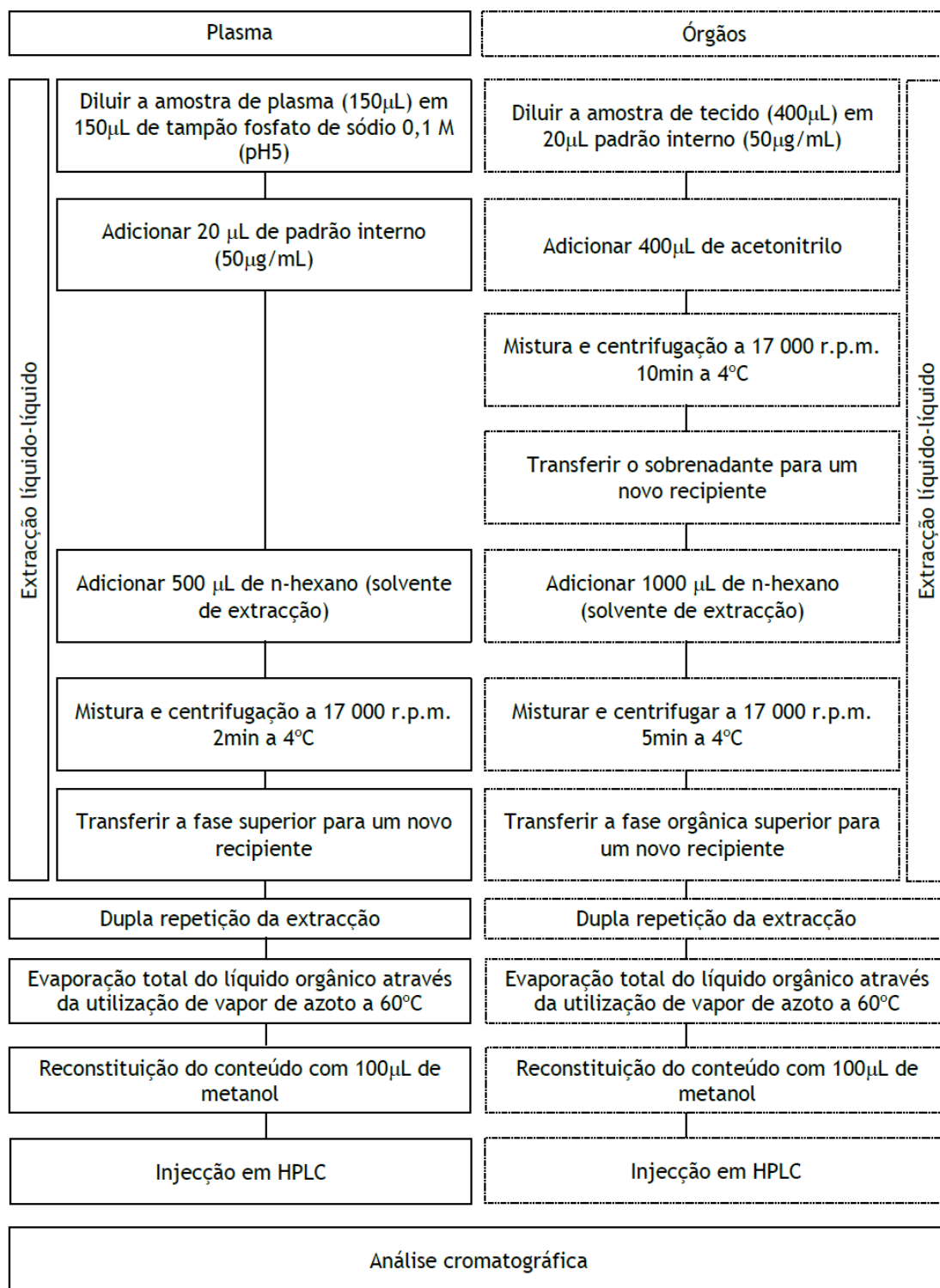


Figura 7: Procedimento aplicado para preparar as amostras de plasma e de órgãos para a análise cromatográfica.

Capítulo 4 - Resultados

Seguidamente são apresentados e discutidos os resultados dos ensaios em DM e em DU, em plasma e órgãos de rato.

4.1 - Perfis farmacocinéticos da amiodarona e da mono-*N*-desetilamiodarona, no rato

A fim de estudar os perfis farmacocinéticos da amiodarona e MDEA, após administração de *Fucus vesiculosus*, foram realizados 2 estudos mediante a administração oral (em DM e em DU), em ratos Wistar.

Seguidamente estão tabeladas as concentrações de amiodarona e MDEA, tal como alguns parâmetros farmacocinéticos, para os ensaios em DM e em DU. Os resultados representam os valores obtidos através da análise das amostras de plasma de rato por HPLC.

4.1.1 - Perfis e parâmetros farmacocinéticos plasmáticos da amiodarona em ratos pré-tratados com o extracto de *Fucus vesiculosus*, em DM.

As duas tabelas seguintes demonstram os valores das concentrações plasmáticas, obtidos após a administração do extracto de *Fucus vesiculosus* (GE/DM), ou do respectivo veículo (CMC 0,5%) (GC/DM), durante 14 dias. As colheitas de sangue foram realizadas durante os 15º e 16º dias.

Tabela 6: Concentrações plasmáticas de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) em ratos Wistar previamente tratados, durante 14 dias, com extracto de *Fucus vesiculosus* (575 mg/kg; *per os*), após a administração oral de uma dose única de amiodarona (50 mg/kg) no 15º dia. Ensaio correspondente ao GE/DM.

UE	Analitos (µg/mL)	Tempo amostragem pós-dose (h)									
		0,00	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	8,00	12,0	24,0
Rato 1	AM	ALQ*	ALQ*	0,258	0,624	0,523	0,555	0,562	0,447	0,528	0,147
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 2	AM	ALQ*	0,148	0,469	1,084	0,971	0,512	0,586	0,536	0,505	0,169
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 3	AM	ALQ*	ALQ*	0,169	0,666	0,618	0,464	0,424	0,329	0,432	0,183
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,106	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 4	AM	ALQ*	0,158	0,277	1,884	0,909	0,670	0,444	0,440	0,618	0,221
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 5	AM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	MDEA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N	AM	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	MDEA	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Média	AM	0,000	0,077	0,293	1,065	0,755	0,550	0,504	0,438	0,521	0,180
	MDEA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,027	0,000	0,000	0,000
DP	AM	0,000	0,088	0,126	0,584	0,218	0,088	0,082	0,085	0,077	0,031
	MDEA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,000	0,000	0,000
CV (%)	AM	NC	115,6	43,1	54,9	28,9	16,0	16,2	19,4	14,7	17,3
	MDEA	NC	NC	NC	NC	NC	NC	200,0	NC	NC	NC

UE, unidade experimental; AM, amiodarona; MDEA, mono-*N*-desetilamiodarona; ALQ, abaixo do limite de quantificação (< 0,100 µg/mL); ND, não disponível; NC, não calculado. *Os valores de concentração ALQ foram considerados zero para efeito de cálculos.

Tabela 7: Concentrações plasmáticas de amiodarona e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) em ratos Wistar previamente tratados, durante 14 dias, com o veículo do extracto de *Fucus vesiculosus* (CMC 0,5%; *per os*), após a administração oral de uma dose única de amiodarona (50 mg/kg) no 15º dia. Ensaio correspondente ao GC/DM.

UE	Analitos (µg/mL)	Tempo amostragem pós-dose (h)									
		0,00	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	8,00	12,0	24,0
Rato 6	AM	ALQ*	ALQ*	0,260	1,136	1,046	1,241	0,786	0,526	0,325	0,373
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,147	0,112	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 7	AM	ALQ*	ALQ*	0,176	0,382	0,475	0,656	0,523	0,365	0,364	0,222
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,100	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 8	AM	ALQ*	ALQ*	0,319	0,682	0,641	0,520	0,404	0,393	0,454	0,234
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 9	AM	ALQ*	0,170	0,352	0,599	0,718	0,503	0,408	0,326	0,317	0,182
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 10	AM	ALQ*	0,130	0,408	1,604	1,241	0,704	0,557	0,466	0,663	0,146
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,112	ALQ*
N	AM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	MDEA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média	AM	0,000	0,060	0,303	0,881	0,824	0,725	0,536	0,415	0,425	0,231
	MDEA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,042	0,000	0,022	0,000
DP	AM	0,000	0,083	0,089	0,489	0,312	0,301	0,155	0,080	0,144	0,087
	MDEA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,066	0,058	0,000	0,050	0,000
CV (%)	AM	NC	138,9	29,3	55,5	37,9	41,5	29,0	19,4	34,0	37,4
	MDEA	NC	NC	NC	NC	NC	223,6	137,3	NC	223,6	NC

UE, unidade experimental; AM, amiodarona; MDEA, mono-*N*-desetilamiodarona; ALQ, abaixo do limite de quantificação (< 0,100 µg/mL); NC, não calculado. *Os valores de concentração ALQ foram considerados zero para efeito de cálculos.

Nas figuras abaixo representadas, são demonstrados os perfis plasmáticos correspondentes à amiodarona e MDEA, obtidos através do ensaio em DM. Na primeira, visualizam-se os valores de concentração plasmática, em $\mu\text{g/mL}$, ao longo de 24 horas. Na segunda figura, as concentrações plasmáticas estão representadas numa escala logarítmica.

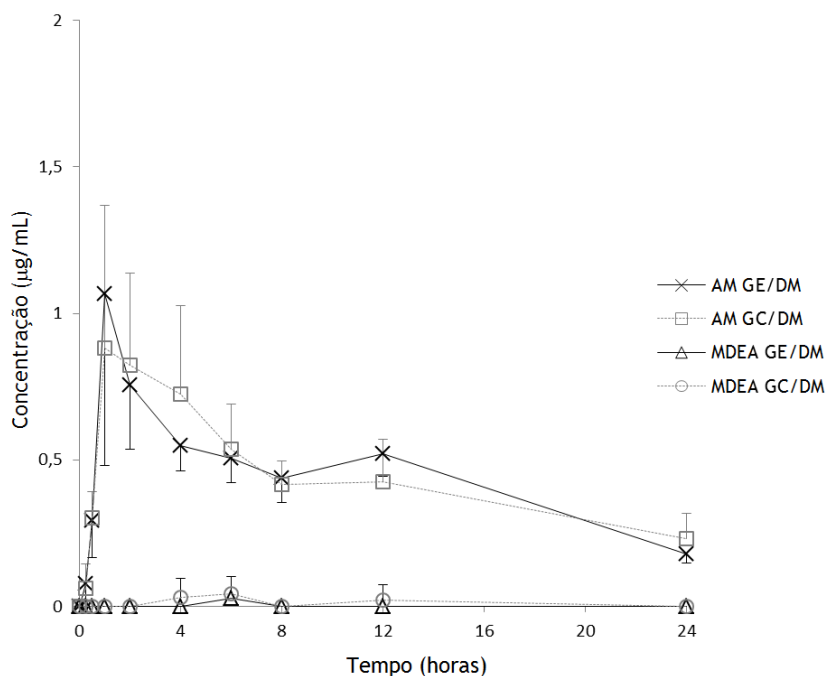


Figura 8: Representação gráfica dos valores plasmáticos médios de amiodarona (AM) e de mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) correspondentes ao ensaio em DM, ao longo de 24 horas. Os desvios padrão têm valores positivos e negativos iguais, em relação a cada um dos pontos do gráfico. GE/DM - grupo de estudo do ensaio em dose múltipla; GC/DM - grupo controlo do ensaio em dose múltipla.

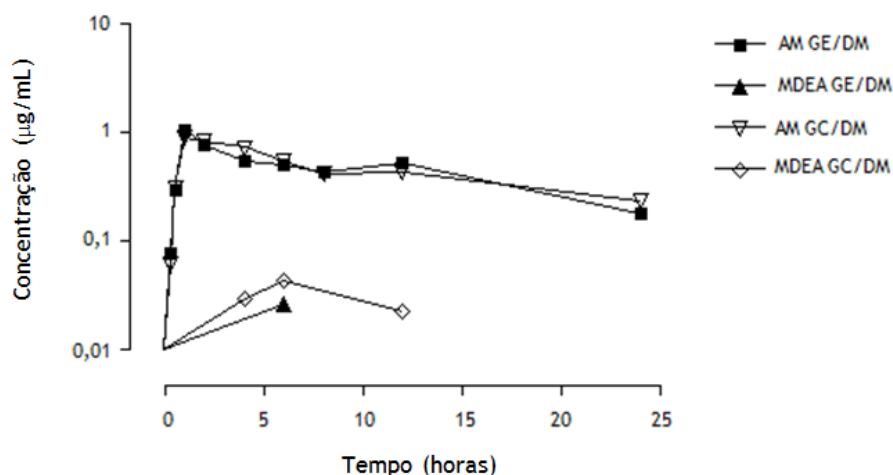


Figura 9: Gráfico com escala semi-logarítmica, que representa as concentrações de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) recolhidas ao longo das 24h correspondentes ao estudo em DM. GE/DM - grupo de estudo do ensaio em dose múltipla; GC/DM - grupo controlo do ensaio em dose múltipla.

Seguidamente, apresentam-se alguns parâmetros plasmáticos calculados, correspondentes ao ensaio em DM. A análise destes parâmetros permitirá comparar, entre o GC/DM e o GE/DM, a quantidade de amiodarona circulante no plasma, os tempos aos quais foram registadas as concentrações plasmáticas máximas (C_{max}), o $t_{1/2}$ e as constantes de eliminação que caracterizam cada grupo de estudo (GE/DM e GC/DM).

Tabela 8: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao GE/DM.

EU	Analitos	Parâmetros farmacocinéticos						
		C_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	t_{\max} (h)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	AUC_{extrap} (%)	K_{el} (h^{-1})	$t_{1/2\text{el}}$ (h)
Rato 1	AM	0,624	1,000	10,030	12,026	16,600	0,0736	9,410
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
Rato 2	AM	1,084	1,000	11,340	13,724	17,400	0,071	9,780
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
Rato 3	AM	0,666	1,000	8,807	12,412	29,000	0,051	13,660
	MDEA	0,106	6,000	0,212	NC	NC	NC	NC
Rato 4	AM	1,884	1,000	12,738	16,915	24,700	0,053	13,100
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
Rato 5	AM	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
N	AM	4	4	4	4	4	4	4
Média	AM	1,065	1,000	10,729	13,769	21,900	0,062	11,490
DP	AM	0,584	0,000	1,692	2,219	5,960	0,012	2,202
Mediana	AM	0,875	1,000	10,685	13,070	21,100	0,062	11,440
CV (%)	AM	54,9	0,0	15,8	16,1	27,2	19,1	19,2

UE, unidade experimental; ND, não determinado; NC, não calculado; C_{\max} , concentração máxima; t_{\max} , tempo ao qual foi registada a concentração máxima; AUC_{0-t} , área sob a curva entre as 0 horas e as 24 horas; $AUC_{0-\infty}$, área sob a curva entre as 0 horas e ∞ ; AUC_{extrap} , área sob a curva extrapolada; K_{el} , constante de eliminação; $t_{1/2\text{el}}$, tempo de meia vida de eliminação.

Tabela 9: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao GC/DM.

EU	Analitos	Parâmetros farmacocinéticos						
		C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC _{0-t} (µg.h/mL)	AUC _{0-∞} (µg.h/mL)	AUC _{extrap} (%)	K _{el} (h ⁻¹)	t _{1/2el} (h)
Rato 6	AM	1,241	4,000	12,988	19,543	33,500	0,057	12,180
	MDEA	0,147	4,000	0,518	NC	NC	NC	NC
Rato 7	AM	0,656	4,000	8,762	15,406	43,100	0,033	20,740
	MDEA	0,100	6,000	0,200	NC	NC	NC	NC
Rato 8	AM	0,682	1,000	9,656	15,230	36,600	0,042	16,500
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
Rato 9	AM	0,718	2,000	8,129	12,485	34,900	0,042	16,590
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
Rato 10	AM	1,604	1,000	13,350	14,969	10,800	0,090	7,690
	MDEA	0,112	12,000	0,896	NC	NC	NC	NC
N	AM	5	5	5	5	5	5	5
Média	AM	0,980	2,400	10,577	15,527	31,800	0,053	14,740
DP	AM	0,424	1,517	2,431	2,539	12,290	0,0225	4,969
Mediana	AM	0,718	2,000	9,656	15,230	34,900	0,042	16,500
CV (%)	AM	43,3	63,2	23,0	16,4	38,7	42,6	33,7

UE, unidade experimental; ND, não determinado; NC, não calculado; C_{max}, concentração máxima; t_{max}, tempo ao qual foi registada a concentração máxima; AUC_{0-t}, área sob a curva entre as 0 horas e as 24 horas; AUC_{0-∞}, área sob a curva entre as 0 horas e ∞; AUC_{extrap}, área sob a curva extrapolada; K_{el}, constante de eliminação; t_{1/2el}, tempo de meia vida de eliminação.

Foi realizada a análise estatística dos parâmetros farmacocinéticos calculados, apresentados nas tabelas 8 e 9. Para tal, utilizou-se o teste *t-student* ($p < 0,05$). Este permite a comparação dos valores obtidos para o GE/DM com os valores obtidos para o GC/DM. Se o resultado do teste for $p < 0,05$, podemos afirmar que a probabilidade de haver uma diferença entre os valores de GE/DM e GC/DM é de 95%. Nas tabelas abaixo estão demonstrados os resultados obtidos após a realização do teste *t-student*.

Tabela 10: Análise estatística dos parâmetros cinéticos da amiodarona correspondentes ao ensaio em DM. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por *t-student* ($p < 0,05$).

Grupo	Parâmetro	Resultado (p)	Análise estatística ($p < 0,05$)
Ensaio em DM Plasma	C_{max}	0,568	S.S
	t_{max}	0,102	S.S
	AUC_{0-t}	0,652	S.S
	$AUC_{0-\infty}$	0,496	S.S
	$AUC_{extrapolado}$	0,334	S.S
	$K_{eliminação}$	0,066	S.S
	$t_{1/2}$ eliminação	0,086	S.S
S.S. - sem significado estatístico			

4.1.2 - Perfis e parâmetros farmacocinéticos plasmáticos da amiodarona em ratos tratados concomitantemente com o extracto de *Fucus vesiculosus*, em DU

Seguidamente são apresentadas as concentrações de amiodarona e MDEA obtidas através da análise, por HPLC, das amostras plasmáticas recolhidas durante as 24h do ensaio em DU. Existem diferenças entre os perfis plasmáticos do GE/DU e do GC/DU, que serão analisadas posteriormente, através do teste *t-student*, a fim de determinar o seu significado estatístico.

Tabela 11: Concentrações plasmáticas de amiodarona e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) em ratos Wistar após administração oral simultânea de uma dose única de amiodarona (50 mg/kg) e extracto de *Fucus vesiculosus* (575 mg/kg). Ensaio correspondente ao GE/DU.

UE	Analitos (µg/mL)	Tempo amostragem pós-dose (h)									
		0,00	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	8,00	12,0	24,0
Rato 11	AM	ALQ*	0,107	0,192	0,330	0,390	0,381	0,373	0,432	0,427	0,271
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,100	0,110	ALQ*
Rato 12	AM	ALQ*	ALQ*	0,155	0,386	0,546	0,528	0,409	0,368	0,436	0,264
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 13	AM	ALQ*	ALQ*	0,157	0,586	0,579	0,469	0,215	0,327	0,177	0,147
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 14	AM	ALQ*	0,103	0,500	0,844	0,705	0,580	0,552	0,391	0,506	0,317
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,105	0,123	ALQ*	0,111	ALQ*
Rato 15	AM	ALQ*	0,324	0,480	0,664	0,694	0,726	0,656	0,516	0,358	0,194
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,110	ALQ*	ALQ*	ALQ*
N	AM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	MDEA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média	AM	0,000	0,107	0,297	0,562	0,583	0,537	0,441	0,407	0,381	0,239
	MDEA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,021	0,047	0,020	0,044	0,000
DP	AM	0,000	0,132	0,177	0,209	0,128	0,129	0,170	0,072	0,125	0,067
	MDEA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,047	0,064	0,045	0,060	0,000
CV (%)	AM	NC	124,0	59,7	37,2	22,0	24,0	38,5	17,7	32,9	28,2
	MDEA	NC	NC	NC	NC	NC	223,6	137,3	223,6	136,9	NC

UE, unidade experimental; AM, amiodarona; MDEA, mono-*N*-desetilamiodarona; ALQ, abaixo do limite de quantificação (< 0,100 µg/mL); ND, não disponível; NC, não calculado. *Os valores de concentração ALQ foram considerados zero para efeito de cálculos.

Tabela 12: Concentrações plasmáticas de amiodarona e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) em ratos Wistar após administração oral simultânea de uma dose única de amiodarona (50 mg/kg) e veículo do extracto *Fucus vesiculosus* (CMC 0,5%; *per os*). Valores correspondentes ao GC/DU.

UE	Analitos (µg/mL)	Tempo amostragem pós-dose (h)									
		0,00	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00	8,00	12,0	24,0
Rato 16	AM	ALQ*	0,161	0,245	1,487	0,853	0,553	0,410	0,385	0,359	0,305
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,101	ALQ*	ALQ*
Rato 17	AM	ALQ*	0,113	0,374	0,868	1,270	0,758	0,608	0,519	0,515	0,306
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,108	0,109	0,113	0,102
Rato 18	AM	ALQ*	0,000	0,114	0,350	0,961	0,936	0,925	0,588	0,580	0,280
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,138	0,144	0,116	0,140	ALQ*
Rato 19	AM	ALQ*	0,125	0,291	2,197	1,126	0,721	0,522	0,433	0,420	0,250
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*
Rato 20	AM	ALQ*	0,105	0,271	1,012	1,189	1,258	1,027	0,945	0,452	0,283
	MDEA	ALQ*	ALQ*	ALQ*	ALQ*	0,120	0,162	0,134	0,158	ALQ*	ALQ*
n	AM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	MDEA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Média	AM	0,000	0,101	0,259	1,183	1,080	0,845	0,698	0,574	0,465	0,285
	MDEA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,060	0,077	0,097	0,051	0,020
DP	AM	0,000	0,060	0,094	0,697	0,170	0,268	0,265	0,222	0,085	0,023
	MDEA	0,000	0,000	0,000	0,000	0,054	0,083	0,072	0,058	0,070	0,046
CV (%)	AM	NC	59,8	36,4	58,9	15,7	31,7	38,0	38,6	18,3	8,0
	MDEA	NC	NC	NC	NC	223,6	137,7	92,9	60,3	138,2	223,6

UE, unidade experimental; AM, amiodarona; MDEA, mono-*N*-desetilamiodarona; ALQ, abaixo do limite de quantificação (< 0,100 µg/mL); NC, não calculado. *Os valores de concentração ALQ foram considerados zero para efeito de cálculos.

Os valores plasmáticos médios de amiodarona e MDEA, explícitos nas tabelas anteriores e correspondentes ao ensaio em DU, estão representados nas figuras seguintes.

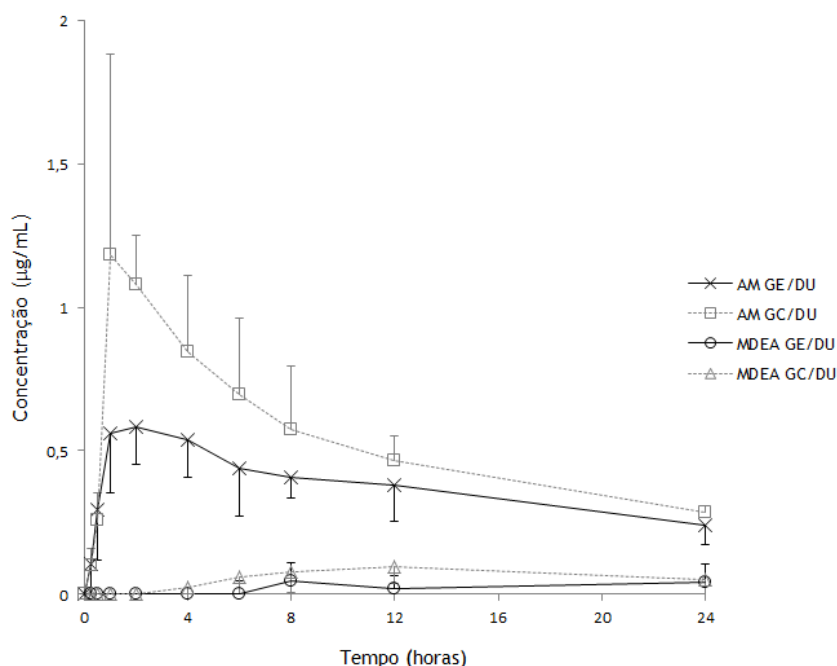


Figura 10: Representação gráfica dos valores plasmáticos médios de amiodarona (AM) e de mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA), nos GE/DU e GC/DU, ao longo de 24 horas. Os desvios padrão têm valores positivos e negativos iguais, em relação a cada um dos pontos do gráfico. GE/DU - grupo de estudo do ensaio em dose única; GC/DU - grupo controlo do ensaio em dose única.

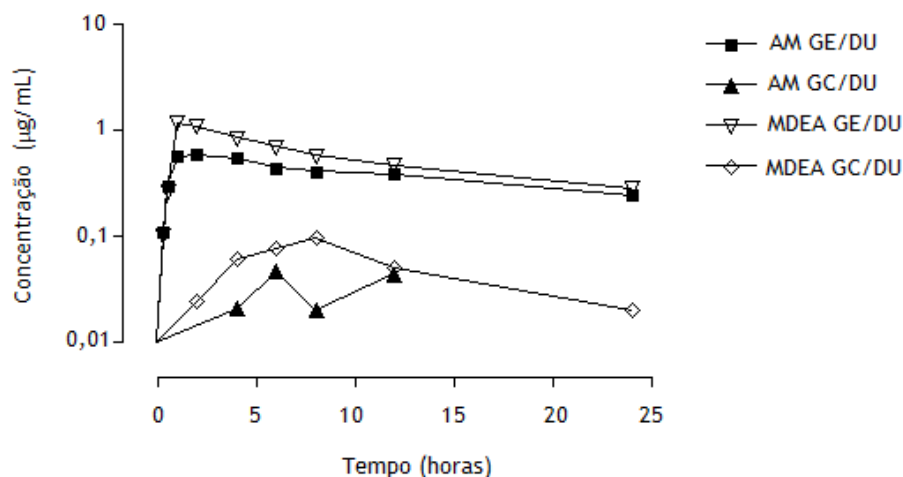


Figura 11: Gráfico com escala semi-logarítmica, que representa as concentrações de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) recolhidas ao longo das 24h correspondentes ao estudo em DU. GE/DU - grupo de estudo do ensaio em dose única; GC/DU - grupo controlo do ensaio em dose única.

Apresentam-se as tabelas com alguns parâmetros farmacocinéticos calculados a partir dos valores de concentrações plasmáticas, obtidos das amostras sanguíneas recolhidas no ensaio em DU.

Tabela 13: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao GE/DU.

EU	Analitos	Parâmetros farmacocinéticos						
		C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	t_{max} (h)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	AUC_{extrap} (%)	K_{el} (h^{-1})	$t_{1/2el}$ (h)
Rato 11	AM	0,432	8,000	8,777	17,474	49,800	0,031	22,240
	MDEA	0,110	12,000	1,180	NC	NC	NC	NC
Rato 12	AM	0,546	2,000	9,217	17,952	48,700	0,030	22,940
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
Rato 13	AM	0,586	1,000	6,014	8,390	28,300	0,062	11,200
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
Rato 14	AM	0,884	1,000	11,291	19,934	43,400	0,037	18,900
	MDEA	0,123	6,000	1,344	NC	NC	NC	NC
Rato 15	AM	0,726	4,000	10,140	13,055	22,300	0,067	10,410
	MDEA	0,110	6,000	0,220	NC	NC	NC	NC
N	AM	5	5	5	5	5	5	5
Média	AM	0,635	3,200	9,088	15,361	38,500	0,045	17,140
DP	AM	0,174	2,950	1,970	4,637	12,470	0,0175	5,986
Mediana	AM	0,586	2,000	9,217	17,47	43,400	0,037	18,900
CV (%)	AM	27,5	92,2	21,7	30,2	32,4	38,7	34,9

UE, unidade experimental; ND, não determinado; NC, não calculado; C_{max} , concentração máxima; t_{max} , tempo ao qual foi registada a concentração máxima; AUC_{0-t} , área sob a curva entre as 0 horas e as 24 horas; $AUC_{0-\infty}$, área sob a curva entre as 0 horas e ∞ ; AUC_{extrap} , área sob a curva extrapolada; K_{el} , constante de eliminação; $t_{1/2el}$, tempo de meia vida de eliminação.

Tabela 14: Parâmetros farmacocinéticos referentes ao GC/DU.

EU	Analitos	Parâmetros farmacocinéticos						
		C _{max} (µg/mL)	t _{max} (h)	AUC _{0-t} (µg.h/mL)	AUC _{0-∞} (µg.h/mL)	AUC _{extrap} (%)	K _{el} (h ⁻¹)	t _{1/2el} (h)
Rato 16	AM	1,487	1,000	10,310	31,589	67,400	0,014	48,360
	MDEA	0,101	8,000	0,303	NC	NC	NC	NC
Rato 17	AM	1,270	2,000	12,97	21,373	39,300	0,036	19,040
	MDEA	0,113	12,000	2,059	21,824	90,600	0,005	134,310
Rato 18	AM	0,961	2,000	13,553	18,353	26,200	0,058	11,880
	MDEA	0,144	6,000	2,032	58,221	98,000	0,002	282,350
Rato 19	AM	2,197	1,000	12,122	18,608	34,800	0,038	17,980
	MDEA	ND	ND	NC	NC	NC	NC	NC
Rato 20	AM	1,258	4,000	15,389	19,271	20,100	0,073	9,510
	MDEA	0,162	4,000	1,246	NC	NC	NC	NC
N	AM	5	5	5	5	5	5	5
Média	AM	1,435	2,000	12,869	21,839	37,600	0,044	21,350
DP	AM	0,465	1,225	1,8665	5,5782	18,270	0,022	15,621
Mediana	AM	1,270	2,000	12,970	19,271	34,800	0,038	17,980
CV (%)	AM	32,4	61,2	14,5	25,5	48,6	48,6	73,2

UE, unidade experimental; ND, não determinado; NC, não calculado; C_{max}, concentração máxima; t_{max}, tempo ao qual foi registada a concentração máxima; AUC_{0-t}, área sob a curva entre as 0 horas e as 24 horas; AUC_{0-∞}, área sob a curva entre as 0 horas e ∞; AUC_{extrap}, área sob a curva extrapolada; K_{el}, constante de eliminação; t_{1/2el}, tempo de meia vida de eliminação.

Seguidamente apresentam-se os resultados da análise estatística, à qual foram submetidos os parâmetros farmacocinéticos das tabelas 13 e 14. O teste *t-student* ($p < 0,05$) permitiu determinar a significância estatística da diferença entre os valores do GE/DU e do GC/DU.

Tabela 15: Análise estatística dos parâmetros cinéticos da amiodarona correspondentes ao ensaio em DU. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por *t-student* ($p < 0,05$).

Grupo	Parâmetro	Resultado (p)	Análise estatística ($p < 0,05$)
<u>Ensaio em DU</u> Plasma	C_{max}	0,009	<u>Estatisticamente significativo</u>
	t_{max}	0,458	S.S.
	AUC_{0-t}	0,037	<u>Estatisticamente significativo</u>
	$AUC_{0-\infty}$	0,071	S.S.
	$AUC_{extrapolado}$	0,856	S.S.
	$K_{eliminação}$	0,788	S.S.
	$t_{1/2}$ eliminação	0,488	S.S.
S.S. - sem significado estatístico			

4.1.3 - Análise estatística dos valores das concentrações plasmáticas de amiodarona dos ensaios em DM e em DU

A fim de verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores de concentrações plasmáticas do GE e do GC, para ambos os ensaios (em DM e em DU), procedeu-se à análise destes através da aplicação do teste *t-student* ($p < 0,05$). A tabela abaixo representa os resultados obtidos.

Tabela 16: Análise estatística dos valores de concentração de amiodarona correspondentes aos ensaios em DU e em DM. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por *t-student* ($p < 0,05$).

Tempos (h)	0,25	0,5	1	2	4	6	8	12	24
p (DM)	0,924	0,876	0,424	0,880	0,394	0,719	0,612	0,105	0,281
<i>t-student</i>	S.S.	S.S.	S.S.	S.S.	S.S.	S.S.	S.S.	S.S.	S.S.
p (DU)	0,622	0,667	0,097	0,001	0,018	0,124	0,116	0,390	0,239
<i>t-student</i>	S.S.	S.S.	S.S.	E.S.	E.S.	S.S.	S.S.	S.S.	S.S.
S.S. - sem significado estatístico; E.S. - estatisticamente significativo; h - hora(s); DM - ensaio em dose múltipla; DU - ensaio em dose única									

4.1.4 - Análise da razão entre alguns parâmetros farmacocinéticos do ensaio em DM e do ensaio em DU

De modo a avaliar quais as diferenças entre o GE e o GC dos ensaios realizados (estudo em DM e estudo em DU) procedeu-se à determinação da razão entre GE e GC, para ambos os ensaios. As figuras seguintes demonstram os resultados obtidos, e permitem uma análise crítica dos mesmos.

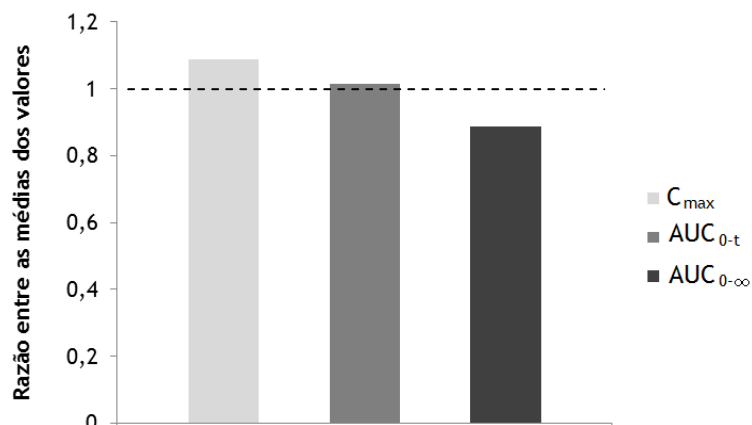


Figura 12: Representação das razões entre os valores médios do GE e do GC, do ensaio em DM, para C_{max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$.

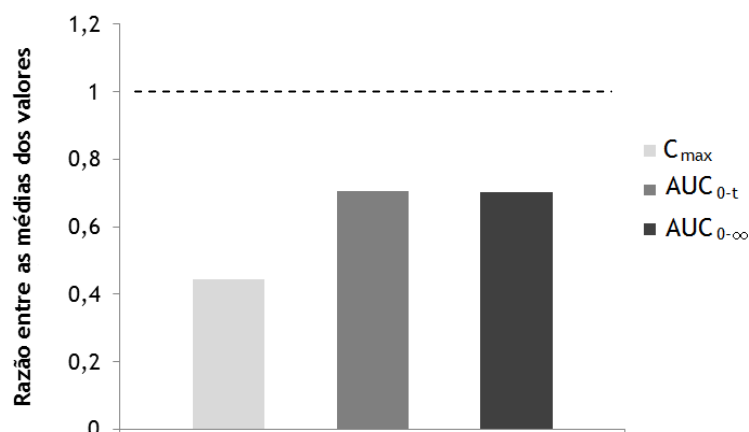


Figura 13: Representação das razões entre os valores médios do GE e do GC, do ensaio em DU, para C_{max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$.

A razão entre os parâmetros médios para a MDEA não foi calculada devido à diminuta quantidade de valores de concentração, e à proximidade destes do limite de quantificação do método de HPLC.

4.2 - Concentrações tecidulares de amiodarona e de mono-*N*-desetilamiodarona, no rato

Foram recolhidos alguns órgãos dos ratos em estudo. O coração é o órgão-alvo da amiodarona, o pulmão é um dos mais afectados pela toxicidade deste fármaco, e o fígado é o principal órgão metabolizador.

Seguidamente apresentam-se as tabelas com os valores de concentração de amiodarona e MDEA, determinados nos diversos órgãos (coração, pulmão e fígado), 24 horas após a administração de uma dose única de fármaco.

4.2.1 - Valores das concentrações de amiodarona e MDEA em tecidos de órgãos de rato, pertencentes aos ensaios em DM e em DU

Tabela 17: Representação dos valores de concentração de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) nos tecidos de órgãos de rato, pertencentes ao estudo GE/DM.

	Coração		Pulmão		Fígado	
	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)
Ratos						
Rato1	2,115	1,061	11,576	10,266	2,817	1,010
Rato2	2,358	1,144	19,618	15,640	2,780	0,880
Rato3	2,658	1,488	22,446	18,387	5,081	1,659
Rato4	3,245	1,466	18,626	13,549	5,023	1,546
Rato5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GE/DM						
N	4	4	4	4	4	4
Média	2,594	1,289	18,067	14,460	3,925	1,274
DP	0,487	0,219	4,620	3,427	1,301	0,386
Mediana	2,508	1,305	19,122	14,594	3,920	1,278
CV (%)	18,8	17,0	25,6	23,7	33,1	30,3

N, número de animais; DP, desvio padrão; CV(%), coeficiente de variação.

Tabela 18: Representação dos valores de concentração de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) nos tecidos de órgãos de rato, pertencentes ao estudo GC/DM.

	Coração		Pulmão		Fígado	
	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)
Ratos						
Rato6	5,863	1,758	35,118	20,988	11,692	1,947
Rato7	3,589	1,470	27,222	20,730	6,516	1,698
Rato8	4,838	1,594	27,504	16,961	7,722	2,320
Rato9	3,102	1,028	20,937	15,742	6,204	1,343
Rato10	1,345	0,702	17,173	14,351	2,276	0,698
GC/DM						
N	5	5	5	5	5	5
Média	3,747	1,311	25,591	17,754	6,882	1,601
DP	1,723	0,435	6,885	2,982	3,378	0,618
Mediana	3,589	1,470	27,222	16,961	6,516	1,698
CV (%)	46,0	33,2	26,9	16,8	49,1	38,6

N, número de animais; DP, desvio padrão; CV(%), coeficiente de variação.

Tabela 19: Representação dos valores de concentração de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) nos tecidos de órgãos de rato, pertencentes ao estudo GE/DU.

	Coração		Pulmão		Fígado	
	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)
Ratos						
Rato11	4,048	1,726	23,665	16,977	6,111	2,138
Rato12	3,946	1,699	32,451	22,752	4,875	1,569
Rato13	6,769	1,649	26,718	15,253	9,945	2,476
Rato14	4,707	2,230	39,593	26,536	6,464	2,272
Rato15	2,663	1,463	22,438	19,697	4,117	1,343
N	5	5	5	5	5	5
Média	4,426	1,753	28,973	20,243	6,302	1,960
DP	1,504	0,286	7,086	4,521	2,244	0,482
Mediana	4,048	1,699	26,718	19,697	6,111	2,138
CV (%)	34,0	16,3	24,5	22,3	35,6	24,6

N, número de animais; DP, desvio padrão; CV(%), coeficiente de variação.

Tabela 20: Representação dos valores de concentração de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) nos tecidos de órgãos de rato, pertencentes ao estudo GC/DU.

	Coração		Pulmão		Fígado	
	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)	AM ($\mu\text{g/g}$)	MDEA ($\mu\text{g/g}$)
Ratos						
Rato16	4,342	1,870	32,686	22,618	6,812	2,235
Rato17	4,795	2,134	33,544	24,839	7,492	2,582
Rato18	4,105	1,541	26,987	16,980	5,952	1,880
Rato19	4,071	1,598	33,598	21,306	6,565	1,852
Rato20	4,273	2,144	31,591	24,410	6,536	2,383
N	5	5	5	5	5	5
Média	4,317	1,857	31,681	22,031	6,671	2,186
DP	0,290	0,285	2,748	3,160	0,557	0,318
Mediana	4,273	1,870	32,686	22,618	6,565	2,235
CV (%)	6,7	15,4	8,7	14,3	8,3	14,5

N, número de animais; DP, desvio padrão; CV(%), coeficiente de variação.

Nos gráficos seguintes comparam-se as concentrações médias de amiodarona e MDEA, nos diferentes órgãos analisados.

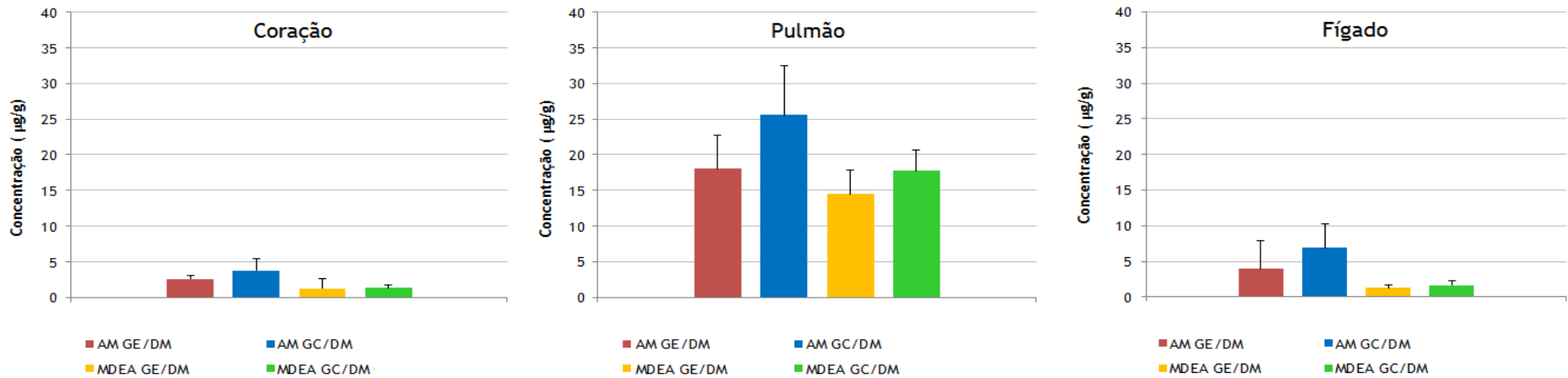


Figura 14: Representação das concentrações de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) obtidas no ensaio em DM, em órgãos de rato. Comparação da concentração dos compostos entre os vários órgãos. GE/DM - grupo de estudo do ensaio em dose múltipla; GC/DM - grupo controlo do ensaio em dose múltipla.

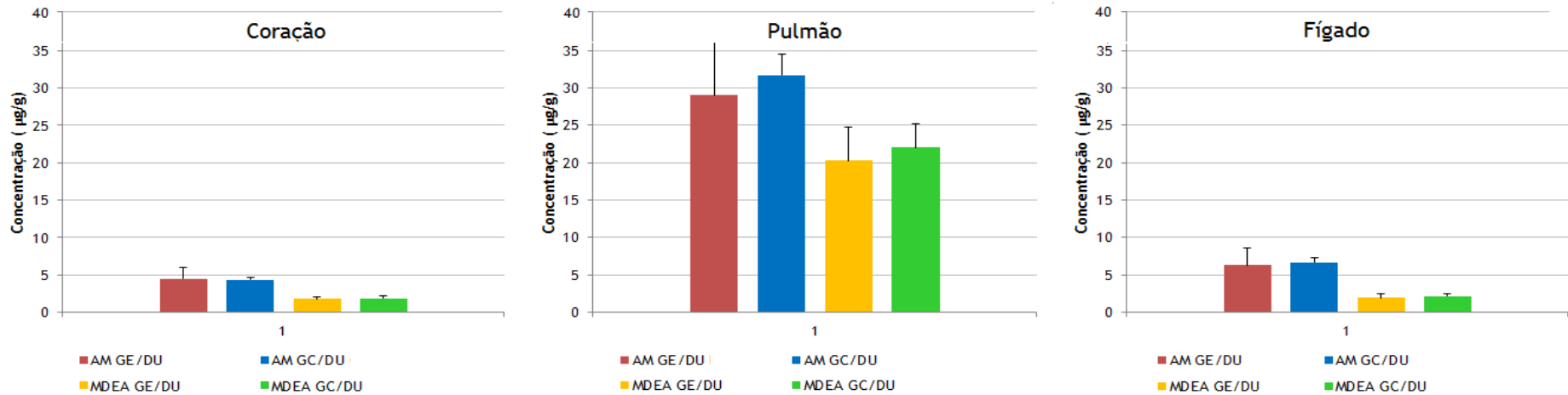


Figura 15: Representação das concentrações de amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) obtidas no ensaio em DU, em órgãos de rato. Comparação da concentração dos compostos entre os vários órgãos. GE/DU - grupo de estudo do ensaio em dose única; GC/DU - grupo controlo do ensaio em dose única.

4.2.2 - Análise estatística dos valores das concentrações de amiodarona e MDEA em tecidos de órgãos de rato, pertencentes aos ensaios em DM e em DU

Nas tabelas seguintes está representada a análise estatística dos valores de concentrações de amiodarona e MDEA, obtidos das amostras de órgãos de rato. Utilizou-se, para tal, o teste *t-student* ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores do GC/DM e os do GE/DM, nem entre os valores do GC/DU e os do GE/DU.

Tabela 21: Análise estatística das concentrações da amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) correspondentes ao ensaio em DM. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por *t-student* ($p < 0,05$).

Grupo	Coração		Pulmão		Fígado	
Composto	AM	MDEA	AM	MDEA	AM	MDEA
Resultado (<i>p</i>)	0,121	0,519	0,136	0,205	0,091	0,122
Sig. estatístico	S.S	S.S	S.S	S.S	S.S	S.S
S.S. - sem significado estatístico						

Tabela 22: Análise estatística das concentrações da amiodarona (AM) e mono-*N*-desetilamiodarona (MDEA) correspondentes ao ensaio em DU. Comparação dos valores do GC e GE através de análise por *t-student* ($p < 0,05$).

Grupo	Coração		Pulmão		Fígado	
Composto	AM	MDEA	AM	MDEA	AM	MDEA
Resultado (<i>p</i>)	0,889	0,671	0,400	0,402	0,772	0,548
Sig. estatístico	S.S	S.S	S.S	S.S	S.S	S.S
S.S. - sem significado estatístico						

Capítulo 5 - Discussão

Os estudos que analisam as interacções planta-fármaco têm sido desenvolvidos há algumas décadas, com o intuito de evidenciar alterações farmacocinéticas e farmacodinâmicas relevantes.

A descoberta de que o hipericão, um suplemento alimentar muito popular, estava implicado em diversas interacções planta-fármaco foi um dos maiores alertas para a necessidade de se proceder ao *screening* de inúmeros produtos de origem botânica [77]. Investigações desenvolvidas nesta área têm demonstrado a existência de interacções potencialmente graves que podem condicionar a saúde dos doentes e a eficácia dos medicamentos [34, 146].

O trabalho desenvolvido nesta dissertação de mestrado pretendeu averiguar qual a possibilidade de existir interacção farmacocinética entre o extracto de uma alga denominada de *Fucus vesiculosus* e a amiodarona, no rato, um animal usado frequentemente em estudos pré-clínicos *in vivo*. Vários foram os fármacos já testados nesta espécie animal, de modo a estudar alguns parâmetros cinéticos que evidenciassem interacções. Contudo, a maioria dos estudos neste âmbito ainda se baseia em ensaios *in vitro* [77]. Apesar dos ensaios *in vitro* serem mais rápidos, seguros e relativamente económicos, têm algumas limitações. Uma delas é a incapacidade de saber quais os compostos que atingem a corrente sanguínea após absorção oral, e qual a concentração destes nos locais de acção; a selecção das moléculas a estudar nos ensaios *in vitro* torna-se, deste modo, bastante complicada. A complexidade de alguns extractos botânicos, em termos fitoquímicos, torna a tarefa de analisar cada componente individualmente, virtualmente impraticável. Outras limitações relacionam-se com o facto de não se saber, *a priori*, quais as enzimas metabolizadoras dos compostos e quais os testes a efectuar *in vitro* [77]. Para além disso, os resultados obtidos *in vitro* nem sempre podem ser extrapolados para o ser humano, necessitando de ensaios *in vivo* para serem confirmados [77]. Neste trabalho, a inexistência de estudos que avaliem a interacção do *Fucus vesiculosus* com a amiodarona, e a falta de informação acerca dos efeitos da alga no organismo humano ou no rato, originou a necessidade de se realizar um estudo *in vivo* em pequena escala, em detrimento um estudo *in vitro*. O rato é facilmente manuseável, está bem estudado em termos fisiológicos e anatómicos, e é usado em diversos estudos *in vivo* envolvendo amiodarona. Como o grupo de trabalho tinha experiência adquirida com este modelo animal e estava autorizado, pela Direcção Geral de Veterinária, a proceder a ensaios no rato, seleccionou-o consensualmente para o estudo. A possibilidade de recolher várias amostras sanguíneas do mesmo animal foi também um factor crucial nesta escolha.

O objectivo dos ensaios foi verificar qual a acção do *Fucus vesiculosus* sobre as concentrações plasmáticas de amiodarona e MDEA, tal como sobre a concentração destes dois elementos nalguns órgãos.

Através da utilização de métodos analíticos de alta precisão aliados aos ensaios *in vivo*, pretendeu-se obter resultados práticos e rigorosos, passíveis de serem extrapolados para o ser humano. Para isso, recorreu-se à análise por HPLC, um método reconhecido pela sua sensibilidade, alta resolução, reprodutibilidade, precisão e capacidade para quantificar simultaneamente diversas substâncias presentes numa amostra biológica [147, 148]. Utilizaram-se técnicas para determinação dos analitos, amiodarona e MDEA, que se adequam às matrizes analisadas neste trabalho (plasma, coração, fígado e pulmão), as quais demonstram limites de quantificação e reprodutibilidade bastante aceitáveis.

Os valores de concentração obtidos para a amiodarona permitem traçar gráficos passíveis de serem interpretados do ponto de vista cinético, em que a variável dependente é a concentração de amiodarona ou de MDEA, e a variável independente é o tempo. A análise semi-logarítmica demonstrou que os valores de concentração plasmática de amiodarona, obtidos das amostras recolhidas, seguiram uma cinética que se aproxima de um processo de primeira ordem, nas condições experimentais consideradas. Tal é evidenciado pela linearidade encontrada no decréscimo das concentrações plasmáticas representadas nos gráficos das figuras 9 e 11 [149].

A fase de distribuição da amiodarona para os tecidos, tal como o metabolismo do fármaco, deverão ser os principais responsáveis pelo declínio de primeira ordem das concentrações plasmáticas, nas primeiras 8 horas. A difusão do fármaco por diversos tecidos do organismo, principalmente o pulmonar, o hepático, o músculo esquelético e o tecido adiposo, faz com que a amiodarona possua um elevado V_D . A disposição do fármaco também contempla processos de eliminação. Contudo, a fracção de fármaco administrado que é eliminada nas primeiras horas deverá ser pequena. O $t_{1/2}$ da amiodarona, no rato, é aproximadamente 32 horas [118], segundo a bibliografia. Nos ensaios realizados, variou entre as 11.5 horas e as 21.3 horas.

A análise dos dados obtidos experimentalmente foi baseada num modelo não-compartmental. Teoricamente, vários modelos podem ser aplicados para descrever os processos cinéticos do fármaco, dependendo da informação que se pretende obter. Para analisar a cinética da amiodarona foram já usados diferentes modelos farmacocinéticos, nomeadamente, os bi e tricompartmental. As vantagens do modelo não-compartmental são a simplicidade, e não ser necessário forçar a integração dos dados obtidos num modelo de análise compartmental, mesmo que estes não se adaptem ao modelo escolhido [150]. O modelo não-compartmental foi utilizado neste trabalho, para que se pudesse avaliar a concentração plasmática do fármaco no rato ao longo de 24h, sem individualizar compartimentos específicos, que poderiam corresponder a órgãos ou tecidos.

A opção da administração do fármaco e do extracto por via oral deveu-se a diversos motivos, nomeadamente, a possibilidade de interacção do *Fucus vesiculosus* e da amiodarona no tracto gastrointestinal. A via oral é, também, a mais utilizada pelos doentes, devido à possibilidade de auto-administração e a diversas comodidades inerentes à forma farmacêutica, tais como, a facilidade de transporte. Contudo está sujeita a diversas

condicionantes. A taxa de absorção dos fármacos varia inter e intraindividualmente, dependendo de vários factores, tais como a velocidade de esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal, a presença de alimentos e a formulação *per se*. Os níveis plasmáticos de amiodarona, neste trabalho, não pareceram ser afectados pela presença de *Fucus vesiculosus* no tracto gastrointestinal. Aos 15 minutos pós-dose registam-se quantidades de amiodarona no plasma de ratos, tanto no GE como no GC de ambos os estudos (tabelas 6, 7, 11 e 12; figuras 8 e 10).

A administração de uma dose de 575 mg/kg de extracto de *Fucus vesiculosus*, durante 14 dias, aos ratos, poderia provocar algumas alterações a nível enzimático e proteico, passíveis de influenciar os perfis cinéticos de amiodarona e MDEA. Os dois mecanismos *major*, envolvidos em interacções com enzimas ou transportadores, são a indução e a inibição. A inibição pode ter como consequência a elevação dos níveis plasmáticos do fármaco, e é passível de ocorrer logo após a administração das primeiras doses do composto inibidor. Mas a indução demora algum tempo a desenvolver-se, devido à necessidade de síntese de proteínas ou enzimas. Assim, a indução apenas pode ser verificada no ensaio em dose múltipla, já que é o único em que o extracto de *Fucus vesiculosus* é administrado regularmente, durante um período de 14 dias. A observação de alterações cinéticas entre o grupo de estudo e o grupo controlo, do ensaio em dose múltipla, pode indicar, deste modo, tanto alterações cinéticas devido a indução, como a inibição. A análise dos resultados do estudo de dose múltipla demonstrou semelhanças entre as concentrações plasmáticas do grupo de estudo e do grupo controlo, como se verifica nas figuras 8 e 9. Posteriormente procedeu-se à verificação dos valores obtidos para a razão entre GE e GC, apresentados na figura 12. O valor correspondente à unidade determina que os parâmetros para GC sejam iguais aos do GE. A obtenção de uma razão entre GE e GC menor que 1 indica que os valores obtidos para GC são maiores que os de GE. Através do teste *t-student* ($p < 0,05$) não foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores plasmáticos obtidos para os grupos GC/DM e GE/DM (tabela 10). A análise das razões GE/GC para o estudo de dose múltipla demonstrou que tanto a AUC_{0-t} como a $AUC_{0-\infty}$ para a amiodarona não foram significativamente alteradas pela administração do extracto. Os valores de C_{max} registados também são idênticos, o que indica a possível ausência de mecanismos indutores que diminuam os valores destes parâmetros. Tais factos poderão indicar que o *Fucus vesiculosus* não altera expressivamente as concentrações plasmáticas de amiodarona, ao longo das 24 horas do estudo. Sugere-se, então, uma fraca capacidade por parte dos componentes da alga, para modificar processos enzimáticos ou a quantidade e eficiência de transportadores.

A hipótese de o extracto de *Fucus vesiculosus*, administrado em dose única, provocar efeitos inibitórios enzimáticos, passíveis de afectar as concentrações plasmáticas de amiodarona, foi considerada não só no ensaio em DM, mas também no de DU. A acção directa sobre as enzimas e transportadores, através de um mecanismo competitivo é plausível e desenvolver-se-ia rapidamente, traduzindo-se em valores plasmáticos mais elevados de amiodarona e MDEA. Tal não acontece no estudo em dose única, que contempla a

administração concomitante de extracto de *Fucus vesiculosus* e amiodarona. Os resultados do ensaio em DU demonstram alterações significativas nos perfis plasmáticos do fármaco, entre o GC e o respectivo GE, com ocorrência de diminuição da concentração de amiodarona no plasma (figuras 10 e 11). De modo a averiguar qual o significado estatístico das diferenças registadas entre o GC e o GE, sujeitaram-se os valores de concentração plasmática de amiodarona do estudo em DU (tabelas 11 e 12) a um teste *t-student* ($p < 0,05$) (tabela 16). Assim, verificou-se que, aos tempos $t=2,0h$ e $t=4,0h$, a probabilidade de os valores das concentrações plasmáticas de amiodarona serem diferentes é de 95%. Para além de se registarem alterações pontuais nas concentrações plasmáticas de fármaco, foram também analisadas as alterações provocadas noutros parâmetros farmacocinéticos. As figuras 12 e 13 demonstram as razões calculadas para os valores médios de C_{max} , AUC_{0-t} e $AUC_{0-\infty}$, entre os GC e GE de ambos os estudos. Através da análise do gráfico, considera-se que o extracto de *Fucus vesiculosus* provocou maiores alterações nos parâmetros farmacocinéticos do ensaio em DU do que nos do ensaio em DM; os valores obtidos para o GC são sempre superiores aos do GE. De modo a validar tais afirmações, submetem-se os valores em análise a um teste *t-student* ($p < 0,05$). Pode-se, através dos resultados obtidos no teste, afirmar que a probabilidade de os valores de C_{max} e AUC_{0-t} do GC e GE serem diferentes é de 95% (tabelas 10 e 15). Assim, é possível assegurar que, para além do extracto de *Fucus vesiculosus* poder alterar pontualmente as concentrações plasmáticas de amiodarona, nomeadamente nas primeiras horas pós-dose, também altera a quantidade de amiodarona presente no organismo, já que modifica significativamente os valores de AUC_{0-t} .

Estando afastada a possibilidade da alteração nos valores plasmáticos de amiodarona, provocada pelo *Fucus vesiculosus*, ser derivada de uma acção sobre enzimas ou transportadores, procurou-se justificar tais alterações nos perfis cinéticos. Estas poderão advir de interacções físico-químicas a nível do tracto gastrointestinal. Uma hipótese provável será baseada na acção das fibras dietéticas de *Fucus vesiculosus* sobre a amiodarona. O conteúdo em fibras dietéticas desta alga demonstrou ser elevado. Diaz-Rúbio et al [74] refere valores de 59% no extracto seco bruto de *Fucus vesiculosus*. Estas fibras são responsáveis por diversos efeitos fisiológicos, nomeadamente a nível do metabolismo do colesterol, devido à capacidade dos polissacáridos o reterem no tracto gastrointestinal. Outros efeitos são a retenção de água no intestino, inerente à capacidade retentiva de água das fibras, e o aumento do volume fecal [95]. Alguns destes efeitos não são específicos das fibras do *Fucus vesiculosus*, e podem ser observados após a ingestão de trigo, cevada e maçã, contudo nenhum possui uma percentagem de fibras tão elevada como o *Fucus vesiculosus* [74]. As alterações que podem provocar nos processos absorptivos já foram alvo de estudo por diversas ocasiões. Alguns casos demonstraram que as fibras diminuem a absorção de medicamentos, tais como o lítio, antidepressivos tricíclicos e carbamazepina [73]. Os resultados obtidos no GE/DU demonstram alterações nos perfis cinéticos de amiodarona que poderão também estar relacionadas com o elevado conteúdo em fibras da alga. Uma análise das tabelas 11 e 12 demonstra que, para todos os ratos do GE/DU, aos quais foi administrado *Fucus vesiculosus*

concomitantemente com amiodarona, houve uma diminuição da absorção do fármaco em comparação com o GC/DU. Alguns estudos indicam que as fibras vegetais não alteram a velocidade do trânsito gastrointestinal, mais um facto que reforça a possibilidade de serem estas as interactuantes e responsáveis pela alteração nos perfis cinéticos de amiodarona [151].

Na bibliografia ainda não foram descritas interacções entre o *Fucus vesiculosus* e outros fármacos, pelo que o mecanismo apresentado é hipotético e necessita de ser comprovado através de mais estudos.

As concentrações de MDEA situaram-se próximas do limite de quantificação do método de HPLC, durante o período de 24 horas, tanto para o ensaio em DM como em DU. Não é possível, assim, avaliar a ocorrência de variações cinéticas entre o GC/DM e o GE/DM ou o GC/DU e o GE/DU. Contudo, verifica-se que a amiodarona foi metabolizada ao seu principal metabolito, MDEA, tal como é descrito na bibliografia [104, 105, 112].

Após a análise dos valores de concentração plasmática, discutir-se-ão os de amiodarona e MDEA em órgãos de rato.

Vários estudos indicam o pulmão como o local onde a amiodarona se acumula em maior extensão [107, 115, 117, 122]. Esta afirmação é concordante com o obtido experimentalmente neste trabalho (figuras 14 e 15). A média das concentrações de amiodarona no pulmão, tanto no estudo em DM como em DU foram bastante superiores àquelas obtidas tanto para plasma, como para o coração ou o fígado. Não foram registadas diferenças significativas através do teste *t-student* ($p < 0,05$) entre os GE/DM e GC/DM ou os GC/DU e GE/DU, quando foram consideradas as concentrações de amiodarona e MDEA no pulmão (tabelas 21 e 22).

Camus et al [132], através de estudos realizados em pulmão de rato, registou a ausência de metabolismo de amiodarona neste órgão. O aumento das concentrações de amiodarona a que o pulmão é exposto, não limita o processo de captura do fármaco pelo tecido pulmonar. Seki et al [152] refere que a acumulação de MDEA no pulmão é maior do que a de amiodarona, podendo atingir valores cinco vezes superiores ao do fármaco. O pulmão tem uma capacidade captativa de MDEA, a partir do meio circundante ao tecido pulmonar, ainda maior que para a amiodarona [132]. Para além deste facto, a MDEA é mais citotóxica que a amiodarona, sobre as células pulmonares, e também não é metabolizada [132, 152].

É possível que o extracto de *Fucus vesiculosus* não afecte os níveis de amiodarona ou MDEA no pulmão, mas tal deverá ser confirmado através de um estudo com maior número de unidades experimentais, e mais amostras recolhidas. Aconselha-se também a realização de testes histológicos de modo a averiguar qual a influência dos componentes do extracto de *Fucus vesiculosus* sobre a toxicidade celular da amiodarona.

A hepatotoxicidade decorrente da administração de amiodarona ocorre em cerca de 6 por cada 1000 doentes. Apesar da percentagem ser diminuta, este fenómeno pode provocar a morte. O *Fucus vesiculosus* não demonstrou afectar as concentrações de amiodarona ou MDEA

no tecido hepático (tabelas 21 e 22; figuras 15 e 16). Poder-se-á avaliar a acção do extracto de *Fucus vesiculosus* sobre a capacidade metabolizadora do fígado (transformação de amiodarona e MDEA) mas, para atingir tal objectivo, será necessário desenhar um estudo de algumas semanas, com recolha de amostras sanguíneas durante vários dias consecutivos.

O coração é o órgão-alvo da amiodarona e da MDEA. Alterações, nos níveis de fármaco ou do seu metabolito activo nos tecidos cardíacos, poderão comprometer as propriedades farmacológicas da amiodarona. A análise estatística das concentrações de amiodarona e MDEA no coração não identificou diferenças significativas, através do teste *t-student* ($p < 0,05$), entre os GC e GE de ambos os estudos (tabelas 21 e 22). Assim, apesar de haver uma diminuição da concentração plasmática de amiodarona, devido à administração concomitante de *Fucus vesiculosus* com o fármaco, este procedimento não parece afectar os níveis cardíacos de amiodarona, e poderá não comprometer a acção farmacológica do fármaco.

Adicionalmente, analisou-se a variação da massa corporal dos ratos pertencentes ao ensaio em DM. Esta não parece demonstrar alterações significativas entre o GC e o GE desse mesmo ensaio (figura 18 - anexos). Contudo, o intervalo de tempo considerado (15 dias) não é o mais indicado para perceber alterações na massa corporal dos ratos, já que tal medição não foi um objectivo do estudo. Um procedimento experimental que contemplasse várias semanas seria o ideal se se pretendesse medir o efeito do extracto de *Fucus vesiculosus* sobre a massa corporal do rato.

O estudo realizado teve diversas limitações:

- O número de animais em cada grupo de estudo foi reduzido e, deste modo, a variabilidade interindividual afectou bastante os resultados, com elevados desvios-padrão registados. Contudo, este trabalho pretendeu ser um *screening*, pelo que não se justificou sacrificar um maior número de animais nesta fase inicial.
- Os estudos foram realizados apenas com uma dose de extracto. A comparação do efeito de diversas doses de extracto sobre as concentrações de amiodarona, a nível plasmático e dos tecidos, também poderia ser analisada, nos ratos.
- O rato é um modelo animal usado regularmente em estudos pré-clínicos *in vivo* mas não possui um organismo totalmente idêntico ao humano. Assim, apesar de os resultados obtidos demonstrarem alterações nos perfis farmacocinéticos de amiodarona no rato, tal não deverá ser extrapolado directamente para o ser humano.
- A amiodarona possui um $t_{1/2}$ elevado, que poderá ultrapassar as 24 h. Um estudo limitado a 1 dia não permite analisar todo o perfil cinético da amiodarona no organismo do rato.
- Um estudo em dose múltipla, cuja administração de amiodarona fosse concomitante com a de extracto de *Fucus vesiculosus*, permitiria averiguar qual o efeito do extracto nas concentrações de amiodarona, plasmáticas e a nível dos tecidos, ao longo de um determinado período de tempo. Tal é sugerido porque a amiodarona é um fármaco que pode ser administrado durante vários meses a um doente, que

poderá também ingerir *Fucus vesiculosus* no mesmo período de tempo. Devido ao seu elevado V_D e ao $t_{1/2}$, apenas atinge concentrações de *steady state* após várias semanas de administração, altura favorável para analisar as alterações provocadas pelo extracto nas concentrações plasmáticas e teciduais de amiodarona e MDEA.

De forma a averiguar qual o mecanismo implicado nas alterações registadas nos perfis farmacocinéticos plasmáticos de amiodarona, será necessário proceder a novos estudos, direccionados para os processos de absorção. A investigação do efeito das fibras de *Fucus vesiculosus* sobre a amiodarona permitirá perceber se são estas as responsáveis pelas alterações registadas na quantidade de amiodarona circulante no plasma. Se tal ocorrer, a amiodarona poderá não ser a única a ser afectada, e estudos com outros fármacos deverão ser realizados.

Capítulo 6 - Conclusão

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação de mestrado enquadra-se numa linha de investigação que se tem desenvolvido no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), em parceria com o Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, com a finalidade de evidenciar potenciais interacções farmacocinéticas entre algumas plantas e fármacos de margem terapêutica estreita. Durante a execução do trabalho experimental foi possível aplicar e testar técnicas desenvolvidas pelo grupo de trabalho, facto que demonstrou ser uma mais-valia para o desenvolvimento da dissertação.

Vários autores têm referido que é necessário estudar cautelosamente as propriedades das plantas utilizadas em suplementos alimentares, de modo a evitar que estas causem toxicidade ou efeitos indesejados no ser humano. O tema abordado na dissertação pretende contribuir para o aumento do conhecimento científico acerca dos suplementos alimentares à base de plantas e os seus efeitos sobre outros medicamentos de margem terapêutica estreita, estudando as interacções farmacocinéticas entre o extracto de *Fucus vesiculosus* e a amiodarona.

Os resultados obtidos demonstraram que o *Fucus vesiculosus* altera alguns parâmetros cinéticos da amiodarona, quando administrado concomitantemente com o fármaco, por via oral. Regista-se um decréscimo estatisticamente significativo na C_{max} e da AUC_{0-t} para a amiodarona, em plasma de rato, quando o *Fucus vesiculosus* é administrado concomitantemente com este fármaco. Hipotetiza-se que tal ocorrência poderá decorrer do grande conteúdo em fibras que o *Fucus vesiculosus* apresenta, e que impedem a absorção de uma parte do fármaco a partir do tracto gastrointestinal, mas estudos posteriores são necessários para confirmar o mecanismo associado à diminuição das concentrações plasmáticas. Contudo, a diminuição das concentrações plasmáticas de fármaco não parece afectar a concentração de amiodarona no local de acção, os tecidos cardíacos.

Bibliografia

1. Avello, L.M. and F.I. Cisternas, *[Origins and situation of phytotherapy in Chile]*. Rev Med Chil, 2010. **138**(10): p. 1288-93.
2. Righetti, G., *Civilizações Fluviais*, in *Grande História Universal*, A.M. Editori, Editor. 2000: Milan. p. 30, 31.
3. Dias, J.P.S. *Sociedades urbanas arcaicas*. [cited 2011 09-05]; Available from: <http://www.ff.ul.pt/paginas/jpsdias/Farmacia-e-Historia/node15.html>.
4. Crosher, J., *Ancient Egypt. A História por dentro*, ed. J. Good. 1992: Reed International Books.
5. Barroso, M.d.S., *A mulher e a medicina magico-religiosa, no Antigo Egipto*, in *Medicina na Beira Interior - Da Pré-História ao Século XXI*. 2007: Castelo Branco.
6. U.S.N.L.M. *Dioscorides: Early Pharmacology*. [History] 2009 14-01-2009 [cited 2011 07-05]; Available from: http://www.nlm.nih.gov/hmd/greek/greek_dioscorides.html.
7. Comailian, M. *Avicenna*. [cited 2011 07-05]; Available from: <http://www.sjsu.edu/depts/Museum/avicen.html>.
8. Falsetto, S. *The Use of Plants in Medicine by Avicenna - Importance of Ib'n Sina and His Contribution to the Medicinal World*. 2009 13-06-2009 [cited 2011 07-05]; Available from: <http://www.suite101.com/content/the-use-of-plants-in-medicine-by-avicenna-a131701>.
9. Ioannides, C., *Pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs*. *Xenobiotica*, 2002. **32**(6): p. 451-78.
10. Morton, D. *10 Excruciating Medical Treatments from the Middle Ages*. 2009 28-03-2009 [cited 2011 08-16]; Available from: http://www.oddee.com/item_96620.aspx.
11. Ang-Lee, M.K., J. Moss, and C.S. Yuan, *Herbal medicines and perioperative care*. *JAMA*, 2001. **286**(2): p. 208-16.
12. Roby, C.A., et al., *St John's Wort: effect on CYP3A4 activity*. *Clin Pharmacol Ther*, 2000. **67**(5): p. 451-7.
13. Canada, H. *About Natural Health Products*. 2011 14-02-2011 [cited 201 08]; Available from: <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodnatur/about-apropos/cons-eng.php>.
14. OMS, O.M.d.S., *WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. 2002. 74.
15. Sim, S.N. and M.A. Levine, *An evaluation of pharmacist and health food store retailer's knowledge regarding potential drug interactions associated with St. John's wort*. *Can J Clin Pharmacol*, 2010. **17**(1): p. e57-63.

16. Shetti, S., et al., *Pharmacovigilance of herbal medicines: Current state and future directions*. Pharmacogn Mag, 2011. **7**(25): p. 69-73.
17. Rodriguez-Rodriguez, E., et al., *[Body weight perception and dieting behaviour in Spanish population]*. Nutr Hosp, 2009. **24**(5): p. 580-7.
18. Espin, J.C., M.T. Garcia-Conesa, and F.A. Tomas-Barberan, *Nutraceuticals: facts and fiction*. Phytochemistry, 2007. **68**(22-24): p. 2986-3008.
19. Perez, E.A., et al., *Four-Year Follow-Up of Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Operable Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Joint Analysis of Data From NCCTG N9831 and NSABP B-31*. J Clin Oncol, 2011.
20. Markman, M., *Docetaxel plus trabectedin appears active in recurrent or persistent ovarian and primary peritoneal cancer after up to three prior regimes: A phase II study of the Gynecologic Oncology Group*. Gynecol Oncol, 2011. **122**(2): p. 462.
21. Baker, S.D., A. Sparreboom, and J. Verweij, *Clinical pharmacokinetics of docetaxel : recent developments*. Clin Pharmacokinet, 2006. **45**(3): p. 235-52.
22. Clarke, S.J. and L.P. Rivory, *Clinical pharmacokinetics of docetaxel*. Clin Pharmacokinet, 1999. **36**(2): p. 99-114.
23. Morike, K. and C.H. Gleiter, *[Phytotherapeutic medicines. A possible source of drug interactions]*. Internist (Berl), 2003. **44**(6): p. 748-52.
24. Thakor, V., et al., *The quality of information on websites selling St. John's wort*. Complement Ther Med, 2011. **19**(3): p. 155-60.
25. Firenzuoli, F., et al., *[Herbs on the Internet: risky information]*. Recenti Prog Med, 2006. **97**(4): p. 189-92.
26. Chitturi, S. and G.C. Farrell, *Herbal hepatotoxicity: an expanding but poorly defined problem*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(10): p. 1093-9.
27. Radulovic, N.S., et al., *Misidentification of tansy, Tanacetum macrophyllum, as yarrow, Achillea grandifolia: a health risk or benefit?* Nat Prod Commun, 2010. **5**(1): p. 121-7.
28. Ernst, E., *Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review*. J Intern Med, 2002. **252**(2): p. 107-13.
29. Chen, Y., et al., *Determination of synthetic drugs used to adulterate botanical dietary supplements using QTRAP LC-MS/MS*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2009. **26**(5): p. 595-603.
30. OMS, O.M.d.S. *Fact Sheet nº 134*. 2008 [cited 2011 17 Julho]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>.
31. EMA, E.M.A. *Herbal medicinal products*. [cited 2011 18 Julho]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_c

ontent_000208.jsp&murl=menus/regulations/regulations.jsp&mid=WC0b01ac05800240cf&jsenabled=true.

32. EMA, E.M.A. *Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)*. [cited 2011 17 Julho]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000264.jsp&murl=menus/about_us/about_us.jsp&mid=WC0b01ac0580028e7c.
33. EMA, E.M.A. *Action Plan for Herbal Medicines 2010-2011*. 2010 [cited 2011 18 Julho]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2010/06/WC500093179.pdf.
34. Henderson, L., et al., *St John's wort (Hypericum perforatum): drug interactions and clinical outcomes*. Br J Clin Pharmacol, 2002. **54**(4): p. 349-56.
35. A. Proença da Cunha, O.R., *Hiperião*, in *Plantas Medicinais da Farmacopeia Portuguesa*. 2008, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa.
36. A. Proença da Cunha, O.R., *Sene*, in *Plantas Medicinais da Farmacopeia Portuguesa*. 2008, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa.
37. Schulman, S., *Addressing the potential risks associated with ephedra use: a review of recent efforts*. Public Health Rep, 2003. **118**(6): p. 487-92.
38. Inchiosa, M.A., *Experience (mostly negative) with the use of sympathomimetic agents for weight loss*. J Obes, 2011. **2011**.
39. Lillegard, J.B. and J.R. Porterfield Jr, *Ephedra-Induced Gastric Mucosal Injury*. Case Rep Gastroenterol, 2010. **4**(1): p. 79-83.
40. Mussig, K., et al., *Iodine-induced thyrotoxicosis after ingestion of kelp-containing tea*. J Gen Intern Med, 2006. **21**(6): p. C11-4.
41. Diaconu, C.H., et al., *Food-drug interactions: grapefruit juice*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2011. **115**(1): p. 245-50.
42. Dahan, A. and H. Altman, *Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability--mechanism, extent and relevance*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(1): p. 1-9.
43. Abdul, M.I., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of echinacea and policosanol with warfarin in healthy subjects*. Br J Clin Pharmacol, 2010. **69**(5): p. 508-15.
44. Mohammed Abdul, M.I., et al., *Pharmacodynamic interaction of warfarin with cranberry but not with garlic in healthy subjects*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(8): p. 1691-700.
45. Robertson, S.M., et al., *Effect of Ginkgo biloba extract on lopinavir, midazolam and fexofenadine pharmacokinetics in healthy subjects*. Curr Med Res Opin, 2008. **24**(2): p. 591-9.

46. Ho, B.E., et al., *Effects of Garlic on Cytochromes P450 2C9- and 3A4-Mediated Drug Metabolism in Human Hepatocytes*. *Sci Pharm*, 2010. **78**(3): p. 473-81.
47. Berginc, K. and A. Kristl, *The Mechanisms Responsible for Garlic - Drug Interactions and Their in vivo Relevance*. *Curr Drug Metab*, 2011.
48. Pfrunder, A., et al., *Interaction of St John's wort with low-dose oral contraceptive therapy: a randomized controlled trial*. *Br J Clin Pharmacol*, 2003. **56**(6): p. 683-90.
49. Murphy, P.A., et al., *Interaction of St. John's Wort with oral contraceptives: effects on the pharmacokinetics of norethindrone and ethinyl estradiol, ovarian activity and breakthrough bleeding*. *Contraception*, 2005. **71**(6): p. 402-8.
50. Fogle, R.H., et al., *Does St. John's wort interfere with the antiandrogenic effect of oral contraceptive pills?* *Contraception*, 2006. **74**(3): p. 245-8.
51. Tsen, L.C., et al., *Alternative medicine use in presurgical patients*. *Anesthesiology*, 2000. **93**(1): p. 148-51.
52. Kaye, A.D., et al., *Herbal medicines: current trends in anesthesiology practice--a hospital survey*. *J Clin Anesth*, 2000. **12**(6): p. 468-71.
53. Muedra, V. and L. Moreno, *[Knowledge of perioperative risk associated with use of medicinal plants]*. *Rev Esp Anestesiol Reanim*, 2009. **56**(8): p. 467-73.
54. Sim, K., et al., *Psychosocial and coping responses within the community health care setting towards a national outbreak of an infectious disease*. *J Psychosom Res*, 2010. **68**(2): p. 195-202.
55. Rosenthal, D.S. and E. Dean-Clower, *Integrative medicine in hematology/oncology: benefits, ethical considerations, and controversies*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 491-7.
56. U.S.D.H.H.S., *Guidance for Industry - In Vivo Drug Metabolism/Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, and Recommendations for Dosing and Labeling* U.S.D.o.H.a.H. Services, Editor. 1999, Food and Drug Administration.
57. Darwich, A.S., et al., *Interplay of metabolism and transport in determining oral drug absorption and gut wall metabolism: a simulation assessment using the "Advanced Dissolution, Absorption, Metabolism (ADAM)" model*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(9): p. 716-29.
58. Varma, M.V., et al., *Targeting intestinal transporters for optimizing oral drug absorption*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(9): p. 730-42.
59. Won, C.S., N.H. Oberlies, and M.F. Paine, *Influence of dietary substances on intestinal drug metabolism and transport*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(9): p. 778-92.
60. H.P. Rang, M.M.D., J.M. Ritter, R.J.Flower, *Rang & Dale - Farmacologia*. 6ª ed. 2008: Elsevier Editora Lda.

61. Wang, J.F. and K.C. Chou, *Molecular modeling of cytochrome P450 and drug metabolism*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(4): p. 342-6.
62. Spina, E., V. Santoro, and C. D'Arrigo, *Clinically relevant pharmacokinetic drug interactions with second-generation antidepressants: an update*. *Clin Ther*, 2008. **30**(7): p. 1206-27.
63. Florek, E., J. Enko, and W. Piekoszewski, [*Cigarette and coffee--pharmacokinetics interaction between nicotine and caffeine*]. *Przeegl Lek*, 2009. **66**(10): p. 866-8.
64. Huttunen, K.M., H. Raunio, and J. Rautio, *Prodrugs--from Serendipity to Rational Design*. *Pharmacol Rev*, 2011.
65. Niemi, M., M.K. Pasanen, and P.J. Neuvonen, *Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake*. *Pharmacol Rev*, 2011. **63**(1): p. 157-81.
66. Zhou, S., L.Y. Lim, and B. Chowbay, *Herbal modulation of P-glycoprotein*. *Drug Metab Rev*, 2004. **36**(1): p. 57-104.
67. Molnar, J., et al., *Reversal of multidrug resistance by natural substances from plants*. *Curr Top Med Chem*, 2010. **10**(17): p. 1757-68.
68. Hellum, B.H., et al., *Potent in vitro inhibition of CYP3A4 and P-glycoprotein by Rhodiola rosea*. *Planta Med*, 2010. **76**(4): p. 331-8.
69. Kumar, Y.S., et al., *P-Glycoprotein- and cytochrome P-450-mediated herbal drug interactions*. *Drug Metabol Drug Interact*, 2010. **25**(1-4): p. 3-16.
70. Lynch, T. and A. Price, *The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects*. *Am Fam Physician*, 2007. **76**(3): p. 391-6.
71. Parys, S., et al., *In vitro chemopreventive potential of fucophloretols from the brown alga Fucus vesiculosus L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes*. *Phytochemistry*, 2010. **71**(2-3): p. 221-9.
72. Colalto, C., *Herbal interactions on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment*. *Pharmacol Res*, 2010. **62**(3): p. 207-27.
73. Gonzalez Canga, A., et al., *Dietary fiber and its interaction with drugs*. *Nutr Hosp*, 2010. **25**(4): p. 535-9.
74. Diaz-Rubio, M.E., J. Perez-Jimenez, and F. Saura-Calixto, *Dietary fiber and antioxidant capacity in Fucus vesiculosus products*. *Int J Food Sci Nutr*, 2009. **60** Suppl 2: p. 23-34.
75. Zhang, L., et al., *Predicting drug-drug interactions: an FDA perspective*. *AAPS J*, 2009. **11**(2): p. 300-6.
76. Chiavolini, D., G. Pozzi, and S. Ricci, *Animal models of Streptococcus pneumoniae disease*. *Clin Microbiol Rev*, 2008. **21**(4): p. 666-85.

77. Markowitz, J.S., L.L. von Moltke, and J.L. Donovan, *Predicting interactions between conventional medications and botanical products on the basis of in vitro investigations*. Mol Nutr Food Res, 2008. **52**(7): p. 747-54.
78. Fuksa, L., et al., *Amiodarone modulates pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rats*. Biopharm Drug Dispos, 2008. **29**(5): p. 289-99.
79. Gupta, S., *Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery*. Indian J Med Res, 2011. **133**: p. 27-39.
80. Singh, S.S., *Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(2): p. 165-82.
81. Coyer, J.A., et al., *Evolution and diversification within the intertidal brown macroalgae *Fucus spiralis*/*F. vesiculosus* species complex in the North Atlantic*. Mol Phylogenet Evol, 2011. **58**(2): p. 283-96.
82. Cairrao, E., et al., *Glutathione-S-transferase activity of *Fucus* spp. as a biomarker of environmental contamination*. Aquat Toxicol, 2004. **70**(4): p. 277-86.
83. Infopédia. *Dioico*. 2011 [cited 2011 08-17]; Available from: <http://www.infopedia.pt/lingua-portuguesa-ao/dioico>.
84. Pronça da Cunha, O.R., *Bodelha*, in *Plantas Mediciniais da Farmacopeia Portuguesa*, F.C. Gulbenkian, Editor. 2008: Lisboa. p. 161-164.
85. *Fucus vesiculosus*. [cited 2011 19-9]; Available from: http://pt.wikipedia.org/wiki/Fucus_vesiculosus.
86. EmbraFarma. *Fucus*. [cited 2011 07-05-2011].
87. MedlinePlus. *Bladderwrack*. 2011 07-01-2011 [cited 2011 19-09]; Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/726.html>.
88. HerbsGuide. *Seawrack*. [cited 2011 19-09]; Available from: <http://www.herbsguide.net/seawrack.html>.
89. Skibola, C.F., *The effect of *Fucus vesiculosus*, an edible brown seaweed, upon menstrual cycle length and hormonal status in three pre-menopausal women: a case report*. BMC Complement Altern Med, 2004. **4**: p. 10.
90. Schmidgall, J., E. Schnetz, and A. Hensel, *Evidence for bioadhesive effects of polysaccharides and polysaccharide-containing herbs in an ex vivo bioadhesion assay on buccal membranes*. Planta Med, 2000. **66**(1): p. 48-53.
91. Fujimura, T., et al., *Fuoidan is the active component of *fucus vesiculosus* that promotes contraction of fibroblast-populated collagen gels*. Biol Pharm Bull, 2000. **23**(10): p. 1180-4.
92. Fujimura, T., et al., *Treatment of human skin with an extract of *Fucus vesiculosus* changes its thickness and mechanical properties*. J Cosmet Sci, 2002. **53**(1): p. 1-9.

93. Fonseca de Oliveira, J., et al., *Assessment of the effect of Fucus vesiculosus extract on the labeling of blood constituents with technetium-99m and the histological modifications on the shape of the red blood cells*. Food Chem Toxicol, 2003. **41**(1): p. 15-20.
94. Ara, J., et al., *Hypolipidaemic activity of seaweed from Karachi coast*. Phytother Res, 2002. **16**(5): p. 479-83.
95. Jiménez-Escrig A, S.-M.F., *Dietary fibre from ediblenext term seaweeds: Chemical previous termstructure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolismnext term*. Nutrition Research, 2000. **20**(4): p. 585-598.
96. Schaeffer, D.J. and V.S. Krylov, *Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria*. Ecotoxicol Environ Saf, 2000. **45**(3): p. 208-27.
97. Luscher-Mattli, M., *Polyanions--a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases?* Antivir Chem Chemother, 2000. **11**(4): p. 249-59.
98. BemStar. *Fucus*. [cited 2011 16 Julho]; Available from: http://bemstar.globo.com/index.php?modulo=fitoterapia_planta&type=7&url_id=2446.
99. *Plantas Medicinais*. [cited 2011 16 Julho]; Available from: <http://plantas-mediciniais.net/ervas-mediciniais-f-g-h.html>.
100. Moro, C.O. and G. Basile, *Obesity and medicinal plants*. Fitoterapia, 2000. **71** Suppl 1: p. S73-82.
101. Van Herendael, H. and P. Dorian, *Amiodarone for the treatment and prevention of ventricular fibrillation and ventricular tachycardia*. Vasc Health Risk Manag, 2010. **6**: p. 465-72.
102. PubChem. *Amiodarone*. 2011 [cited 2011 08-17]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound?term=Amiodarone>.
103. Waldhauser, K.M., et al., *Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **319**(3): p. 1413-23.
104. Han, T.S., G.R. Williams, and M.P. Vanderpump, *Benzofuran derivatives and the thyroid*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **70**(1): p. 2-13.
105. Quaglino, D., et al., *Effects of metabolites and analogs of amiodarone on alveolar macrophages: structure-activity relationship*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(2): p. L438-47.
106. Campos, M.V., *[Amiodarone effects on thyroid--current concepts]*. Acta Med Port, 2004. **17**(3): p. 241-6.
107. Haffajee, C.I., *Clinical pharmacokinetics of amiodarone*. Clin Cardiol, 1987. **10**(7 Suppl 1): p. 16-9.

108. Holt, D.W., et al., *Amiodarone pharmacokinetics*. Am Heart J, 1983. **106**(4 Pt 2): p. 840-7.
109. Pollak, P.T., T. Bouillon, and S.L. Shafer, *Population pharmacokinetics of long-term oral amiodarone therapy*. Clin Pharmacol Ther, 2000. **67**(6): p. 642-52.
110. Freedman, M.D. and J.C. Somberg, *Pharmacology and pharmacokinetics of amiodarone*. J Clin Pharmacol, 1991. **31**(11): p. 1061-9.
111. Deng, P., et al., *Identification of amiodarone metabolites in human bile by ultraperformance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. Drug Metab Dispos, 2011. **39**(6): p. 1058-69.
112. Ha, H.R., et al., *Identification and quantitation of novel metabolites of amiodarone in plasma of treated patients*. Eur J Pharm Sci, 2005. **24**(4): p. 271-9.
113. Gassanov, N., et al., *[Amiodarone-induced liver dysfunctions]*. Dtsch Med Wochenschr, 2010. **135**(27): p. 1372-4.
114. Shiga, T., et al., *Pharmacokinetics of intravenous amiodarone and its electrocardiographic effects on healthy Japanese subjects*. Heart Vessels, 2011. **26**(3): p. 274-81.
115. Plomp, T.A., et al., *Pharmacokinetics and body distribution of amiodarone in man*. Arzneimittelforschung, 1984. **34**(4): p. 513-20.
116. Gaete, L.E., et al., *[Amiodarone absorption and elimination after oral and intravenous administration in healthy individuals]*. Rev Med Chil, 1995. **123**(6): p. 713-9.
117. Plomp, T.A., et al., *Pharmacokinetics and body distribution of amiodarone and desethylamiodarone in rats after oral administration*. In Vivo, 1987. **1**(5): p. 265-79.
118. Shayeganpour, A., A.O. El-Kadi, and D.R. Brocks, *Determination of the enzyme(s) involved in the metabolism of amiodarone in liver and intestine of rat: the contribution of cytochrome P450 3A isoforms*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(1): p. 43-50.
119. Yamreudeewong, W., et al., *Potentially significant drug interactions of class III antiarrhythmic drugs*. Drug Saf, 2003. **26**(6): p. 421-38.
120. Elsherbiny, M.E. and D.R. Brocks, *The effect of CYP1A induction on amiodarone disposition in the rat*. J Pharm Sci, 2010. **99**(1): p. 539-48.
121. Shayeganpour, A., D.A. Hamdy, and D.R. Brocks, *Pharmacokinetics of desethylamiodarone in the rat after its administration as the preformed metabolite, and after administration of amiodarone*. Biopharm Drug Dispos, 2008. **29**(3): p. 159-66.
122. Wolkove, N. and M. Baltzan, *Amiodarone pulmonary toxicity*. Can Respir J, 2009. **16**(2): p. 43-8.

123. Laurence Brunton, Bruce Chabner, Bjorn Knollman, ed. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 2009.
124. INFARMED. *Prontuário Terapêutico Online*. [cited 2011 10-06]; Available from: <http://www.infarmed.pt/prontuario/framepesactivos.php?palavra=amiodarona&x=0&y=0&rb1=0>.
125. Aasbo, J.D., et al., *Amiodarone prophylaxis reduces major cardiovascular morbidity and length of stay after cardiac surgery: a meta-analysis*. *Ann Intern Med*, 2005. **143**(5): p. 327-36.
126. Vassallo, P. and R.G. Trohman, *Prescribing amiodarone: an evidence-based review of clinical indications*. *JAMA*, 2007. **298**(11): p. 1312-22.
127. Siddoway, L.A., *Amiodarone: guidelines for use and monitoring*. *Am Fam Physician*, 2003. **68**(11): p. 2189-96.
128. Wyeth. *Dear Pharmacist Letter - Wyeth*. 2004 [cited 2011 21-09]; Available from: <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm150978.htm>.
129. Rotmensch, H.H., et al., *Steady-state serum amiodarone concentrations: relationships with antiarrhythmic efficacy and toxicity*. *Ann Intern Med*, 1984. **101**(4): p. 462-9.
130. Jackevicius, C.A., et al., *Population-Level Incidence and Risk Factors for Pulmonary Toxicity Associated With Amiodarone*. *Am J Cardiol*, 2011.
131. Brouse, S.D. and S.M. Phillips, *Amiodarone use in patients with documented allergy to iodine-containing compounds*. *Pharmacotherapy*, 2005. **25**(3): p. 429-34.
132. Camus, P. and H.M. Mehendale, *Pulmonary sequestration of amiodarone and desethylamiodarone*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986. **237**(3): p. 867-73.
133. Papiris, S.A., et al., *Amiodarone: review of pulmonary effects and toxicity*. *Drug Saf*, 2010. **33**(7): p. 539-58.
134. Singhal, A., P. Ghosh, and S.A. Khan, *Low dose amiodarone causing pseudo-alcoholic cirrhosis*. *Age Ageing*, 2003. **32**(2): p. 224-5.
135. Shepherd, N.A., et al., *Granular cells as a marker of early amiodarone hepatotoxicity: a pathological and analytical study*. *J Clin Pathol*, 1987. **40**(4): p. 418-23.
136. Mitchell, L.B., et al., *Prophylactic Oral Amiodarone for the Prevention of Arrhythmias that Begin Early After Revascularization, Valve Replacement, or Repair: PAPABEAR: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2005. **294**(24): p. 3093-100.
137. Piccini, J.P., J.S. Berger, and C.M. O'Connor, *Amiodarone for the prevention of sudden cardiac death: a meta-analysis of randomized controlled trials*. *Eur Heart J*, 2009. **30**(10): p. 1245-53.

138. Skibola, C.F., et al., *Brown kelp modulates endocrine hormones in female sprague-dawley rats and in human luteinized granulosa cells*. J Nutr, 2005. **135**(2): p. 296-300.
139. *Fitoterápicos*. [cited 2011 05-03]; Available from: <http://www.extratus.com.br/fitoterapia.php>.
140. *Fucus vesiculosus Bionatus*. [cited 2011 05-02]; Available from: http://www.suplementos-vitaminas.com.br/index.php?p=emagrecimento_celulite_gastrites_fucus_bionatus.
141. Zaragoza, M.C., et al., *Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two Fucus vesiculosus extracts*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(17): p. 7773-80.
142. McConnell, E.L., A.W. Basit, and S. Murdan, *Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments*. J Pharm Pharmacol, 2008. **60**(1): p. 63-70.
143. Neves, J.R., et al., *1.8 cineole decreases gastric compliance in anesthetized rats*. Acta Cir Bras, 2007. **22**(1): p. 63-7.
144. Márcio Rodrigues, G.A., Joana Bicker, Ana Ferreira, João Queiroz, Amílcar Falcão, *Simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone by HPLC-DAD in plasma and heart tissue of rat*. Livro de Resumos - COIFFA 2011, 2011: p. 178.
145. Márcio Rodrigues, G.A., Joana Bicker, Ana Ferreira, João Queiroz, Amílcar Falcão, *Fast HPLC-DAD method for the determination of amiodarone and desethylamiodarone in liver, kidney and lung tissues of rat*. Livro de Resumos - COIFFA 2011, 2011: p. 177.
146. Bailey, D.G. and G.K. Dresser, *Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs*. Am J Cardiovasc Drugs, 2004. **4**(5): p. 281-97.
147. Cziczko, D.J., *Chromatography Lecture 4: LC, HPLC and IC*. 2004: Colorado.
148. Martins, A., *DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DA RODAMINA 123 EM PLASMA DE RATO: FERRAMENTA PARA A AVALIAÇÃO IN VIVO DA ACTIVIDADE DA GLICOPROTEÍNA-P*, in *Ciências da Saúde*. 2010, Universidade da Beira Interior: Covilhã.
149. LAURIAN VLASE, M.A., DANA MUNTEAN,, C.C. ADRIAN GAL, CONSTANTIN BODOLEA,, and S.E. LEUCUȚA, LAURIAN VLASE1,*, MARCELA ACHIM1, DANA MUNTEAN1, ADRIAN GAL2, CORNEL CĂTOI2, CONSTANTIN BODOLEA3, SORIN E. LEUCUȚA1. *Farmacia*, 2011. **59**(3): p. 338-356.
150. Svensson, C.K. *PHARMACOKINETICS AND BIOPHARMACEUTICS*. 2006 07/13/05 [cited 2011 07-10]; Available from: <http://www.uiowa.edu/~c046138/tut-noncomp.htm>.
151. van Nieuwenhoven, M.A., et al., *The effect of different dosages of guar gum on gastric emptying and small intestinal transit of a consumed semisolid meal*. J Am Coll Nutr, 2001. **20**(1): p. 87-91.

152. Seki, S., et al., *Amiodarone increases the accumulation of DEA in a human alveolar epithelium-derived cell line*. Biol Pharm Bull, 2008. **31**(7): p. 1449-52.
153. Lukas, Victor, *Volume Guidelines for Compound Administration*. Utah State University. [cited: 2011 20-10]; Available from: http://iacuc.usu.edu/files/uploads/volume_guidelines.pdf

Anexos

Anexo 1 - Cromatogramas obtidos através da análise por HPLC (exemplo).

Plasma (6 horas pós -dose)

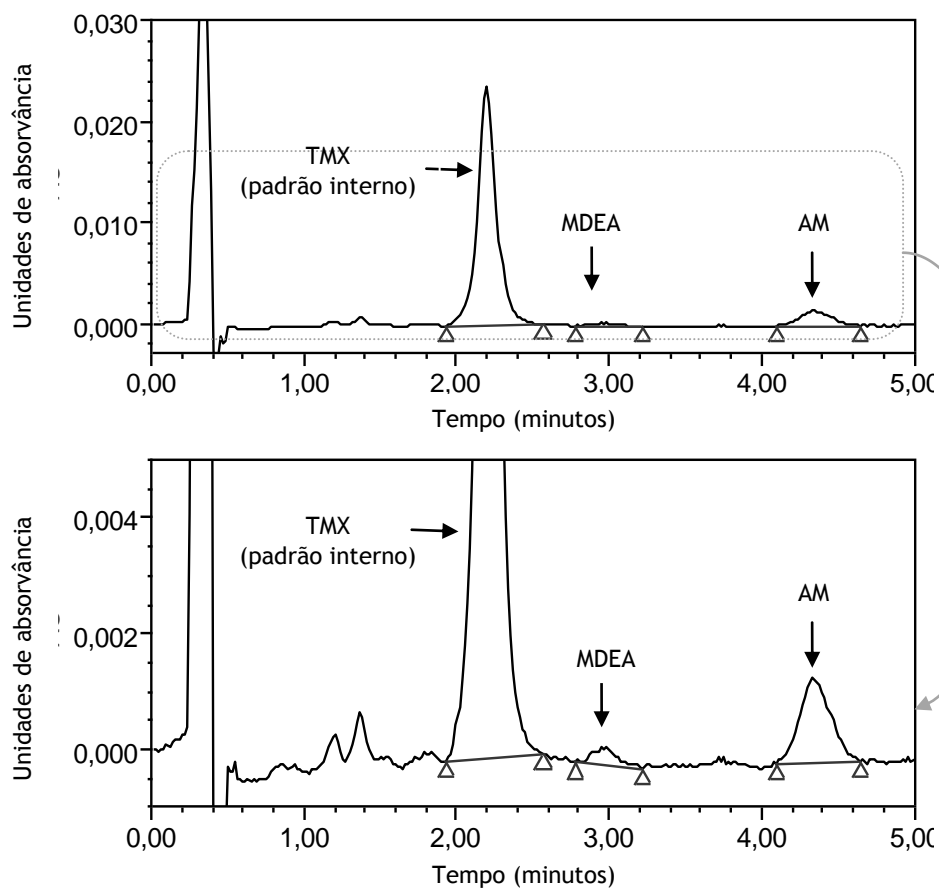
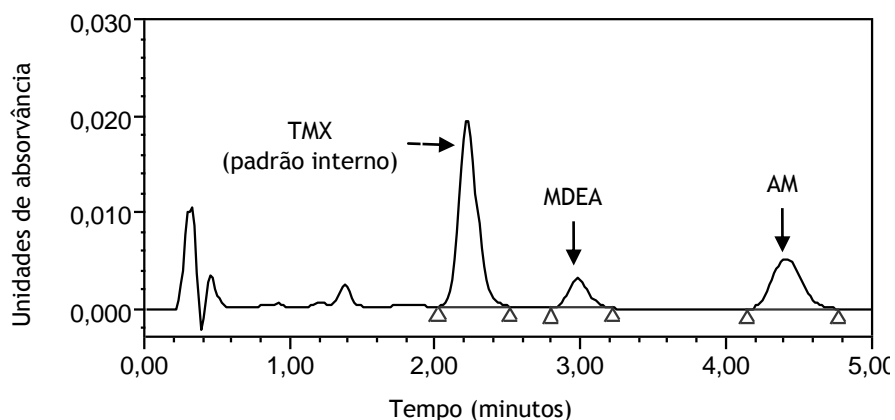
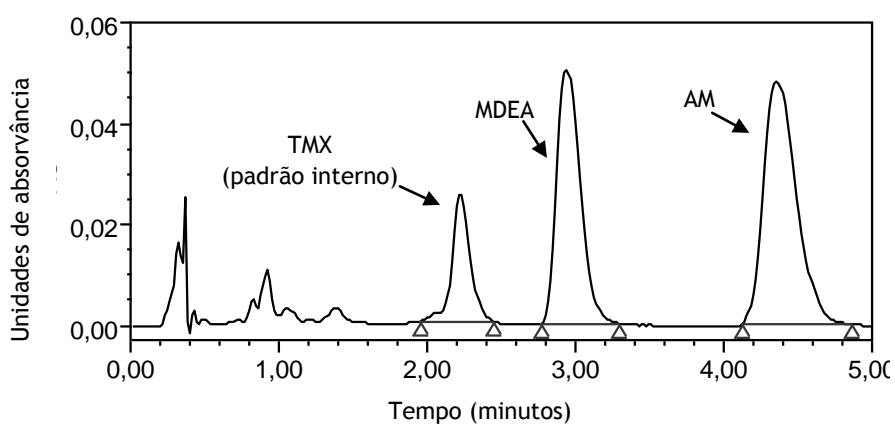


Figura 16: Cromatograma obtido através da análise das amostras de plasma de rato (correspondente à colheita da amostra, 6 horas pós-dose de amiodarona), por HPLC (exemplo). A segunda imagem corresponde à diminuição da escala de unidades de absorvância; tal permite verificar a presença de MDEA no plasma, correspondente ao pico de absorvância aos 3 minutos. TMX - tamoxifeno; AM - amiodarona; MDEA - mono-*N*-desetilamiodarona.

Coração



Pulmões



Fígado

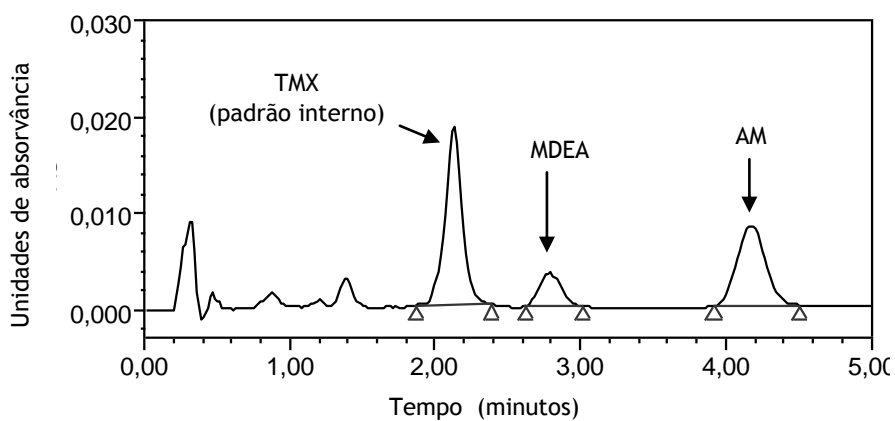


Figura 17: Cromatogramas obtidos através da análise das amostras de tecidos de rato, por HPLC (exemplo). Verifica-se que o padrão interno (TMX) é eluído, aproximadamente, aos 2 minutos. A MDEA, metabolito principal da amiodarona, é eluída, aproximadamente, aos 2 minutos e 40 segundos. A amiodarona corresponde ao último pico de absorvância (aproximadamente aos 4 minutos). TMX - tamoxifeno; AM - amiodarona; MDEA - mono-*N*-desetilamiodarona.

Anexo 2 - Gráfico com a representação da variação da massa dos ratos em estudo (ensaio em DM)

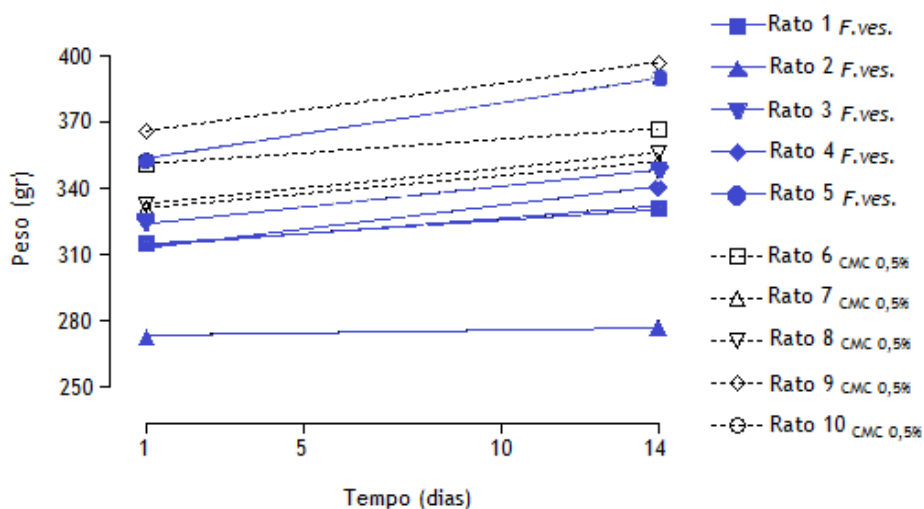


Figura 18: Gráfico representando a variação de massa, dos animais do ensaio em DM (GE e GC), durante os 15 dias em que decorreu o estudo. Os ratos que pertenceram ao GE (Rato $F_{ves.}$) do ensaio em DM têm a variação da massa corporal representada a ■. A variação de massa corporal dos animais que integraram o GC (Rato $CMC_{0,5\%}$) do ensaio em DM está representada a ■.