

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (IMUNOLOGIA**  
**E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA)**  
**DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA)**

**Jucélia Barbosa da Silva**

**Análise do perfil químico e investigação da atividade hepatoprotetora *in vivo* e da citotoxicidade e das atividades anti-inflamatória e antibacteriana *in vitro* de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae Bencht. & Presl)**

**Juiz de Fora**

**2017**

**Jucélia Barbosa da Silva**

**Análise do perfil químico e investigação da atividade hepatoprotetora in vivo e da citotoxicidade e das atividades anti-inflamatória e antibacteriana in vitro de Vernonia condensata Baker (Asteraceae Bencht. & Presl)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas - Área: de Concentração: Genética e Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elita Scio Fontes

**Juiz de Fora  
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Silva, Jucélia Barbosa.

Análise do perfil químico e investigação da atividade hepatoprotetora in vivo e da citotoxicidade e das atividades anti inflamatória e antibacteriana in vitro de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae Bencht. & Presl) / Jucélia Barbosa da Silva. – 2017. 145 p.

Orientadora: Elita Scio Fontes

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. *Vernonia condensata* Baker. 2. etnofarmacologia. 3. bioatividades. 4. hepatoproteção. 5. antibacteriana. I. Fontes, Elita Scio, orient. II. Título.

JUCÉLIA BARBOSA DA SILVA

**ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE  
HEPATOPROTETORA *IN VIVO* E DA CITOXIDADE E DAS ATIVIDADES  
ANTI-INFLAMATÓRIAS E ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE VERNONIA  
CONDENSATA BAKER (ASTERACEAE BENCHT. & PRESL)**

Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

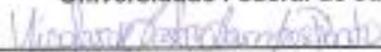
Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

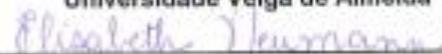


Prof.ª Dr.ª Elita Scio Fontes  
Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Nicolas de Castro Campos Pinto  
Universidade Veiga de Almeida

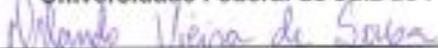


Prof.ª Dr.ª Elizabeth Neumann  
Universidade Federal de Minas Gerais



Prof.ª Dr.ª Antónia Ribeiro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## DEDICATÓRIA

*Dedico meu trabalho a Deus, criador supremo*

*. Aos meus pais, minha inspiração.*

*Meu marido, meu porto seguro.*

*Meu filho, minha obra-prima*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sempre me abençoando e iluminando meus passos e dando forças nos momentos difíceis;

Registro meus sinceros agradecimentos à Prof<sup>a</sup>. Dra. Elita Scio Fontes, pelo apoio, carinho, compreensão, orientação e paciência durante estes anos de trabalho;

À Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Silvana Alves, pela inspiração e colaboração em todos os momentos;

Aos professores e parceiros de pesquisa Dr<sup>a</sup>. Antônia Ribeiro, Dr<sup>a</sup> Danielle Maria Aragão, Dr<sup>a</sup> Elaine Maria Fagundes, Dr. Jair Adriano Kopke de Aguiar, Dr<sup>a</sup> Maria Christina Castañon, Dr. Rodrigo Luiz Fabri e Dr<sup>a</sup> Valquíria Medeiros;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) pela concessão dos recursos financeiros;

Ao Laboratório de Glicoconjugados do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, ao Centro de Biologia da Reprodução da UFJF, meu muito obrigado pelas análises realizadas e pela parceria;

Ao Departamento de Bioquímica/ICB/UFJF e ao Laboratório de Produtos Naturais Bioativos pela estrutura oferecida;

Aos funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica /ICB/UFJF, em especial ao amigo Delfino, com sua genialidade criativa;

Aos Amigos e parceiros desta jornada Martha Bessa, Nicolás Castro, Jéssica Leiras, Maria Fernanda, Renata Mendes, Luiz Gustavo, Mara Lúcia e Ana Paula Duque;

Um agradecimento mais que especial a Vívian Tomasco, pela amizade, dedicação irrestrita e convívio; sem sua colaboração nada disso seria possível;

À minha família, muito obrigada pelo incentivo e carinho;

Aos membros desta banca, desde já pela disposição em ler este trabalho e pelas críticas que muito contribuirão para o engrandecimento deste estudo!



*"Nós continuamos seguindo em frente, abrindo portas e fazendo coisas novas porque nós somos curiosos e a curiosidade nos leva a descobrir novos caminhos."*

Walt Disney (1901-1966)

## RESUMO

A espécie vegetal *Vernonia Condensata* Baker (Asteraceae), tradicionalmente empregada para o alívio de diversas doenças, tais como distúrbios gástricos e hepáticos, e, ainda, em processos inflamatórios, foi foco deste estudo que buscou aprofundar os conhecimentos sobre o potencial biológico desta espécie. As folhas da mesma foram submetidas à extração a frio com etanol. O extrato (EE) assim obtido foi seco e ressuspendido, passando por um processo de partição líquido-líquido com solventes em ordem crescente de polaridade, originando as partições: hexânica (PH), diclorometânica (PD) e em acetato de etila (PA). A atividade hepatoprotetora foi avaliada *in vivo*. Para tal foram aplicados três modelos de indução de lesão hepática: paracetamol dose aguda, paracetamol doses repetidas e etanol dose aguda. Para o primeiro modelo foram testados o extrato etanólico e suas partições, observou-se inibição do dano hepático para os animais tratados com PA nas concentrações 50, 100 e 200 mg / kg, com a diminuição dos níveis das transaminases hepáticas, dos parâmetros lipídicos e ação antioxidante observada pelos ensaios de peroxidação lipídica e atividade das enzimas catalase e glutathione reduzida realizados no tecido hepático. Para o modelo de paracetamol em doses repetidas os animais foram tratados com PA nas concentrações 100 e 200 mg / kg, dado o perfil do tratamento não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros bioquímicos dos diferentes grupos, porém foi possível verificar a atividade antioxidante da partição para este modelo. Para indução de lesão hepática aguda por etanol, observaram-se diferenças significativas para os níveis de transaminases hepáticas para os grupos tratados simultaneamente e após a indução com PA na concentração de 200 mg / kg. A atividade anti-inflamatória *in vitro* também foi testada frente a células RAW (macrófagos) para PA e os níveis de NO, IL- 6 e TNF-  $\alpha$  foram dosados e observou-se redução significativa destes mediadores pró-inflamatórios. A atividade antibacteriana das amostras foi verificada pelos testes de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), *checkerboard*, análise da curva de crescimento, viabilidade celular e inibição da adesão do biofilme. Os resultados da CIM para PA indicaram moderada atividade antibacteriana para as cepas de *S. aureus* com resultados iguais ou inferiores a 625  $\mu$ g / mL, apresentando, então, atividade bacteriostática. PA levou a diminuição da velocidade de crescimento das cepas de *S. aureus* bem como inibiu a adesão do biofilme. Em PA, que se mostrou mais promissora pelos ensaios realizados, foram identificados e quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo de diodo com padrões externos os flavonoides luteolina, apigenina e o composto fenólico ácido clorogênico. PA foi ainda fracionado e de uma das frações obtidas foi isolado, identificado e quantificado o ácido 1,5 – o-dicafeoilquínico. A presença destes pode justificar, em parte, as atividades observadas neste estudo.

Palavras-Chave: *Vernonia condensata* Baker, etnofarmacologia, bioatividades, hepatoproteção, antibacteriana.

## ABSTRACT

*Vernonia Condensata* Baker (Asteraceae), traditionally used for the relief of several diseases, such as gastric and hepatic disorders, and also in inflammatory processes, was the focus of this study, which sought to deepen the knowledge about the biological potential of this species. The leaves were subjected to cold extraction with ethanol. The extract (EE) thus obtained was dried and resuspended, passing through a liquid-liquid partitioning process with solvents in increasing order of polarity, giving the partitions: hexane (PH), dichloromethane (PD) and ethyl acetate (PA). Hepatoprotective activity was evaluated in vivo. Three models of hepatic injury induction were applied: acetaminophen, acetaminophen, acetaminophen, acetaminophen and acetaminophen. For the first model the ethanolic extract and its partitions were tested, inhibition of hepatic damage was observed for the animals treated with PA at the concentrations 50, 100 and 200 mg / kg, with the reduction of hepatic transaminases levels, lipid parameters and antioxidant action observed by the lipid peroxidation assays and the activity of catalase and reduced glutathione enzymes performed in hepatic tissue. For the paracetamol model in repeated doses the animals were treated with PA at concentrations 100 and 200 mg / kg, given the treatment profile no significant differences were observed between the biochemical parameters of the different groups, however it was possible to verify the antioxidant activity of the partition for this model. For induction of acute hepatic injury by ethanol, significant differences were observed for hepatic transaminase levels for the groups treated simultaneously and after induction with BP at the concentration of 200 mg / kg. In vitro anti-inflammatory activity was also tested against RAW (macrophages) PA cells and levels of NO, IL-6 and TNF- $\alpha$  were measured and a significant reduction of these pro-inflammatory mediators was observed. The antibacterial activity of the samples was verified by tests of minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), checkerboard, growth curve analysis, cell viability and inhibition of biofilm adhesion. The results of CIM for PA indicated moderate antibacterial activity for *S. aureus* strains with results equal to or less than 625  $\mu$ g / mL, presenting bacteriostatic activity. PA led to a decrease in the growth rate of *S. aureus* strains as well as to inhibit biofilm adhesion. In PA, which was more promising for the tests performed, the flavonoids luteolin, apigenin and the chlorogenic acid phenolic compound were identified and quantified by means of high performance liquid chromatography coupled to diode array with external standards. PA was further fractionated and one of the fractions obtained was isolated, identified and quantified 1,5 - o - dicyclohexylic acid. The presence of these may justify, in part, the activities observed in this study.

Keywords: *Vernonia condensata* Baker, ethnopharmacology, bioactivities, hepatoprotection, antibacterial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia de <i>Vernonia condensata</i> cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde se observa os aspectos gerais da morfologia externa dessa espécie	23
Figura 2	Fotografia da morfologia foliar externa de <i>Vernonia condensata</i>	24
Figura 3	Ilustração da anatomia hepática humana	30
Figura 4	Ativação do paracetamol pelo citocromo p450 levando a hepatotoxicidade	36
Figura 5	Esquema geral do metabolismo do etanol no tecido hepático	37
Figura 6	Estruturas químicas dos constituintes da silimarina	39
Figura 7	Estimativa do número de mortes atribuídas à resistência antimicrobiana até 2050	40
Figura 8	Proporção de MRSA em partes do mundo durante o ano de 2006	42
Figura 9	Representação esquemática de distribuição de amostra <i>versus</i> antibiótico no teste tabuleiro de damas	57
Figura 10	Efeito da administração de EE, PH, PD e PA (concentração mg / kg) níveis de AST no soro de ratos tratados com paracetamol em dose aguda	64
Figura 11	Efeito da administração de EE, PH, PD e PA (concentração mg / kg) nos níveis de ALT no soro dos ratos tratados com paracetamol em dose aguda.	65
Figura 12	Níveis de fosfatase alcalina no soro de animais com lesão hepática induzida por paracetamol e tratados com EE, PH, PD e PA (concentração mg / Kg).	66
Figura 13	Níveis de malonaldeído (MDA) em animais pré-tratados com <i>Vernonia condensata</i> e lesão hepática aguda causada por paracetamol em modelo animal.	69
Figura 14	Níveis da atividade da enzima catalase em animais pré-tratados com <i>Vernonia condensata</i> e lesão hepática aguda causada por paracetamol em modelo animal.	70

Figura 15	Níveis da atividade da enzima glutathiona redutase em animais pré-tratados com <i>Vernonia condensata</i> e lesão hepática aguda causada por paracetamol em modelo animal.	71
Figura 16	Fotomicrografia representativa das seções longitudinais do fígado de rato após 7 dias de pré-tratamento seguido pela indução de dano hepático agudo por paracetamol.	72
Figura 17	Efeito da administração de PA nos níveis de AST no soro de ratos tratados com paracetamol em doses repetidas.	74
Figura 18	Efeito da administração de PA nos níveis de ALT no soro dos ratos tratados com paracetamol em doses repetidas.	74
Figura 19	Níveis de malonaldeído (MDA) em animais com lesão hepática causada por paracetamol em doses repetidas em animais tratados com <i>Vernonia condensata</i> .	77
Figura 20	Atividade da enzima catalase em animais com lesão hepática causada por paracetamol em doses repetidas em animais tratados com <i>Vernonia condensata</i> .	78
Figura 21	Atividade da enzima glutathiona redutase em animais com lesão hepática causada por paracetamol em doses repetidas em animais tratados com <i>Vernonia condensata</i> .	78
Figura 22	Fotomicrografia representativa das seções longitudinais do fígado de rato após 10 dias de tratamento com PA e simultânea administração de paracetamol.	79
Figura 23	Níveis de malonaldeído (MDA) em animais com lesão hepática induzida etanol.	82
Figura 24	Atividade da enzima catalase em animais com lesão hepática induzida por etanol.	83
Figura 25	Atividade da enzima glutathiona reduzida em animais com lesão hepática causada por indução com etanol.	83
Figura 26	Níveis de malonaldeído (MDA) em animais com lesão hepática causada por indução com etanol e tratados com PA.	86
Figura 27	Atividade da enzima catalase em animais com lesão hepática causada por indução com etanol tratados com PA.	87
Figura 28	Atividade da enzima glutathiona redutase em animais com lesão	87

	hepática causada por indução com etanol tratados com PA.	
Figura 29	Efeito de PA na citotoxicidade em linhagem de células Raw 264.7 em 48 h	89
Figura 30	Efeitos de PA sobre os níveis de NO em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.	90
Figura 31	Produção de IL-6 pelas células Raw 264.7 em resposta a indução com LPS.	91
Figura 32	Produção de TNF- $\alpha$ pelas células Raw 264.7 em resposta a indução com LPS.	92
Figura 33	Curvas de crescimento na presença de partição de acetato de etila obtida de folhas de <i>Vernonia condensata</i> (PA) CIM, 2x CIM, 4x CIM, cloranfenicol (CHL), ampicilina (AMP) e PA combinada com CHL ou AMP contra (a) <i>S. aureus</i> (ATCC® 29213), (b) <i>S. aureus</i> (ATCC® 25923) e (c) MRSA 1485279.	98
Figura 34	Viabilidade celular <i>S. aureus</i> nos tempos de exposição 1, 4 e 6 horas.	99
Figura 35	Efeito inibitório de PA sobre a adesão de <i>S. aureus</i> em superfície de poliestireno	100
Figura 36	Cromatograma em CLAE-DAD da partição em acetato de etila	102
Figura 37	a) Cromatograma do ácido clorogênico. b) Perfil UV ácido clorogênico em 330 nm. c) Estrutura química	105
Figura 38	a) Cromatograma da apigenina. b) Perfil UV apigenina em 330 nm. c) Estrutura química.	105
Figura 39	a) Cromatograma da LUTEOLINA. b) Perfil UV apigenina em 330 nm. c) Estrutura química.	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metabólitos secundários descritos para espécies do gênero <i>Vernonia</i>	25
Tabela 2	Usos tradicionais de <i>Vernonia condensata</i>	27
Tabela 3	Medicamentos, toxinas e drogas que aumentam níveis séricos de atividade das aminotransferases	33
Tabela 4	Lesões hepáticas induzidas por fármacos e principais fármacos envolvidos	35
Tabela 5	Patógenos de maior prioridade nas pesquisas de novos antibióticos	41
Tabela 6	Peso médio corporal dos animais antes e após tratamento com as amostras e do fígado	63
Tabela 7	Parâmetros bioquímicos dos animais normais e tratados, com lesão hepática aguda causada por paracetamol.	67
Tabela 8	Perfil lipídico de animais normais e tratados, lesão hepática aguda induzida por paracetamol.	68
Tabela 9	Peso médio corporal e dos fígados de animais com lesão hepática induzida pelo uso contínuo de paracetamol, normais e tratados com PA	73
Tabela 10	Parâmetros bioquímicos analisados no soro de ratos com lesão hepática causada por doses repetidas de paracetamol tratadas com PA.	75
Tabela 11	Parâmetros lipídicos analisados no soro para o teste de hepatoproteção indução por paracetamol em doses repetidas.	76
Tabela 12	Peso corporal médio e do fígado dos animais com lesão hepática causada pelo etanol.	80
Tabela 13	Efeito da administração de PA nos níveis de ALT no soro dos ratos tratados com etanol.	80
Tabela 14	Parâmetros bioquímicos e lipídicos analisados no soro de ratos	81

com lesão hepática causada por etanol em dose aguda

Tabela 15	Peso médio corporal e dos fígados dos ratos tratados com PA após lesão induzida com etanol.	84
Tabela 16	Níveis das enzimas AST, ALT, de proteínas totais e albumina no soro dos animais tratados com PA após indução de lesão por etanol	85
Tabela 17	Perfil lipídico analisados no soro de ratos tratados com PA após lesão hepática causada por etanol em dose aguda	85
Tabela 18	Média do percentual de viabilidade celular para diferentes linhagens	88
Tabela 19	Perfil de susceptibilidade às principais classes de antimicrobianos de cepas de rotina de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) realizado pelo sistema automatizado VITEK®2	94
Tabela 20	Efeito combinatório da partição em acetato de etila obtida de folhas de <i>Vernonia condensata</i> (PA) com ampicilina (AMP) ou cloranfenicol (CHL), Índice de Redução da Dose (IRD), Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (iCIF)	96
Tabela 21	Deslocamentos Químicos do ácido 1,5-dicafeoilquínico isolado da partição em acetato de etila das folhas de <i>Vernonia condensata</i>	103
Tabela 22	Curvas de calibração e concentração de ácido clorogênico, apigenina, luteolina e ácido 1,5-o-dicafeoilquínico	106

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Ácool Desidrogenase
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
ALB	Albumina
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina amino transferase
AMP	Ampicilina
AST	Aspartato amino transferase
ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
AUC	do inglês <i>Area under the curve</i>
BD	Bilirrubina Direta
BI	Bilirrubina Indireta
BT	Bilirrubina Total
BHT	2,6-di-ter—butil-4-metilfenol
CAT	Catalase
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CC	Controle de Crescimento
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência aclopado a detector de
DAD	arranjo de diodos
CLO	Cloranfenicol
CLSI	do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
c-VLDL	Colesterol “very low density lipoprotein”
c-LDL	Colesterol “low density lipoprotein”
c-HDL	Colesterol “high density lipoprotein”
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CT	Colesterol Total
DILI	do inglês <i>Drug-induced liver injury</i>
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Extrato Etanólico
EtOH	Etanol
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GSH	Glutationa Redutase
HCl	Ácido Clorídrico
IM	Índice Mitótico
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
MDA	Malonaldeído
MeOH	Metanol
MEOS	Sistema Mitocondrial de Oxidação do Etanol
MHA	Ágar Mueller Hinton
MHB	Caldo Mueller Hinton
MRSA	do inglês <i>Multiple-resistant Staphylococcus aureus</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NAPQI	n-acetil-p-benzoquinonaimina

NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NO	Óxido Nítrico
OD	Densidade Ótica
PA	Partição em Acetato de Etila
PBS	Tampão Salina Fosfato
PD	Partição Diclorometânica
PH	Partição Hexânica
TSB	Caldo Soja Triptose
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TEP	1,1,3,3-tetraetanopropano
TRIGL	Triglicérides
PT	Proteínas Totais
SFB	Soro Fetal Bovino
RPMI	Caldo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

1 JUSTIFICATIVA	20
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS	22
2.1 HIPÓTESE	22
2.2 OBJETIVO GERAL	22
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 <i>VERNONIA CONDENSATA</i> BAKER	23
3.2 O FÍGADO: BREVES CONSIDERAÇÕES	30
3.2.1 Intoxicação hepática	33
3.2.2. Doenças hepáticas e o tratamento com produtos naturais	38
3.3 OUTRO PONTO DE RELEVÂNCIA PARA ESTE ESTUDO	39
3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAL VEGETAL	44
4.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO E PARTIÇÕES	44
4.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	44
4.3.1 Ensaio de viabilidade celular	44
4.3.1.1 Análise de citotoxicidade geral para células eucarióticas	44
4.3.1.2 Análise de citotoxicidade específica para determinação da atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	45
4.3.2 Avaliação da atividade hepatoprotetora <i>in vivo</i>	46
4.3.2.1 Animais	46

4.3.2.2 Atividade hepatoprotetora via indução da lesão hepática aguda por paracetamol em ratos	46
4.3.2.3 Hepatoproteção frente à indução por doses repetidas de paracetamol	47
4.3.2.4 Hepatoproteção frente à indução de lesão hepática aguda por etanol	48
4.3.2.5 Tratamento de lesão aguda induzida por etanol	48
4.3.2.6 Determinação dos parâmetros bioquímicos	49
4.3.2.7 Determinação da peroxidação lipídica por meio do teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA) – in vivo	49
4.3.2.8 Procedimento para dosagem de proteínas totais pelo Método de Lowry (1951) adaptado para microplaca	50
4.3.2.9 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes	51
4.3.3 Atividade anti-inflamatória	52
4.3.3.1 Linhagem celular	52
4.3.3.2 Determinação de óxido nítrico	52
4.3.3.3 Determinação dos mediadores inflamatórios	52
4.3.4 Atividade antibacteriana	53
4.3.4.1 Cepas bacterianas utilizadas	53
4.3.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	54
4.3.4.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	55
4.3.4.4 Método de combinação de drogas “ <i>Checker Board</i> ” ou “Tabuleiro de Damas”	56
4.3.4.5 Cinética bacteriana ou curva de crescimento ou <i>time kill assay</i>	57
4.3.4.6 Ensaio de viabilidade celular bacteriana	58
4.3.4.7 Atividade antibiofilme in vitro	58
4.4. ESTUDO QUÍMICO DA PARTIÇÃO EM ACETATO DE ETILA (PA)	59
4.4.1 Perfil cromatográfico de PA por CLAE-DAD	59
4.4.2. Isolamento da substância 1	59
4.4.3. Identificação estrutural da substância 1	59
4.4.4. Identificação de marcadores químicos da partição em acetato de etila (PA)	61

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
5.1. ATIVIDADES BIOLÓGICAS	62
5.1.1 Avaliação da atividade hepatoprotetora	62
5.1.1.1. Avaliação da atividade hepatoprotetora <i>in vivo</i> frente à indução de lesão hepática aguda por paracetamol	62
5.1.1.2. Avaliação da atividade hepatoprotetora <i>in vivo</i> frente à indução de lesão com doses repetidas de paracetamol	73
5.1.1.3. Avaliação da atividade hepatoprotetora <i>in vivo</i> frente à indução de lesão aguda por etanol	79
5.1.3. Partição em acetato de etila como pós tratamento de lesão hepática aguda induzida por etanol	84
5.1.4. Citotoxicidade da partição em acetato de etila <i>in vitro</i>	88
5.1.5. Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>	88
5.1.6. Atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	92
5.2. PERFIL FITOQUÍMICO	101
6 CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	110
ANEXOS	129
Anexo A – Espectro de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, DEPT, COSY, HSQC e HMBC. Registados em espectrômetro Bruker AVANCE III em solução de MeOD a 25°C, utilizando TMS (δ= 0) como padrão interno. Os desvios químicos são reportados em ppm na escala δ e referenciados às ressonâncias do pico do solvente residual.	129
Anexo B – Parecer da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA).	135
Anexo C – Artigo publicado em periódico científico	137

---

## 1 JUSTIFICATIVA

---

*Vernonia condensata* Baker (Asteraceae Bercht. & Presl), popularmente conhecida como figatil, boldo baiano ou necroton, tem sido tradicionalmente usada no Brasil e em diversos países africanos como hepatoprotetora, antimicrobiana, antipirética, antiulcerogênica (LORENZI; MATOS, 2002), analgésica e anti-inflamatória (FRUTUOSO et al., 1994; RISSO, 2010; SILVA et al., 2011; VALVERDE, 2001). Existem, ainda, relatos de seu uso como agente protetor contra a ação deletéria de veneno de cobras (HOUGHTON; OSIBOGUN, 1993; PEREIRA et al. 1994).

Adicionalmente, o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde brasileiro divulgou, em 2009, a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS), que contém os nomes de 71 plantas com potencial terapêutico, onde a *V. condensata* ocupa a 69ª posição. O objetivo desta lista é

"orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença" (BRASIL, 2009).

Sob a ótica da pesquisa científica, ao se efetuar atualização da literatura por meio de importante plataforma de busca utilizada por profissionais da área de saúde, o *Pubmed*, e empregando como palavras-chave *hepatoprotective* e *Vernonia condensata* e *antimicrobial activity* e *Vernonia condensata*, ambas as combinações confirmaram a necessidade de exploração desses temas, visto que, no primeiro caso, não havia nenhum relato, e no segundo, somente duas publicações, sendo que, em uma delas, não foram realizados experimentos de ação antimicrobiana (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=hepatoprotective+and+Vernonia+condensata>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antimicrobial+activity+and+Vernonia+condensata>, acessado em 14 de junho de 2013).

Estudos prévios mostraram que a partição em acetato de etila (PA) concentra altos teores de compostos fenólicos e flavonoides e, ainda, apresenta atividade antioxidante promissora (SILVA et al, 2013). Assim, o presente trabalho visou aprofundar os estudos químicos e biológicos de PA.

Portanto, com base na abordagem etnofarmacológica de *V. condensata* e em estudos preliminares de suas propriedades biológicas realizados por esta investigadora, a presente tese visou avaliar a atividade hepatoprotetora *in vivo*, aprofundar os estudos *in vitro* acerca dos potenciais anti-inflamatório e antibacteriano dessa planta medicinal, previamente observado, além de identificar seus constituintes químicos.

## 2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

---

### 2.1 HIPÓTESE

Qual partição da espécie vegetal *V. condensata* possui atividades hepatoprotetora, antioxidação *in vivo*, anti-inflamatória e antibacteriana?

### 2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades hepatoprotetora *in vivo* e antibacteriana e anti-inflamatória *in vitro* de *V. condensata* e identificar constituintes químicos presentes no extrato ou partição mais ativa obtida a partir das folhas.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### ***Investigação da atividade hepatoprotetora in vivo***

- Avaliar a atividade hepatoprotetora *in vivo* do extrato etanólico bruto (EE) e suas partições hexânica (PH), diclorometânica (PD) e em acetato de etila (PA) frente ao modelo de hepatotoxicidade induzido;

#### ***Investigação da atividade anti-inflamatória in vitro de PA***

- Avaliar a atividade anti-inflamatória de PA por meio de ensaios *in vitro* utilizando linhagem celular Raw 264.7 com lesão induzida por LPS;

#### ***Investigação da citotoxicidade in vitro de PA***

- Verificar a citotoxicidade de PA para diferentes linhagens celulares;

#### ***Investigação da atividade antibacteriana in vitro***

- Avaliar o potencial antibacteriano de EE, PH, PD e PA frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas envolvidas em vários cenários relevantes, desde clínicos até ambientais;

#### ***Caracterização do perfil fitoquímico***

- Identificar e quantificar marcadores químicos presentes na partição em acetato de etila (PA);

- Isolar e identificar substância química de PA.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

---

#### 3.1 *VERNONIA CONDENSATA* BAKER: CONSIDERAÇÕES RELEVANTES

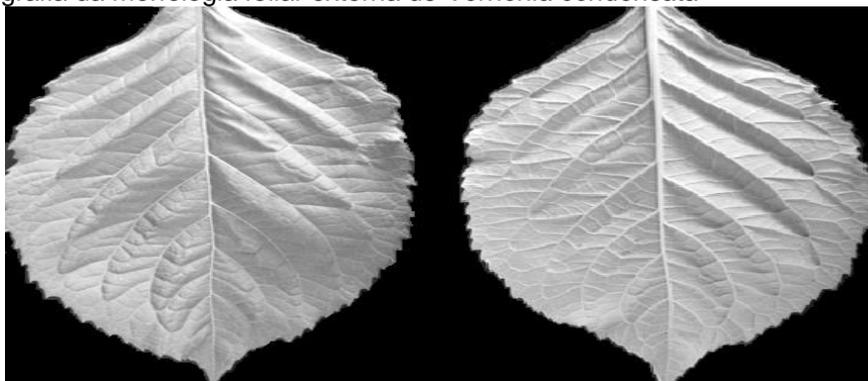
*V. condensata* Baker é um arbusto zoocórico, família das *Asteraceae* gênero *Vernonia*, distribuído principalmente no cerrado, matas de galerias e regiões semi-áridas do nordeste do Brasil, bem como em diversas áreas africanas (ALBUQUERQUE et al., 2007; RAMOS et al., 2013). As folhas deste arbusto (Figuras 1 e 2) são descritas como simples, com forma elíptica e aguda para o ápice acuminado; apresenta base cuneiforme e margem denteada. Possuem consistência membranosa e estão inseridas em um padrão em espiral. Vistas pela frente, apresentam epiderme hipoestomática e com estômatos anomocíticos e tricomas na superfície abaxial. *V. condensata* apresenta dois diferentes tipos de tricomas glandulares com um número variável de células-haste, enquanto as células terminais possuem forma semi-esférica alongada. O mesófilo é dorsiventral e a nervura central no terço médio das folhas, em geral, apresenta cinco (5) feixes vasculares colaterais. As veias laterais do sistema vascular também são colaterais e pode ou não apresentar extensões de bainha em relação à superfície. No pecíolo ocorre massa globular formada por cristais em forma de agulha (LOLIS; MILANEZE-GUTIERRE, 2003; MILAN et al., 2006).

Figura 1: Fotografia de *Vernonia condensata* cultivada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, onde se observa os aspectos gerais da morfologia externa dessa espécie.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2013.

Figura 2: Fotografia da morfologia foliar externa de *Vernonia condensata*



Fonte: SILVA, 2012.

Sob o ponto de vista químico, as plantas, em seu metabolismo, sintetizam diferentes classes de substâncias importantes à sua sobrevivência, adaptação e reprodução. Estes produtos do metabolismo vegetal são divididos em metabólitos primários (carboidratos, lipídeos e proteínas) e secundários, também denominados especiais (compostos fenólicos, cumarinas, flavonoides, alcaloides, entre outros). Estudos que tratam especificamente das moléculas sintetizadas por *V. condensata* são escassos. Bohlmann e colaboradores (1981), ao estudarem espécies do gênero *Vernonia*, identificaram a presença de alguns hirsutinolídeos e, para esta planta medicinal, foram identificados dois (2) derivados do 8- $\alpha$ -acetoxi-10- $\beta$ -hidroxi-isohirsutinolídeo. A lactona sesquiterpênica, vernoniosídeo B2, também foi descrita (VALVERDE et al., 2001), assim como também foram detectados os flavonoides luteolina e apigenina (SILVA et al., 2013), e alcaloides isoquinolínicos (AFFONSO, 2001). As atividades biológicas descritas na literatura para esses constituintes químicos sugerem que tais metabólitos estejam envolvidos com as ações antioxidante, antimicrobiana, analgésica, antipirética e anti-inflamatória relatadas pela medicina tradicional. Diferentes metabólitos secundários são descritos para espécies deste gênero (Tabela 1); porém, referências que quantifiquem esses compostos isolados, bem como que correlacionem a presença de determinados componentes com as atividades biológicas sugeridas, são raras.

Tabela 1: Metabólitos secundários descritos para espécies do gênero *Vernonia*

Metabólito	Referência
Vernonidina	Kupchan et al., 1969
3-oxovernoniol B1, Hidroxivernolídeo, Isovernoniol B1, Vernodalina, Vernoniol: A4 e B1	Ohigashi et al., 1994
Vernodalol, Vernolida	Erasto et al., 2006
Ácido mirístico, Ácido 9-metildodecanoico, Ácido 14-metilhexadecanoico, Ácido linoleico, Ácido alfa-linoleico, Ácido esteárico, Ácido eicosanoico, Ácido heneicosanoico, Ácido gama-linoleico, Ácido docosanoico, Ácido tetradocosanoico	Erasto et al., 2007
Ácido 1,5-dicafeoilquínico, Ácido clorogênico, Apigenina-O-glucoronídeo, Luteolina e seus derivados glicosilados, Rutina	Ola et al., 2009
Vernodalinol, Vernoniosídeo: A1, A2, A3, A4, B1 e B2	Luo et al., 2010

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Quanto ao aspecto ecológico, estudos têm relatado que *V. condensata* é hospedeira de certos insetos, como a *Bucephalogonia xanthophis* (Berg) (BEZERRA-SILVA et al., 2012; MIRANDA et al., 2008), os insetos machos são atraídos pelos compostos voláteis liberados pelas folhas de *V. condensata* (ARAB; BENTO, 2006). A multiplicação *in vitro* desta *Vernonia*, como medida para minimizar o impacto de sua crescente exploração nas reservas naturais, foi proposta com sucesso (VICENTE et al., 2009).

O papel de *V. condensata* como planta medicinal no Brasil pode ser observado em diversos estudos de revisão etnobotânica e etnofarmacológica (MONTEIRO et al., 2011; PERONI; BEGOSSI; HANAZAKI 2008; ROSSATO et al., 1999; SCUDELLER et al., 2009; VOEKS, 1996). Entre as plantas medicinais usadas tradicionalmente para combater e prevenir malária, *V. condensata* foi citada pela população para tratar sintomas da infecção pelo protozoário envolvido no processo, estando sua aplicação relacionada aos distúrbios do fígado causados pelo parasito (BRANDÃO et al., 1992).

A revisão de Houghton e Osibogun (1993) relatou o uso desta espécie no tratamento de picadas de cobras, referenciando Pereira e colaboradores (1991) que, por sua vez, demonstraram a ação antiofídica do extrato aquoso das folhas da planta, via oral, em camundongos, frente ao veneno de *Bothrops jararaca*, corroborando seu uso popular para esse propósito.

O levantamento sobre o perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares no município de Pato Branco, Paraná, realizado por Marchese e colaboradores (2004), apontou a *V. condensata* como uma entre as dez plantas medicinais preferidas pela população local, onde é tradicionalmente chamada de boldo e utilizada no tratamento de distúrbios hepáticos.

Albuquerque e colaboradores (2007) fizeram um levantamento das plantas medicinais da caatinga, região semi-árida do Brasil, com base em uma análise de dados de 21 referências. A espécie é conhecida nesta região como alcachofra e alumã e, segundo estes autores, é usada tradicionalmente para o tratamento de afecções do estômago, problemas digestivos e hepáticos, bem como para dores musculares.

Pesquisa etnofarmacológica realizada na cidade de Diadema, São Paulo, buscou analisar a influência do uso de plantas medicinais na região por migrantes de outros estados. Neste estudo, as entrevistas, usadas como instrumento de investigação, apontaram o uso de *V. condensata*, mais uma vez, no tratamento de distúrbios gástricos e hepáticos, além do frequente cultivo doméstico dessa planta (GARCIA et al., 2010). Outro estudo foi publicado, no qual esta espécie teve seu uso tradicional elencado entre as plantas usadas em Santa Catarina, onde é conhecida como boldo da Amazônia, com aplicação popular no tratamento de hipercolesterolemia e hiperglicemia, como emagrecedor e no tratamento de doenças do fígado, como hepatite (GIRALDI; HANAZAKI, 2010). O mesmo uso tradicional foi relatado no estudo realizado por Pompilho e colaboradores (2011), em um levantamento etnobotânico na cidade de Natividade, Rio de Janeiro, onde também é conhecida como boldo.

Em estudo mais recente, Conde e colaboradores (2014) listaram, na região da Zona da Mata Mineira, as plantas medicinais usadas pela população local e, novamente, foi relatado o uso tradicional das folhas de *V. condensata*, conhecida nesta região como necroton, como hepatoprotetoras.

O uso popular de *V. condensata* não se limita apenas ao homem. Existem comunidades nas quais a espécie é utilizada no tratamento de dor, inflamação e até mesmo como cicatrizante em animais (OLIVEIRA et al., 2009).

Os principais usos tradicionais de *V. condensata* citados em diferentes fontes de revisão estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Usos tradicionais de *Vernonia condensata*

Uso Tradicional	Parte da Planta	Forma de Uso	Local	Referência
Analgésico e anti-inflamatório	Folhas	Suco/Infusão	Nordeste	Albuquerque et al., (2007); Oliveira et al, 2009; Monteiro et al, 2011
Cicatrizante	Folhas	Suco/Emplastro	Diversas regiões	Oliveira et al, 2009
Picada de Cobra	Folhas	Infusão	Diversas regiões	Pereira et al.,1991; Houghton; Osibogun,1993
Hepatoprotetor e distúrbios hepáticos	Folhas	Suco	Paraná; Nordeste; São Paulo; Rio de Janeiro; Minas Gerais	Brandão et al, 1992; Voeks, 1996; Albuquerque et al. 2007; Scudeller et al., 2009; Garcia et al, 2010; Giraldi; Hanazaki, 2010; Monteiro et al, 2011; Pompilho et al, 2011; Conde, 2014
Distúrbios gástricos	Folhas	Suco/Infusão	Nordeste; São Paulo	Voeks, 1996; Scudeller et al., 2009; Garcia et al., 2010; Giraldi; Hanazaki, 2010; Monteiro et al, 2011
Emagrecedor e Hipocolesterolêmico	Folhas	Infusão	Santa Catarina	Giraldi; Hanazaki, 2010
Diabetes	Folhas	Suco/Infusão	Santa Catarina	Monteiro et al, 2011

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2016).

No Brasil, uma mistura popular, constituída do extrato de sete (7) plantas, tem sido utilizada para melhorar a atividade do sistema imunológico, bem como para combater a proliferação de células tumorais. As plantas são Babaçu (*Orbignia martiana* Rodr.), Ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae* L.G.), Bardana (*Arctium lappa* L.), Rosa (*Rosa centifolia* L.), Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.), Boldo-baiano (*Vernonia condensata* Baker) e Tuia (*Thuja occidentalis* L.). A mistura é denominada "Mais Vida" (CORREA et al., 2006; FRANÇA et al., 2010; FRANÇA et al., 2012). Correa e colaboradores (2006) verificaram a capacidade do "Mais Vida" em modular a atividade funcional de fagócitos do sangue. Estes autores concluíram que os resultados obtidos contribuíram para a sustentação do uso popular do composto "Mais vida" como imunomodulador. Outros efeitos imunomoduladores deste composto contendo extrato de *V. condensata* foram avaliados *in vivo* e *in vitro* apresentando resultados bastante promissores como agente imunoestimulante (FRANÇA et al., 2010, FRANÇA et al., 2012).

Na busca por compostos antimicrobianos naturais, o extrato etanólico a 10% de partes aéreas de *V. condensata* teve a atividade antibacteriana avaliada para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* pelos testes de difusão em ágar, CIM e CBM, o qual não demonstrou atividade significativa para ambos os micro-

organismos (BRASILEIRO et al., 2006). No entanto, segundo Fabri e colaboradores (2011), o extrato metanólico das folhas dessa espécie vegetal foi ativo contra cepas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica subsp enterica sorovar Typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*. Em estudo realizado por Erasto e colaboradores (2006), duas lactonas sesquiterpênicas foram isoladas a partir de folhas de *Vernonia amygdalina*, espécie representativa do gênero *Vernonia*: vernolida e vernodalol. Estas foram testadas pelo método de diluição em ágar contra 10 cepas bacterianas e cinco (5) espécies de fungos. Vernolida demonstrou atividade contra *B. cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Entre os micro-organismos Gram-negativos, vernolida teve ação somente sobre *Salmonella pooni*. O vernodalol foi ativo contra *B. cereus*, *S. epidermidis*, *S. pooni* e *S. pyogenes*. Portanto, concluiu-se que os resultados obtidos com estes compostos fornecem suporte científico para a utilização médica de folhas da espécie no tratamento de doenças infecciosas. Também para *V. amygdalina*, Anibijuwon et al. (2012) observaram que o extrato etanólico foi mais ativo do que o extrato aquoso frente a cepas de *Streptococcus mutans* e *S. aureus*. Okigbo e Mmekka (2008) também fizeram observações semelhantes para os extratos aquoso e etanólico, frente a *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans*.

A atividade antioxidante, avaliada pelo método do DPPH, também foi observada para o extrato metanólico das folhas de *V. condensata* (FABRI et al., 2011). A mesma atividade também foi avaliada por Silva e colaboradores (2013) para o extrato etanólico das folhas e suas partições (hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica) que avaliaram, ainda, a atividade antioxidante pelo método poder de redução do  $Fe^{+3}$ , pelo teste de reação com fosfomolibdênio e pelo teste do ácido tiobarbitúrico. Considerando os resultados obtidos, os autores ressaltaram que o extrato etanólico bruto, as partições diclorometânica e em acetato de etila são promissores agentes antioxidantes. Dois flavonoides com atividade antioxidante, luteolina e apigenina, foram detectados na partição em acetato de etila.

A ação analgésica central foi observada por Frutuoso (1994) para o extrato aquoso liofilizado (200 mg / kg) em modelo de contorções abdominais. Neste estudo, também foi observado o aumento acentuado do tempo de sono induzido por tiopental. Já a fração polar, preparada por lavagem do extrato bruto com clorofórmio, não alterou o tempo de sono, mas manteve a atividade analgésica. Os autores relataram, ainda, a atividade antiulcerogênica do extrato aquoso liofilizado em ratos

com úlcera péptica induzida por indometacina. A atividade analgésica também foi observada por Risso e colaboradores (2010), Affonso (2001) e Silva e colaboradores (2011) para diferentes extratos da planta.

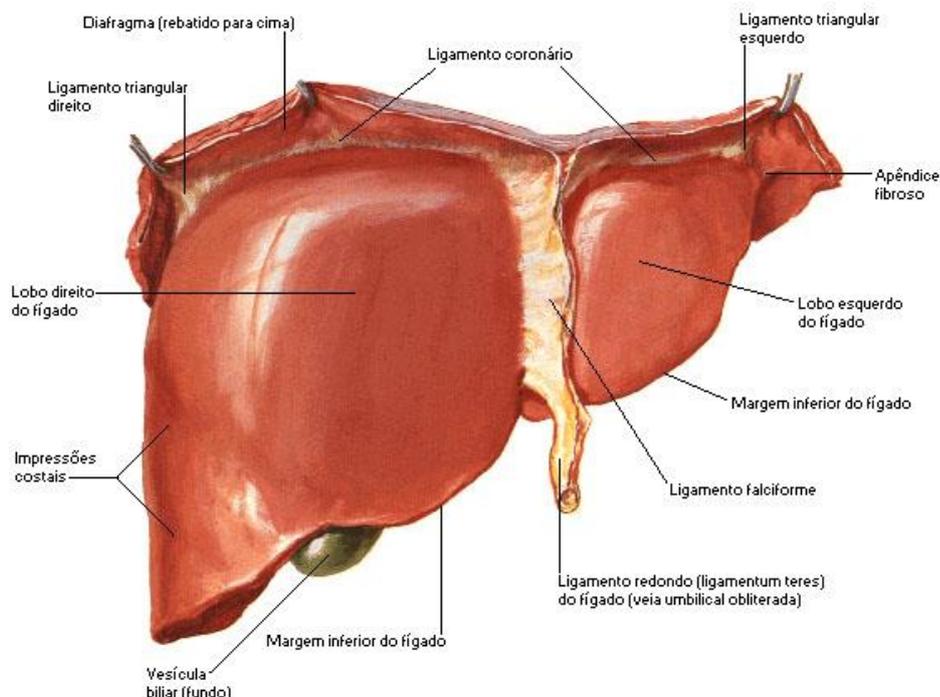
O extrato etanólico das folhas de *V. condensata* também teve sua atividade anti-inflamatória avaliada em modelo animal pelos testes de edema de pata induzida por carragenina e de pleurisia induzida por carragenina (SILVA et al., 2011). Este estudo sugeriu que as ações anti-inflamatórias do extrato estão relacionadas com a inibição de um ou mais sinais intracelulares de vias envolvidas nos efeitos de mediadores inflamatórios. Os autores relataram letargia nos animais tratados, indicando um provável efeito sedativo. Assim, usaram modelo de sono induzido para melhor compreender a sonolência e letargia. O extrato etanólico de *V. condensata* aumentou significativamente a duração do sono induzido em camundongos sugerindo provável ação tranquilizante, bem como ação depressora do SNC.

A toxicidade aguda, a embriotoxicidade e a mutagenicidade também foram avaliadas em animais para o extrato aquoso liofilizado de folhas de *V. condensata*. Nenhuma toxidade foi observada após a administração oral. A embriotoxicidade foi investigada em camundongos Han: NMRI. Exceto por uma pequena redução de peso corporal fetal acompanhada por sinais de ossificação retardada na dose mais elevada, nenhum outro efeito embriotóxico foi observado pelo grupo. A mutagenicidade foi avaliada em *Salmonella sp* pelo teste de Ames e o mesmo não foi mutagênico para cepas teste TA97a, TA98 e TA100. Com os resultados obtidos sugeriram que o extrato aquoso desta espécie apresenta baixa toxicidade aguda, não possui efeitos teratogênicos e não oferecem riscos mutagênicos (MONTEIRO et al., 2001). Este trabalho foi citado como referência por Rodrigues et al. (2011) em sua revisão intitulada: “Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais” o que ajuda a evidenciar a relevância da espécie no rol de plantas medicinais usadas tradicionalmente no país. Com impacto semelhante, este estudo também foi referenciado em 2011 por Veríssimo e colaboradores, em estudo sobre as plantas de interesse do Governo Federal onde compilou referências de trabalhos relacionados a toxidade no sistema reprodutor de fêmeas e no desenvolvimento do feto.

### 3.2 O FÍGADO: BREVES CONSIDERAÇÕES

O fígado é um órgão vital e bastante complexo do corpo humano. É responsável por centenas de reações metabólicas necessárias à sobrevivência do organismo. Didaticamente, as funções hepáticas podem ser divididas em duas categorias principais: uma de processamento das substâncias absorvidas e reações de síntese; e a outra, secreção e excreção (LOPES, 2009).

Figura 3: Ilustração da anatomia hepática humana



Fonte: NETTER, 2000.

Os hepatócitos, células parênquimais, correspondem a aproximadamente 80% do tecido hepático, a fração não parenquimatosa equivale aos 20% restantes e são localizadas em compartimentos sinusoidais e das vias biliares do tecido. O hepatócito realiza muitas funções metabólicas e sintéticas, tais como armazenamento e de mobilização dos carboidratos, manutenção dos fatores sanguíneos de coagulação e o metabolismo de substâncias exógenas (fármacos ou drogas). Em condições normais, o hepatócito é capaz de se regenerar e restaurar a função normal. A manutenção da função hepática é vital para a fisiologia normal, e danos a esse órgão são prejudiciais para a saúde humana (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As células de Kupffer (KC) constituem os macrófagos do tecido hepático. São encontradas no interior do lúmen das sinusoides do fígado, e estão constantemente expostas a bactérias da microbiota intestinal e toxinas diversas que muitas vezes as ativam. Uma vez ativas as KC produzem citocinas, óxido nítrico e outros mediadores da inflamação. Assim, pode-se dizer que estão intimamente envolvidas na resposta a infecções, toxinas, isquemia e outros tipos de estresse no tecido hepático (BILZER et al., 2006).

As doenças hepáticas podem possuir etiologia diversa, podendo ser ocasionadas, por exemplo, por infecção viral, excesso de álcool ou exposição a determinados fármacos (GIANNINI, 2005). A lesão hepática induzida por vários agentes tóxicos, incluindo o paracetamol, tem sido atribuída, em parte, para a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores pelas KC. Foi demonstrado que fatores hepatoprotetores, tais como a interleucina (IL) -10 e os mediadores derivados de ciclo-oxigenase, também são regulados positivamente em resposta ao dano hepático, e as KC têm sido apontadas como fonte destes fatores moduladores. Estas células, também têm funções reguladoras importantes em estados patofisiológicos do fígado protegendo o órgão por meio da produção de uma variedade de fatores moduladores que podem neutralizar as respostas inflamatórias e / ou estimular a regeneração hepática (JU et al., 2002).

Alguns parâmetros bioquímicos são usados como ferramentas de estudo e avaliação das funções hepáticas. Porém, a maioria dos testes clínico-laboratoriais empregados indicam apenas determinados aspectos do comprometimento do órgão. Os testes mais utilizados são os que avaliam as bilirrubinas, as proteínas séricas e algumas enzimas. Alguns fundamentos fisiopatológicos do diagnóstico enzimáticos são base para o entendimento da correlação da função hepática com estes parâmetros bioquímicos (LOPES, 2009).

As enzimas podem ser classificadas em intra e extracelular, de acordo com o local onde exercem sua atividade biológica. As enzimas intracelulares diferenciam-se quanto à localização no interior da célula. Uma vez sintetizadas distribuem-se no citoplasma ou nas diferentes organelas citoplasmáticas participando dos processos celulares. Alterações na célula, tais como danos diretos na membrana celular, traumas, mudanças de pressão, quantidade insuficiente de oxigênio e substratos, alterações metabólicas são possíveis causas para liberação de enzimas intracelulares, aumentando assim seus níveis séricos. (LOPES, 2009).

O aumento dessas enzimas não é proporcional à gravidade da desordem em cada célula. Assim, na hepatite aguda causada por vírus, a lesão celular é ligeira, porém extensa (a maioria das células está comprometida) e de evolução rápida. Neste caso há acentuado aumento dos níveis séricos das enzimas transaminases. No caso de intoxicação por fungos, por exemplo, a lesão no hepatócito é grave, extensa e a evolução é rápida, acarretando aumento dos níveis séricos dessas enzimas e ainda daquelas de localização mitocondrial e lisossomal. A cirrose hepática por sua vez, é um quadro de lesão celular grave, porém, com pequena extensão e evolução lenta, produzindo discreto aumento dos níveis de atividade das aminotransferases (GIANINNI, 2005).

As principais enzimas que fornecem informações sobre o comprometimento hepático são alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e a  $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT) (GHABRIL et al., 2010).

A ALT é uma enzima intracelular de localização exclusiva citoplasmática. Encontra-se em maior concentração no tecido hepático, sendo encontrada também, porém em menores quantidades, no miocárdio, rins e músculos esqueléticos. Apesar de presente em outros tecidos é considerada pela prática clínica um importante marcador específico de lesão hepática (LOPES, 2009).

A AST é encontrada no citoplasma e nas mitocôndrias do miocárdio e do fígado em maiores quantidades, sendo presente também no músculo esquelético, nos rins e no pâncreas.

Em caso de hepatite fulminante (necrose hepática de grande extensão), os níveis de ALT e AST inicialmente aumentam, mas como os hepatócitos estão destruídos, os níveis retornam a níveis discretos ou normais (LOPES, 2009).

Nas lesões hepáticas por envenenamento, os níveis de aminotransferases podem atingir valores muito elevados, já em casos de hepatite alcoólica a razão AST/ALT costuma ser de aproximadamente 2:1, sendo que o aumento dos níveis de AST raramente ultrapassa dez vezes o limite superior normal (GIANINNI, 2005). Certos medicamentos e alguns produtos químicos também podem provocar aumento nos níveis séricos das aminotransferases (Tabela 3).

Tabela 3: Medicamentos, toxinas e drogas que aumentam níveis séricos de atividade das aminotransferases.

<b>Medicamento</b>	<b>Toxina</b>	<b>Droga</b>
Paracetamol	Tetracloroeto de Carbono	Esteroides anabolizantes
Metildopa	Clorofórmio	Cocaína
Carbamazepina	Dimetilformamida	Ecstasy
Fluconazol	Hidrazina	Fenciclidina
Heparina	2-Nitropropano	
Nitrofurantoína	Tricloroetileno	
Alguns AINES	Tolueno	
Fenitoína		
Sulfonamidas		
Ácido Valproico		
Vitamina A		
Anticoncepcionais		

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2016).

Outra enzima intracelular presente no fígado é a fosfatase alcalina (FAL). Porém também é encontrada em outros tecidos. Na clínica, o aumento dos níveis de FAL é indicativo de colestase, diminuição do fluxo biliar. Nas lesões hepáticas, observa-se aumento de até dez vezes o limite superior normal, como no caso de icterícia obstrutiva e nas colestases induzidos por drogas (LOPES, 2009).

A  $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT) aparece no fígado (ductos biliares e fração microsomal) e em outros tecidos como o pâncreas, rins, intestino, próstata, coração, cérebro e glândulas mamárias. Esta enzima apresenta maiores alterações quando há comprometimento do sistema biliar. O consumo aumentado de etanol eleva os níveis de GGT no soro, porém uma vez cessada a ingestão da bebida, os níveis retornam aos valores normais (GHABRIL et al., 2010).

### 3.2.1 Intoxicação hepática

A hepatite medicamentosa ou lesão hepática idiossincrática induzida por drogas é definida como uma lesão hepática provocada pelo uso de fármacos sintéticos, fitofármacos, ou qualquer outro xenobiótico que conduz à alteração na bioquímica hepática com consequente aumento das aminotransferases (SUK, KIM, 2012). Existem mais de 1.200 substâncias farmacêuticas com potencial de provocar

fenômenos de hepatotoxicidade, a imensa maioria de natureza idiossincrásica (BITTENCOURT, 2011).

Dados mostram que aproximadamente 10% dos casos de óbito por doença hepática grave, ou da necessidade transplante de fígado, devem-se à lesão irreversível do hepatócito por fármacos (BARBIERI et al., 2010).

A doença hepática medicamentosa é um problema de saúde pública com profundas implicações para os doentes, profissionais de saúde, indústrias farmacêuticas e os sistemas de saúde como um todo. Muitas vezes o lançamento de um novo medicamento é interrompido na fase de ensaios clínicos devido a questões toxicológicas e de segurança, com destaque para toxicidade hepática (WATKINS, SEEFF, 2006). Sendo também a causa principal de remoção de drogas do mercado mesmo após as fases clínica e pós-clínica. Ainda é um desafio à prática clínica o diagnóstico preciso de hepatite medicamentosa devido à ausência de evidência direta da hepatotoxicidade induzida e a sua incidência relativamente baixa (NOBRE et al., 2008). O atraso no estabelecimento do diagnóstico é, portanto, muito comum uma vez que requer a exclusão de outras causas de lesão hepática (GHABRIL, 2010).

A insuficiência hepática aguda é um quadro clínico grave e imprevisível, podendo ser definido pelo aparecimento repentino de encefalopatia e distúrbios na coagulação. A superdosagem de paracetamol é a causa mais comum de insuficiência hepática aguda e é, ainda, uma das principais causas de lesão hepática que leva ao transplante de fígado (FONTANA, 2008).

O paracetamol, também chamado acetoaminofeno, é um fármaco com ação analgésica e antitérmica cuja venda é isenta de prescrição. É encontrado sob diversas formas farmacêuticas com fácil acesso para população, porém muitos desconhecem seus efeitos nocivos ao organismo (HE et al., 2011; SEBBEN et al., 2010). Vários princípios ativos de uso comum na prática clínica são potenciais agressores aos tecidos hepáticos (Tabela 4).

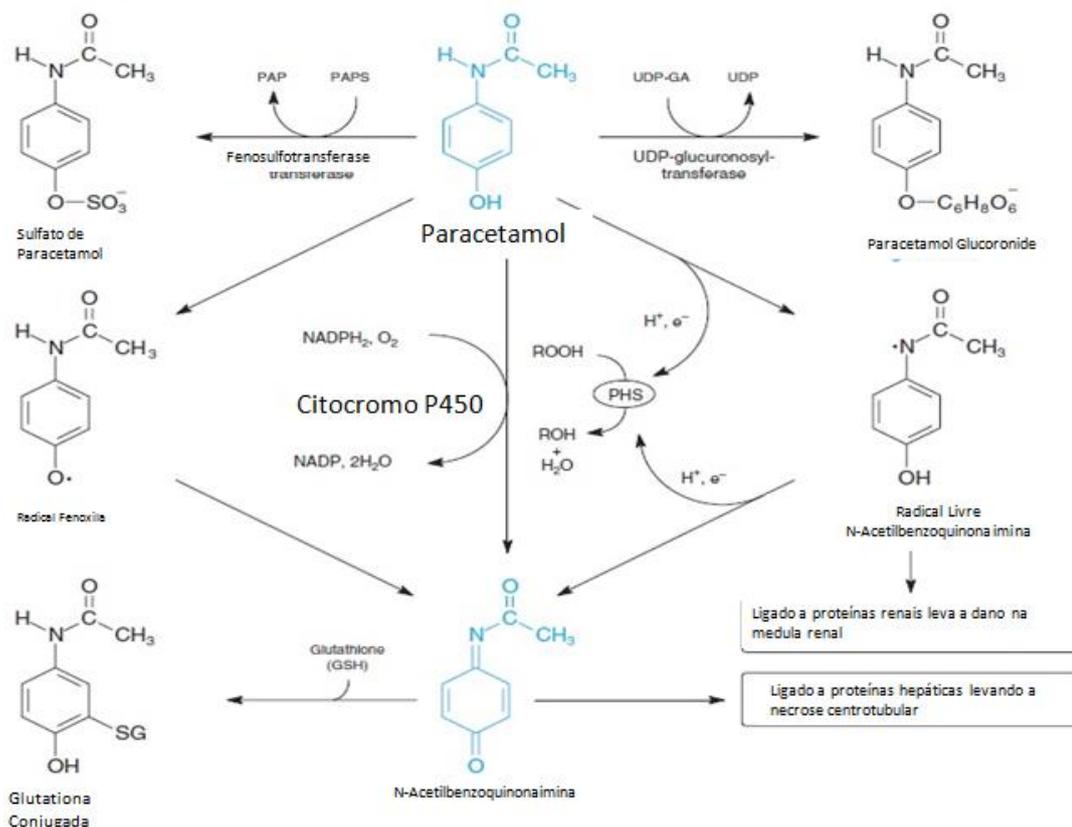
Tabela 4: Lesões hepáticas induzidas por fármacos e principais fármacos envolvidos.

<b>Tipo de lesão</b>	<b>Principais drogas</b>
Lesão aguda no fígado dependente da dose	Paracetamol, salicilatos (>2g/dia)
Lesão aguda no fígado independente da dose	Indometacina, alopurinol, atenolol, piroxicam, carbamazepina
Infiltração de gordura no fígado	Salicilatos, fenitoína, ácido valproico, metotrexato, tetraciclina
Icterícia	Eritromicina, carbamazepina, cefalosporinas, haloperidol, cetoconazol, contraceptivos orais, antidepressivos tricíclicos
Nódulos inflamatórios crônicos	Quinidina, carbamazepina, fenilbutazona
Doenças hepáticas crônicas	Paracetamol (uso crônico), metildopa, nitrofurantoína
Cirrose hepática	Metotrexato, terbinafina
Icterícia crônica	Combinação de clorpromazina e ácido valproico, imipramina, fenitoína
Tumor hepático	Esteroides anabolizantes, contraceptivos orais

Fonte: HepCNet, 2003 com modificações.

O metabolismo do paracetamol é hepático e pode ocorrer por meio de três mecanismos distintos: sulfatação, glicuronização e oxidação (Figura 4). Quando ligado ao ácido glicurônico, o acetoaminofeno produz um metabólito inerte, da mesma forma como quando passa pelo mecanismo de sulfatação. A via oxidativa produz um metabólito altamente tóxico que em condições terapêuticas, se une a glutathione, formando conjugados de cisteína e ácido mercaptúrico (SEBBEN et al., 2010). Porém, quando administrado em doses acima de 4 g/dia, após a saturação das vias metabólicas principais, o paracetamol sofre oxidação, gerando o metabólito tóxico n-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) (HE et al., 2011).

Figura 4: Ativação do paracetamol pelo citocromo P450 levando a hepatotoxicidade.



Fonte: Klaassen, 2007 (adaptado).

Quando administrado em doses terapêuticas, o metabolismo do paracetamol resulta em quantidades pequenas de NAPQI que são conjugadas a glutathione. Em doses elevadas, a oxidação do paracetamol por meio da ativação do sistema citocromo P450 (CYP) incrementa a produção de NAPQI, e o acúmulo deste leva a um processo irreversível de lesão hepatocelular (JUNIOR, 2011).

A NAPQI é um metabólito muito reativo que se liga a proteínas dos rins e do fígado do organismo intoxicado. Estudos revelaram que, tanto em roedores quanto em humanos, leva a lesão mitocondrial e fragmentação de DNA, resultando em morte celular por necrose (MCGILL et al, 2012).

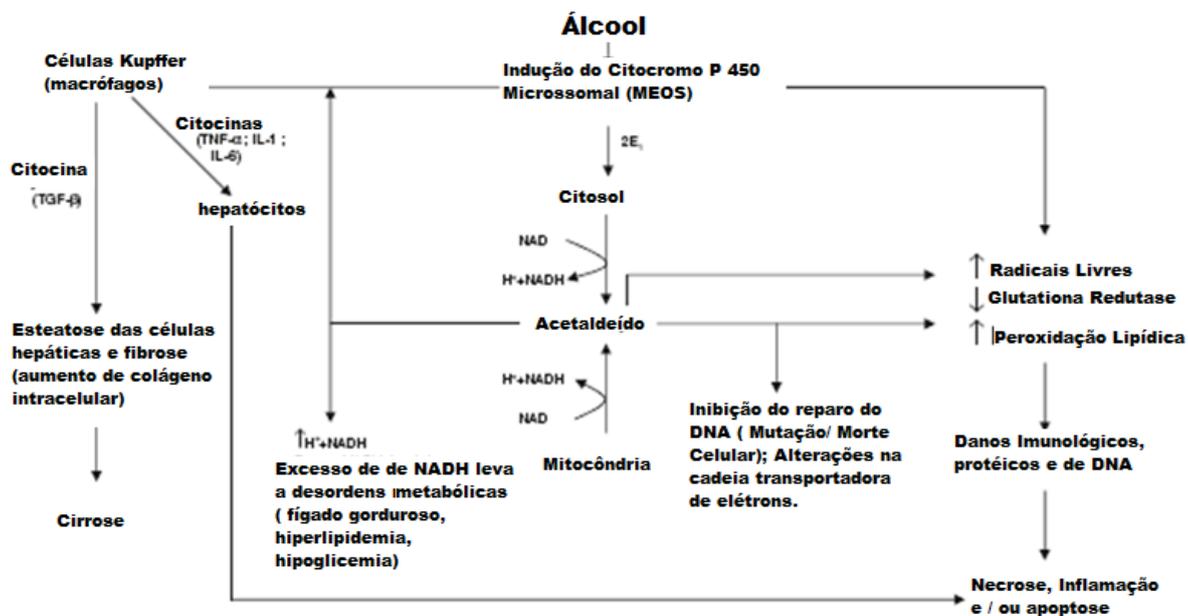
Outro importante agente causador de lesões hepáticas é o álcool etílico. Entre as inúmeras drogas de abuso, o álcool é uma das drogas mais acessíveis e com maior taxa de consumo abusivo no mundo sendo, talvez, uma das drogas mais antigas utilizadas pela espécie humana (MARQUES, 2001).

Os estudos epidemiológicos permitiram evidenciar a correlação do consumo de etanol e os índices de mortalidade por cirrose hepática em vários países. Em estudo realizado com babuínos pôde-se observar o desenvolvimento de

cirrose mesmo sem deficiência nutritiva, uma vez que foi oferecida uma dieta completa, denominada, então, protetora. A hepatotoxicidade do etanol está associada ao processo metabólico do mesmo (MINCIS, MINCIS, 2011).

O etanol é metabolizado principalmente no fígado por meio de uma série de reações oxidativas, sendo que na primeira reação o etanol é catalisado pela enzima, a álcool desidrogenase (ADH). No indivíduo alcoólico crônico, em que a atividade de ADH pode encontrar-se já bloqueada, duas outras vias, “vias de recurso”, são acionadas: a via do Sistema Mitocondrial de Oxidação do Etanol (*sigla em inglês - MEOS*) pelo citocromo P450 (CYP2E1), e a da catalase, localizada nos peroxissomas dos hepatócitos (KACHANI et al., 2008). Independentemente do sistema enzimático, ADH, MEOS ou catalase, a primeira etapa do metabolismo do etanol leva à produção de hidrogênio e acetaldeído, sendo este, um produto tóxico (JÚNIOR et al., 1998). Também reduz os níveis de glutatona aumentando o efeito tóxico de radicais livres (Figura 5). E, interfere com a cadeia de transporte de elétrons, causando alterações estruturais na mitocôndria, além de inibir os mecanismos de reparação do DNA (MATOS, 2003).

Figura 5: Esquema geral do metabolismo do etanol no tecido hepático



Fonte: Muriel, 2009 (adaptado).

Lesões agudas por etanol são consideradas intoxicações hepáticas e, em geral, em lesões hepáticas isquêmicas ou tóxicas, os níveis de AST geralmente aumentam antes dos níveis de ALT. Tal evento ocorre, pois esta enzima apresenta distribuição intralobular peculiar. A Zona 3 do acinus é mais vulnerável a ambas situações: níveis reduzidos de oxigênio (no caso das lesões isquêmicas) e toxidez (hepatócitos são mais ricos em enzimas microssomais). Além disso, os níveis de aminotransferase tendem a diminuir rapidamente após um pico (GIANINNI, 2005).

O uso crônico de álcool traz consequências complexas, como a esteatose, fibrose hepática, síndrome de Wernicke-Korsakoff (grave síndrome psiquiátrica), hipoglicemia, entre outros (MATOS, 2003).

### 3.2.2. Doenças hepáticas e o tratamento com produtos naturais

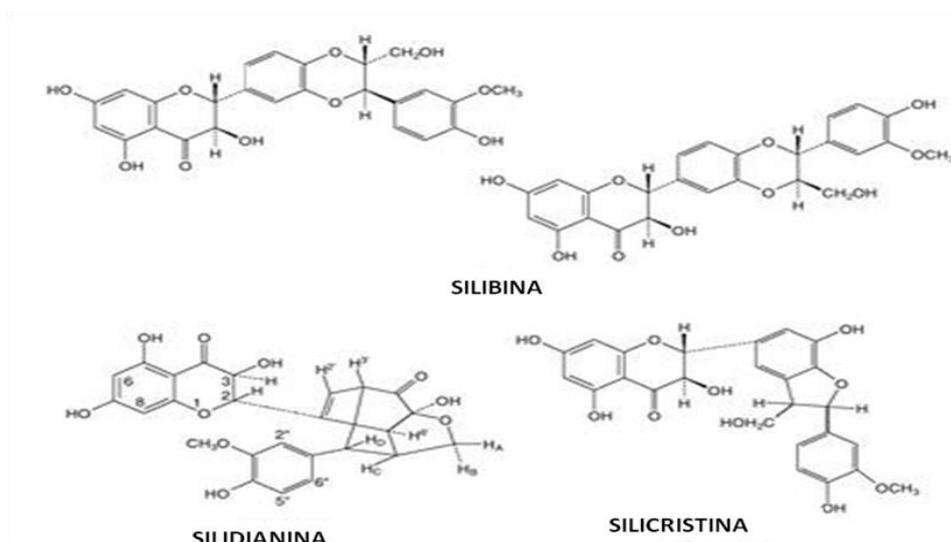
Por todo o mundo há um crescente interesse em medicamentos de origem vegetal para o tratamento de várias doenças incluindo hepatopatias (IBRAHIM et al., 2008). Algumas espécies apresentaram resultados bastante significativos no que tange a hepatoproteção tais como a *Spirulina maxima* (TORRES-DURAN et al., 1999), *Eclipta Alba* (SAXENA et al., 1993), *Boehmeria nivea* (LINN et al., 1998), *Cichorium intybus* (HEIBATOLLAH et al., 2008), e *Picrorhiza kurroa* (NALLAMILI et al., 2013).

Os agentes hepatoprotetores são as ferramentas terapêuticas usadas na prática clínica para se minimizar, ou mesmo evitar os efeitos da hepatotoxicidade. É possível encontrar no mercado inúmeros medicamentos descritos com propriedades hepatoprotetoras. Muitos desses medicamentos são produtos do metabolismo especial de plantas tais como a curcumina, o resveratrol, a glicirrizina, a Liv-52 e com grande destaque, a silimarina, (RIVERA-ESPINOZA, 2008). A glicirrizina é o principal constituinte da raiz de *Glycyrrhiza glabra* e é usada desde a antiguidade pelos chineses como droga hepatoprotetora (WAN, 2009). A curcumina (CECÍLIO FILHO et al., 2000; MATHEWS et al., 2012) e o resveratrol (ADEWUSI e AFOLAYAN, 2010; RIVERA et al., 2008) demonstraram em estudos recentes resultados significativos como compostos protetores e curativos para doenças hepáticas em modelos experimentais.

A silimarina compreende um complexo formado por várias substâncias do metabolismo especial de *Silybum marianum*, tais como silibina, silidianina e silicristina (Figura 6), e é utilizada principalmente como hepatoprotetora, antifúngica,

antiedema cerebral e antidepressiva (LEMOS JÚNIOR e LEMOS, 2012). Estudos evidenciaram os potenciais benefícios terapêuticos da silimarina em necrose inflamatória do fígado e fibrogênese dada a sua ação antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, bem como sua provável capacidade de estimular seletivamente a proliferação dos hepatócitos (SALLER et al., 2001). O conhecimento sobre o papel do estresse oxidativo na patogênese da doença hepática alcoólica, sugere que as propriedades farmacológicas da silimarina podem ter valor terapêutico potencial no tratamento desta patologia (ARTEEL, 2003).

FIGURA 6: Estruturas químicas dos constituintes da silimarina.



Fonte: MEDSCAPE, 2014. (adaptado)

### 3.3. OUTRO PONTO DE RELEVÂNCIA PARA ESTE ESTUDO

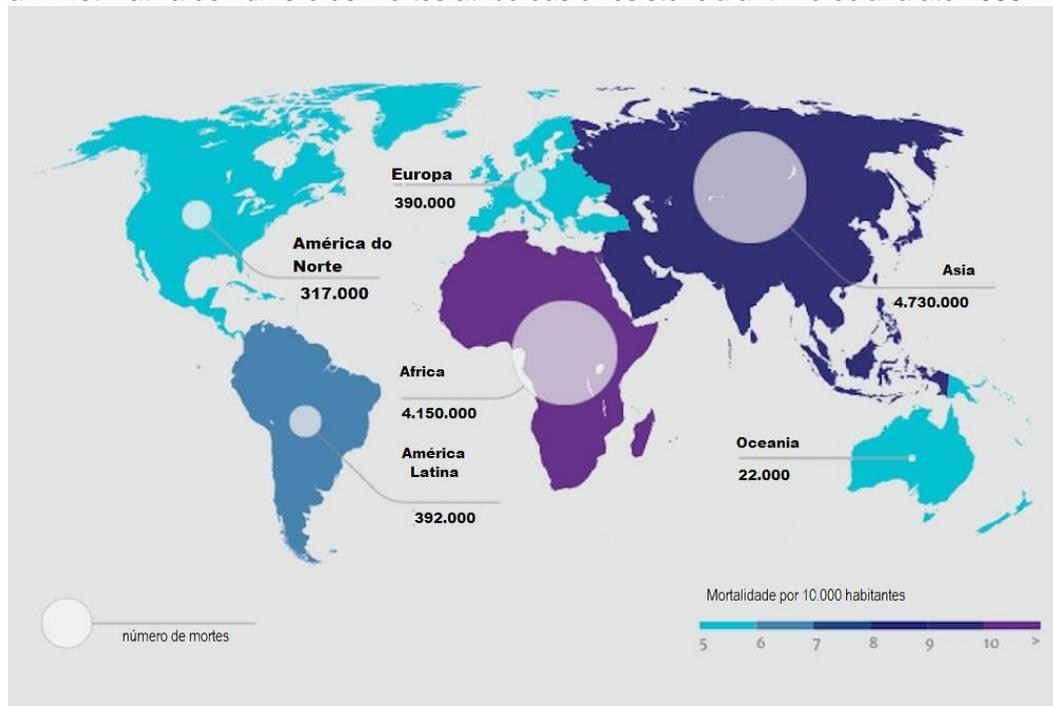
#### 3.3.1 *Staphylococcus aureus*

A existência de bactérias patogênicas resistentes a drogas antimicrobianas é uma das principais questões de saúde pública da atualidade (WOOLHOUSE et al., 2016). Os agentes antimicrobianos tornam-se ineficazes frente a esses patógenos por diferentes razões tais como antibioticoterapia inadequada ou prolongada, manejo inadequado de antimicrobianos na agropecuária (LUYT et al., 2014; SPELLBERG e GILBERT, 2014).

Estimativas do número de mortes (Figura 7) em escala global decorrentes de resistência aos antibióticos chegam 10 milhões de mortes por ano. A resistência

bacteriana foi classificada como uma séria ameaça à sociedade como o terrorismo (O'NEILL, 2014).

Figura 7: Estimativa do número de mortes atribuídas à resistência antimicrobiana até 2050.



Fonte: O'NEILL, 2014 (adaptada).

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou a lista das bactérias mais resistentes aos antibióticos no mundo (Tabela 5). Estes patógenos figuram, para a OMS desde então, como prioridade nas pesquisas de novos agentes antibacterianos. Os patógenos de maior relevância para pesquisa foram agrupados em níveis de prioridade e *S. aureus* situa-se entre aqueles de alta prioridade (WHO, 2017).

Existe um forte apelo global para o desenvolvimento de medicamentos alternativos para combater as infecções causadas por patógenos resistentes aos fármacos em uso. Embora o número de dados venha crescendo nos últimos anos, as informações sobre epidemiologia de *S. aureus* resistente na América Latina ainda não correspondem à realidade vivenciada pela população, especialmente em regiões em que são poucos os recursos disponíveis para a caracterização e descrição das linhagens (MEJIA, ZURITA, GUZMAN-BLANCO, 2010).

Tabela 5: Patógenos de maior prioridade nas pesquisas de novos antibióticos:

Nível de Prioridade	Patógeno	Resistencia
Crítico	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenem
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenem
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenem; $\beta$ -lactamase de espectro ampliado
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>Meticilina; Vancomicina</b>
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter spp.</i>	Fluoroquinolona
	<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolona
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolona; Cefalosporina
Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella spp</i>	Fluoroquinolona

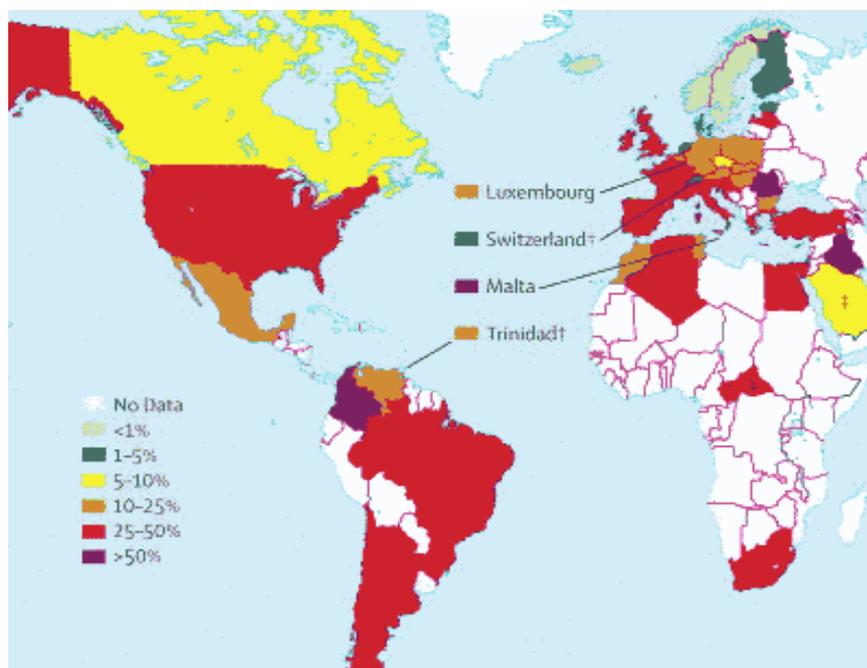
Fonte: WHO, 2017 (adaptada).

Cerca de 30% da população mundial são colonizadas por *Staphylococcus aureus*, bactérias tipo cocos Gram-positivas (TONG et al., 2015). Pele e fossas nasais de pessoas saudáveis são locais onde é possível isolar com facilidade amostras deste micro-organismo. Apesar de estar presente na microbiota normal, *S. aureus* frequentemente está relacionada a uma série de patologias da pele (espinhas, furúnculos e celulites), do trato respiratório (pneumonia) e outras doenças graves como endocardite e meningite (BANNERMAN, 2003, HEPBURN et al., 2016, REPESSÉ et al., 2016; VANEPEREN E SEGRETI, 2016). O *S. aureus* libera diferentes toxinas e enzimas que lesionam a pele, e a partir de proteínas da derme adere na mesma formando um biofilme, é um importante mecanismo de adesão e resistência aos agentes antibacterianos (ABRAHAN et al., 2012; MASAKO et al., 2007; NAVASIVAYAM et al., 2013). Os biofilmes de *S. aureus* representam um problema real para a eficiência dos tratamentos de tecidos infectados bem como para higienização de superfícies em ambientes hospitalares e para indústria de alimentos (PERIASAMY et al., 2011). E ainda, *S. aureus* apresenta grande plasticidade genética sendo capaz de adquirir novos genes, inclusive àqueles relacionados à resistência aos antimicrobianos. Assim, este micro-organismo é uma

das principais causas de infecções hospitalares e comunitárias em todo o mundo (SPAGNOLO et al., 2014).

Com o advento da penicilina na década de 1940, o número de infecções causadas por *S. aureus* reduziu por um tempo, contudo em poucos anos começaram a surgir os primeiros casos de resistência à penicilina pela ação das  $\beta$ -lactamases (HIRAMATSU et al., 2014). A meticilina, penicilina semissintética, foi desenvolvida como alternativa às bactérias produtoras de penicilinas. Contudo, sua utilização irracional levou ao surgimento de amostras de *S. aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) que rapidamente se disseminaram pelo mundo (NAMVAR et al., 2014). A prevalência de MRSA (Figura 8) é apontada como elevada no Brasil, em países do Mediterrâneo e nos Estados Unidos desde 2006 (GRUNDMANN et al., 2006).

Figura 8: Proporção de MRSA em partes do mundo durante o ano de 2006.



Fonte: GRUNDMANN et al., 2006.

O número de novos agentes antibacterianos descobertos tem diminuído nos últimos anos, sendo lançadas no mercado apenas 5 novas classes de antibacterianos desde o ano 2000 (RENWICK et al., 2016). Muitos compostos têm sido testados, porém as atividades não têm correspondido ao esperado (ABRAHAN et al., 2012; COWAN, 1999).

Por outro lado, as investigações de produtos de origem natural no combate a bactérias vêm apresentando resultados bastante promissores. Muitos extratos de plantas podem ser utilizados para inibir a formação de biofilmes de *S*

*aureus*. Por exemplo, o extrato da raiz de *Rubus ulmifolius* (QUAVE et al., 2012), das folhas de *Cassia alata* (SAITO et al., 2012), dos frutos e das folhas de *Quercus cerris* (HOBBY et al., 2012) entre outros extratos, e ainda os óleos obtidos de plantas, óleo de cássia (*Cinnamomum aromaticum*), Bálsamo do Peru (*Myroxylon balsamum*), óleo vermelho de Thymus (*Thymus vulgaris*) demonstraram resultados bastante promissores (KAVANAUGH e RIBBECK, 2012), bem como moléculas isoladas de plantas, tais como ácido tânico, quercetina (LEE et al., 2013), apigenina (SUPURAN, 2015) e luteolina (ZHU et al., 2015).

Muitos estudos sugeriram que os flavonoides possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, dentre outras. Diversos versam sobre a atividade antimicrobiana dos flavonoides e indicam que os extratos brutos contendo esses constituintes têm mostrado atividade significativa contra várias estirpes de *S. aureus*, e *E. coli* (BAHARFAR, AZIMI, MOHSENI, 2015; LEE et al., 2013; TALEB-CONTINI et al., 2003; XIE et al., 2015).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **4.1 MATERIAL VEGETAL**

As folhas de *Vernonia condensata* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Uma exsicata (CESJ nº 52943) encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger da UFJF, e foi gentilmente identificada pela Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena. As coletas foram realizadas entre os horários de 8:00 e 9:00 horas, no período de junho a setembro de 2012. O nome da planta *V. condensata* Baker foi verificado no sítio eletrônico da *The Plant List* (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Vernonia+condensata>, acessado em 26 de junho de 2017), não tendo sido encontrada outra sinonímia para essa espécie vegetal.

### **4.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO E PARTIÇÕES**

As folhas (2,5 Kg) foram secas à temperatura ambiente, e em seguida transferidas para estufa com ventilação forçada para perda de umidade.

Após a secagem, todo o material botânico foi triturado em liquidificador industrial e pulverizado em tamise nº18.

O pó assim obtido foi pesado (500g) e então submetido à extração por maceração estática em etanol P.A. Após evaporação do solvente em rotavapor com temperatura em até no máximo 45°C, parte do extrato etanólico (EE) seco (57g) foi ressuspenso em água: etanol (9:1) seguido de partição líquido/líquido com solventes orgânicos de polaridades crescentes: hexano (PH) (19,2 g), diclorometano (PD) (6,06 g) e acetato de etila (PA) (5,7 g) (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

### **4.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

#### **4.3.1 Ensaio de viabilidade celular**

##### **4.3.1.1 Análise de citotoxicidade geral para células eucarióticas**

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila) - 2,5 - difeniltetrazólio, MTT. O MTT é um sal insolúvel metabolizado pelas enzimas mitocondriais de células viáveis, originando cristais de formazana com coloração azul (MOSSMAN, 1983). O teste foi realizado sobre

linhagens de células tumorais e não tumorais. As células Raw 264.7, 3T3, HepG2, MDA-MB 231 e HCT-116 foram inoculadas em microplacas a  $1 \times 10^4$  células/poço. As demais suspensões celulares foram semeadas em microplacas de 96 poços contendo  $1 \times 10^5$  células/poço. As placas foram pré-incubadas por 24h a 37 °C para permitir a adaptação das células antes da adição das amostras.

Posteriormente, PA foi adicionado às células na concentração de 50 µg/mL. As placas foram incubadas por 48h a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 5 % de umidade relativa. Após período de incubação com as amostras, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato) foram adicionados a cada poço e incubados por 4h. Ao final deste período, o sobrenadante foi removido e 200 µL de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazana. Os grupos controle incluíram o tratamento com 0,1% de DMSO (controle de interferência do sistema solvente-diluyente), etoposídeo (controle positivo para células tumorais), silimarina (controle positivo para HepG2) e um controle de células (CC) em que há apenas meio e células. Todas as amostras foram solubilizadas em DMSO, antes da diluição. Para comparação, a citotoxicidade do etoposídeo foi avaliada sob as mesmas condições experimentais.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos como a média de três experimentos independentes. A densidade óptica (DO) foi avaliada em espectrofotômetro a 590 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de proliferação celular, em comparação com 0,1% de DMSO.

#### **4.3.1.2 Análise de citotoxicidade específica contra Raw 264.7 para determinação da atividade anti-inflamatória *in vitro***

A viabilidade celular na presença de PA foi avaliada pelo teste do MTT (MOSMANN, 1983). Resumidamente, as células foram cultivadas em microplacas de 96 poços em meio DMEM para cultura celular sem SFB e incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% umidificada. Depois de 24 h, o meio foi gentilmente retirado e substituído por meio DMEM suplementado com PA em concentrações variando entre 0,5 a 40 µg / mL, as células foram, então, tratadas com lipossacarídeos de *Escherichia coli* (LPS) 100 ng / mL, as microplacas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% por 44 h, quando foram adicionados 20 µL de solução de MTT e a incubação foi mantida por mais 4 h. O meio foi então removido, e os cristais de formazana foram solubilizados em 100% de DMSO. A quantidade de

MTT-formazan obtido é diretamente proporcional ao número de células viáveis que é determinada pela medida da absorvância a 590 nm no leitor de microplacas. O controle positivo utilizado foi dexametasona em concentrações variando de 0,001  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ .

#### **4.3.2 Avaliação da atividade hepatoprotetora *in vivo***

##### 4.3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 60 dias, pesando entre 250 e 350 g provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF. Os animais foram alojados em gaiolas e mantidos sob condições adequadas e controladas. Os animais foram adaptados ao ambiente e aos tratadores por um período mínimo de 72 h antes da realização dos experimentos. Os protocolos experimentais e procedimentos seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e os protocolos foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF e aprovados sob o número de protocolo nº 027/2014 (Anexo B).

##### 4.3.2.2 Atividade hepatoprotetora frente a indução de lesão hepática aguda por paracetamol

Foram realizados os ensaios de hepatoproteção frente à toxicidade aguda induzida por paracetamol (KURIAKOSE, KURUP, 2010). Os tratamentos consistiram em EE, PH, PD e PA solubilizados em água destilada com auxílio de Lauril Sulfato de Sódio a 0,6% e Tween 80 a 2% (veículo).

Este ensaio envolveu três etapas: pré-tratamento, indução da lesão e coleta de resultados. Os animais foram divididos em 12 grupos (A - L) de seis animais cada, como se segue:

Grupo A: controle normal – Veículo;

Grupo B: controle negativo – Veículo (7dias) + Paracetamol 3 g/kg (dose única);

Grupo C: EE 200 mg / kg (7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);

Grupo D: EE 100 mg / kg (7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);

Grupo E: PH 200 mg / kg (7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);  
Grupo F: PH 100 mg / kg (7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);  
Grupo G: PD 200 mg / kg (7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);  
Grupo H: PD 100 mg / kg (7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);  
Grupo I: PA 200 mg / kg(7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);  
Grupo J: PA 100 mg / kg (7dias) +Paracetamol 3 g / kg (dose única);  
Grupo K: PA 50 mg / kg (7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);  
Grupo L: Silimarina 100 mg / kg – Controle positivo – hepatoprotetora (7dias) + Paracetamol 3 g / kg (dose única);

O paracetamol foi administrado após 7 dias do início dos tratamentos, em dose única e, após 24 h os animais foram eutanasiados. O sangue foi coletado para análises bioquímicas.

Os seguintes parâmetros bioquímicos foram avaliados de acordo com metodologia descrita pelo fornecedor (LABTEST®): alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL), proteínas totais (PT), albumina (ALB), bilirrubina direta (BD), indireta (BI) e total (BT), triglicérides (TRIGL), colesterol total (CT), colesterol VLDL (c-VLDL), colesterol LDL (c-LDL) e colesterol HDL (c-HDL).

No tecido hepático foi realizada a avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada como um índice de peroxidação lipídica. Foram avaliadas também as atividades das enzimas catalase (CAT) e glutathione redutase (GSH).

Exame histopatológico do fígado foi realizado preservando o órgão em formalina 10% para histopatologia. Para avaliação microscópica dos tecidos, seções em série de 5 µm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina.

#### 4.3.2.3 Hepatoproteção frente à indução de lesão hepática por doses repetidas de paracetamol

Este ensaio foi realizado com partição e doses que apresentaram melhor resultado no ensaio anterior. Os animais divididos em cinco grupos (A-E), de seis animais cada, foram tratados por 10 dias, como se segue:

Grupo A: controle normal – Veículo;

Grupo B: controle negativo – Veículo + Paracetamol 750 mg / kg;

Grupo C: PA 100 mg / kg + Paracetamol 750 mg / kg;

Grupo D: PA 200 mg / kg + Paracetamol 750 mg / kg ;

Grupo E: Controle positivo – Silimarina 100 mg / kg + Paracetamol 750 mg / kg .

Os parâmetros bioquímicos e histopatológicos foram avaliados da mesma forma como descrito no item 4.3.2.6.

#### 4.3.2.4 Hepatoproteção frente à indução de lesão hepática aguda por etanol

A indução da lesão hepática aguda por etanol foi realizada como descrita por Beena (2011) com modificações. Para este ensaio, optou-se por testar PA na concentração de 200 mg / kg, uma vez que o conjunto dos resultados nos testes anteriores mostraram-se mais promissores. Os animais foram divididos em seis grupos de seis animais cada, exceto grupo B com 12 animais, como se segue:

Grupo A: controle normal – Veículo (uma dose a cada 12 h em um total de 3 doses);

Grupo B: controle negativo – Veículo + Etanol 5 g / kg (uma dose a cada 12 h em um total de 3 doses);

Grupo C: PA 200 mg / kg + Etanol 5 g / kg (uma dose a cada 12 h em um total de 3 doses). Administração simultânea;

Grupo D: PA 200mg/kg por 3 dias + Etanol 5g / kg (uma dose a cada 12 h em um total de 3 doses). Pré-tratamento;

Grupo E: Silimarina 100 mg / kg + Etanol 5 g / kg (uma dose a cada 12h em um total de 3 doses). Administração simultânea;

Grupo F: Silimarina 100mg / kg por 3 dias + Etanol 5 g / kg (uma dose a cada 12 h em um total de 3 doses). Pré-tratamento.

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados como descrito no item 4.3.2.6.

#### 4.3.2.5 Tratamento de lesão aguda induzida por etanol

A indução da lesão hepática aguda por etanol foi realizada como descrita por Beena (2011) com modificações. Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais cada, como se segue:

Grupo A: controle normal – Veículo (uma dose a cada 12 h em um total de 3 doses);

Grupo B: controle negativo – Etanol 5 g / kg (uma dose a cada 12 h em um total de 3 doses) + veículo por 3 dias após indução;

Grupo C: Etanol 5 g / kg (uma dose a cada 12 h em um total de 3 doses) + PA 200mg/kg por 3 dias após a indução;

Grupo D: Etanol 5g/kg (uma dose a cada 12h em um total de 3 doses) + Silimarina 100 mg / kg por 3 dias após a indução.

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados como descrito no item 4.3.2.6.

#### 4.3.2.6 Determinação dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL), proteínas totais (PT), albumina (ALB), de bilirrubina, triglicérides totais (TRIGL) e colesterol total (CT) e frações (c-VLDL, c-LDL e c-HDL) foram avaliados por kits comerciais LABTEST® conforme as especificações do fabricante adaptado para leitor de microplaca.

#### 4.3.2.7 Determinação da peroxidação lipídica por meio do teste com o ácido tiobarbitúrico (TBA) – *in vivo*.

O objetivo desta análise foi determinar a concentração de ácido tiobarbitúrico em amostras de fígado para identificar a presença de peroxidação lipídica.

Para os cálculos da concentração de ácido tiobarbitúrico foi construída a curva padrão de malonaldeído (MDA) preparando-se 10 mL de solução com 164 µL 1,1,3,3-tetraetanopropano (TEP, libera MDA e etanol após hidrólise ácida) ao qual foi adicionado 836 µL etanol e o volume da solução foi completado para 10mL com água destilada. Os tubos foram deixados por 15 minutos em banho fervente, e, então, resfriados imediatamente em banho com água gelada por 10 minutos. 200 µL da solução foram adicionados a microplaca de 96 poços e a absorvância foi medida em leitor de microplacas a 535 nm, em triplicata.

Para esta análise preparou-se um homogeneizado do fígado triturando aproximadamente 0,3 g do mesmo e adicionando 1,2 mL de tampão fosfato pH 7,4,

homogeinizando em vortex. O sobrenadante ficou armazenado a -80 °C até o momento da análise. A dosagem de TBA no homogeneizado de fígado foi realizada pesando-se 0,5g de cada homogeneizado e colocando em tubos de ensaio, em triplicata. Logo após, adicionou 50µL de solução etanólica de 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) 4% (p/v), 2,5mL de ácido fosfórico 1% (v/v) e 1,25mL de ácido tiobarbitúrico 1% (p/v) (em NaOH 0,05M). Estas soluções foram aquecidas em banho fervente por 15 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo por 10 minutos. Depois de resfriadas, adicionou se 3 mL de butanol em cada tubo de ensaio para que o complexo TBA-MDA (indicativo de peroxidação lipídica) passe para a fase orgânica, e agitou-se por inversão (10 vezes). Em seguida centrifugou-se a 4000 RPM por 5 minutos e retirou 200µL do sobrenadante (fase butanólica) de cada amostra, colocando em microplaca de 96 poços, em triplicata. A leitura foi realizada em leitor de microplaca a 535 nm e calculou-se a concentração do complexo TBA-MDA a partir da curva padrão de MDA.

A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\text{Abs controle negativo} - \text{Abs extrato}}{\text{Abs controle negativo}} \times 100$$

#### 4.3.2.8 Procedimento para dosagem de proteínas totais pelo Método de Lowry (1951) adaptado para microplaca

A dosagem de proteínas totais no homogeneizado do fígado dos modelos tratados com a amostra foi necessária para verificar a atividade das enzimas antioxidantes: glutathiona redutase (GSH) e catalase (CAT) *in vivo*. Para a dosagem de proteínas totais é necessário estabelecer a curva padrão de albumina. Para tal, preparou-se uma solução estoque de albumina, no momento da dosagem, na concentração de 1 mg / mL; em seguida foram preparadas diluições seriadas (em triplicata) variando de 19,2 a 288,4 µg / mL, adicionou-se em cada tubo 2,0 mL de solução alcalina de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) e tartarato de sódio potássio. Aguardou-se 10 minutos e, em seguida foram acrescentados 0,2mL do reativo de Folin. Após 30 minutos 200 µL da mistura foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. Como branco utilizou-se 200 µL de água destilada. A leitura da absorvância foi realizada a 625 nm, em leitor de microplaca.

Para determinação da dosagem de proteínas totais no fígado dos diferentes grupos experimentais um homogeneizado foi preparado conforme descrito anteriormente em 4.4.2.7. Então, em uma microplaca de 96 poços foi pipetado 2  $\mu\text{L}$  de homogenato (em triplicata) e a este foi acrescentado: 38  $\mu\text{L}$  de água destilada e 200  $\mu\text{L}$  de solução alcalina de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e tartarato de sódio e potássio. Aguardou-se 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado 20  $\mu\text{L}$  de reativo de Folin, aguardou-se por mais 10 minutos e realizou-se a leitura da absorvância em 625nm tendo como branco do teste água destilada.

#### 4.3.2.9 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

Para a determinação da atividade enzimática um homogeneizado do tecido hepático foi preparado conforme está descrito no item 4.4.2.7.

- Atividade de catalase (BEUTLER, 1975)

Em uma placa de ELISA acrescentou-se, na seguinte ordem: 170  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e 10  $\mu\text{L}$  de homogenato. A microplaca foi imediatamente colocada em isopor com gelo para manter a temperatura baixa, em seguida a microplaca foi incubada 30°C por 1 minuto no leitor de microplaca ELISA. No momento da análise acrescentou-se 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 M e a placa foi incubada novamente por 10 segundos a 30°C com agitação prévia de 5 segundos. As leituras de absorvância foram realizadas a cada minuto por um tempo total de 5 minutos em um comprimento de onda de 240 nm. Como branco, foi colocado em um dos poços da microplaca: 180  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1M, pH 7.4 mais 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 M; o resultado foi expresso em U /  $\mu\text{g}$  de proteína.

- Atividade de glutathion redutase (CARLBERG e MANNERVIK, 1985)

Em uma placa de ELISA adicionou-se, nessa ordem: 80  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4 e 20  $\mu\text{L}$  de homegenato, e armazenou-se imediatamente em uma caixa de isopor com gelo. No momento da análise, a placa foi incubada 30°C por 1 minuto e em seguida acrescentou-se 50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 1M, pH 7.0; 10  $\mu\text{L}$  de solução de EDTA 0,2 mM; 20  $\mu\text{L}$  de solução de glutathion 10 mM; 20  $\mu\text{L}$  de solução estoque de NADPH 0,1 mM; como branco, adicionou-se em um dos poços da microplaca: 150  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 1 M, pH 7.0; 10  $\mu\text{L}$  de solução de EDTA 0,2 mM; 20  $\mu\text{L}$  de solução de glutathion 10 mM; 20  $\mu\text{L}$  de solução estoque de NADPH 0,1 mM. A microplaca foi incubada a 30 °C por 10 segundos com agitação de 5 segundos. A leitura da absorvância foi realizada a cada minuto por um tempo total

de 5 minutos em um comprimento de onda de 340 nm. O resultado foi expresso em U /  $\mu$ g de proteína.

### **4.3.3 Atividade anti-inflamatória**

#### **4.3.3.1 Linhagem celular**

A linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7) foi adquirida no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com os antibióticos penicilina (100 IU / ml) e estreptomicina (100  $\mu$ g / ml), e soro fetal bovino (SFB) estéril a 10%. Todas as linhagens foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.3.2 Determinação de óxido nítrico**

A produção de Oxido Nítrico foi determinada de forma indireta pelo reação de Griess para medir nitrito no meio de cultura. As células Raw 264.7 foram aderidas em microplacas de 96 poços a densidade de  $8 \times 10^4$  células por poço e foram incubadas por 24h. As células foram expostas a 100 ng/mL de LPS (Sigma®) com concentrações de PA variando de 1,0 a 20  $\mu$ g/mL por 48 h. O sobrenadante da cultura (100  $\mu$ L) foi misturado com o reagent de Griess (100  $\mu$ L, 1% sulfanilamida, 0.1% N-[1-naftil]-etilenodiamina em ácido fosfórico a 5%) e foi incubado a temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi medida a 540nm. A concentração de NO foi determinada usando uma curva padrão de nitrito (NaNO<sub>2</sub>).

#### **4.3.3.3 Determinação dos mediadores inflamatórios**

A determinação das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , mediadores da inflamação, foi avaliada em leitor de microplaca com Duo Set kit (R & D Systems®) segundo instruções do fabricante. As microplacas de 96 poços foram revestidas com 50  $\mu$ L de anticorpos primários diluídos em tampão salina fosfato (PBS) e incubados por 18 h a 4 ° C. As placas foram lavadas com 0.05 % Tween PBS por 3 vezes. Então a elas foram adicionados 200  $\mu$ L / poço de PBS / 1% BSA para bloquear locais não ocupados durante 1 h à temperatura ambiente. Depois da incubação, as placas foram lavadas novamente. As amostras e as citocinas recombinantes em concentração conhecida foram adicionadas nas placas a um volume de 100  $\mu$ L / poço, e incubadas por 2 h a 37 ° C. Depois de lavar as placas, 50  $\mu$ l de anticorpo de

detecção biotínido para cada citocina foi adicionado e as placas foram incubadas mais uma vez por 1 h a 37 ° C. Após a lavagem, as placas foram incubadas com estreptoavidina conjugada com peroxidase diluído em PBS 1: 200 (50 µL) durante 30 min à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com uma solução de tetrametilbenzidina, durante 20 minutos. A reação de bloqueio ocorreu com a adição de ácido sulfúrico 2 N. A densidade óptica das amostras foi determinada em leitor de microplaca com filtro de 450 nm.

#### **4.3.4 Atividade antibacteriana *in vitro***

##### 4.3.4.1 Linhagens bacterianas utilizadas

Os ensaios microbiológicos foram realizados empregando as seguintes linhagens de referências da *American Type Culture Collection* (ATCC), na segunda passagem, gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, representativas de grupos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos fermentadores e não fermentadores:

- *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* (ATCC® 29213™);
- *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* (ATCC® 25923™);
- *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* (ATCC® 33591™);
- *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* (ATCC® 33592™);
- *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* (ATCC® 6538™);
- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228™);
- *Escherichia coli* (ATCC® 25922™);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 25619™);
- *Acinetobacter baumannii* (ATCC® 19606™);
- *Enterobacter aerogenes* (ATCC® 13048™);
- *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* (ATCC® 4352™).

Foram também testadas cinco (5) cepas de rotina clínica de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) 1485279, MRSA 1605677, MRSA 1664534, MRSA 1688441 e MRSA 1830466, isoladas de infecções sanguíneas de pacientes atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

(HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho número 976.427), identificadas pelo sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Durham, NC, EUA) e gentilmente cedidas pela MSc. Adriana Lúcia Pires Ferreira, responsável pelo Laboratório de Bacteriologia do Serviço de Patologia Clínica dessa Instituição.

As linhagens *S. aureus* (ATCC® 29213™) e *E. coli* (ATCC® 25922™) foram empregadas na etapa de validação dos ensaios, como controle de qualidade, conforme recomendado pelos documentos M07-A9 e M100-S24 (CLSI, 2012; 2014).

Durante o texto, foram adotados os seguintes termos para referenciar as linhagens mencionadas acima, respectivamente:

- *S. aureus* ATCC 29213;
- *S. aureus* ATCC 25923;
- *S. aureus* ATCC 33591;
- *S. aureus* ATCC 33592;
- *S. aureus* ATCC 6538;
- *S. epidermidis* ATCC 12228;
- *E. coli* ATCC 25922;
- *P. aeruginosa* ATCC 25619;
- *A. baumannii* ATCC 19606;
- *E. aerogenes* ATCC 13048;
- *K. pneumoniae* ATCC 4352;
- MRSA 1485279;
- MRSA 1605677;
- MRSA 1664534;
- MRSA 1688441;
- MRSA 1830466.

#### 4.3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada usando o método de microdiluição em caldo Müller Hinton (MHB) de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), com pequenos ajustes, frente a amostras de referência representativas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas bem como de rotina, listadas no item anterior.

Um gradiente de concentração das amostras foi estabelecido segundo Fabry e colaboradores (1998), cujo estudo propõe que plantas medicinais utilizadas tradicionalmente contra infecções podem apresentar alguma atividade quando apresentam CIM < 8000 µg/mL. Assim, de cada amostra, EE, PH, PD ou PA foram preparadas soluções estoque que foram diluídas em série (2500 - 18 µg / mL) (volume final = 200 µL) e uma concentração final de dimetilssulfóxido (DMSO) ≤ 1%. Para este ensaio, foram adicionados 20 µL de suspensões bacterianas a 10<sup>8</sup> UFC / mL (de acordo com os padrões de turbidez McFarland). As placas foram incubadas a 35 ± 2 ° C por 24 h. Os mesmos testes foram realizados simultaneamente para o controle do crescimento (MHB + bactérias) e controle de esterilidade (MHB + amostra). Os agentes antimicrobianos utilizados como controles positivos foram ampicilina (1000 – 7,8 µg / mL), um β-lactâmico que interfere na integridade da parede celular bacteriana de efeito bactericida, e cloranfenicol (100 - 0,78 µg / mL), um inibidor de síntese proteica de efeito bacteriostático. O teste foi realizado em triplicata. A CIM foi determinada como a menor diluição capaz de inibir o crescimento visível da cepa bacteriana testada, conforme conceito descrito no documento M07-A9 (CLSI, 2012). A inibição foi constatada mediante a adição de 40 µL de p-iodonitrotetrazolium (INT).

#### 4.3.4.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada em placa de Petri contendo ágar Müller Hinton (MHA) de acordo com as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) com modificações. A placa de Petri foi previamente demarcada de acordo com as posições das diluições dos extratos e na placa de microdiluição. Uma alíquota do conteúdo dos poços da placa de microdiluição onde não foi visualizado crescimento foi transferida com o auxílio de uma alça estéril descartável para o respectivo local na placa de Petri. Incubou-se a placa em estufa a 35 ± 2 °C por um período entre 18 - 24 h. Foi determinada como CBM a menor concentração dos extratos que não permitiu o desenvolvimento dos micro-organismos, indicando assim, a amostra como bactericida ou bacteriostático.

Para realização dos ensaios microbiológicos abaixo, foram selecionadas três (3) cepas de *S. aureus*, a saber: 1) *S. aureus* (ATCC® 25923), caracterizada como formadora de biofilme; 2) *S. aureus* (ATCC® 29213), *S. aureus* sensível à meticilina; e 3) MRSA 1485279, isolada de ponta de catéter de paciente com

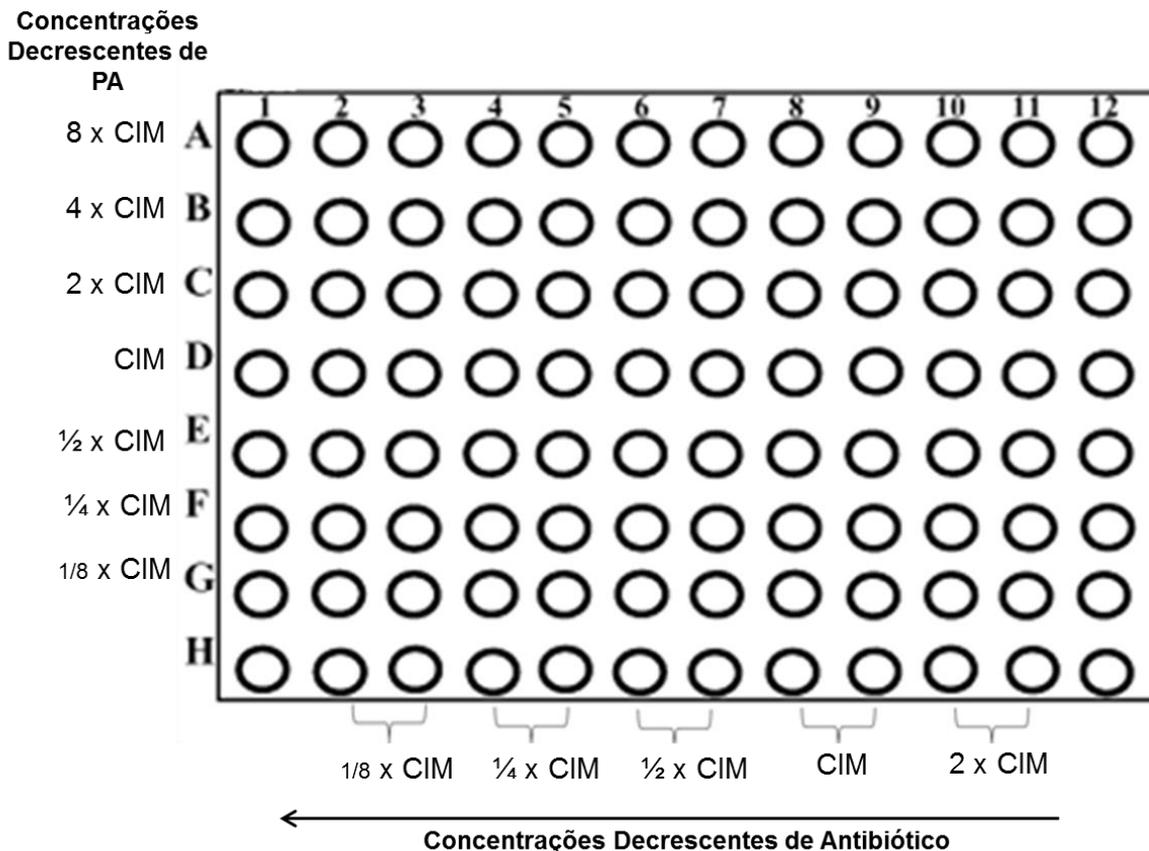
diagnóstico de infecção de corrente sanguínea e que apresentou perfil de resistência ao maior número de agentes antibacterianos constantes do painel do sistema VITEK®2.

#### 4.3.4.4 Método de combinação *Checkerboard* ou “Tabuleiro de Damas”

O possível sinergismo entre PA e ampicilina ou cloranfenicol foi avaliado pelo método *checkerboard* e o cálculo do índice de redução de dose (FADLI et al., 2012). Este método foi realizado utilizando microplacas de 96 poços contendo caldo de Mueller Hinton (MHB) com concentrações de PA variando de 1/8 a 8x CIM e combinados com ampicilina ou cloranfenicol em concentrações variando de 1/8 a 2x CIM na placa em estilo do tabuleiro de damas. As diluições em série de PA e cloranfenicol foram combinados de modo que cada linha continha uma concentração do primeiro agente e concentrações crescentes do segundo. O inóculo foi de aproximadamente  $10^8$  UFC / mL em cada tubo. As microplacas foram incubadas por 18-20 h a  $35 \pm 2$  °C. O índice de redução da dose (IRD) foi calculado como se segue:

$$\text{IRD} = \frac{\text{CIM do antibiótico sozinho}}{\text{CIM do antibiótico combinado}}$$

Figura 9: Representação esquemática da distribuição amostra *versus* antibiótico no teste “tabuleiro de damas”.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2017)

O índice de concentração inibitória fracionada (IFIC) foi calculado como se segue:  $IFIC = CIF_A + CIF_B$

Onde:  $CIF = \frac{CIM \text{ amostra combinado}}{CIM \text{ amostra sozinha}}$

A = amostra PA

B = Cloranfenicol/ Ampicilina

O sinergismo foi definido como (FADLI, 2012):

$ICIF < 0,5$ ; Sinergismo Total;

$0,5 > ICIF \leq 0,75$ ; Sinergismo Parcial ou Aditivismo;

$0,75 > ICIF < 2$ ; Indiferença

$ICIF > 2$  Antagonismo

#### 4.3.4.5 Cinética bacteriana ou curva de crescimento ou *time kill assay*

A análise da curva de crescimento foi realizada segundo Sutton (2006) para determinar influência de PA na taxa de multiplicação das linhagens *S. aureus*

(ATCC® 29213), *S. aureus* (ATCC® 25923) e MRSA 1485279. Culturas bacterianas na densidade de  $5 \times 10^5$  UFC / mL foram expostas a PA e combinações com antibióticos em caldo MHB (concentrações de PA variando de 1 x CIM a 4 x CIM). O caldo MHB contendo apenas inóculo bacteriano foi usado como controle de crescimento. A leitura da densidade ótica a 630 nm foi realizada antes da incubação ( $t = 0$ ) e a cada 60 minutos até completar 10 h de incubação a 37° C. A curva de crescimento foi contruída com a variação da densidade ótica em função tempo.

#### 4.3.4.6 Ensaio da viabilidade celular bacteriana

A viabilidade das células bacterianas na presença de PA foi determinada segundo protocolo previamente descrito por KIM e colaboradores (2015) com modificações. Um mL de células bacterianas subcultivadas em ágar nutriente foram ressuspendidas em solução salina 0,9% estéril e, então, padronizadas a densidade ótica de 0,7 em 600 nm. A seguir, as células foram adicionadas a 19 mL de tampão fosfato pH= 7,1 (50mM) estéril com 1x, 2x ou 4x CIM de PA. Os controles foram células sem PA na presença de equivalente de DMSO utilizado na solubilização e Cloranfenicol e/ou Ampicilina na concentração equivalente ao CIM, bem como a associação destes com PA na combinação que inibiu o crescimento bacteriano pelo teste do “tabuleiro de damas”. Nos tempos equivalentes a 1, 4 e 6 horas de incubação a 37°C, uma alíquota na ordem de diluição  $10^{-5}$  foi inoculada em placas de Petri contendo ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*) e incubada a 37°C por 20 h. O resultado foi expresso graficamente como UFC  $\text{mL}^{-1} \times 10^5$ . A razão entre o número de bactérias e o número de horas de incubação representou o tempo de geração bacteriana em presença de PA, antibióticos e associação.

#### 4.3.4.7 Atividade antibiofilme *in vitro*

A quantificação da produção do biofilme foi realizada conforme descrito por Silva e colaboradores, 2016. Em microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços, foram adicionados 200 $\mu$ L de solução teste em concentrações equivalentes a CIM, 2 x CIM e 4 x CIM de PA bem como de combinações deste com os antibióticos ampicilina e cloranfenicol com o inóculo bacteriano a  $10^8$  UFC / mL sendo adicionado a 2% (v/v). Na sequência, as microplacas foram incubadas a 37°C

por 24 h. Após este período, o conteúdo das placas foi descartado e, cada poço foi cuidadosamente lavado com tampão fosfato pH 7,1 por 3 vezes para remoção das células não aderidas. Os biofilmes foram fixados com etanol 98% e corados com solução de cristal violeta. Todos os ensaios foram realizados em hexaplicata, o controle do crescimento foi preparado utilizando inóculo e meio estéril, controle do método foi sistema diluente utilizado para amostra e antibiótico (DMSO 1% – para PA e EtOH – para cloranfenicol) e controle negativo foi utilizado apenas o meio estéril. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de aderência do micro-organismo, calculado de acordo com a fórmula abaixo, em que  $OD_{\text{ensaio}}$  é a densidade ótica medida na presença de PA e/ou antibióticos e  $OD_{\text{cc}}$  é a medida do controle de crescimento.

$$\% \text{ inibição de adesão} = 1 - (OD_{\text{ensaio}} / OD_{\text{cc}}) \times 100$$

#### **4.4. ESTUDO QUÍMICO DA PARTIÇÃO EM ACETATO DE ETILA (PA)**

##### **4.4.1. Perfil cromatográfico de PA por CLAE-DAD**

O perfil cromatográfico foi obtido utilizando em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD Agilent® 1200 Series) em coluna Zorbax SB-C18 (5 µm x 4,6 x 150 mm). Foram injetados 20 µL de PA em concentração de 1 mg / mL. A fase móvel foi um gradiente linear de solventes A e B, onde A (MeOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v / v, pH = 3 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (MeOH); 0 a 100% de B em 30 min. Foi utilizado um fluxo de 0,6 mL / min. O cromatograma foi obtido a 330 nm.

##### **4.4.2. Isolamento da substância 1**

PA (2 g) foi fracionado utilizando uma coluna aberta (4 x 74 cm) de Sephadex® LH 20, Sigma® (250 g), eluído com MeOH e as frações foram agrupadas de acordo com o seu perfil em cromatografia de camada delgada, de modo que cinco frações foram obtidas e nomeadas de acordo com a sua ordem de eluição cinco frações: A (2110 mg), B (12 mg), C (44 mg), D (970 mg), E (41 mg) que foram então analisadas por CLAE. 7,4 mg da substância **1** foi isolada a partir da fração FE utilizando CLAE-DAD com uma coluna semi-preparativa Zorbax CN (5 µm x 9,4 x 250 mm). Utilizou-se uma solução isocrática a 70% A (MeOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v /

v, pH = 3 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e 30% de B (MeOH), 0-10 min como fase móvel a um fluxo de 2,5 mL /min.

#### 4.4.3. Identificação estrutural da substância 1

A substância **1** foi identificada por espectros de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz), RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz), DEPT-135 e 2D RMN (COSY, HMBC, HSQC), os quais foram registrados em espectrômetro Bruker AVANCE III em solução de MeOD a 25°C, utilizando TMS (δ= 0) como padrão interno. Os deslocamentos químicos foram reportados em ppm na escala δ e referenciados às ressonâncias do pico do solvente residual. Essas análises espectroscópicas foram realizadas no departamento de física do Instituto de Ciências Exatas, UFJF, com auxílio da prof. Dr. Antônia Ribeiro.

Para determinação da massa, 4 µg de **1** foram diluídos em metanol para o modo negativo. A solução foi infundida diretamente na fonte de ESI utilizando uma bomba de seringa a uma taxa de fluxo de (10 µL / min). ESI (-) - MS e tandem ESI-MS / MS foram adquiridos usando um híbrido de alta resolução e alta precisão Xevo® G2-S Q-Tof (Waters®). Para aquisição e processamento de dados, foi utilizado o software MassLynx V4.1 (Waters®). Os dados foram recolhidos na faixa m / z de 50-1000 à velocidade de uma varredura por segundo. A espectroscopia de massa foi realizada na Central Analítica da Faculdade de Farmácia, com auxílio da técnica em química Carolina Gasparetto e as análises contaram com a colaboração da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antônia Ribeiro.

A substância **1** foi identificada como ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico:

Ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico: C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>, pó branco amorfo. ESI-MS / EM m / z (rel. Int.): 515 [M-H] (75); 353 [M-H-C 9 H 6 O 3] - (100); 335 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O] - (7); 191 [M-H-2xC<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>] - (20). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 2,09 (H-6ax; dd, J<sub>6ax-6eq</sub> = 13,7, Hz, J<sub>5-6ax</sub> = 8,6 Hz); 2,58 (H-6eq, dd, J<sub>6ax-6eq</sub> = 13,7Hz e J<sub>5-6eq</sub> = 3,9Hz); 5,41 (H-5, td, J<sub>4-5</sub> = 8,2 Hz, J<sub>5-6eq</sub> = 3,9 Hz, J<sub>5-6ax</sub> = 8,6 Hz); 3,80 (H-4, dd, J<sub>3-4</sub> = 3,6 e J<sub>4-5</sub> = 8,2 Hz); 4,32 (H-3, m); 2,46 (2H, m, H-2ax e H-2eq), (fração de ácido quínico); 7,08 (2H, H-2' e H-2''; d, J<sub>2' / 2'' - 6' / 6''</sub> = 2Hz); 6,80 (2H, H-5' e H-5''; d, J<sub>5' / 5'' - 6' / 6''</sub> = 8,0 Hz); 6,96 (2H, H-6' e H-6''; dd, J<sub>2' / 2'' - 6' / 6''</sub> = 2Hz e J<sub>5' / 5'' - 6' / 6''</sub> = ; 7,60 (2H, H-7' e H-7''; d, J<sub>7' / 7'' - 8' / 8''</sub> =

15,1 Hz); 6,30 (2H, H-8 'e H-8' '); d,  $J_{7' / 7'' - 8' / 8''} = 15,1$  Hz); 6,28 (H-8'', d,  $J_{7'' - 8''} = 15,1$  Hz), (grupo cafeíco). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$ 79,48 (C-1); 34,22 (C-2); 67,96 (C-3); 71,35 (C-4); 70,15 (C-5); 35,45 (C-6), 173,37 (COOH) (porção de ácido quínico); 126,40 (C-1' / C-1''); 113,84 / 113,83 (C-2' / C-2''); 145,42 (C-3' e C-3''); 148,26 / 148,23 (C-4' / C-4''); 115,11 / 115,08 (C-5' / C-5''); 121,70 / 121,63 (C-6' / C-6''); 146,13 / 145,92 (C-7' / C-7''); 113,76 / 113,70 (C-8' / C-8''); 166,61 / 167,23 / (C-9' / C9''), (grupo cafeico). Os espectros obtidos podem ser apreciados no Anexo A desta obra.

#### **4.4.4. Identificação de marcadores químicos da partição em acetato de etila (PA)**

A quantificação de biomarcadores químicos de PA foi realizada em CLAE-DAD conforme descrito anteriormente (item 4.4.1), utilizando-se os padrões externos apigenina (pureza  $\geq 95\%$ ), luteolina (pureza  $\geq 98\%$ ) e ácido clorogênico (pureza  $\geq 95\%$ ) todos os padrões utilizados foram da marca Sigma®, e ainda um padrão interno (ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico isolado de PA).

Para construção da curva padrão foi utilizado 1,0 mg de substância padrão ácido clorogênico, apigenina, luteolina ou padrão interno ácido 1,5-di-o-cafeoilquínico (diluídos em 1,0 mL de MeOH). Em seguida foram realizadas diluições sucessivas para obtenção das seguintes concentrações: 0,500; 0,250; 0,125; 0,0625 e 0,0312 mg / mL. Para cada marcador foi realizado um gradiente linear de solventes A (MeOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH= 3 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (MeOH); 0 a 100% de B em 30 min; fluxo de 0,6 mL / min; volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ , detecção UV 330nm. As injeções foram realizadas em triplicata. As curvas de calibração foram construídas correlacionando a concentração *versus* a área sob a curva de cada padrão no cromatograma obtido a 330nm de detecção.

#### **4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

As análises estatísticas dos testes *in vivo* e *in vitro* foram realizadas pelo teste de *one way* ANOVA seguido de teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

---

### 5.1. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 5.1.1 Avaliação da atividade hepatoprotetora *in vivo*

##### 5.1.1.1. Frente à indução de lesão hepática aguda por paracetamol

O pré-tratamento dos animais com EE, PH, PD e PA seguido de paracetamol (3g / kg), utilizado para causar lesão hepática aguda, teve como objetivo avaliar a capacidade hepatoprotetora da planta e verificar qual destes produtos das folhas de *V. condensata* seria mais ativo. O controle positivo utilizado foi a silimarina. As atividades hepatoprotetora e antioxidante da silimarina advêm de sua capacidade em inibir os radicais livres que são produzidos pelo metabolismo de substâncias tóxicas tais como o paracetamol e o CCl<sub>4</sub>. Esses radicais livres causam danos nas membranas celulares. A silimarina aumenta a glutathione hepática e pode contribuir para ação antioxidante do fígado. Estudos demonstraram que animais com lesões hepáticas induzidas por paracetamol e etanol apresentaram redução significativa dos marcadores bioquímicos de lesão hepática AST e ALT quando receberam tratamento com silimarina (VARGAS-MENDOZA et al., 2014).

Para o modelo proposto foram utilizados doze grupos com seis animais cada. O tratamento com PA foi realizado em três doses diferentemente dos demais extratos que foram avaliados apenas em duas doses. Essa diferença foi motivada pela promissora atividade antioxidante *in vitro* demonstrada para PA em estudos prévios (SILVA et al., 2012). Na tabela 6 estão apresentados os pesos médios dos animais de cada grupo e ainda o peso médio dos fígados destes.

Tabela 6: Peso médio corporal e do fígado dos animais antes e após o tratamento com as amostras

Grupos	Peso Médio Corporal (g)		Peso Médio do Fígado (g)	Índice Hepático (%)
	Dia 0	DIA 8		
Normal	212,8 ± 5,0	232,2 ± 4,9	8,32 ± 0,25 <sup>a</sup>	35,83 ± 0,51 <sup>a</sup>
Controle Negativo	211,8 ± 2,1	234,6 ± 1,7	9,71 ± 0,15 <sup>b</sup>	41,39 ± 0,88 <sup>b</sup>
Sil 100 mg / kg	225,6 ± 4,4	226,4 ± 5,8	9,62 ± 0,43 <sup>b</sup>	42,49 ± 0,74 <sup>b</sup>
EE 100 mg / kg	233,6 ± 7,5	245,2 ± 4,4	9,00 ± 0,31 <sup>c</sup>	36,73 ± 0,70 <sup>a</sup>
EE 200 mg / kg	220,6 ± 8,6	226,2 ± 7,2	9,06 ± 0,58 <sup>c</sup>	40,05 ± 0,8 <sup>b</sup>
PH 100 mg / kg	235,4 ± 8,3	239,6 ± 8,8	8,00 ± 0,32 <sup>a</sup>	33,38 ± 0,36 <sup>c</sup>
PH 200 mg / kg	220,2 ± 9,5	230,8 ± 10,5	9,31 ± 0,89 <sup>b</sup>	40,33 ± 0,84 <sup>b</sup>
PD 100 mg / kg	267,6 ± 11,4	258,4 ± 10,3	10,54 ± 0,30 <sup>c</sup>	40,78 ± 0,29 <sup>b</sup>
PD 200 mg / kg	245,2 ± 7,4	242,6 ± 13,6	10,34 ± 0,30 <sup>c</sup>	42,72 ± 0,22 <sup>b</sup>
PA 50 mg / kg	269,4 ± 8,7	269,0 ± 8,4	9,68 ± 0,27 <sup>c</sup>	35,98 ± 0,32 <sup>a</sup>
PA 100 mg / kg	229,4 ± 6,5	232,6 ± 7,2	8,00 ± 0,31 <sup>a</sup>	34,39 ± 0,43 <sup>a</sup>
PA 200 mg / kg	226,6 ± 8,3	229,8 ± 7,4	8,98 ± 0,43 <sup>b</sup>	39,07 ± 0,58 <sup>b</sup>

Valores são apresentados média ±ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; EE = Extrato Etanólico, PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclomética, PA = Partição em acetato de etila. Valores seguidos pela letra a na mesma coluna não possuem diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

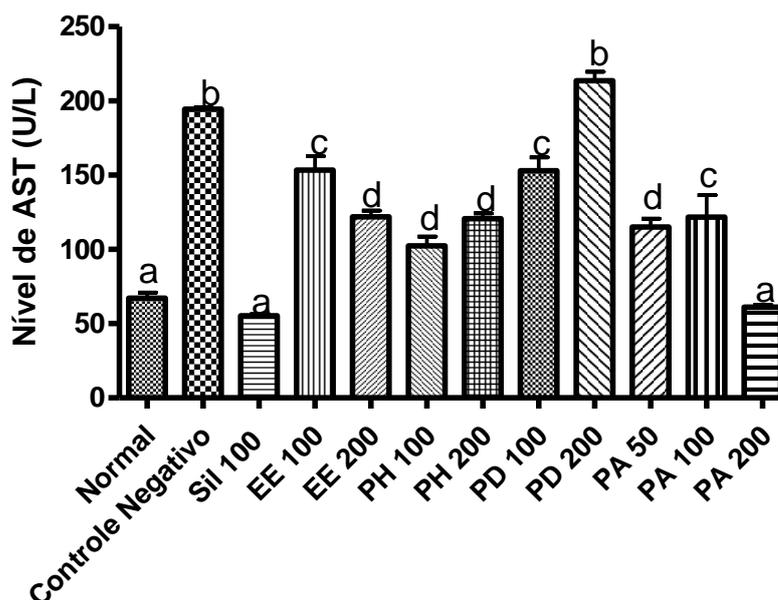
O índice hepático dos animais tratados com EE (100 mg / kg), PH (100 mg / kg) e PA (50 e 100 mg / kg) não sofreu alterações significativas em relação ao grupo normal, sugerindo a manutenção da integridade do órgão.

Em lesões hepáticas agudas induzidas por paracetamol e outras substâncias com metabolismo semelhante é possível detectar alterações em alguns parâmetros, uma vez que o fígado é um órgão central na homeostase bioquímica do organismo. As transaminases são indicadores sensíveis de dano hepático, particularmente quando é uma lesão aguda, por exemplo, na hepatite tóxica induzida por drogas. As transaminases hepáticas são AST (aspartato aminotransferase) e a ALT (alanina aminotransferase). A AST, como já mencionado, existe também em outros tecidos como o coração, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas e, portanto, é um indicador muito menos específico de lesão hepática do que a ALT que existe primariamente no fígado. Portanto em se tratando de lesão hepática há refluxo de ambas as enzimas para o plasma com elevação dos níveis de ambas, sendo que a ALT sobe ligeiramente mais do que a AST se a lesão for puramente hepática. Assim, como paracetamol e outros agentes tóxicos

provocam lesão hepatocelular, essas enzimas são importantes indicadores de dano hepatocelular uma vez que se apresentam aumentadas no soro quando há lesão do tecido e, conseqüente extravasamento do citoplasma (GIANNINI et al., 2005).

A manutenção dos níveis de AST (Figura 10) e ALT (Figura 11) a valores próximos aos níveis normais é um importante indicativo de proteção da lesão das células hepáticas ou, ainda, da recuperação das células injuriadas.

Figura 10: Efeito da administração de EE, PH, PD e PA (concentração mg / kg) nos níveis de AST no soro de ratos induzidos com paracetamol em dose aguda.



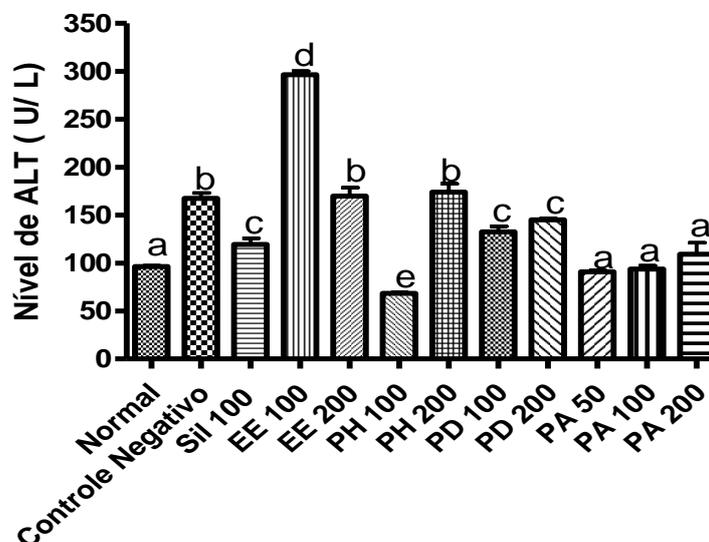
Valores são apresentados média±erro padrão, n = 6. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). Onde EE = Extrato Etanólico; PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclometânica; PA = Partição em Acetato de Etila; Sil = Silimarina.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Para AST, apenas os animais tratados com PA na concentração de 200 mg / kg e com silimarina mantiveram seus níveis próximos ao valor normal, o que é um indicativo que PA pode possuir ação hepatoprotetora frente aos possíveis danos causados pelo paracetamol administrado em dose aguda. As outras amostras de *V. condensata* testadas, excetuando-se PD na concentração de 200 mg / kg, apresentaram também uma redução dos níveis de AST quando comparado ao controle negativo. Reduções dos níveis de AST em ratos com lesão hepática por paracetamol também já foram descritas para extratos de outras plantas como para *Coccinia grandis* (SHERIEF et al., 2011), *Plumbago zeylanica* (KANCHANA et al.,

2011) e também o extrato aquoso de *Vernonia amygdalina* (IWALOKUN et al., 2006).

Figura 11: Efeito da administração de EE, PH, PD e PA (concentração mg / kg) nos níveis de ALT no soro dos ratos induzidos com paracetamol em dose aguda.



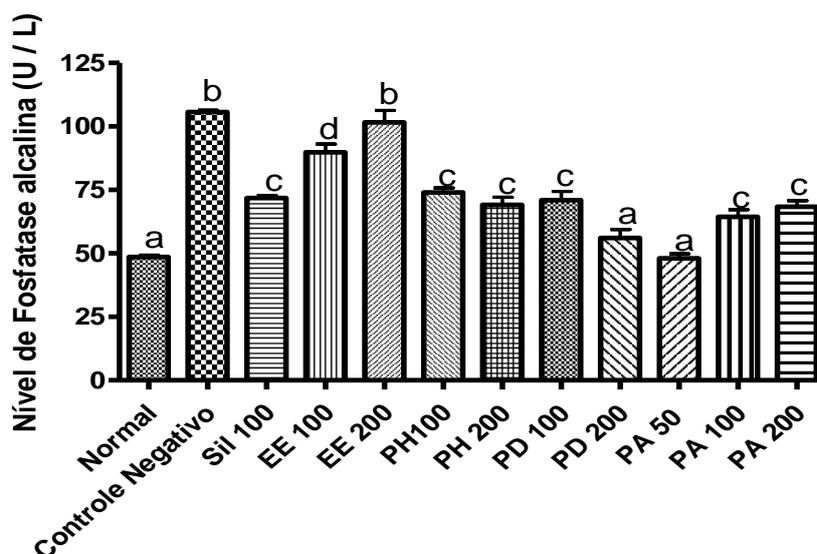
Valores são apresentados média±erro padrão, n = 6. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ ). Onde EE = Extrato Etanólico; PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclometânica; PA = Partição em Acetato de Etila; Sil = Silimarina.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Para a transaminase ALT, específica para dano hepático, excetuando EE 100 mg / mL e 200mg / mL, e PH 200 mg / mL, as demais amostras reduziram os níveis desta enzima. E mais uma vez, os animais tratados com PA apresentaram valores de ALT estatisticamente iguais aos do grupo normal. Assim, foi possível atestar a possível atividade hepatoprotetora da espécie frente ao dano hepatocelular.

A fosfatase alcalina também foi medida e os resultados estão apresentados na Figura 12.

Figura 12: Níveis de fosfatase alcalina no soro de animais pré-tratados com EE, PH, PD e PA (concentração mg / Kg) e induzidos com paracetamol em dose aguda.



Valores são apresentados média±erro padrão, n = 6. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ ). Onde EE = Extrato Etanólico; PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclometânica; PA = Partição em Acetato de Etila; Sil = Silimarina. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

O grupo controle negativo teve os níveis de fosfatase alcalina (FAL) aumentados em relação ao grupo normal. Os níveis de FAL foram estatisticamente iguais ao grupo normal para os grupos PD 200 mg/ kg e PA 50 mg / kg, os grupos tratados com o controle silimarina 100 mg / kg, PH em ambas concentrações, enquanto, PD em 100 mg / kg e PA em 100 e 200 mg / kg apresentaram resultados estatisticamente diferente do grupo controle negativo não tratado. O aumento na atividade de FAL é resultado da maior síntese desta enzima pelas células que revestem os canalículos biliares. Em geral, ocorre em resposta à colestase e à redução do fluxo biliar. (GAW et al., 2015). Porém, segundo Giannini et al.(2005), lesões hepáticas induzidas por paracetamol e outros medicamentos não causam necessariamente aumento significativo nos níveis de FAL. No entanto, no que tange os tratamentos, a manutenção dos níveis de fosfatase é outro importante indicativo de proteção ao dano hepático por PH, PD e PA.

Outros parâmetros bioquímicos (proteínas totais, albumina, bilirrubina total, bilirrubina direta, bilirrubina indireta) que se relacionam indiretamente com a lesão hepática foram avaliados no soro dos animais (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros bioquímicos dos animais normais e tratados, com lesão hepática aguda causada por paracetamol.

Grupo	PT g / dL	ALB g / dL	BT mg / dL	BD mg / dL	BI mg / dL
Normal	3,19±0,09 <sup>a</sup>	3,33±1,99 <sup>a</sup>	2,40±0,08 <sup>a</sup>	0,56±0,04 <sup>a</sup>	1,83±0,11 <sup>a</sup>
Controle Negativo	2,84±0,02 <sup>a</sup>	2,81±1,07 <sup>a</sup>	3,04±0,7 <sup>a</sup>	0,87±0,12 <sup>a</sup>	2,22±0,67 <sup>a</sup>
Sil 100mg / kg	3,22±0,02 <sup>a</sup>	3,35±0,89 <sup>a</sup>	2,34±0,3 <sup>a</sup>	0,65±0,07 <sup>a</sup>	1,69±0,31 <sup>a</sup>
EE 100 mg /kg	2,49±0,14 <sup>a</sup>	1,63±1,25 <sup>a</sup>	2,98±0,21 <sup>a</sup>	1,0±0,11 <sup>a</sup>	1,93±0,24 <sup>a</sup>
EE 200mg / kg	2,78±0,29 <sup>a</sup>	3,88±0,87 <sup>a</sup>	1,44±0,21 <sup>a</sup>	0,91±0,10 <sup>a</sup>	1,72±0,21 <sup>a</sup>
PH 100mg / kg	3,07±0,13 <sup>a</sup>	3,35±3,41 <sup>a</sup>	1,48±0,29 <sup>a</sup>	0,59±0,02 <sup>a</sup>	0,89±0,30 <sup>a</sup>
PH 200 mg / kg	2,83±0,11 <sup>a</sup>	2,73±0,93 <sup>a</sup>	2,76±0,36 <sup>a</sup>	1,03±0,05 <sup>a</sup>	1,73±0,32 <sup>a</sup>
PD 100 mg / kg	2,97±0,16 <sup>a</sup>	2,82±1,67 <sup>a</sup>	1,75±0,39 <sup>a</sup>	0,63±0,097 <sup>a</sup>	1,11±0,39 <sup>a</sup>
PD 200 mg / kg	3,32±0,10 <sup>a</sup>	2,51±2,73 <sup>a</sup>	2,03±0,15 <sup>a</sup>	0,79±0,13 <sup>a</sup>	1,23±0,18 <sup>a</sup>
PA 50 mg / kg	3,72±0,08 <sup>a</sup>	2,71±1,71 <sup>a</sup>	1,71±0,24 <sup>a</sup>	0,63±0,09 <sup>a</sup>	1,30±0,13 <sup>a</sup>
PA 100 mg / kg	3,86±0,01 <sup>a</sup>	2,90±1,77 <sup>a</sup>	1,88±0,09 <sup>a</sup>	0,58±0,07 <sup>a</sup>	1,30±0,13 <sup>a</sup>
PA 200 mg / kg	2,85±0,19 <sup>a</sup>	3,32±1,98 <sup>a</sup>	2,16±0,16 <sup>a</sup>	0,92±0,13 <sup>a</sup>	1,32±0,21 <sup>a</sup>

Valores são apresentados como média  $\pm$ ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; EE = Extrato Etanólico, PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclometânica, PA = Partição em acetato de etila. PT: Proteína Total; ALB: Albumin; BT: Bilirrubina Total; BD: Bilirrubina Direta; BI: Bilirrubina Indireta. Na mesma coluna, valores seguidos pela letra a não possuem diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo normal pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Foi observado que para proteínas totais e albumina não houve alterações significativas para os grupos testados. A albumina é uma proteína produzida pelo fígado e é extremamente sensível a lesões/doenças hepáticas. Tem meia-vida longa no plasma, assim, diminuições nas concentrações de albumina demoram a ocorrer quando há redução súbita de sua síntese (GAW et al., 2015). Como o modelo de indução de lesão hepática foi agudo, não houve tempo suficiente para percepção de alterações significativas nas proteínas hepáticas.

A tabela 7 também mostra que não houve diferenças significativas entre os grupos para os níveis de bilirrubinas. Segundo Giannini et al (2005), para lesões

agudas causadas por paracetamol e outros medicamentos, alterações significativas nos parâmetros de bilirrubina não são esperados uma vez que o dano agudo não provocou colestase e o fluxo biliar não foi alterado.

O paracetamol demonstrou ser capaz de aumentar os níveis de colesterol no soro de animais tratados com este medicamento (ÖZSOY E PABUÇCUOGLUO, 2007). O perfil lipídico no soro dos animais tratados com as amostras está apresentado na tabela 8 abaixo.

Tabela 8: Perfil lipídico de animais normais e tratados, com lesão hepática aguda induzida por paracetamol.

Grupo	TRIGL mg / dL	CT mg / dL	C- HDL mg / dL	C-VLDL mg / dL	C-LDL mg / dL
Normal	88,99±2,64 <sup>a</sup>	88,40±1,94 <sup>a</sup>	11,88±1,35 <sup>a</sup>	17,80±0,53 <sup>a</sup>	62,28±1,59 <sup>a</sup>
Controle Negativo	123,1±13,76 <sup>b</sup>	122,40±14,6 <sup>b</sup>	3,59±1,14 <sup>b</sup>	20,57±1,35 <sup>b</sup>	86,49±5,13 <sup>b</sup>
Sil 100mg / kg	116,5±4,78 <sup>c</sup>	84,27±4,46 <sup>a</sup>	3,87±0,21 <sup>b</sup>	23,29±0,96 <sup>b</sup>	57,10±4,40 <sup>a</sup>
EE 100 mg /kg	111,2±3,58 <sup>c</sup>	97,57±4,45 <sup>c</sup>	5,98±0,28 <sup>c</sup>	22,25±0,71 <sup>b</sup>	69,34±4,50 <sup>c</sup>
EE 200mg / kg	105,2±4,32 <sup>b</sup>	82,79±2,13 <sup>a</sup>	4,44±0,92 <sup>b</sup>	21,05±0,86 <sup>b</sup>	57,30±2,81 <sup>a</sup>
PH 100mg / kg	104,4±3,13 <sup>b</sup>	80,58±2,72 <sup>a</sup>	9,09±1,39 <sup>a</sup>	20,89±0,62 <sup>b</sup>	50,60±3,27 <sup>d</sup>
PH 200mg / kg	112,5±7,00 <sup>c</sup>	86,02±1,57 <sup>a</sup>	5,30±0,86 <sup>b</sup>	22,78±1,75 <sup>b</sup>	57,39±1,41 <sup>a</sup>
PD 100mg / kg	113,1±10,30 <sup>c</sup>	84,75±3,83 <sup>a</sup>	5,07±0,76 <sup>b</sup>	22,63±2,06 <sup>b</sup>	57,04±4,46 <sup>a</sup>
PD 200mg / kg	108,5±4,29 <sup>b</sup>	82,23±2,10 <sup>a</sup>	7,75±0,64 <sup>d</sup>	21,70±0,85 <sup>b</sup>	52,78±2,34 <sup>d</sup>
PA 50mg / kg	117,8± 15,87 <sup>b</sup>	81,54±3,32 <sup>a</sup>	7,57±1,19 <sup>d</sup>	24,98±6,8 <sup>c</sup>	50.10±5.49 <sup>d</sup>
PA 100mg / kg	125,1±5,53 <sup>c</sup>	81,04±1,12 <sup>a</sup>	12,47±1,08 <sup>a</sup>	25,01±1,11 <sup>c</sup>	43,56±1,76 <sup>d</sup>
PA 200mg / kg	84,22±1,00 <sup>a</sup>	83,06±1,64 <sup>a</sup>	12,34±0,81 <sup>a</sup>	16,84±0,20 <sup>a</sup>	53,88±0,90 <sup>a</sup>

Valores são média ±ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; EE = Extrato Etanólico, PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclometânica, PA = Partição em acetato de etila. TRIGL: Triglicérides; C.T.: Colesterol Total; C- HDL: Colesterol – HDL, C-LDL: Colesterol – LDL; C-VLDL: Colesterol-VLDL. Na colunas, valores seguidos pela mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

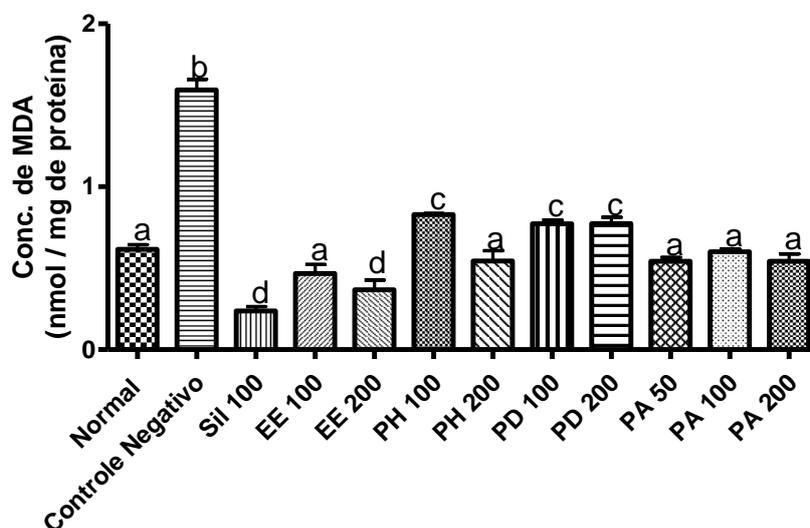
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Foi possível observar um aumento significativo no nível de colesterol total e frações c - LDL e c - VLDL, bem como nos níveis de triglicérides para o grupo controle negativo não tratado, em relação ao grupo normal (Tabela 8). Em

contrapartida, os grupos tratados com o controle positivo silimarina, EE e suas partições não apresentaram alterações significativas no CT e c-LDL em relação ao grupo normal. Exceto pelos animais tratados com PA (200 mg/ kg), os demais grupos apresentaram alteração nos níveis de c-HDL, c-VLDL e TRIGL. Assim, em relação ao perfil lipídico, PA nesta concentração manteve os níveis dos parâmetros avaliados próximos aos valores normais, sugerindo sua provável atividade hepatoprotetora.

Com a finalidade de aprofundar o entendimento sobre a atividade hepatoprotetora em animais com lesão hepática aguda causada por paracetamol, a atividade antioxidante *in vivo* das amostras também foi realizada pela reação com o ácido tiobarbitúrico, e pela avaliação da atividade das enzimas catalase e glutathione redutase.

Figura 13: Níveis de malonaldeído (MDA) em animais pré-tratados com *Vernonia condensata* e lesão hepática aguda causada por paracetamol em modelo animal.



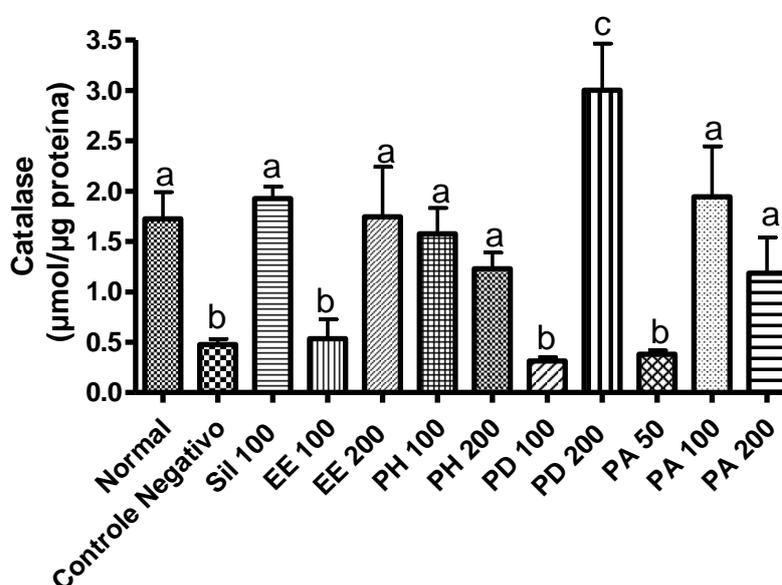
Valores expressos como média  $\pm$ ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; EE = Extrato Etanólico, PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclometânica, PA = Partição em acetato de etila, doses em mg / kg. Valores seguidos pela mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

A Figura 13 mostra o aumento da concentração de MDA, um subproduto da lipoperoxidação dos tecidos, em animais com lesão e não tratados. Esse fato acontece devido ao estresse oxidativo provocado pela presença do radical livre NAPQI nas células hepáticas. Diversos estudos têm demonstrado que os radicais livres podem danificar lipídeos e proteínas de membrana, alterando a estrutura celular e, muitas vezes, levando à morte celular (SILVA, et al., 2011). Todos os

grupos tratados previamente com as amostras, mantiveram os níveis de MDA abaixo do nível apresentado pelo grupo controle negativo não tratado. Amostras que diminuem os níveis de MDA nos tecidos animais são consideradas como bons antioxidantes. *In vitro* também, as amostras EE, PH, PD e PA demonstraram atividade antioxidante promissora, porém PA foi mais ativo (SILVA et al., 2013). Com os resultados *in vivo* obtidos no presente trabalho, associados aos descritos anteriormente, fica clara a forte ação de *V. condensata* como antioxidante na inibição da peroxidação lipídica nos tecidos.

Outro importante parâmetro da capacidade antioxidante avaliado foi o nível da atividade da enzima catalase (Figura 14).

Figura 14: Níveis da atividade da enzima catalase em animais pré-tratados com *Vernonia condensata* e lesão hepática aguda causada por paracetamol em modelo animal.



Valores expressos como média  $\pm$ ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; EE = Extrato Etanólico, PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclorometânica, PA = Partição em acetato de etila, doses em mg / kg. Valores seguidos pela mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

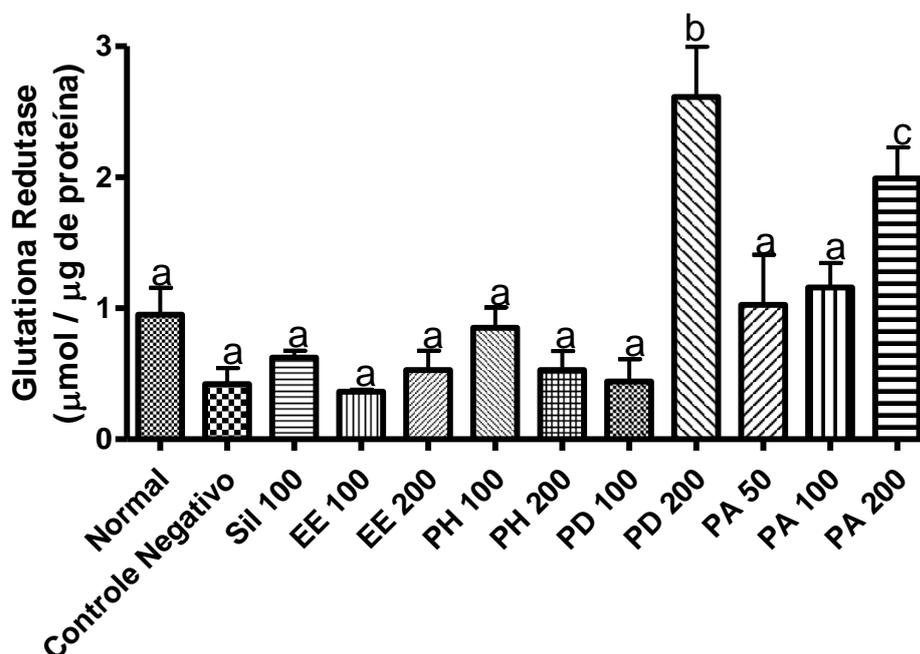
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

A catalase é uma enzima presente nas células aeróbicas que catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio, subproduto de várias reações químicas, em água e oxigênio livre protegendo o organismo dos danos oxidativos causados por esta espécie altamente reativa. Neste trabalho, observou-se que os animais com lesão hepática não tratados tiveram a atividade desta enzima bastante diminuída, caracterizando o estresse oxidativo provocado pelo metabolismo do paracetamol. EE e PD, 100 mg / g bem como PA, 50 mg / kg não demonstraram diferença

significativa em relação ao grupo não tratado. Este resultado indica o efeito antioxidante *in vivo* das demais amostras.

A atividade antioxidante da enzima glutatona redutase também foi avaliada (Figura 15).

Figura 15: Níveis da atividade da enzima glutatona redutase em animais pré-tratados com *Vernonia condensata* e lesão hepática aguda causada por paracetamol em modelo animal.



Valores expressos como média  $\pm$ ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; EE = Extrato Etanólico, PH = Partição Hexânica, PD = Partição Diclometânica, PA = Partição em acetato de etila, dose em mg / kg. Valores seguidos pela mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
 Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

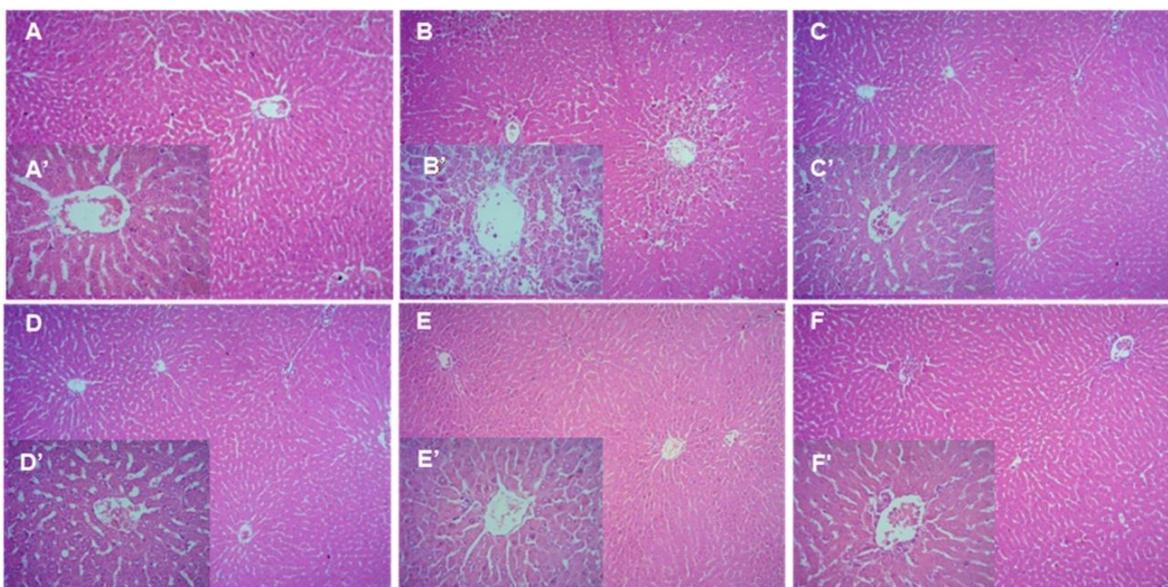
A glutatona redutase (GSH) encontra alta atividade no fígado. Atua como um antioxidante endógeno reduzindo níveis de hidroperóxidos ( $H_2O_2$ ) tal como a catalase, e ainda demais espécies reativas de oxigênio como os peróxidos lipídicos que são ainda mais reativos que as espécies primárias de  $O_2$  ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ). A redução relativa dos níveis de GSH no interior das células leva a uma situação de estresse oxidativo (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989). Os níveis de GSH para os grupos PD 200 mg / kg e PA na mesma concentração apresentaram-se aumentados em relação ao grupo normal. Este aumento de GSH são evidências da atividade antioxidante dessas partições de *V. condensata*.

Em resumo, os resultados obtidos para os parâmetros e para atividade antioxidante indicam um maior potencial hepatoprotetor para a partição acetato de

etila das folhas de *V. condensata*. Assim, a fim de corroborar esses resultados, os fígados dos animais dos grupos tratados com PA foram submetidos ao exame histopatológico.

Os estudos histopatológicos confirmaram o dano hepático causado pelo paracetamol. Os animais não tratados (controle negativo) apresentaram mudanças degenerativas tais como vacuolização e núcleo picnótico nas células parenquimais na área centrolobular, congestão e dilatação sinusoidal, grau moderado de infiltrado linfocítico e sangramento (Figura 16). Por outro lado, o fígado dos animais pré-tratados com PA não apresentaram mudanças degenerativas mantendo os aspectos histológicos bastante próximos ao órgão dos animais do grupo normal, com poucas áreas de congestão e algum infiltrado linfocítico.

Figura 16: Fotomicrografia representativa das seções longitudinais do fígado de rato após 7 dias de pré-tratamento seguido pela indução de dano hepático agudo por paracetamol.



Grupo normal (A 100x, A' 400x), Controle negativo (B 100x, B' 400x), Controle Referência silimarina (C 100x, C' 400x), PA 50 mg/kg (D 100x, D' 400x), PA 100 mg/kg (E 100x, E' 400x) e PA 200 mg/kg (F 100x, F' 400x). Cortes histológicos de 5 $\mu$ m, lâminas coradas com hematoxilina e eosina. As imagens foram capturadas usando o Image-Pro Plus® 6.0 software. Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

#### 5.1.2.2. Avaliação da atividade hepatoprotetora *in vivo* frente à indução de lesão com doses repetidas de paracetamol

Dessa forma, PA foi selecionada para tratar animais, agora com lesão hepática induzida por paracetamol em doses diárias de 750 mg / kg, sendo administrada simultaneamente ao paracetamol.

O peso médio corporal, fator considerado quando se avalia a toxicidade de um fármaco, bem como o dos fígados dos animais estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Peso médio corporal e dos fígados de animais induzidos pelo uso contínuo de paracetamol, normais e tratados com PA

Grupo	Peso médio corporal (g)		Peso médio do fígado (g)	Índice Hepático (%)
	Dia 0	Dia 11		
Normal	273,5 ± 8,6	279,5±10,6	9,00 ± 0,57 <sup>a</sup>	32,20 ± 0,53 <sup>a</sup>
Controle Negativo	301,4 ± 5,3	318,8±6,6	11,80 ± 0,58 <sup>b</sup>	37,01 ± 0,87 <sup>b</sup>
Sil. 100 mg / kg	288,8 ± 4,0	299,2±6,5	10,60 ± 0,24 <sup>c</sup>	35,42 ± 0,36 <sup>c</sup>
PA 100 mg / kg	251,6 ± 8,1	268,0±7,8	9,20 ± 0,20 <sup>a</sup>	34,33 ± 0,25 <sup>b,c</sup>
PA 200 mg / kg	294,0 ± 3,4	314,8±4,5	11,6 ± 0,24 <sup>b</sup>	36,84 ± 0,53 <sup>b</sup>

Valores expressos como média ±ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. Médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,01).

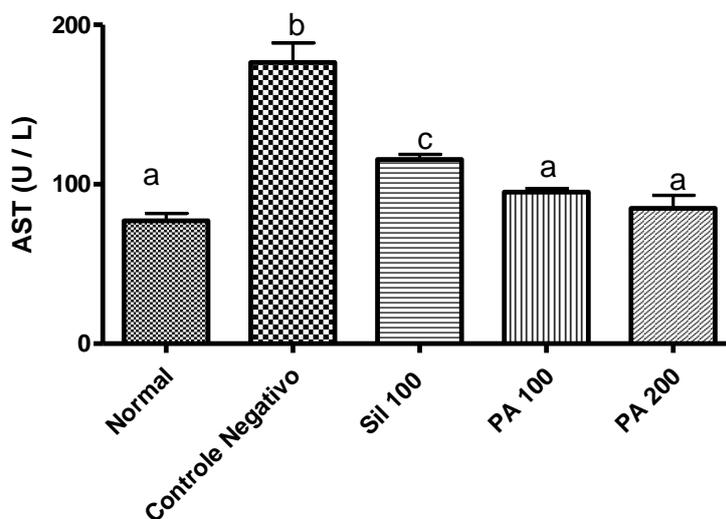
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

O índice hepático dos animais tratados com PA (100 mg / kg) não apresentou diferenças significativas em relação ao dos animais do grupo normal e do controle Silimarina, o que sugere mais uma vez que PA (100 mg / kg) não interferiu significativamente na homeostase deste órgão.

O nível das enzimas AST (Figura 17) e ALT (Figura 18), foi medido também neste modelo de indução.

Foi observado um aumento de AST, em animais com lesão hepática induzida por doses contínuas de paracetamol, porém não tratados. Os animais tratados com PA apresentaram níveis de AST estatisticamente iguais ao nível apresentado pelos animais do grupo normal.

Figura 17: Efeito da administração de PA nos níveis de AST no soro de ratos induzidos com paracetamol em doses repetidas.

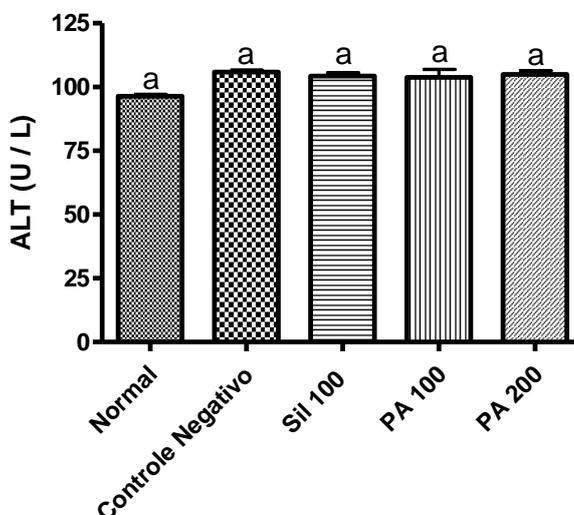


Onde PA = Partição em Acetato de Etila; Sil = Silimarina em doses em mg / kg. Valores são apresentados média  $\pm$  erro padrão, n = 6. Letras iguais para valores não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

A Figura 18 mostra os níveis da ALT. Não foi observada diferença entre os grupos avaliados.

Figura 18: Efeito da administração de PA nos níveis de ALT no soro dos ratos induzidos com paracetamol em doses repetidas.



Valores são expressos média  $\pm$  ep, n = 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. Valores seguidos pela letra a não possuem diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo normal pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

O tratamento com paracetamol em doses repetidas nas doses terapêuticas diárias pode levar a elevações transitórias dos níveis das transaminases séricas, geralmente começando depois de 3 a 7 dias. Estas elevações são assintomáticas e resolvidas rapidamente com a interrupção do tratamento ou redução da dose, e em alguns casos a elevação dos níveis de transaminases é resolvida pelo organismo, mesmo com a continuação na dose completa (ZIMMERMAN et al, 1999). Portanto, a manutenção dos níveis de ALT era esperada.

Os níveis de transaminases não permitiram concluir se houve ou não lesão hepática causada por doses contínuas de paracetamol, então, outros parâmetros foram também avaliados para se verificar o quadro de lesão hepática. Os níveis de proteínas totais, fosfatase alcalina e albumina estão apresentados na Tabela 10, enquanto os parâmetros lipídicos encontram-se apresentados na Tabela 11.

Tabela 10: Parâmetros bioquímicos analisados no soro de ratos com lesão hepática induzida por doses repetidas de paracetamol.

Grupo	PT g / dL	FAL U / L	ALB g / dL
Normal	4,33 ± 0,09 <sup>a</sup>	83,82 ± 8,92 <sup>a</sup>	3,26 ± 0,64 <sup>a</sup>
Controle Negativo	4,12 ± 0,07 <sup>a</sup>	127,42 ± 8,83 <sup>b</sup>	3,37 ± 0,48 <sup>a</sup>
Sil 100mg / kg	4,43 ± 0,07 <sup>a</sup>	117,52 ± 4,09 <sup>a</sup>	3,30 ± 0,40 <sup>a</sup>
PA 100 mg / kg	4,59 ± 0,04 <sup>a</sup>	108,52 ± 9,95 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,95 <sup>a</sup>
PA 200 mg / kg	4,41 ± 0,05 <sup>a</sup>	122,69 ± 10,03 <sup>b</sup>	3,26 ± 0,45 <sup>a</sup>

Valores são média ± ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. PT: Proteína Total; FAL: Fosfatase alcalina; ALB: Albumina. Na mesma coluna, valores seguidos mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas teste de Tukey (p < 0,05).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Da mesma forma que nos animais com lesão hepática induzida por dose única de paracetamol, não foram observadas alterações significativas em proteínas totais e albumina. Como a meia vida sérica da albumina é de 12 a 21 dias e a indução com doses repetidas foi realizada por 10 dias, a não alteração deste parâmetro era esperada. A FAL mostrou-se aumentada para o grupo controle negativo e PA 200 mg / kg, indicando uma possível colestase no fígado destes

animais. Assim, o tratamento simultâneo com PA 200 mg / kg não foi capaz de manter os níveis da FAL nestas condições.

A tabela 11 apresenta o perfil lipídico, triglicérides, colesterol total e frações no soro dos animais tratados com doses repetidas.

Tabela 11: Parâmetros lipídicos analisados no soro para o teste de hepatoproteção

Grupo	TRIGL mg / dL	CT mg / dL	c- HDL mg / dL	c-VLDL mg / dL	c-LDL mg / dL
Normal	115,4±3,82 <sup>a</sup>	82,72±2,19 <sup>a</sup>	11,88±1,34 <sup>a</sup>	23,09±0,76 <sup>a</sup>	45,43±2,42 <sup>a</sup>
Controle Negativo	114,3±4,39 <sup>a</sup>	89,60±7,52 <sup>a</sup>	2,09±0,22 <sup>b</sup>	22,86±0,87 <sup>a</sup>	65,76±7,59 <sup>b</sup>
Sil 100mg / kg	101,2±4,71 <sup>a</sup>	81,53±1,95 <sup>a</sup>	12,35±2,04 <sup>a</sup>	20,24±0,94 <sup>a</sup>	49,87±3,24 <sup>a</sup>
PA 100 mg / kg	108,8±4,59 <sup>a</sup>	84,83±2,54 <sup>a</sup>	9,77±2,69 <sup>a</sup>	21,76±0,02 <sup>a</sup>	54,13±1,76 <sup>c</sup>
PA 200 mg / kg	104,9±3,91 <sup>a</sup>	75,45±0,78 <sup>a</sup>	12,14±0,78 <sup>a</sup>	20,98±0,78 <sup>a</sup>	43,90±1,03 <sup>a</sup>

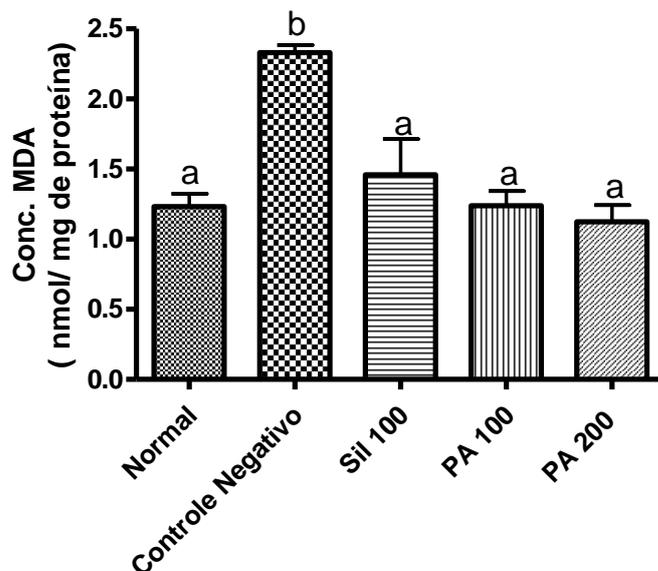
Valores são média ±ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. TRIGL: Triglicérides; C.T.: Colesterol Total; C- HDL: Colesterol – HDL, C-LDL: Colesterol – LDL; C-VLDL: Colesterol-VLDL. Na mesma coluna, valores seguidos pela letra mesma não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey (p< 0,05).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Em relação aos parâmetros lipídicos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para os níveis de TRIGL, CT, c-VLDL. Contudo, de forma análoga ao tratamento agudo, os níveis de c-LDL aumentaram para o grupo controle negativo e diminuíram para os animais tratados com Sil 100 mg / kg e PA em ambas as doses, sendo a diminuição mais expressiva na dose de 200 mg/ kg. Os níveis de c-HDL apresentaram-se diminuídos para o grupo não tratado. Para os grupos tratados seja com PA a 200 mg / kg seja com silimarina, esse parâmetro apresentou valores significativamente iguais aos do grupo normal. O c-HDL é uma fração lipídica com função protetora e a redução de seu nível pode comprometer o balanço normal das frações. O tratamento com PA favoreceu a manutenção do perfil lipídico em relação ao balanço c-HDL / c-LDL, alterado pelo paracetamol.

A atividade antioxidante de PA neste modelo também foi avaliada. A concentração de MDA foi mensurada para avaliar a peroxidação lipídica induzida pelo radical livre NAPQI (Figura 19).

Figura 19: Níveis de malonaldeído (MDA) em animais com lesão hepática causada por paracetamol em doses repetidas e tratados com *Vernonia condensata*.



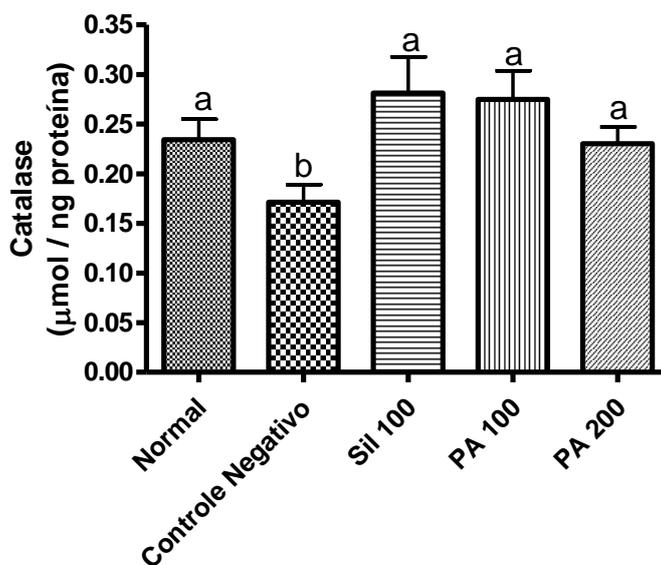
Valores expressos como média  $\pm$ ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila (doses em mg / kg). Valores seguidos pela letra mesma não possuem diferenças estatísticas significativas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Foram observados níveis normais de MDA para os grupos tratados com PA, em ambas as concentrações, bem como para o controle positivo, silimarina. Os danos inflamatórios causados pelos radicais livres à membrana celular, oriundos da lipoperoxidação, foram inibidos pela ação protetora de PA.

Tal como para indução aguda com paracetamol, a atividade das enzimas catalase e glutathione redutase foram avaliadas. Assim, foi possível observar no que tange a atividade da enzima catalase (Figura 20), que não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados com PA e o grupo normal.

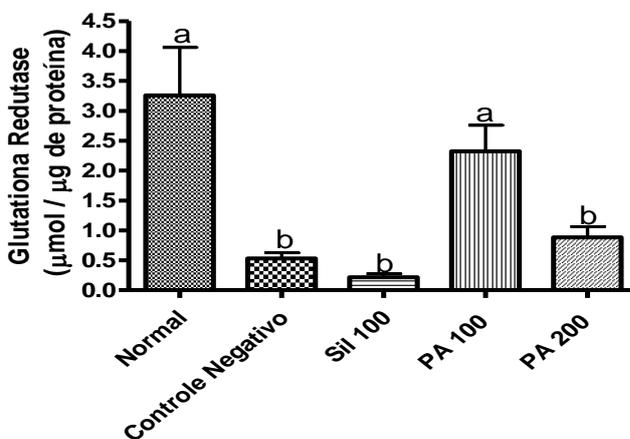
Figura 20: Atividade da enzima catalase para animais com lesão hepática causada por paracetamol em doses repetidas e tratados com *Vernonia condensata*.



Valores expressos como média  $\pm$ ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila (doses em mg / kg). Valores seguidos por letras iguais não possuem diferenças estatísticas significativas entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Da mesma forma, como foi possível observar na figura 20, a atividade da enzima glutatona redutase (Figura 21), nos animais tratados com PA, permaneceu significativamente igual àquela apresentada pelos animais do grupo normal.

Figura 21: Atividade da enzima glutatona redutase em animais com lesão hepática induzida pelo uso por paracetamol em doses repetidas e tratados com *Vernonia condensata*.

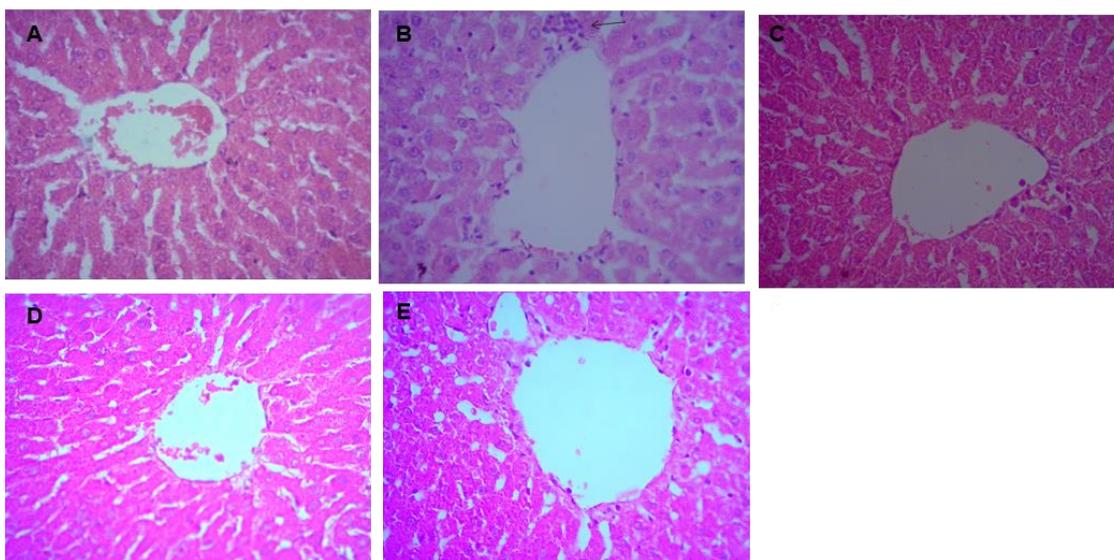


Valores expressos como média  $\pm$ ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. Valores seguidos pela letra a não possuem diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo normal pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Portanto, foi possível verificar que PA exerceu importante atividade antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica e aumentando a atividade das enzimas catalase e glutathione redutase. A observação deste conjunto de atividades reforça o potencial de PA como hepatoprotetor e antioxidante.

Os estudos histopatológicos confirmaram as análises bioquímicas. Os animais não tratados (controle negativo) não apresentaram significativas mudanças degenerativas exceto por pequenas regiões com infiltrado inflamatório (Figura 22). O fígado dos animais pré-tratados com PA também não apresentaram mudanças degenerativas mantendo os aspectos histológicos bastante próximos ao órgão dos animais do grupo normal.

Figura 22: Fotomicrografia representativa das seções longitudinais do fígado de rato após 10 dias de tratamento com PA e simultânea administração de paracetamol.



Grupos: normal (A, 400x), controle negativo (B, 400x), silimarina (C, 400x), PA 100 mg/kg (D, 400x), PA 200 mg/kg (E, 400x). Cortes histológicos de 5 $\mu$ m e lâminas coradas com hematoxilina e eosina. As imagens foram capturadas usando o Image-Pro Plus® 6.0 software.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

### 5.1.2.3. Avaliação da atividade hepatoprotetora *in vivo* frente à indução de lesão aguda por etanol

A indução de lesão aguda por etanol também foi utilizada para se avaliar a atividade hepatoprotetora de PA. Para este modelo foi utilizada somente a dose de 200 mg / kg pois foi a que apresentou, de maneira geral, maior atividade hepatoprotetora em animais com lesão hepática induzida por paracetamol.

Os animais foram pesados antes e depois do tratamento. Ao final do experimento, o fígado dos animais foi retirado e pesado. Os resultados estão expressos Tabela 12.

Tabela 12: Peso corporal médio e do fígado dos animais com lesão hepática causada pelo etanol.

Grupos	Peso Médio Corporal (g)		Peso Médio do Fígado (g)	Índice Hepático (%)	
	Antes da lesão	Após lesão			
Normal	258,6 ± 2,2	280,2 ± 2,7	9,6 ± 0,33 <sup>a</sup>	34,3 ± 0,12 <sup>a</sup>	
Controle Negativo	310,0 ± 3,0	342,5 ± 7,5	11,15 ± 0,35 <sup>b</sup>	32,6 ± 0,46 <sup>b</sup>	
Simultâneo	Sil. 100 mg / kg	280 ± 5,2	298 ± 3,9	10,4 ± 0,40 <sup>a</sup>	34,9 ± 0,10 <sup>a</sup>
	PA 200 mg / kg	250,0 ± 7,5	263,2 ± 4,1	8,8 ± 0,48 <sup>a</sup>	33,4 ± 0,11 <sup>b</sup>
Pré-tratamento	Sil. 100 mg / kg	299 ± 2,1	319,8 ± 1,6	11,0 ± 0,43 <sup>b</sup>	34,4 ± 0,26 <sup>a</sup>
	PA 200 mg / kg	266 ± 4,5	284,0 ± 4,3	9,34 ± 0,16 <sup>a</sup>	32,9 ± 0,37 <sup>b</sup>

Valores são: média ± ep, n = 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. Valores seguidos pela mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

O índice hepático dos animais tratados com silimarina e PA tratados em simultâneo não apresentou diferença significativa.

Os parâmetros bioquímicos e a atividade antioxidante foram avaliados para as duas situações propostas. A tabela 13 apresenta o efeito da administração de PA nos níveis de AST e ALT no soro dos animais tratados com etanol.

Tabela 13: Efeito da administração de PA nos níveis de AST e ALT no soro dos ratos com lesão hepática aguda induzida por etanol.

Grupos	AST (U / L)	ALT (U / L)	
Normal	94,59 ± 4,20 <sup>a</sup>	98,66 ± 1,86 <sup>a</sup>	
Controle Negativo	201,90 ± 7,68 <sup>b</sup>	122,30 ± 2,68 <sup>b</sup>	
Simultâneo	Sil 100 mg / kg	94,07 ± 2,51 <sup>a</sup>	113,80 ± 3,50 <sup>a</sup>
	PA 200 mg / kg	91,22 ± 1,03 <sup>a</sup>	110,10 ± 3,25 <sup>a</sup>
Pré – tratamento	Sil 100 mg / kg	165,77 ± 11,61 <sup>c</sup>	118,64 ± 10,61 <sup>b</sup>
	PA 200 mg / kg	215,6 ± 28,88 <sup>b</sup>	112,61 ± 8,18 <sup>a</sup>

Valores são: média ± ep, n = 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. Valores seguidos pela letra a não possuem diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo normal pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Os níveis das transaminases hepáticas estavam aumentados para os animais do grupo controle negativo indicando a lesão hepática provocada pelo etanol. Os animais que receberam o tratamento com PA, simultaneamente ao etanol, não apresentaram alterações significativas nas transaminases. Para os animais que receberam pré-tratamento com PA 200 mg / kg, observou-se alteração significativa nos níveis de AST. O resultado implica no impedimento da lesão hepática causada pelo etanol quando administrado simultaneamente. A administração da PA antes da indução de lesão por etanol impediu o aumento dos níveis de ALT. O mesmo não foi observado para os níveis de AST.

Valores dos parâmetros bioquímicos e do perfil lipídico avaliados nos animais com lesão hepática por etanol e tratados com PA foram apresentados na tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros bioquímicos e lipídicos analisados no soro de ratos com lesão hepática aguda causada por etanol

Grupo	PT g / dL	ALB g / dL	TRIGL mg / dL	CT mg / dL	C- HDL mg / dL	C-VLDL mg / dL	C- LDL mg / dL	
Normal	4,3±0,1 <sup>a</sup>	3,2±0,6 <sup>a</sup>	110,0±2,6 <sup>a</sup>	83,9±2,8 <sup>a</sup>	11,5±1,3 <sup>a</sup>	22,5±0,5 <sup>a</sup>	49,9±1,5 <sup>a</sup>	
C. Negativo	4,4±0,1 <sup>a</sup>	2,5±0,2 <sup>a</sup>	129,2±8,6 <sup>b</sup>	78,8±0,8 <sup>a</sup>	2,7±0,3 <sup>b</sup>	21,8±4,0 <sup>a</sup>	54,2±1,7 <sup>b</sup>	
Simult.	Sil	3,2±0,2 <sup>b</sup>	2,6±0,8 <sup>a</sup>	131,9±7,2 <sup>b</sup>	75,5±4,0 <sup>a</sup>	5,5±0,3 <sup>c</sup>	26,4±1,4 <sup>a</sup>	50,9±2,9 <sup>a</sup>
	PA	3,5±0,3 <sup>b</sup>	2,6±2,1 <sup>a</sup>	108,3±2,7 <sup>a</sup>	67,1±3,3 <sup>b</sup>	6,2±0,1 <sup>c</sup>	21,6±0,5 <sup>a</sup>	39,2±1,4 <sup>c</sup>
Pré Tratam.	Sil	3,6±0,2 <sup>b</sup>	2,3±0,6 <sup>a</sup>	151,3±6,9 <sup>c</sup>	67,1±3,2 <sup>b</sup>	9,7±1,2 <sup>a</sup>	28,1±1,7 <sup>a</sup>	29,3±2,0 <sup>d</sup>
	PA	4,3±0,2 <sup>a</sup>	2,6±0,8 <sup>a</sup>	153,3±2,5 <sup>c</sup>	66,5±2,7 <sup>b</sup>	5,6±0,6 <sup>c</sup>	30,3±0,4 <sup>a</sup>	30,6±1,2 <sup>d</sup>

Valores são expressos: média ±ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina 100 mg /kg; PA = Partição em acetato de etila 200 mg / kg. PT: Proteínas totais; Alb: Albumina; TRIGL: Triglicédeos; C.T.: Colesterol Total; C- HDL: Colesterol – HDL; C-LDL: Colesterol LDL; C-VLDL: Colesterol-VLDL. Na mesma coluna, valores seguidos pela mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas entre si pelo teste de Tukey (p< 0,05).

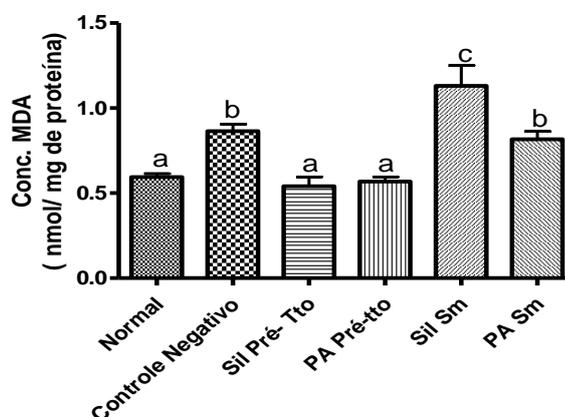
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

As proteínas totais e a albumina não apresentaram alterações significativas em todos os grupos avaliados. Os triglicerídeos mostraram-se inalterados apenas para o grupo tratado com PA administrado simultaneamente ao etanol. O nível de colesterol total não foi alterado pela administração aguda de etanol nos animais do grupo controle negativo, contudo os animais tratados com PA,

nas duas situações avaliadas, apresentaram colesterol total abaixo dos apresentados pelos animais do grupo normal. A fração c-HDL ficou aumentada em todos os grupos tratados com PA, em relação ao grupo controle negativo. As frações c-LDL diminuíram para os grupos tratados com PA em relação ao grupo controle negativo. As alterações observadas nos níveis de colesterol total e c-LDL no soro dos animais tratados com PA sugerem possível efeito hipocolesterolêmico, estas observações já foram registradas nos grupos com lesão aguda por paracetamol tratadas com PA.

A atividade de PA sobre a produção de MDA (Figura 23) e das enzimas antioxidantes catalase e glutathione oxidase também foi avaliada.

Figura 23: Níveis de malonaldeído (MDA) em animais com lesão hepática induzida etanol.

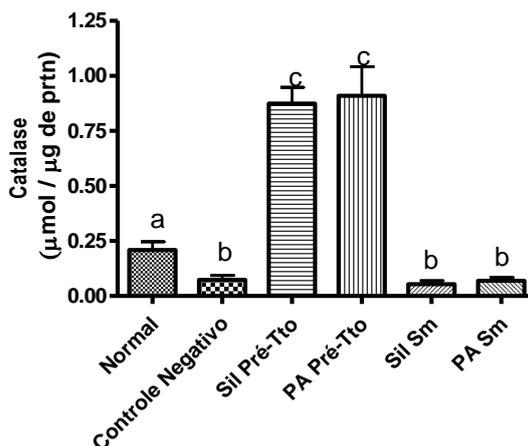


Valores são: média  $\pm$ ep, n= 6. Onde: Sil Pré-Tto = silimarina 100 mg / kg pré tratamento; PA Pré-Tto = Partição em acetato de etila 200 mg / kg pré tratamento; Sil Sm = silimarina 100 mg / kg tratamento simultâneo; PA Sm = Partição em acetato de etila 200 mg / kg simultâneo. Valores seguidos por letras iguais não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Os níveis de MDA se mantiveram inalterados apenas para o grupo pré-tratado com PA. Ao ser administrado simultaneamente, PA não inibiu a formação de MDA.

A atividade da enzima catalase está representada na figura 24. A atividade da enzima catalase apresentou-se aumentada para os animais pré-tratados com PA, sugerindo uma possível ação antioxidante do mesmo quando administrado em pré-tratamento.

Figura 24: Atividade da enzima catalase em animais com lesão hepática induzida por etanol.

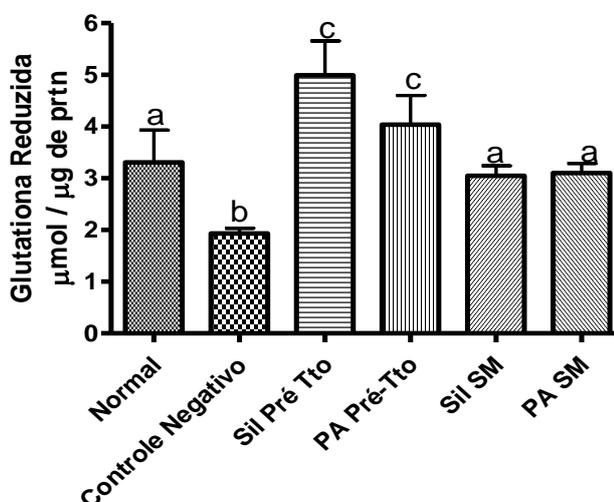


Valores são média  $\pm$ ep, n= 6. Onde: Sil Pré-Tto = silimarina 100 mg / kg pré tratamento; PA Pré-Tto = Partição em acetato de etila 200 mg / kg pré tratamento; Sil Sm = silimarina 100 mg / kg tratamento simultâneo; PA Sm = Partição em acetato de etila 200 mg / kg simultâneo. Valores seguidos por letras iguais não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

A atividade da enzima glutatona redutase se apresentou aumentada em relação ao grupo normal para os grupos tratados tanto com PA (200 mg / kg) quanto pelo controle positivo, e, ainda, não apresentou diferente do grupo normal quando administrada simultaneamente ao etanol (Figura 25).

Figura 25: Atividade da enzima glutatona reduzida em animais com lesão hepática causada por indução com etanol.



Valores são média  $\pm$ ep, n= 6. Onde: Sil Pré-Tto = silimarina 100 mg / kg pré tratamento; PA Pré-Tto = Partição em acetato de etila 200 mg / kg pré tratamento; Sil Sm = silimarina 100 mg / kg tratamento simultâneo; PA Sm = Partição em acetato de etila 200 mg / kg simultâneo. Valores seguidos por letras iguais não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Os resultados até agora apresentados mostram que, a proteção hepática proporcionada por PA está ligada à atividade antioxidante.

A promissora atividade da partição acetato de etila já foi descrita previamente e pode estar correlacionada com a presença de compostos fenólicos quantificados para esta partição (SILVA et al., 2012).

### 5.1.3. Partição em acetato de etila como pós-tratamento de lesão hepática aguda induzida por etanol

Uma vez observada a capacidade hepatoprotetora de PA no pré-tratamento, a indução de lesão aguda por etanol foi utilizada para avaliar a atividade de PA como tratamento após a lesão. Neste caso, a dose de 200 mg / kg foi escolhida para o modelo proposto.

Os animais foram pesados antes e depois do tratamento. Ao final do experimento, o fígado dos animais foi retirado e pesado. Os resultados estão expressos na tabela 15.

Tabela 15: Peso médio corporal e dos fígados dos ratos tratados com PA após lesão induzida com etanol.

Grupo	Peso médio corporal (g)		Peso médio do fígado (g)	Índice hepático (%)
	Antes do Tratamento	Após Tratamento		
Normal	280,2 ± 2,7	258,6 ± 2,2	9,6 ± 0,33 <sup>a</sup>	37,2 ± 0,15 <sup>a</sup>
Controle Negativo	323,0 ± 3,1	293,1 ± 5,2	11,00 ± 0,1 <sup>b</sup>	37,5 ± 0,19 <sup>a</sup>
Sil. 100 mg / kg	310,0 ± 1,9	301,2 ± 1,9	10,36 ± 0,26 <sup>a</sup>	34,4 ± 0,13 <sup>b</sup>
PA 200 mg / kg	277,2 ± 7,65	266,6 ± 8,5	9,1 ± 0,16 <sup>a</sup>	34,2 ± 0,18 <sup>b</sup>

Valores são expressos: média ± ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. Valores seguidos pela mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey (p< 0,05).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Os pesos dos fígados dos animais tratados com PA não apresentaram aumento significativo em relação ao grupo normal. O peso médio corporal dos animais de todos os grupos reduziu após o tratamento. A tabela 16 apresenta os níveis das enzimas AST, ALT, de proteínas totais e albumina no soro dos animais tratados com PA após indução de lesão por etanol.

Tabela 16: Níveis das enzimas AST, ALT, de proteínas totais e albumina no soro dos animais tratados com PA após indução de lesão por etanol

Grupo	AST (U / L)	ALT (U / L)	PT g / dL	ALB g / dL
Normal	94,59±4,20 <sup>a</sup>	98,66±1,86 <sup>a</sup>	4,33±0,09 <sup>a</sup>	3,25±0,64 <sup>a</sup>
Controle Negativo	284,865±5,36 <sup>b</sup>	116,25±6,53 <sup>b</sup>	4,20±0,07 <sup>a</sup>	2,60±0,65 <sup>a</sup>
Sil 100 mg / kg	237,725±16,12 <sup>c</sup>	109,81±5,10 <sup>c</sup>	3,90±0,10 <sup>a</sup>	2,78±1,18 <sup>a</sup>
PA 200 mg / kg	149,125±2,60 <sup>d</sup>	116,08±4,81 <sup>b</sup>	4,25±0,14 <sup>a</sup>	2,81±1,03 <sup>a</sup>

Valores são: média ±ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina; PA = Partição em acetato de etila. Valores seguidos pela mesma letra não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey (p< 0,05).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

A administração de etanol aos animais elevou os níveis das transaminases hepáticas, contudo o tratamento com PA diminuiu significativamente apenas os níveis de AST. As proteínas totais e albuminas não demonstraram alterações significativas pelos motivos já discutidos anteriormente.

O perfil lipídico do soro dos animais tratados com PA foi apresentado na tabela 17.

Tabela 17: Perfil lipídico analisados no soro de ratos tratados com PA após lesão hepática causada por etanol em dose aguda

Grupo	TRIGL mg / dL	CT mg / dL	c- HDL mg / dL	c-VLDL mg / dL	c- LDL mg / dL
Normal	110,00±2,65 <sup>a</sup>	83,98±2,78 <sup>a</sup>	11,54±1,35 <sup>a</sup>	22,50±0,49 <sup>a</sup>	49,94±1,54 <sup>a</sup>
Controle Negativo	130,00±10,93 <sup>b</sup>	92,63±7,25 <sup>b</sup>	8,52±0,84 <sup>a</sup>	25,99±2,18 <sup>a</sup>	58,12±3,36 <sup>b</sup>
Sil 100 mg / mL	100,90±9,98 <sup>a</sup>	70,15±1,55 <sup>a</sup>	6,54±0,29 <sup>c</sup>	20,18±1,99 <sup>a</sup>	43,43±1,27 <sup>c</sup>
PA 200 mg / mL	101,60±7,54 <sup>a</sup>	59,06±3,40 <sup>c</sup>	9,33±0,29 <sup>a</sup>	21,20±1,51 <sup>a</sup>	28,53±1,73 <sup>d</sup>

Valores são: média ±ep, n= 6. Grupos: Sil = Silimarina 100 mg /kg; PA = Partição em acetato de etila 200 mg / kg. TRIGL: Triglicérides; C.T.: Colesterol Total; C- HDL: Colesterol – HDL; C-LDL: Colesterol LDL; C-VLDL: Colesterol-VLDL. Na mesma coluna, valores seguidos pela letra a não possuem diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo normal pelo teste de Tukey (p< 0,05).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

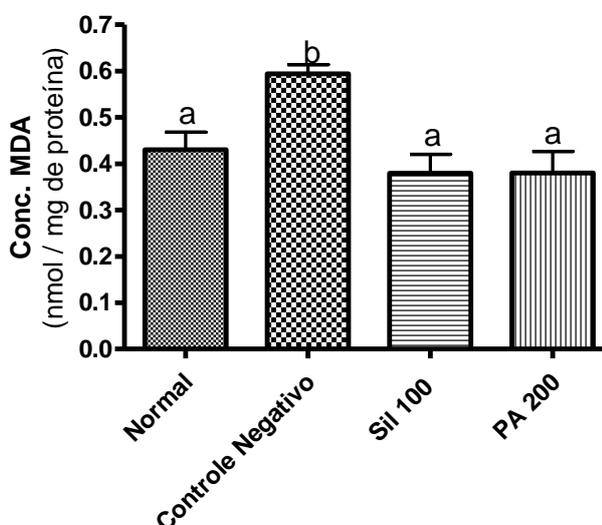
A lesão hepática com etanol alterou significativamente os níveis de TRIGL no soro dos animais não tratados com PA. O tratamento com PA foi capaz de diminuir significativamente os níveis de TRIGL para os valores normais. O colesterol total também se apresentou aumentado no soro dos animais controle negativo,

porém o tratamento com PA inibiu o aumento do colesterol total. A fração c-LDL, aumentada pelo etanol, diminuiu significativamente no soro dos animais tratados com PA.

O fígado é considerado o principal local de metabolismo lipídico. Os hepatócitos contribuem nos ciclos endógenos e exógenos de lipídeos, além de fazer parte do transporte dos lipídeos pelo organismo. Em indivíduos com a integridade do tecido hepático preservada, um equilíbrio complexo é mantido entre a biossíntese, a utilização e o transporte do colesterol e das lipoproteínas, no entanto, em distúrbios hepáticos essa homeostase é rompida, gerando um desequilíbrio no sistema (JIANG et al., 2010). Assim, o perfil lipídico, em casos de exposição a agentes hepatotóxicos é superestimado, os níveis de triglicérides, colesterol total e frações aumentam em função da lesão do hepatócito (SANTOS et al, 1999). Neste contexto, a manutenção do perfil lipídico em todos os animais utilizados neste estudo é mais uma forma de atestarmos a capacidade hepatoprotetora de PA.

A atividade de PA sobre a produção de MDA (Figura 26) e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (Figura 27) e glutathiona redutase (Figura 28) também foi avaliada.

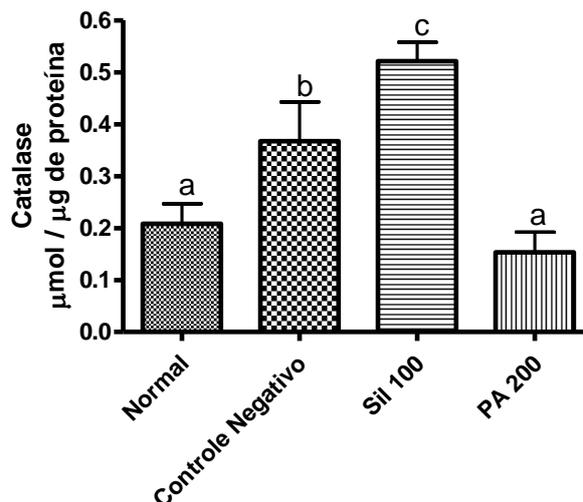
Figura 26: Níveis de malonaldeído (MDA) em animais com lesão hepática induzida por indução com etanol e tratados com PA.



Valores são expressos: média  $\pm$ ep, n= 6. Onde: Sil = silimarina 100 mg / kg; PA= Partição em acetato de etila 200 mg / kg; Valores seguidos por letras iguais não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

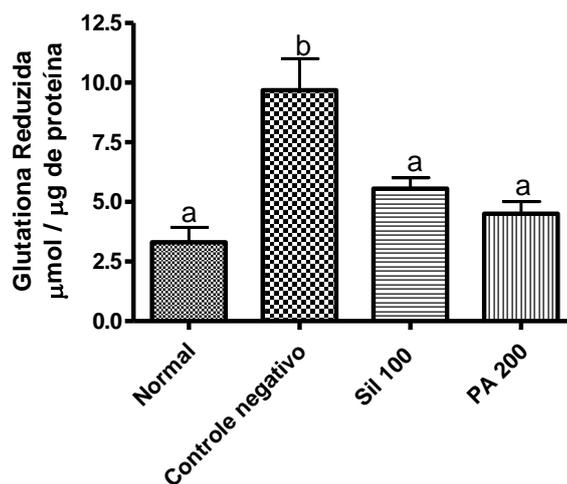
Figura 27: Atividade da enzima catalase em animais com lesão hepática induzida por etanol tratados com PA.



Valores são expressos: média  $\pm$ ep, n= 6. Onde: Sil = silimarina 100 mg / kg; PA = Partição em acetato de etila 200 mg / kg. Valores seguidos por letras iguais não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Figura 28: Atividade da enzima glutatona redutase em animais com lesão hepática causada por indução com etanol tratados com PA.



Valores são expressos média  $\pm$ ep, n= 6. Onde: Sil = silimarina 100 mg / kg; PA = Partição em acetato de etila 200 mg / kg. Valores seguidos por letras iguais não possuem diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Após os três dias de tratamento, os níveis de catalase e de glutatona redutase se mantiveram significativamente iguais aos níveis normais.

#### 5.1.4. Citotoxicidade da partição em acetato de etila (PA) *in vitro*

A citotoxicidade de PA *in vitro* foi avaliada utilizando como modelos diferentes linhagens tumorais e não tumorais. Assim, foi realizado o ensaio MTT para avaliar a citotoxicidade de PA na concentração de 50 µg / mL. PA foi considerado citotóxico para linhagens cujo percentual de viabilidade celular ficou abaixo de 50% (Tabela 18).

Tabela 18: Média do percentual de viabilidade celular para diferentes linhagens

Linhagens Tumorais	HepG2	HL-60	Jurkat	MDA-MDB 231	MCF-7	HCT - 116
	100	23,85	85,54	59,41	85,31	55,26
Linhagens não tumorais	Vero		Raw 264.7		3T3	
	85,31		69,70		100	

Resultados expressos como média percentual de viabilidade celular em dois experimentos independentes.

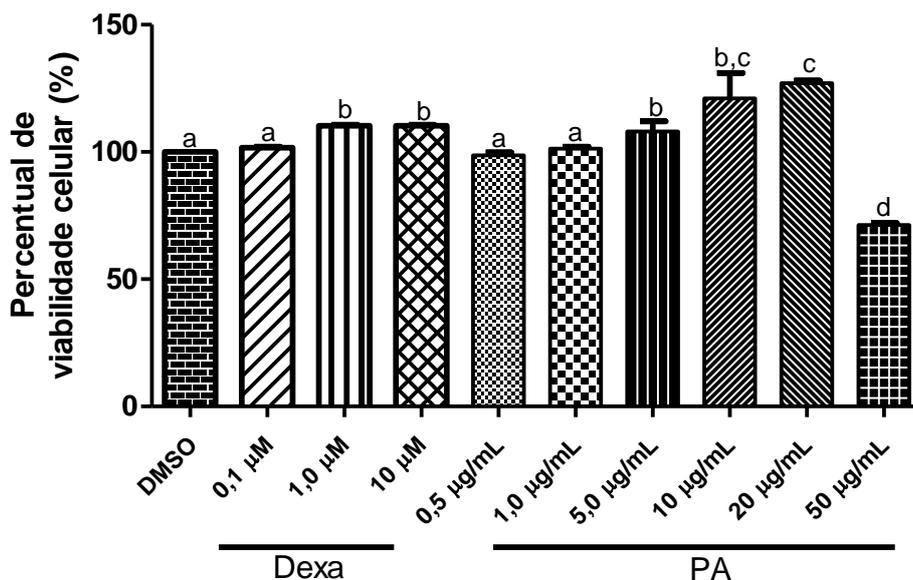
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Este ensaio permitiu verificar de forma preliminar que PA não apresentou significativa toxicidade para os diferentes tipos celulares testados, exceto para linhagem tumoral HL-60. Embora, HepG2 seja uma linhagem tumoral, o fato de PA não diminuir sua viabilidade celular é muito importante, uma vez que esta é frequentemente utilizada em modelos de hepatoproteção *in vitro* (RAJ et al, 2010).

#### 5.1.5. Atividade anti-inflamatória *in vitro*

A atividade anti-inflamatória *in vivo* de *V. condensata* já foi demonstrada e os resultados estão descritos em detalhes em Silva e colaboradores, 2011. Contudo, a atividade anti-inflamatória de PA ainda não foi descrita. Com o objetivo de verificar se existe relação da atividade anti-inflamatória com hepatoprotetora de PA, foi avaliada *in vitro* sua atividade em células RAW 264.7, bem como frente à produção de NO e citocinas IL-6 e TNF-α, envolvidas no processo inflamatório. A atividade anti-inflamatória foi avaliada *in vitro* com indução de inflamação nas células RAW 264.7 por LPS.

Figura 29: Efeito citotóxico de PA em linhagem de células Raw 264.7 em 48 h.



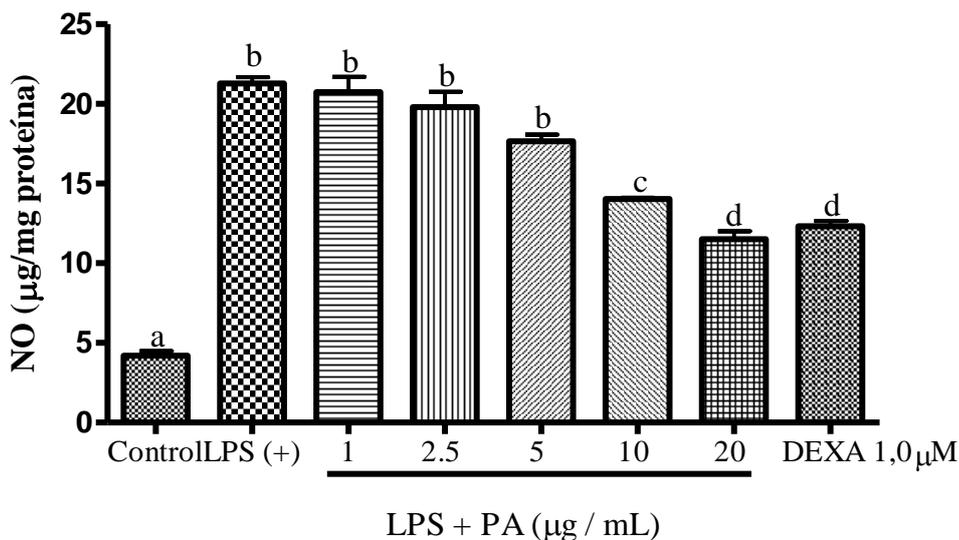
Cada valor foi expresso em média  $\pm$  erro padrão.  $1 \times 10^4$  células / poço em microplacas de 96 poços. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Onde PA: partição acetato de etila; DEXA: dexametasona; DMSO: dimetilsulfóxido. Teste realizado em hexaplicata.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Pela Figura 29, foi possível perceber que em concentrações crescentes de PA até 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$  não há citotoxicidade celular, e nas concentrações  $\leq 20 \mu\text{g} / \text{mL}$  os valores de viabilidade maiores de 100% sugeriram um provável estímulo à multiplicação celular. O controle positivo, dexametasona, não demonstrou citotoxicidade nas concentrações testadas. Assim, para o modelo de inflamação com LPS foram utilizadas concentrações de PA abaixo de 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Para a verificação da atividade anti-inflamatória *in vitro*, foram dosados os níveis de NO (óxido nítrico), IL-6 e TNF- $\alpha$  48 h após a estímulo com o LPS.

Não houve diminuição dos níveis de NO produzido pelas células em concentrações menores de 5  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de PA, contudo a partir da concentração de 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  os níveis de NO foram significativamente reduzidos. Importante destacar que, na concentração de 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , PA reduziu os níveis de NO a valores significativamente iguais aos atingidos pelas células tratadas com dexametasona, um anti-inflamatório esteroideal utilizado como referência (Figura 30).

Figura 30: Efeitos de PA sobre os níveis de NO em células RAW 264.7 estimuladas por LPS.



Cada valor foi expresso como média  $\pm$  erro padrão.  $8 \times 10^4$  células / poço em microplacas de 96 poços. Teste realizado em hexaplicata. Onde: Control: controle células não induzidas e não tratadas, LPS: controle células induzidas, PA: partição em acetato de etila, DEXA: dexametasona. Barras com letras iguais, valores não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

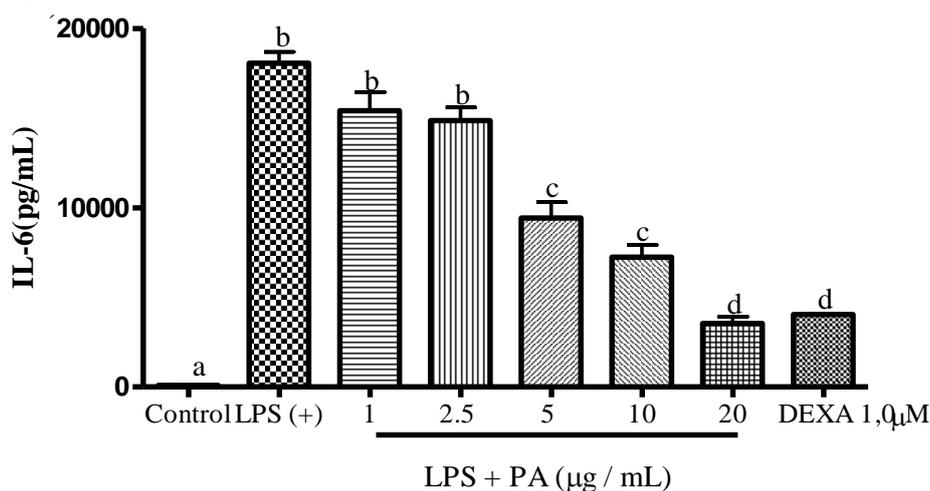
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Em situações que causam injúria celular, NO é produzido em grandes quantidades pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), importante enzima pró-inflamatória, que está relacionada com alguns eventos inflamatórios tais como a vasodilatação e a hipotensão (YANG et al., 2009). O NO é um radical livre de curta duração e um mensageiro intracelular produzido por diferentes células humanas e de outros mamíferos. Atua como mediador de inúmeras ações biológicas tais como a vasodilatação, neurotransmissão, inibição da aderência e agregação de plaquetas (MACMICKING et al, 1997; OH et al, 2008). O nível de NO produzido por iNOS pode refletir o grau de inflamação de determinado tecido e ainda, serve como um importante indicador na avaliação de processos inflamatórios. NO em grande quantidade inibe a respiração celular, danifica o DNA e diminui os níveis de antioxidantes intracelulares (CHEN et al., 2002). Os níveis excessivos de NO sintetizado por iNOS têm sido implicados como um dos fatores em lesão hepática, por isso, é essencial reduzir a indução de iNOS para a prevenção de lesões do fígado (MIKI et al., 2015). Sabe-se que a dexametasona é capaz de inibir a expressão do gene de iNOS (SUH et al, 1998).

O LPS, endotoxina, é um glicolípido da membrana externa de bactérias Gram-negativas como a *E. coli*. O LPS é reconhecido pelos receptores tipo TLR4,

presentes em células animais como os macrófagos, que ativam o sistema imune inato e estimula a secreção de citocinas entre elas o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) por estas células. O TNF- $\alpha$  é geralmente produzido com a interleucina-6 (IL-6) que exerce importante papel regulatório na inflamação aguda (local ou sistêmica). Amostras capazes de diminuir ou inibir a expressão desses dois fatores pró-inflamatórios são consideradas promissoras com atividade anti-inflamatória (IIMURO et al., 1997; SITTISART et al., 2016). PA também demonstrou a diminuição dos níveis de IL-6 (Figura 31).

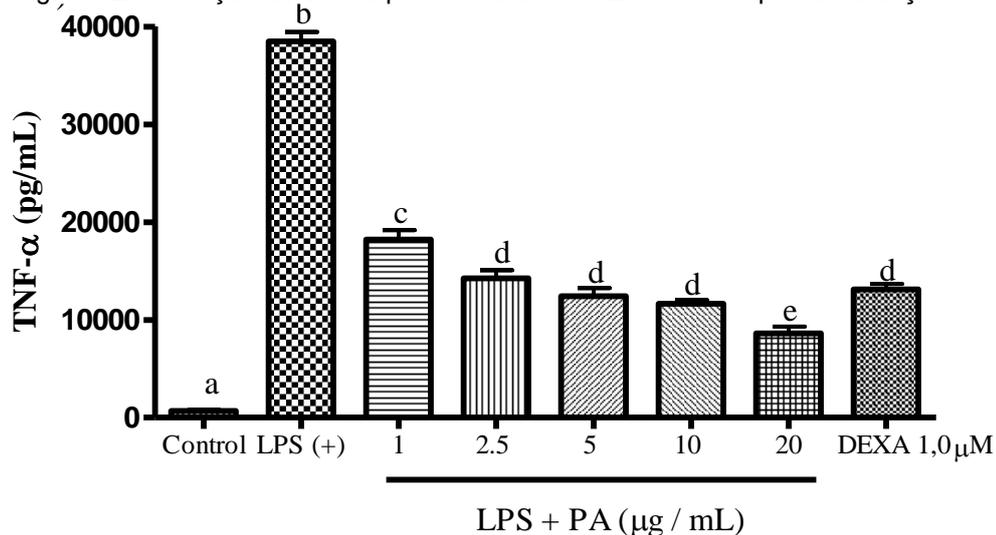
Figura 31: Produção de IL-6 pelas células Raw 264.7 em resposta ao estímulo com LPS.



Cada valor foi expresso como média.  $8 \times 10^4$  células / poço em microplacas de 96 poços. Onde: Control: controle células não induzidas e não tratadas, LPS: controle células induzidas, PA: partição em acetato de etila, DEXA: dexametasona. Teste realizado em hexaplicata. Barras com letras iguais, valores não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Os níveis de TNF- $\alpha$  também foram reduzidos por PA. A Figura 32 mostra que PA diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  tal como a dexametasona. Os níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  diminuiram à medida que a concentração de PA aumentou, sugerindo uma relação entre a dose e a diminuição da expressão dessas citocinas.

Figura 32: Produção de TNF- $\alpha$  pelas células Raw 264.7 em resposta a indução com LPS.

Cada valor foi expresso como média.  $8 \times 10^4$  células / poço em microplacas de 96 poços. Onde: Control: controle células não induzidas e não tratadas, LPS: controle células induzidas, PA: partição em acetato de etila, DEXA: dexametasona. Teste realizado em hexaplicata. Barras com letras iguais, valores não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Os macrófagos desempenham um papel importante na patogênese de doenças hepáticas, como a hepatite alcoólica por exemplo. Os resultados obtidos no presente estudo são relevantes, pois a ativação da expressão dos mediadores inflamatórios pelo LPS nas células RAW são correlacionáveis às injúrias causadas por toxinas no tecido hepático. Em outros estudos, foi demonstrado que a inibição da expressão de TNF- $\alpha$  atenua a lesão hepática alcoólica (IIMURO et al, 1997), e a importância de TNF- $\alpha$  foi confirmada pela ausência de lesão hepática alcoólica em camundongos knockout do receptor-1 de TNF (YIN et al, 1999).

Estes resultados são importantes para melhor compreender, não apenas da atividade anti-inflamatória de um modo geral, mas também a atividade protetora exercida por PA no tecido hepático.

#### 5.1.6. Atividade antibacteriana *in vitro*

Com o objetivo de responder à segunda hipótese deste estudo, avaliou-se a atividade antibacteriana *in vitro* de EE, PH, PD e PA frente a um painel de 16 estirpes bacterianas por meio da determinação da CIM e CBM e da classificação do efeito antibacteriano bactericida ou bacteriostático.

Todos os gêneros testados figuram na lista das 20 bactérias resistentes aos agentes antibacterianos, *Acinetobacter baumannii* resistente à carbapenêmicos, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes à carbapenêmicos e às cefalosporinas de 3ª geração, *Pseudomonas aeruginosa* resistente à carbapenêmicos e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e intermediário e resistente à vancomicina, e estão classificadas como risco crítico ou alto risco. Esta lista foi publicada pela OMS como prioridade para a pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, em virtude do cenário alarmante mundial do evento de resistência bacteriana (WHO, 2017).

Quanto à atividade antibacteriana in vitro, os valores de CIM de EE, PH, PD e PA foram determinados pelo método de microdiluição em caldo, enquanto que os de CBM foram estabelecidos sub-cultivando todas as concentrações que não apresentaram crescimento visível ( $\geq$  CIM). PA foi ativa para *S. aureus* (ATCC® 6538), *S. aureus* (ATCC® 25923), *S. aureus* (ATCC® 29213), *S. aureus* (ATCC® 33591), *S. aureus* (ATCC® 33592), MRSA 1485279, MRSA 1605677, MRSA 1664534, MRSA 1688441 e MRSA 1830466, com valores de CIM de 625  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para as cepas ATCC® e de 1250, 1250,  $> 5000$ , 2500 e 2500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para as MRSA, nessa ordem. PD inibiu *S. aureus* (ATCC® 29213), com CIM de 625  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . EE, PH, PD e PA foram inativas frente às demais cepas nas concentrações testadas (CIM  $> 2500 \mu\text{g} / \text{mL}$ ). As CBMs não puderam ser estabelecidas em virtude de estarem acima do gradiente de concentração empregado ( $> 5000 \mu\text{g} / \text{mL}$ ), sendo o efeito definido como bacteriostático para as CIMs determinadas. De acordo com a classificação de Kuete (2010), a atividade antimicrobiana de extratos vegetais ou substâncias com valor de CIM  $< 100 \mu\text{g} / \text{mL}$  é considerada significativa,  $100 < \text{CIM} \leq 625 \mu\text{g} / \text{mL}$  equivale à atividade moderada e CIM  $> 625 \mu\text{g} / \text{mL}$  implica em efeito fraco. Pela análise dos resultados obtidos no presente estudo, PA demonstrou atividade moderada para as cepas de referência de *S. aureus* investigadas e fraca ação sobre MRSA. PD também revelou efeito moderado sobre as cepas ATCC® desta espécie.

Ainda que fraca, a atividade observada para as cepas de rotina de MRSA testadas foram relevantes, uma vez que as principais opções terapêuticas mostraram-se ineficazes (cepas resistentes) para a condução dos quadros dos pacientes acometidos com infecções da corrente sanguínea, inclusive glicopeptídeos

(vancomicina) (Tabela 19), e esses achados prospectam novas abordagens no tratamento desses casos.

Tabela 19 - Perfil de susceptibilidade às principais classes de antimicrobianos de linhagens de rotina clínica de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) realizado pelo sistema automatizado VITEK®2

Nº Cepa	Classe de Antimicrobiano	Perfil Susceptibilidade
MRSA 1664534	Benzilpenicilina	R
	Eritromicina	R
	Vancomicina	R
MRSA 1485279	Benzilpenicilina	R
	Clindamicina	R
	Eritromicina	R
	Oxacilina	R
	Vancomicina	R
MRSA 1605877	Benzilpenicilina	R
	Clindamicina	R
	Oxacilina	R
	Vancomicina	R
MRSA 1830466	Benzilpenicilina	R
	Oxacilina	R
	Vancomicina	R
MRSA 1688441	Benzilpenicilina	R
	Vancomicina	R

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

No que diz respeito aos dados microbiológicos, alguns resultados conflitantes podem ser encontrados na literatura revisada e são atribuídos aos diferentes procedimentos de extração e aos métodos de atividade antimicrobiana *in vitro* realizados para avaliar esta relevante propriedade biológica (GITIRANA, 2017; submitted article). Assim, excluindo a discussão sobre as interferências destas questões e focando apenas nas cepas investigadas e na atividade antibacteriana *in vitro*, Brasileiro e colaboradores (2006), ao estudarem o extrato etanólico obtido das partes aéreas de *V. condensata* frente a *S. aureus* (ATCC® 25985) e *E. coli* (ATCC® 25922), reportaram que esse extrato foi ativo somente contra a cepa de *S. aureus*, com CIM de 10 mg / mL. Fabri e colaboradores (2011), por sua vez, investigaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico obtido de folhas desta planta medicinal frente a *S. aureus* (ATCC® 6538), *P. aeruginosa* (ATCC® 15442), *Salmonella enterica* sorovariedade *Typhimurium* (ATCC® 13311), *Shigella sonnei* (ATCC® 11060), *K. pneumoniae* (ATCC® 13866), *E. coli* (ATCC® 10536) e *B. cereus* (ATCC® 11778) e descreveram que esse extrato inibiu o crescimento das cepas de *B. cereus*, *S. Typhimurium*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, com valores de CIM de 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 5 mg / mL, respectivamente. Denota-se

que existe um consenso entre os autores e o presente estudo sobre o efeito de *V. condensata* sobre cepas de *S. aureus*, o que fortalece a hipótese do potencial antibiótico desta planta medicinal sobre esse micro-organismo.

Com base nos resultados da atividade antibacteriana *in vitro* obtidos e em virtude dos dados das demais atividades apresentadas no presente estudo, PA foi selecionada para dar prosseguimento aos ensaios microbiológicos. Quanto à PD, essa partição foi devidamente armazenada a - 20°C, em *freezer*, para investigações posteriores. Vale ressaltar que, conforme descrito no item 5.1.1, PA revelou valores compatíveis com um perfil de baixa citotoxicidade, o que nos leva a crer que os resultados da atividade antibacteriana *in vitro* refletem um efeito antibiótico verdadeiro decorrente da ação dessa partição. Então, considerando a relevância do conjunto destas informações, testes adicionais foram realizados para o maior entendimento da propriedade antibacteriana de *V. condensata*, visto que a atividade moderada para *S. aureus* apresentada por PA e PD sugere que ambas possuem potencial como adjuvantes em produtos farmacêuticos voltados para tratamento de infecções causadas por esse micro-organismo ou, ainda, como insumo na indústria de alimentos para evitar a contaminação por esse patógeno.

Com o objetivo de se investigar se PA teria uma ação sinérgica com ampicilina ou cloranfenicol sobre estirpes de *S. aureus*, realizou-se o método de combinação ou *checkerboard*, onde diferentes concentrações a partir da CIM de PA e desses agentes antimicrobianos foram testadas de modo a se demonstrar um possível efeito combinatório (Tabela 20). A CIM do cloranfenicol para as cepas de *S. aureus* testadas neste método e nos próximos foi determinada e correspondem à 75 µg / mL para *S. aureus* (ATCC® 29213) e *S. aureus* (ATCC® 25923), e 7,5 µg / mL para MRSA 1485279. Da mesma forma, em relação à ampicilina, a CIM determinada foi de 4 µg / mL para *S. aureus* (ATCC® 29213) e *S. aureus* (ATCC® 25923) e 1000 µg / mL para MRSA 1485279. Assim para este ensaio estabeleceu-se que o cloranfenicol seria o controle para todas as cepas testadas, enquanto a ampicilina seria aplicada quando se tratasse da MRSA.

Tabela 20 - Efeito combinatório da partição em acetato de etila obtida de folhas de *Vernonia condensata* (PA) com ampicilina (AMP) ou cloranfenicol (CHL), Índice de Redução da Dose (IRD), Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e Índice de Concentração Inibitória Fracionada (iCIF)

Cepa Bacteriana	Partição / Agente Antibacteriano	CIM		IRD	CIF	ICIF**	Efeito Combinatório
		Sozinho	Combinado				
<i>S. aureus</i> 29213	PA	625	75	8	0,12	0,62	Aditivismo
	Cloranfenicol	75	37,5	2	0,50		
<i>S. aureus</i> 25923	PA	625	156	4	0,25	0,75	Aditivismo
	Cloranfenicol	75	37,5	2	0,50		
MRSA 1485279	PA	1250	1250	1	1	2	Indiferença
	Cloranfenicol	7,5	7,5	1	1		
MRSA 1485279	PA	1250	78	16	0,06	0,31	Sinergismo
	Ampicilina	1000	250	4	0,25		

\*Valores em µg / mL; \*\*Valores < 0,5 implicam em efeito sinérgico de acordo com a classificação de FADLI et al. (2012).

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

Conforme mostra a Tabela 20, quando combinados PA e cloranfenicol, observou-se efeito aditivo para *S. aureus* (ATCC® 29213) e *S. aureus* (ATCC® 25923), com redução da CIM desse agente antimicrobiano, e indiferente para MRSA 1485279. Por outro lado, a combinação de PA e ampicilina revelou um efeito sinérgico frente à MRSA 1485279, sendo esta ação combinatória capaz de reduzir a CIM desse agente antimicrobiano em 4x o seu valor testado separadamente (1000 µg / mL). Essa resposta a este β-lactâmico com redução na CIM merece destaque, visto que a cepa de rotina MRSA 1485279 mostrou-se resistente à classe das benzilpenicilinas, conforme apresentou a Tabela 19.

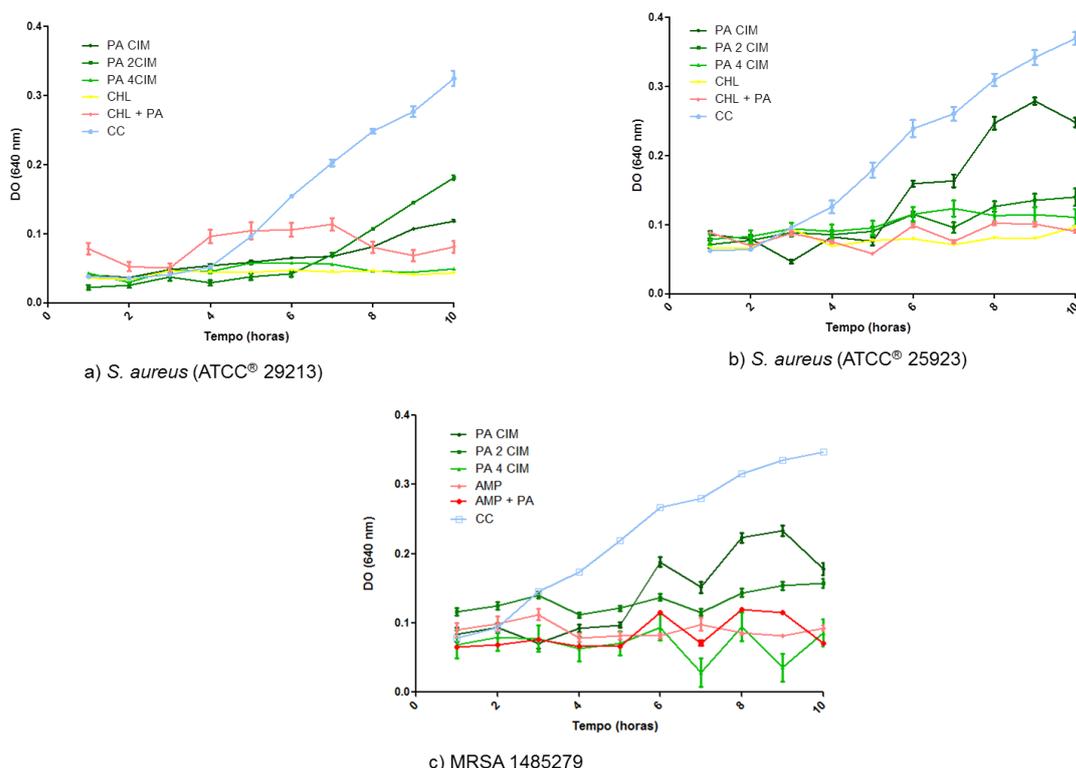
Em virtude do ineditismo deste estudo com esta espécie vegetal, não dispomos de outros relatos na literatura para que possamos discutir nossos resultados. No entanto, na tentativa de melhor compreendermos os nossos achados, foi realizada busca científica nas principais plataformas que pudessem contribuir para a explanação deste tema.

Neste contexto, Eumkeb, Siritwong e Thumanu (2012) avaliaram a atividade antibacteriana de luteolina frente às cepas de *E. coli* resistentes ao β-lactâmico amoxicilina e a ação sinérgica dela combinada com amoxicilina. Estes autores concluíram que esta flavona tem potencial de reverter a resistência bacteriana a amoxicilina nestas cepas. Cha, Kim e Cha (2016) analisaram a atividade antibacteriana sinérgica de outra flavona, a apigenina, sozinha e em combinação com ampicilina, gentamicina, eritromicina ou vancomicina contra bactérias orais. De acordo com estes autores, os resultados obtidos pelo método de *checkerboard* revelaram atividade sinérgica na combinação de apigenina com os antibióticos testados. A apigenina também foi objeto de estudo envolvendo o sinergismo entre ela e ampicilina contra cepas MRSA (AKILANDESWARI, RUCKMANI, 2016). Finalmente, Sanhueza e colaboradores (2017), ao investigarem as interações sinérgicas entre substâncias fenólicas identificadas em extrato em acetato de etila obtido do bagaço de uva e agentes antimicrobianos de diferentes classes contra cinco (5) cepas de *S. aureus*, incluindo duas (2) de MRSA, e quatro (4) de *E. coli*, reportaram a diminuição significativa da CIM de todos os antibióticos testados quando combinados com esse extrato, independente se a bactéria era ou não resistente a eles. De acordo com estes autores, as substâncias fenólicas mais abundantes identificadas neste extrato foram quercetina (26,3%), ácido gálico (24,4%), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (16,7%) e luteolina (11,4%). Porém, eles

concluíram que a abundância relativa destas substâncias não teria correlação com o efeito sinérgico obtido, sugerindo que o mecanismo envolvido estaria ligado a uma ação multi-objetiva. Tanto luteolina quanto apigenina foram detectadas em PA, o que será apresentado e discutido oportunamente.

O efeito bactericida de PA (1x CIM, 2x CIM e 4x CIM), cloranfenicol (1x CIM) e PA combinada com cloranfenicol sobre *S. aureus* (ATCC® 25923) e *S. aureus* (ATCC® 29213) também foi avaliado pelo método de *time kill*. Quanto à ampicilina, empregou-se a CIM desse antibiótico e, quando combinado à PA, foi testada somente MRSA 1485279 (Figura 33).

Figura 33 - Curvas de crescimento de *S. aureus* na presença de partição de acetato de etila obtida de folhas de *Vernonia condensata* (PA) CIM, 2x CIM, 4x CIM, cloranfenicol (CHL), ampicilina (AMP) e PA combinada com CHL ou AMP.



Os dados representam as médias  $\pm$  e.p.; experimento realizado em hexaplicata. CC: controle de crescimento bacteriano.

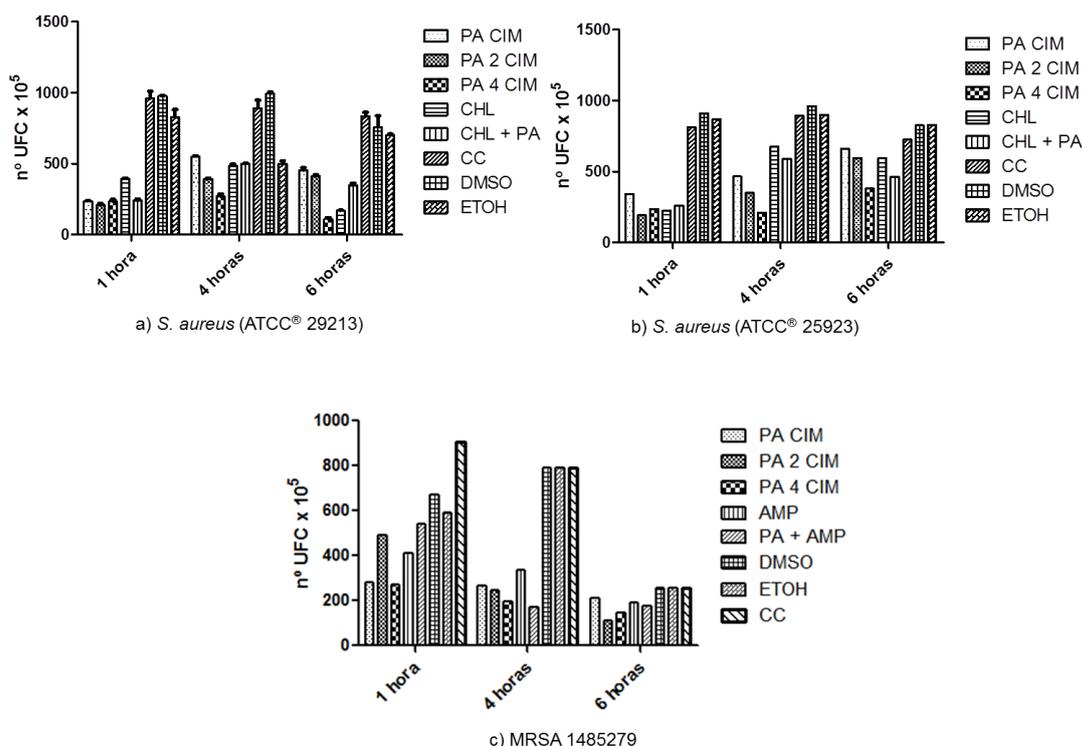
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017

As curvas de crescimento para as três (3) estirpes testadas mostram que PA reduziu a velocidade de multiplicação nessas três situações de uma forma dose dependente (Figura 33a, 33b e 33c). Nas combinações de PA e antibióticos, observou-se, também, redução. Esta redução da velocidade de multiplicação pode ser observada ao se comparar a inclinação da curva de controle de crescimento das

bactérias não tratadas (CC, cor azul) com aquelas tratadas com PA, antibióticos e PA combinada com antibióticos.

Para corroborar essa observação, foi analisada a viabilidade celular por meio da contagem de células viáveis nos tempos 1, 4 e 6 horas de exposição a PA (Figura 34). Esses tempos foram determinados após a análise da curva de crescimento. Kim e colaboradores (2015) propuseram a observação da viabilidade das células bacterianas após 1 hora de exposição ao composto em teste. Contudo, neste tempo as células bacterianas ainda estão em fase de adaptação ao ambiente. Assim, para se ter uma avaliação mais precisa, a viabilidade foi verificada também no tempo de 4 horas, no qual a detecção da inibição de crescimento foi graficamente melhor visualizada para PA combinada ao antibiótico controle e, ainda, é equivalente ao ponto de mudança da fase Lag (adaptação) para a fase Log (crescimento). No tempo 6 horas os dados obtidos mostraram a fase de crescimento exponencial dos micro-organismos.

Figura 34: Viabilidade celular *S. aureus* nos tempos de exposição 1, 4 e 6 horas.



Onde: PA: partição acetato de etila, CHL: cloranfenicol; AMP: ampicilina; DMSO: dimetilsulfóxido; ETOH: etanol; CC: controle de crescimento. Valores expressos como média ± erro padrão.  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2017.

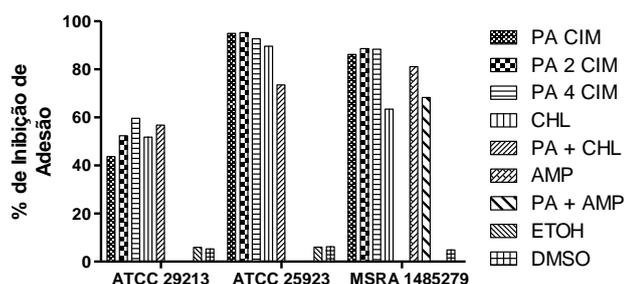
É possível verificar pela figura acima que, no tempo de 4 horas, houve diminuição da viabilidade celular para as células tratadas. Já no tempo 6 horas houve diminuição da viabilidade da MRSA 1485279.

Assim estes resultados permitem inferir que o mecanismo de ação de PA a síntese de material genético, uma vez que diminui a velocidade de multiplicação bacteriana.

Essas observações podem ser justificadas em parte pela presença de flavonoides (CUSHNIE, LAMB, 2005) como, por exemplo, aqueles que foram detectados e quantificados, luteolina e apigenina, cuja atividade anti *S. aureus* já foi descrita como relacionada a aumento de permeabilidade de membrana celular (DONG et al., 2012, CHENG et al., 2014, JOUNG et al., 2016) e ainda um potencial sinergismo destes com antibióticos da prática clínica (EUMKEB et al, 2012, LIU et al, 2013, USMAN et al, 2016)

Assim sendo, para contemplar ao menos um aspecto de virulência de *S. aureus*, considerou-se importante verificar se há um potencial de inibição de adesão do biofilme deste em superfície plásticas como o poliestireno da microplaca, simulando prováveis ambientes de adesão tais como sondas e cateteres. A figura 35 mostra os percentuais de adesão celular para os micro-organismos testados sendo possível verificar um alto percentual de inibição de adesão para ATCC 25923, caracterizada por apresentar este determinante de virulência, e para MRSA 1485279, cujo isolamento proveio de sangue de cateter contaminado por biofilme de *S. aureus*.

Figura 35: Efeito inibitório de PA sobre a adesão de *S. aureus* em superfície de poliestireno.



PA: partição acetato de etila, CHL: cloranfenicol, AMP: ampicilina, ETOH: etanol; DMSO: dimetilsulfóxido.

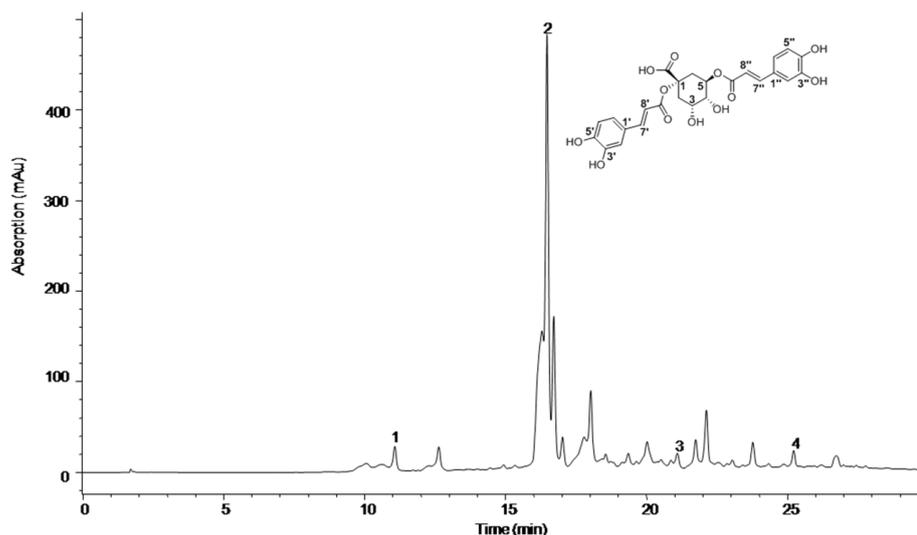
Com base nos resultados apresentados foi possível verificar o potencial de PA como agente antiestafilocócico capaz de diminuir a velocidade de multiplicação desse micro-organismo, combinar-se sinergisticamente com ampicilina frente à cepa MRSA 1485279 e ainda inibir a adesão em superfícies sólidas.

## 5.2. PERFIL FITOQUÍMICO

Assim, folhas de *V. condensata* Baker constituem importante recurso etnofarmacológico para a população brasileira em geral. A presença de variados compostos do metabolismo especial justificam as múltiplas atividades biológicas já descritas para essa espécie vegetal, e estão de acordo com os estudos anteriormente realizados por outros grupos (VALVERDE et al., 2001; AFFONSO, 2011; SILVA et al., 2013).

Como no presente estudo PA deve destaque em todos os quesitos avaliados, a composição fitoquímica deste foi avaliada. O perfil cromatográfico de PA obtido por CLAE está apresentado na Figura 36. Em co-injeção com padrões externos foi possível identificar a presença do composto fenólico ácido clorogênico e dos flavonoides Apigenina e Luteolina. A presença destes flavonoides foram descritas anteriormente (SILVA et al, 2012). O fracionamento de PA em coluna aberta preenchida por Sephadex LH 20 forneceu 89 frações que foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico em camada delgada após observação sob luz UV 365nm e revelação com vanilina/ácido sulfúrico, cloreto férrico, e NP/PEG. Com o agrupamento, foram obtidas cinco frações: A (2110 mg), B (12 mg), C (44 mg), D (970 mg), E (41 mg) que foram então analisadas por CLAE.

Figura 36: Cromatograma da partição acetato de etila e estrutura química da substância 1.



A análise foi realizada nas seguintes condições: em fase reversa em coluna SB C18 (25cmx 4,6x 5µm); gradiente linear de solventes A (MEOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH= 3 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (MEOH); 0 a 100% de B em 30 min; fluxo de 0,6 mL/ min; concentração da amostra 1 mg / mL; volume de injeção 20 µL, temperatura 25°C, detecção UV 330nm. (1) Ácido Clorogênico (2) Ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico, (3) luteolina e (4) apigenina.

O composto correspondente ao pico 2 foi isolado da fração E e identificado como ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico pela análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional de alta resolução, (Anexo 1) e pela comparação dos espectros encontrados (Tabela 21) com dados publicados (MERFORT, 1992). A massa molecular (C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>) foi determinada pelo ESI-MS espectro negativo que demonstrou o pico molecular desprotonado, [M-H], a m/z 515. O padrão de fragmentação ESI-MS/MS foi idêntico ao observado por Clifford (2005) para os isômeros do ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico. Este composto já havia sido previamente detectado em *V. condensata* (ARANTES et al., 2016).

Tabela 21 Deslocamentos Químicos do ácido 1,5-dicafeoilquínico isolado da partição em acetato de etila das folhas de *Vernonia condensata*

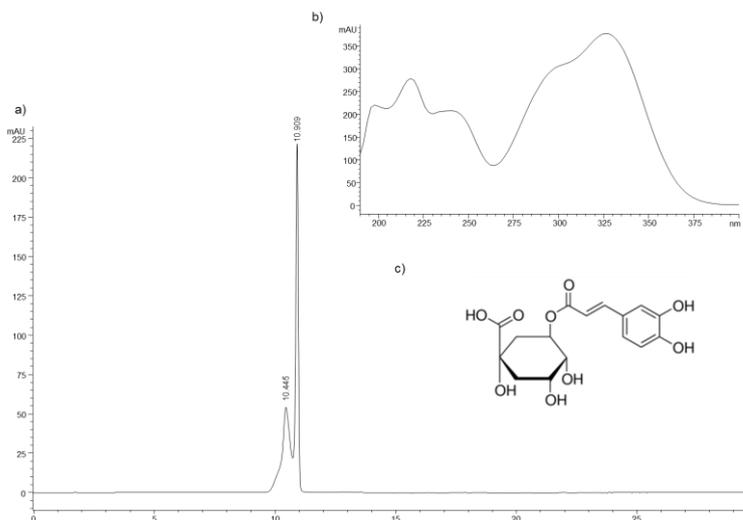
<sup>13</sup> C	DEPT	<sup>1</sup> H	COSY( <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H)	HMBC( <sup>13</sup> C, <sup>1</sup> H)
<b>34,22 (C-2)</b>	CH <sub>2</sub>	2,58 (H-2eq, dd; $J(2)_{ax-eq} = 14,5\text{Hz}$ , $J_{ax-eq} = 3,6\text{Hz}$ ) 2,09 (H-2ax, dd; $J_H = 8,5\text{ Hz}$ ; $J(2)_{ax-eq} = 14,5\text{ Hz}$ )	(H-2eq-H-2ax)	2,09 (H-2ax); 2,58 (H-2eq); ,32 (H-5)
<b>35,45 (C-6)</b>	CH <sub>2</sub>	2,46 (2H, H-6ax e H-6eq, m)	(H-6-H-5)	2,46 (H-6) ; 3,80 (H-4)
<b>67,96 (C-5)</b>	CH	4,32 (H-5, dd, $J_{4-5} = 8,0\text{ Hz}$ ; $J_{5-6} = 3,2\text{Hz}$ )	(H-5-H-3) (H-5-H-6)	2,46 (H-6); 5,41 (H-3)
<b>70,15 (C-3)</b>	CH	5,41 (H-3; td, $J_{3-4} = 3,6\text{ Hz}$ ; $J_{3-2eq} = 3,6\text{ Hz}$ , $J_{3-2ax} = 8,5\text{ Hz}$ )	H-3-H-2ax) (H-3-H-2eq) (H-3-H-4)	2,09 (H-2ax); 2,58 (H-2eq); 3,80 (H-4); 4,32(H-5)
<b>71,35 (C-4)</b>	CH	3,80 (H-4; dd; $J_{3/4} = 3,6\text{ Hz}$ e $J_{4/5} = 8,0\text{ Hz}$ )	(H-4-H-3) e (H-4-H-5)	5,41 (H-3); 2,46 (H-6)
<b>79,48 (C-1)</b>	C	-	-	5,41 (H-3'); 4,32 (H-5'); 2,58(H-2'); 2,46 (H-6')
<b>113,70 (C-8'')</b>	CH	6,28 (H-8''); d, $J = 15,1\text{ Hz}$ )	(H-8'' -H-7'')	
<b>113,76 (C-8')</b>	CH	6,30 (H-8'); d, $J = 15,1\text{ Hz}$ )	(H-8' -H-7')	
<b>113,83 (C-2'')</b>	CH	7,08 (H-2''); d, $J = 2\text{Hz}$ )	(H-2''-H-6'')	
<b>113,84 (C-2')</b>	CH	7,08 (H-2'); d, $J = 2\text{Hz}$ )	(H-2'-H-6')	
<b>115,08 (C-5'')</b>	CH	6,80 (H-5''); d, $J = 8,0\text{ Hz}$ )	(H-5''-H-6'')	
<b>115,11 (C-5')</b>	CH	6,80 (H-5'); d, $J = 8,0\text{ Hz}$ )	(H-5'-H-6')	
<b>121,63 (C-6'')</b>	CH	6,98 (H-6''); dd, $J = 8,0\text{ Hz}$ e $=J 2\text{Hz}$ )	(H-6'' -H-5'') e (H6'' -H-2'')	7,60 (H-7''); 6,98 (H-6''); 6,80 (H-5'')
<b>121,70 (C-6')</b>	CH	6,98 (H-6'); dd, $J = 8,0\text{ Hz}$ e $J = 2\text{Hz}$ )	(H-6' -H-5') e (H6' -H-2')	7,60 (H-7'); 6,98 (H-6'); 6,80 (H-5')

<b>126,40 (C-1' e C-1'')</b>	C	-	-	7,60 (H-7'); 6,30(H-8') e 6,80 (H-5')
<b>145,42 (C-3' e C-3'')</b>	C	-	-	7,08 (H-2' e H-2''); 6,80 (H-5' e H-5''); 6,98 (H-6' e H-6'')
<b>145,92 (C-7'')</b>	CH	7,60 (H-7'; d, <i>J</i> 15,1 Hz)	(H-7'' –H-8'')	
<b>146,13 (C-7')</b>	CH	7,60 (H-7'; d, <i>J</i> 15,1 Hz)	(H-7' –H-8')	
<b>148,23 (C-4'')</b>	C	-	-	7,08 (H-2''); 6,80 (H-5''); 6,98 (H-6'')
<b>148,26 (C-4')</b>	C	-	-	7,08 (H-2'); 6,80 (H-5'); 6,98 (H-6')
<b>166,61 (C-9')</b>	C	-	-	7,60 (H-7'); 6,28(H-8')
<b>167,23 (C9'')</b>	C	-	-	7,60 (H7'') e 6,30 (H-8'') e 5,41(H-3)
<b>173,37 (COOH em C-1)</b>	C	-	-	

As substâncias: ácido clorogênico (1), apigenina (3) e luteolina (4) foram identificadas e quantificadas por meio de padrões externos (Figura 38).

As Figuras 37, 38 e 39 apresentam as estruturas químicas e espectro UV a 330 nm dos padrões externos.

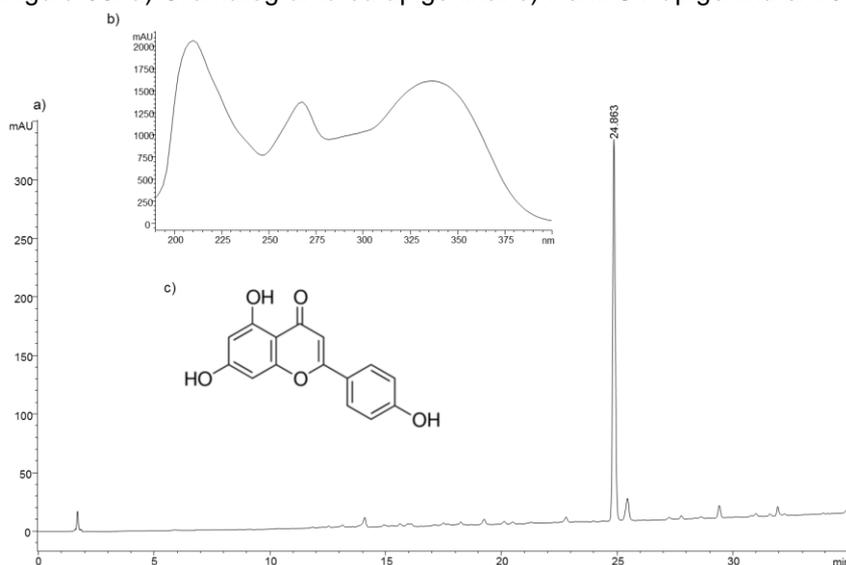
Figura 37: a) Cromatograma do ácido clorogênico. b) Perfil UV ácido clorogênico em 330 nm. c) Estrutura química.



A análise foi realizada nas seguintes condições: coluna SB C18 (25cmx 4,6x 5µm); gradiente linear de solventes A (MEOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH= 3 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (MEOH); 0 a 100% de B em 30 min; fluxo de 0,6 mL/ min; concentração da amostra 1 mg / mL; volume de injeção 20 µL, temperatura 25°C, detecção UV 330nm.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

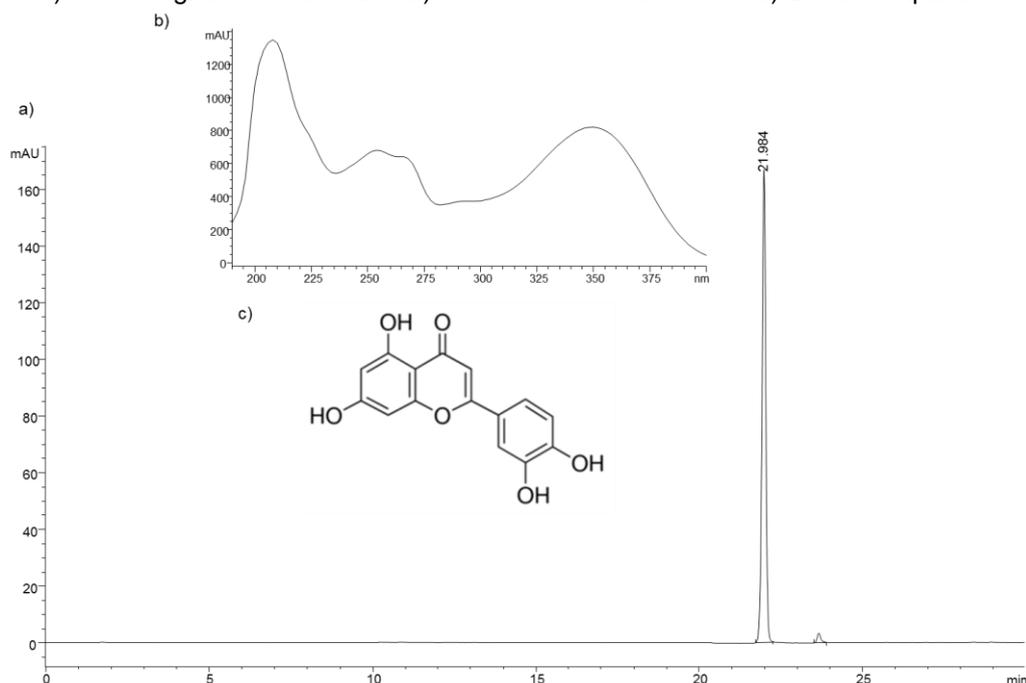
Figura 38: a) Cromatograma da apigenina. b) Perfil UV apigenina em 330 nm. c) Estrutura química.



A análise foi realizada nas seguintes condições: coluna SB C18 (25cmx 4,6x 5µm); gradiente linear de solventes A (MEOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH= 3 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (MEOH); 0 a 100% de B em 35 min; fluxo de 0,6 mL/ min; concentração da amostra 1mg / mL; volume de injeção 20 µL, temperatura 25°C, detecção UV 330nm.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Figura 39: a) Cromatograma da luteolina. b) Perfil UV luteolina 330nm. c) Estrutura química.



A análise foi realizada nas seguintes condições: coluna SB C18 (25cmx 4,6x 5 $\mu$ m); gradiente linear de solventes A (MEOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH= 3 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (MEOH); 0 a 100% de B em 35 min; fluxo de 0,6 mL/ min; concentração da amostra 1mg / mL; volume de injeção 20  $\mu$ L, temperatura 25°C, detecção UV 330nm.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Essas substâncias já foram anteriormente detectadas nesta espécie contudo não foram quantificadas (OLA, et al., 2009, SILVA et al 2012). A curva de calibração e teores desses marcadores detectados em PA estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22: Curvas de calibração e concentração de ácido clorogênico, apigenina, luteolina e ácido 1,5-O-dicafeoilquínico.

Marcadores Químicos	Tempo de Retenção	Curva de calibração	Concentração em PA ( $\mu$ g / mg)
Ácido Clorogênico	10'909"	$y = 7998,6x - 31,639$ $r^2 = 0,9982$	$9,23 \pm 0,08$
Apigenina	24'863"	$y = 2918,3x + 47,453$ $r^2 = 0,9936$	$25,08 \pm 0,005$
Luteolina	21'984"	$y = 20233x + 419,43$ $r^2 = 0,9975$	$1,87 \pm 0,08$
Ácido 1,5-O-Dicafeoilquínico	16'315"	$y = 12012x + 688,60$ $r^2 = 0,9986$	$292,00 \pm 0,06$

Valores expressos em média  $\pm$  erro padrão. Onde PA: Partição em acetato de etila.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR, 2016.

Essas substâncias foram utilizadas como marcadores químicos para caracterização e padronização de PA. O ácido clorogênico e os flavonoides, luteolina e apigenina, são comumente encontrados em várias espécies de plantas e possuem atividades biológicas relacionadas aos resultados relatados neste estudo. De acordo com a literatura, o ácido clorogênico é dotado de atividade antioxidante (JOHNSTON et al.; 2003, SHIMODA et al., 2006; SATO et al., 2011). Além disso, este composto pode inibir a absorção de lipídeos, aumentar o seu metabolismo e reduzir os níveis séricos de colesterol (SHIMODA et al., 2006; KHAN et al., 2016). A apigenina e a luteolina são também agentes antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos e hepatoprotetores (LEOPOLDINI et al., 2004, RATHEE et al., 2009, SIMEONOVA et al., 2014, RAJASEKARAN et al., 2014 MORIMOTO et al., 2015). E ainda, é válido ressaltar uma vez mais, que outros autores descreveram a atividade antioxidante dos ácidos dicafeoilquínicos (ZHAO et al., 2014; SALEM et al., 2015). Assim, a presença destes compostos em PA pode contribuir para as propriedades das folhas de *V. condensata* demonstradas neste estudo.

Em PA foi isolado e identificado por o ácido 1,5- O – dicafeoilquínico, cuja atividade antioxidante já havia sido relacionada a extratos vegetais por outros grupos (CHAKRABORTY, MITRA, 2008, KIM et al., 2010; GASIC et al., 2014).

O extrato aquoso da cabeça de alcachofra (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayeke) cujas atividades hepatoprotetora, emagrecedora e antioxidante são bastante difundidas é comercializado sob diversas formas farmacêuticas (LATTANZIO et al., 2009). Essas atividades são atribuídas à presença dos ácidos cafeicos, entre eles o ácido 1,5- O – dicafeoilquínico, cuja concentração determinada por D'Antuono et al.(2015) em CLAE-DAD ficou em torno de 208,1 mg/ 100g de extrato seco. Ajustando as unidades, o presente estudo detectou em PA uma concentração de aproximadamente 29,2 g/ 100 g Mesmo considerando as diferenças nas metodologias empregadas nos dois estudos, ainda assim podemos inferir a maior concentração do ácido 1,5- O – dicafeoilquínico em PA. Cao et al. (2010), mostraram a capacidade deste composto em mediar a síntese de glutathiona reduzida em modelos celulares. Assim, tais achados nos levam a inferir, também, que a presença de alto teor do ácido 1,5- O – dicafeoilquínico em PA relaciona-se diretamente com a atividade antioxidante observada no soro de animais pré-tratados. A presença de luteolina, apigenina e ácido clorogênico, substâncias reconhecidamente antioxidantes (ROMANOVA et al., 2001; SATO et al., 2011;

WÖLFLE et al., 2013) e identificadas em PA também devem estar contribuindo para os efeitos observados.

## 6 CONCLUSÕES

---

A partição acetato de etila apresentou atividade hepatoprotetora para o ensaio com paracetamol em dose aguda diminuindo significativamente os níveis das transaminases bem como inibiu alterações nos parâmetros lipídicos comuns em danos hepáticos. A atividade antioxidante também foi notadamente promissora ao inibir a formação do MDA e manter os níveis de atividade das enzimas catalase e glutathione redutase próximos aos níveis do grupo normal não tratado.

A indução com doses repetidas de paracetamol não aumentou significativamente a transaminase hepática específica, porém os grupos tratados com PA mantiveram todos os parâmetros alterados pelo paracetamol significativamente próximos aos níveis do grupo normal o que permitiu verificar a atividade hepatoprotetora.

A indução aguda com etanol causou alterações nos parâmetros analisados e verificou-se que a administração simultânea de PA é capaz de diminuir o dano hepatocelular.

As atividades, anti-inflamatória e antioxidante, observadas podem estar relacionadas com a atividade hepatoprotetora observada.

A atividade contra *S. aureus* observada bem como uma potencial aplicação de PA como inibidor da adesão deste em superfícies, embora mais estudos sejam necessários.

Os compostos que foram detectados e quantificados (ácido clorogênico, apigenina, luteolina) e isolado (ácido 1,5-O- dicafeoilquínico) podem justificar em parte as atividades observadas: hepatoprotetora, antioxidante, anti-inflamatória e antiestafilocócica.

## REFERÊNCIAS

---

ABRAHAM, K. P., SREENIVAS, J. A. G. A. R. L. A. P. U. D. I., VENKATESWARULU, T. C., INDIRA, M. I. K. K. I. L. I., BABU, D. J., DIWAKAR, T. E. L. L. A., & PRABHAKAR, K. V. Investigation of the potential antibiofilm activities of plant extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, n. 4, p. 282-285, 2012.

ADEWUSI, E. A.; AFOLAYAN, A. J. A review of natural products with hepatoprotective activity. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4, n. 13, p.1318-1334, 2010.

AFFONSO, S. Análise exploratória e avaliação da atividade analgésica em camundongos de extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker. 2001. 145f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

AKILANDESWARI, K., RUCKMANI. Synergistic antibacterial effect of apigenin with  $\beta$ -lactam antibiotics and modulation of bacterial resistance by a possible membrane effect against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Biology**. v. 6, n. 14, p. 74-82. 2016.

ALBUQUERQUE, U.P., MEDEIROS, P. M., ALMEIDA, A.L.S., MONTEIRO, J. M., LINS NETO, E. M. F., MELO, J. G., SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 114, p. 325-354, 2007.

ANIBIJUWON, I. I., OLADEJO, B. O., ADETITUN, D. O., KOLAWOLE, O. M. Antimicrobial activities of *Vernonia amygdalina* against oral microbes. **Global Journal of Pharmacology**. v. 6, n. 3, p.178-85, 2012.

ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant Volatiles: **New Perspectives for Research in Brazil**. **Neotropical Entomology**. v. 35, n. 2, p.151-158, 2006.

ARANTES, A. A., FALÉ, P. L., COSTA, L. C. B., PACHECO, R., ASCENSÃO, L., SERRALHEIRO, M. L. Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** advance online publication 28 July 2016.

ARTEEL, G. E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease. **Gastroenterology**, v. 124, p. 780-790. 2003.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that aerobically. In: MURRAY, P. R. et al. (eds.). *Manual of Clinical Microbiology* 8. ed. Washington, DC: ASM Press, 1, 384-404. 2003.

BARBIERI, M. M; SILVA, L. M. S.; MATTOS, A. C.; FERREIRA, M. C. F. Lesão hepática grave induzida por anticonvulsivantes. Relato de casos. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. v. 8, n. 6, p. 542-544, 2010.

BAHARFAR, R., AZIMI, R., MOHSENI, M. J. Antioxidant and antibacterial activity of flavonoid-, polyphenol- and anthocyanin-rich extracts from *Thymus kotschyanus* boiss & hohen aerial parts. **Journal of Food Science and Technology**. v. 52, n. 10, p. 6777-6783, 2015.

BEENA, R. In vitro hepatoprotective activity of ethanolic extract of *Coldenia procumbens* Linn. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v. 3, n. 2, p. 144 -149, 2011.

BEUTLER, E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Second edition. Grune & Stratton New York. 1975.

BEZERRA-SILVA, G. C. D.; SILVA, M. A.; DE MIRANDA, M. P., LOPES, J.R.S. Effect of Contact and Systemic Insecticides on the *Sharpshooter Bucephalagonia xanthophis* (Hemiptera: Cicadellidae), a Vector of *Xylella fastidiosa* in Citrus. **Florida Entomologist**. v. 95, n. 4, p.854-861, 2012.

BILZER, M., ROGGEL, F., GERBES, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. **Liver International**. v. 26, n.10, p. 1175-1186, 2006.

BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. GED Gastroenterologia Endoscopia Digestiva, v. 30, n.1, p. 06-47. Mecanismos de hepatotoxicidade medicamentosa: o exemplo do acetaminofen/paracetamol TEXTO COMENTADO PELO DR. RAYMUNDO PARAN COM BASE NA PALESTRA DO DR. JAVIER C. WAKSMAN 2011- **GED gastroenterol. endosc.dig**. v. 30, n.1, p. 06-47, 2011.

BOHLMANN, F.; MÜLLER, L.; GUPTA, R K.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Hirsutinolides from *Vernonia* species. **Phytochemistry**. v. 20, n. 9, p. 2233-2237, 1981.

BRANDÃO, M. G. L, GRANDI, T. S. M., ROCHA E. M. M., SAWYER, D. R., KRETTL A. U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 36, p. 175-182, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em 16 jul. 2015.

BRASILEIRO, B.G., PIZZILO, V.R., RASLAN, D.S., JAMAL, M., SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 42, p. 195-202, 2006.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**. v. 113, p. 484-490, 1985.

CAO, X., XIAO, H., ZHANG, Y., ZOU, L., CHU, Y., CHU, X. 1, 5-Dicaffeoylquinic acid-mediated glutathione synthesis through activation of Nrf2 protects against OGD/reperfusion-induced oxidative stress in astrocytes. **Brain research**. v. 1347, p. 142-148, 2010.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECILIO FILHO, A. B., SOUZA, R. J., BRAZ, L. T., TAVARES, M. 2000. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**. v. 30, n. 1, p. 171-177, 2000.

CHA, S. M., KIM, G.U, CHA, J.D. Synergistic antimicrobial activity of apigenin against oral pathogens. **International Journal of Engineering Research Science**. v. 2, n. 1, p. 27-37, 2016.

CHAKRABORTY, M., MITRA, A. The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic extract from *Cocos nucifera* mesocarp. **Food Chemistry**. v. 107, p. 994–999, 2008.

CHENG, J., GUAN, M., ZHU, J., WANG, C., SU, L., ZHANG, X. Facile and material-independent fabrication of poly (luteolin) coatings and their unimpaired antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* after steam sterilization treatments. **Polymer Chemistry**. v.5, n.14, p. 4211-4214, 2014.

CHEN, G. G., LAU, W. Y., LAI, P., CHUN, Y. S., CHAK, E. C., LEUNG, B., CHUI, A. K. Activation of Kupffer cells inhibits tumor growth in a murine model system. **International Journal of Cancer**. v. 99, n.5, p. 713-720, 2002.

CLIFFORD, M.N., KNIGHT, S., KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 53, p. 3821–3832, 2005.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M07-A9, 9th ed., Wayne, PA, USA.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24rd Informational Supplement M100-S24, CLSI, Wayne, PA, USA.

CONDE, B. E.; SIQUEIRA, A.M.; ROGÉRIO, I.T.S.; MARQUES, J.S.; FERREIRA, M.Q.; CHEDIER, L.M.; PIMENTA, D.S. Synergy in ethnopharmacological data collection methods employed for communities adjacent to urban Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 24, p. 425-432, 2014.

CORREA, V. S.C.; MAYNIÉ, J. C.; FRANÇA, E. L.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C. 2006. Atividade funcional de fagócitos na presença do fitoterápico “Mais Vida”. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, n. 2, p. 26-32, 2006.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews** v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T. P., LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

D'ANTUONO I, GARBETTA A, LINSALATA V, MINERVINI F, CARDINALI A. Polyphenols from artichoke heads (*Cynara cardunculus* (L.) subsp. *scolymus* Hayek): in vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. **Food & Function**. v. 6, n. 4, p. 1268-77, 2015.

DONG, J., QIU, J., WANG, J., LI, H., DAI, X., ZHANG, Y. WANG, X., TAN, W., NIU, X., DENG, X. ZHAO, S. Apigenin alleviates the symptoms of *Staphylococcus aureus* pneumonia by inhibiting the production of alpha-hemolysin. **FEMS microbiology letters**. v. 338, n. 2, p. 124-131, 2013.

ERASTO, P., GRIERSON, D. S., AFOLAYAN, A. J. Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 106, p. 117-120, 2006.

ERASTO, P., GRIERSON, D. S., AFOLAYAN, A. J. Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of *Vernonia amygdalina* growing in South Africa. **Food Chemistry**. v. 104, n.2, p. 636-42, 2007.

EUMKEB, G., SIRIWONG, S., THUMANU, K. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 117, p. 247–253, 2012.

FABRI, R. L., NOGUEIRA, M. S., DUTRA, L. B., BOUZADA, M. L. M., SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família *Asteraceae*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13, n. 2, p. 183-189, 2011.

FABRY, W., OKEMO, P.O., ANSORG, R., Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, n. 1, p. 79–84, 1998.

FADLI, M.; SAAD, A.; SAYADI, S.; CHEVALIER, J.; MEZRIOUI, N. E.; PAGÈS, J. M., HASSANI, L. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection – bacteria and their synergistic potential with antibiotics. **Phytomedicine**. v. 19, p. 464-471, 2012.

FONTANA, R. J. Acute Liver Failure including Acetaminophen Overdose. **The Medical clinics of North America**. v. 92, n. 4, p.761-794, 2008.

FRANÇA, E. L.; FAGUNDES, D. L. G.; LEÃO, L. D.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. Efeito do composto “mais vida” na ativação de macrófagos de ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, n. 1, p. 1-7, 2012.

FRANÇA, E. L.; MAYNIÉ, J. C.; CORREA, V. C.; PEREIRA, U. C. R.; BATALINI, C.; FERRARI, C. K. B.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C. Immunomodulatory effects of herbal plants plus melatonin on human blood phagocytes. **International Journal of Phytomedicine**. v. 2, p. 354-362, 2010.

FRUTUOSO, V. S.; GURJÃO, M. R. R.; CORDEIRO, R. S. B.; MARTINS, M. A. Analgesic and Anti-Ulcerogenic Effects of a Polar Extract from Leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Medica**. v. 60, n. 1, p. 21-25, 1994.

GARCIA, D.; DOMINGUES, M. V.; RODRIGUES, E. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v. 6, n. 29, 2010. [conteúdo on line em <http://www.ethnobiomed.com/content/6/1/29>].

GAŠIĆ, U. ; KEČKEŠ, S. ; DABIĆ, D. ; TRIFKOVIĆ, J. ; MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D. ; NATIĆ, M.; TEŠIĆ, Ž. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry**. v. 145, p. 599-607, 2014.

GAW, A.; MURPHY, M. J.; SRIVASTAVA, R.; COWAN, R. A.; O'REILLY, D.ST. Clinical Biochemistry, 5th edition, Elsevier Ltd. 188p.

GHABRIL, M; CHALASANI, N.; BJÖRNSSON, E. 2010. Drug-induced liver injury: a clinical update. **Current opinion in gastroenterology**. v. 26, n. 3, p. 222, 2010.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**. v. 3, n. x, p. 367-379, 2005.

GIRALDI, M., HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GRUNDMANN H, AIRES-DE-SOUSA M, BOYCE J, TIEMERSMA E. Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **Lancet**. v. 368, n. 9538, p. 874-85, 2006.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543 p.

HE, Y. Y., ZHANG, B. X., JIA, F. L. Protective effects of 2, 4-dihydroxybenzophenone against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **World Journal of Gastroenterology**. v. 17, n. 21, p. 2663-2666, 2011.

HEIBATOLLAH, S., REZA, N. M., IZADPANAH, G., SOHAILLA, S. Hepatoprotective effect of *Cichorium intybus* on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. **African Journal of Biochemistry Research**. v. 2, n. 6, p. 141-144, 2008.

HepCnet.net <http://www.hepcnet.net/drugsandliverdamage.html> site acessado em 17/06/2014.

HEPBURN, L., HIJNEN, D. J., SELLMAN, B. R., MUSTELIN, T., SLEEMAN, M. A., MAY, R. D., STRICKLAND, I. The complex biology and contribution of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis, current and future therapies. **British Journal Dermatology**. 2016.

HIRAMATSU, K., KATAYAMA, Y., MATSUO, M. SASAKI, T., MORIMOTO, Y., SEKIGUCHI, A., BABA, T. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. **Journal of infection and chemotherapy**. v. 20, n. 10, p. 593-601, 2014.

HOBBY, G. H., QUAVE, C. L., NELSON, K., COMPADRE, C. M., BEENKEN, K. E., SMELTZER, M. S. *Quercus cerris* extracts limit *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 144, n. 3, p. 812-815, 2012.

HOUGHTON, P.J.; OSIBOGUN, I. M. Flowering plants used against snakebites. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 39, n. 1, p. 1–29, 1993.

IIMURO, Y., GALLUCCI, R. M., LUSTER, M. I., KONO, H., THURMAN, R. G. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. **Hepatology**. v. 26, p. 1530–7, 1997.

IWALOKUN, B. A.; EFEDEDE, B. U.; ALABI-SOFUNDE, J. A.; ODUALA, T.; MAGBAGBEOLA, O. A.; AKINWANDE, A. I. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Vernonia amygdalina* on acetaminophen-induced hepatic damage in mice. **Journal of Medicinal Food**. v.9, n.4, p. 524-530, 2006.

JIANG, M., LIU, F., XIONG, W. J., ZHONG, L., XU, W., XU, F., LIU, Y. B. Combined MELD and blood lipid level in evaluating the prognosis of decompensated cirrhosis. **World Journal Gastroenterology**. v. 16, p. 1397-1401, 2010.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 78, n. 4, p. 728-733, 2003.

JOUNG, D. K., LEE, Y. S., HAN, S. H., LEE, S. W., CHA, S. W., MUN, S. H., KONG, R., KANG, O.H., SONG, H.J., SHIN, D.W., KWON, D.Y. Potentiating activity of luteolin on membrane permeabilizing agent and ATPase inhibitor against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 9, n.1, p.19-22, 2016.

JU, C., REILLY, T. P., BOURDI, M., RADONOVICH, M. F., BRADY, J. N., GEORGE, J. W., POHL, L. R. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. **Chemical research in toxicology**. v. 15, n. 12, p. 1504-1513, 2002.

JÚNIOR, A. A. J. Peroxidação lipídica e etanol:Papel da Glutaciona reduzida e da vitamina E. **Medicina**. v. 31, n. x, p. 434-449, 1998.

JUNIOR E.V.M. Situações que favorecem ou reduzem a hepatotoxicidade pelo acetaminofem. **Revista Suplemento hepatotoxicidade**. v. 30, n. 1, p. 06-47, 2011.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. 2004. Histologia Básica, 10ª Edição, Ed. Guanabara Koogan, 324-334.

KACHANI, A. T. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. **Revista de Psiquiatria Clínica**. v. 35, n. 1, p. 21-24, 2008.

KANCHANA, N.; SADIQ, A.M. Hepatoprotective Effect of *Plumbaga zeylanica* on Paracetamol induced liver Toxicity in rats. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 3, n. 1, p.151-154, 2011.

KAVANAUGH, N. L., RIBBECK, K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus aureus* biofilms. **Applied and environmental microbiology**. v. 78, n.11, p. 4057-4061, 2012.

KHAN, J., SARAF, S., SARAF, S. 2016. Preparation and evaluation of luteolin–phospholipid complex as an effective drug delivery tool against GalN/LPS induced liver damage. **Pharmaceutical development and technology**. v. 21, n. 4, p.475-486, 2016.

KIM, S.; LEE, H.; LEE, S.; YOON, S.; CHOI, K.H. Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. **PLOS ONE**. v. 10, n. 3, 0118800, 2015.

KIM, J. Y. ; CHO, J.Y. ; MA, Y.K. ; PARK, K.Y. ; LEE, S. ; HAM, K.S. ; LEE, H. J. ; PARK, K.H. ; MOON, J.H. Dicafeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their antioxidative activity. **Food Chemistry**. v. 125, n. 1, p. 55-62, 2011.

KLAASSEN, C.; CASARETT, D. 2007. Toxicology: The Basic Science of Poisons, Seventh Edition: McGraw Hill professional ISBN.: 0071593519, 9780071593519. 1280p.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta Medica**. v. 6, n. 14, p. 1479–1491, 2010.

KUPCHAN S.M., HEMINGWAY R.J., KARIMA, WERNER. D. Tumor inhibitors. XLVII. Vernodalin and vernomygdin, two new cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia amygdalina* Del. **Journal of Organic Chemistry**. v. 34, n. 12, p. 3908-4011, 1969.

KURIAKOSE, G. C.; KURUP, M.G. Antioxidant and Hepatoprotective of *Aphanizomenon flos-aquae* Linn against paracetamol intoxication in rats, **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 48, n. 11, p. 1123-1130, 2010.

LATTANZIO, V., KROON, P.A., LINSALATA, V., CARDINALI, A. Globe artichoke: a functional food and source of nutraceutical ingredients. **Journal of Functional Foods**. v. 1, n. 2, p. 131-144, 2009.

LEE, J. H., PARK, J. H., CHO, H. S., JOO, S. W., CHO, M. H., LEE, J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**. v. 29, n. 5, p. 491-499, 2013.

LEE, K., MOON, S., LEE, J., KIM, K., PARK, Y., PAIK, H. Antibacterial activity of a novel flavonoid, 7-O-butyl naringenin, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Science and Biotechnology**. v. 22, n. 6, p. 1725 -1728, 2013.

LEMOS JÚNIOR, H. P.; LEMOS, A. L. A. Silimarina. **Diagnóstico e tratamento**. v. 17, n. 1, 2012.

LEOPOLDINI, M., PITARCH, I. P., RUSSO, N., TOSCANO, M. 2004. Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry A**. v. 108, n. 1, p. 92-96, 2004.

LINN, C. C., YEN, M. H., LO, T. S., LIN, J. M. Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activity of *Boehmeria nivea* var. *nivea* and *B. nivea* var. *tenacissima*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, n. 1, p. 9-17, 1998.

LIU, R., ZHANG, H., YUAN, M., ZHOU, J., TU, Q., LIU, J. J., WANG, J. Synthesis and biological evaluation of apigenin derivatives as antibacterial and antiproliferative agents. **Molecules**. v. 18, n. 9, p. 11496-11511, 2013.

LOLIS, M.I.G.A., MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Morfo-anatomia das folhas de *Vernonia condensata* Baker (*Asteraceae*), o "figatil". **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, n. 1, p. 68-71, 2003.

LOPES, A.C. Tratado de Clínica Médica, Volume I, 2ed. São Paula: Rocca, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil – Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. 544 p.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-276, 1951.

LUO X, JIANG Y, FRONCZEK FR, LIN C, IZEBIGIE EB, LEE KS. Isolation and structure determination of a sesquiterpene lactone (vernodalinol) from *Vernonia amygdalina* extracts. **Pharmaceutical Biology**. v. 49, n. 5, p. 464-470, 2011.

LUO X, OYUGI DA, LIN C, IZEBIGIE EB, LEE KS. Isolation and characterization of the antibreast carcinoma cell growth components of *Vernonia amygdalina* extracts. **Experimental Biology and Medicine**. v. 235, p. 1472-1478, 2010.

LUYT, C.E., BRÉCHOT, N., TROUILLET, J.L., CHASTRE, J. Antibiotic stewardship in the intensive care unit. **Critical Care**. v. 18, n. 5, p. 480, 2014.

MACMICKING, JOHN; XIE, QIAO-WEN; NATHAN, CARL. Nitric oxide and macrophage function. **Annual review of immunology**. v. 15, n. 1, p. 323-350, 1997.

MARCHESE, J.A.; BROETTO, F.; MING, L.C.; GOTO, R.; STEFANINI, M.B.; GALINA, A.; TEDESCO, A.C.; CONTE, C.; MINIUK, C.M.; SCHURT, D.A.; SANGALETTI, E.; SILVA, G.O.; GOMES, G.; BERTAGNOLLI, J.A.; FRANCHESCHI, L.; COSSA, M.L.; MORAES, M.R.D.; LIMA, P.M.; LIRA, R.; COSTA, S. Perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares do município de Pato Branco (PR). **Horticultura Brasileira**. v. 22, n. 2, p. 332-335, 2004.

MARQUES, A. C. P. R. O uso do álcool e a evolução do conceito de dependência de álcool e outras drogas e tratamento. **Revista IMESC**. v. 3, p.73-86, 2001.

MASAKO, K., HIDEYUKI, I., SHIGEYUKI, O., ZENRO, I. A novel method to control the balance of skin microflora: Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. **Journal of dermatological science**. v. 38, n. 3, p. 197-205, 2005.

MATHEWS, V. V., BINU, P., SAUGANTH PAUL, M.V., ABHILASH, M, HARIKUMARAN, R. Hepatoprotective efficacy of curcumin against arsenic trioxide toxicity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 2, n. 2, p. 706-711, 2012.

MATOS, L. C. Doença Hepática Alcoólica (DHA). **Revista Sociedade Portuguesa Medicina Interna**. v. 13, n. 3, p. 307-316, 2003.

MATOS, F.J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, 141p.

MCGILL, M.R., SHARPE, M.R., WILLIAMS, C.D., TAHA, M., CURRY, S.C., JAESCHKE, H. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in

humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 122, n. 4, p. 1574-1583, 2012.

MEJIA, C.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infection Disease**. v. 14, n. 2, p. 79-86, 2010.

MERFORT, I. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. **Phytochemistry**. v. 31, n. 6, p. 2111-2113, 1992.

MIKI, H., TOKUHARA, K., OISHI, M., NAKATAKE, R., TANAKA, Y., KAIBORI, M., KON, M. Japanese Kampo Saireito Has a Liver-Protective Effect Through the Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Induction in Primary Cultured Rat Hepatocytes. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. 0148607115575035, 2015.

MILAN, P.; HAYASHI, A.H.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. Comparative Leaf Morphology and Anatomy of Three Asteraceae Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 49, n. 1, p. 135-144, 2006.

MINCIS, M; MINCIS, R. Álcool e o fígado. **GED Gastroenterologia Endoscopia Digestiva**. v. 30, n. 4, p. 152-162, 2011.

MIRANDA, M. P., VIOLA, D. N., MARQUES, R.N., BONANI, J. P., LOPES, J. R. S. Locais e período de alimentação da cigarrinha vetora de *Xylella fastidiosa*, *Bucephalagonia xanthophis* (BERG) (HEMIPTERA: CICADELLIDAE), em mudas cítricas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, n. 4, p. 913-918, 2008.

MONTEIRO, J.M., RAMOS, M. A., ARAÚJO, E.L., AMORIM, E. L. C., ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of medicinal plants knowledge and commerce in an urban ecosystem (Pernambuco, Northeast Brazil). **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 178, p. 179–202, 2011.

MONTEIRO, M. H.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; FELZENSWALB, I.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F. J. 2001. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 74, n. 2, p. 149-157, 2001.

MORIMOTO, Y., BABA, T., SASAKI, T., HIRAMATSU, K. Apigenin as an anti-quinolone-resistance antibiotic. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 46, n. 6, p. 666-673, 2015.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURIEL, P. Role of free radicals in liver diseases. **Hepatology International**. v. 3, n. x, p. 526-536, 2009.

NALLAMILLI, B. R., KUMAR, C. S. P., REDDY, K. V., PRASANNA, M. L., MARUTHI, V., SUCHARITA, P. Hepatoprotective activity of *Cichorium intybus* (Linn.) root extract against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in albino Wistar rats. **Drug Invention Today**. v. 5, n. 4, p. 311-314, 2013.

NAMVAR, A.E., AFSHAR, M., ASGHARI, B., RASTEGAR, L.A. Characterization of SCCmec elements in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients. **Burns**. v. 40, p. 708-712, 2014.

NAMASIVAYAM, S. K. R., ROY, E. A. Anti biofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. **International Journal of Pharmarmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 5, n. 2, p. 486-489, 2013.

NETTER, Frank H. 2000. Atlas de Anatomia Humana, 2 ed. Porto Alegre. Artmed.

NOBRE S. R., ROMÃOZINHO, J.M.; FERREIRA, M.; AMARO, P.; PINA CABRAL, J.E., LEITÃO M. C. L. Hepatotoxicidade por Nimesulida A propósito de um caso clínico. **Jornal Português de Gastroenterologia**. v. 15, n. 4, p. 168-172, 2008.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **The review on antimicrobial resistance**. 2014.

OH, J. H., LEE, T. J., PARK, J. W., KWON, T. K.; WITHAFERIN A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB in RAW 264.7 cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 599, p.11–17, 2008.

OHIGASHI, H., HUFFMAN, M. A. D. I., KOSHIMIZU, K., KAWANAKA, M., SUGIYAMA, H. Toward the chemical ecology of medicinal plant use in chimpanzees: the case of *Vernonia amygdalina*, a plant used by wild chimpanzees possibly for parasite-related diseases. **Journal of Chemical Ecology**. v. 20, n. 3, p. 541-53, 1994.

OKIGBO, R.N., MMEKA, E.C. Antimicrobial effects of three tropical plant extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. **African Journal of**

**Traditional, Complementary and Alternative Medicines.** v. 5, n. 3, p. 226-229, 2008.

OLA, S.S., CATIA, G., MARZIA, I., FRANCESCO, V.F., AFOLABI, A.A., NADIA, M. HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. **Food Chemistry.** v. 115, p.1568-1574, 2009.

OLIVEIRA, L.S.T.; CUNHA E SILVA, S. L.; TAVARES, D. C.; SANTOS, A. V., OLIVEIRA, G.C.B. Uso de plantas medicinais no tratamento de animais. Centro Científico Conhecer. **Enciclopédia Biosfera.** v. 5, n. 8, p. 1-8, 2009.

ÖZSOY, M. B., PABUÇCUOĞLU, A. The Effect of Acetaminophen on Oxidative Modification of Low-Density Lipoproteins in Hypercholesterolemic Rabbits. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition.** v. 41, n. 1, p. 27–31, 2007.

PEREIRA, N. A., PEREIRA, B. M., DO NASCIMENTO, R. M.C., PARENTE, J. P., MORS, W. B. Folk medicine as snake venom antidotes, VI. Protection against Jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica.** v. 60, n. 2, p. 99-100, 1994.

PEREIRA, N. A., RUPPELT, B.M., DO NASCIMENTO, M. C., PARENTE, J. P.; MORS, W.B. In Update on Plants Used Against Snakebite. **Brasilianisch-Deutsches Symposium fur Naturstoffchemie.** Hanover, p. 48-51, 1991.

PERIASAMY, S.; JOO, H. S.; DUONG, A. C.; BACH, T. H. L.; TON, V. Y.; CHATTERJEE, S. S.; CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 109, n. 4, p. 1281-1286, 2012.

PERONI, N.; BEGOSSI, A.; HANAZAKI, N. 2008. Artisanal fishers' ethnobotany: from plant diversity use to agrobiodiversity management. **Environment, Development and Sustainability.** v. 10, p. 623–637, 2008.

POMPILHO, W. M.; AZEVEDO, L.D.; MIGUEL, E. C.; OLIVEIRA, T.T. Popular Knowledge and Medicinal Plants Use In Natividade City - RJ, Brazil. **Perspectivas online Ciências Biológicas e Saúde.** v. 1, n. 2, 2011.

QUAVE, C. L., ESTÉVEZ-CARMONA, M., COMPADRE, C. M., HOBBY, G., HENDRICKSON, H., BEENKEN, K. E., SMELTZER, M. S. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. **PLoS One.** v. 7, n. 1, 28737, 2012.

RAJ, V. P., CHANDRASEKHAR, R. H., VIJAYAN, P., DHANARAJ, S. A., RAO, M. C., RAO, V. J., NITESH, K. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the total alkaloid fraction of *Hygrophila auriculata* leaves. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 42, n. 2, p. 99, 2010.

RAJASEKARAN, A., ARIVUKKARASU, R., MATHEW, P. J., BONAGIRI, R., SARADHI, R. P. Antimicrobial evaluation and quantification of apigenin content by HPTLC in methanol stem extract of *Cardiospermum halicacabum* L. **Research Journal of Pharmacy and Technology**. v. 7, n. 5, 537-543, 2014.

RAMOS, W. M.; SARTORI, A. L. B. Floristic analysis and dispersal syndromes of woody species of the Serra de Maracaju, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 73, n. 1, p. 67-78, 2013.

RATHEE, P., CHAUDHARY, H., RATHEE, S., RATHEE, D., KUMAR, V., KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflammation & Allergy-Drug Targets** (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy), v. 8, n. 3, p. 229-235, 2009.

RENWICK, M.J. BROGAN, D.M. MOSSIALOS, E. A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. **Journal Antibiotery** (Tokyo), v. 69, n. 2, p. 73-88, 2016.

REPESSÉ, X., CHARRON, C., GUÉRIN, L., AU, S.M. VIEILLARD-BARON, A. What does acute onset means in the context of *Staphylococcus aureus* infective endocarditis? Description of a hyperacute infective endocarditis. **Presse medicine**. v. 45, n. 10, p. 933-935, 2016.

RISSE, W. E.; SCARMINIO, I. S.; MOREIRA, E. G. Antinociceptive and toxicity evaluation of *Vernonia condensata* leaves. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 48, n. 8, p. 811- 816, 2010.

RIVERA, H., SHIBAYAMA, M., TSUTSUMI, V., PEREZ-ALVAREZ, V., MURIEL, P. Resveratrol and trimethylated resveratrol protect from acute liver damage induced by CCl<sub>4</sub> in the rat. **Journal of Applied Toxicology**. v. 28, n. 2, p. 147-155, 2008.

RIVERA-ESPINOZA, M.P. Beneficial drugs for liver diseases. **Journal of Applied Toxicology**. v. 28, n. x, p.93-103, 2008.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G., LIMA, J. T. S.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.

ROMANOVÁ, D; VACHÁLKOVÁ, A., CIPÁK, L. OVESNÁ, Z., RAUKO, P. Study of antioxidant effect of apigenin, luteolin and quercetin by DNA method. **Neoplasma**. v. 48, n. 2, p. 104-107, 2001.

ROSSATO, S. C., LEITÃO-FILHO, H. F., BEGOSSI, A. Ethnobotany of caiçaras of the atlantic forest coast (Brazil). **Economic Botany**. v. 53, n. 4, p. 387-395, 1999.

SAITO, S. T., TRENTIN, D. D. S., MACEDO, A. J., PUNGARTNIK, C., GOSMANN, G., SILVEIRA, J. D. D., BRENDEL, M. Bioguided fractionation shows *Cassia alata* extract to inhibit *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012. Article ID 867103, 13 pages.

SALEM, M. B., AFFES, H., KSOUDA, K., DHOUBI, R., SAHNOUN, Z., HAMMAMI, S., ZEGHAL, K. M. Pharmacological studies of artichoke leaf extract and their health benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.70, n.4, p. 441-453, (2015).

SALLER R, MEIER R, BRIGNOLI R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. **Drugs**. v. 61, n. x, p. 2035-2063, 2001.

SANHUEZA, L.; MELO, R.; MONTERO, R.; MAISEY, K.; MENDOZA, L.; WILKENS, M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **PLoS ONE**. v. 12, n. 2, p.e 0172273, 2017.

SANTOS, J. E. G. COSTA, A., DIAMANTE, J. Consenso Brasileiro sobre dislipidemias: detecção, avaliação e tratamento. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**. v. 43, n. 4, p. 287-305, 1999.

SATO, Y., ITAGAKI, S., KUROKAWA, T., OGURA, J., KOBAYASHI, M., HIRANO, T.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 403, n. 1, p. 136-138, 2011.

SAXENA, A. K., SINGH, B., ANAND, K. K. Hepatoprotective effects of *Eclipta alba* on subcellular levels in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 40, n. 3, p. 155-161, 1993.

SCUDELLER, V. V.; VEIGA, J. B.; ARAÚJO-JORGE, L. H. 2009. Etnoconhecimento de plantas de uso medicinal nas comunidades São João do Tupé e Central (Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé). Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central volume 2 Edinaldo Nelson SANTOS -SILVA, Veridiana Vizoni SCUDELLER (Orgs.),UEA Edições, Manaus, 2009. Capítulo 15: 185-199.

SEBBEN, V. C., LUGOCH, R. W., SCHLINKER, C. S., ARBO, M. D., VIANNA, R. L. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica do paracetamol. **Revista Brasileira de Patologia Médica e Laboratorial**. v. 46, n. 2, p. 143-148, 2010.

SHERIEF, M. K. S. H.; SENGOTTUVELU, S.; SIVAKUMAR, T. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Coccinia Grandis* root extract against paracetamol induced hepatic oxidative stress in wistar albino rats. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**. v. 2, n. 3, p. 858-863, 2011.

SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **Complementary and Alternative Medicine**. v. 6, n. 1, p. 1-9, 2006.

SILVA, J. B.; TEMPONI, V. S.; FERNANDES, F. V.; ALVES, G. A. D.; MATOS, D. M.; GASPARETTO, C. M.; RIBEIRO, A.; PINHO, J. J. R. G.; ALVES, M. S.; SOUSA, O. V. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 12, n. x, p. 8993-9008, 2011.

SILVA, J. B.; TEMPONI, V. S.; GASPARETTO, C. M., FABRI, R. L; ARAGÃO, D. M. O; PINTO, N. C. C.; RIBEIRO, A, SCIO, E.; VIEIRA, G. D.; SOUSA, O. V.; ALVES, M. S. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A Promising Source of Antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. Article ID 698018, 9 pages, 2013.

SILVA, S., COSTA, E.M., MENDES, M., MORAIS, R.M. CALHAU, C. PINTADO, M.M. Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm activity of an ethanolic, anthocyanin-rich blueberry extract purified by solid phase extraction. **Journal of Applied Microbiology**. v. 121, p. 693-703, 2016.

SIMEONOVA, R., KONDEVA-BURDINA, M., VITCHEVA, V., KRASTEVA, I., MANOV, V., MITCHEVA, M. Protective effects of the apigenin-O/C-diglucoside saponarin from *Gypsophila trichotoma* on carbone tetrachloride-induced hepatotoxicity in vitro/in vivo in rats. **Phytomedicine**. v. 21, n. 2, p. 148-154, 2014.

SITTISART, P., CHITSOMBOON, B., KAMINSKI, N. E. *Pseuderanthemum palatiferum* leaf extract inhibits the proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-6 expression in LPS-activated macrophages. **Food and Chemical Toxicology**. v. 97, n. x, p.11-22, 2016.

SPAGNOLO, A. M., ORLANDO, P., PANATTO, D., AMICIZIA, D., PERDELLI, F., CRISTINA, M.L. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in healthcare settings. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**. v. 55, n. 4, p. 137-144, 2014.

SPELLBERG, B., GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Disease**. v. 15, p, 59, 2014.

SUH, N, HONDA, T., FINLAY, H. J., BARCHOWSKY, A., WILLIAMS, C., BENOIT, N. E., XIE, Q. W., NATHAN C., GRIBBLE, G. W., SPORN, M. B. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. **Cancer Research**. v. 58, n. 4, p. 717-728, 1998.

SUK, K. T.; KIM, D. J. Drug-induced liver injury: presente and future. **Clinical and molecular hepatology**. v. 18, n. 3, p. 249-257, 2012.

SUPURAN, C. T. Nanoparticles for controlled release of anti-biofilm agents WO2014130994 (A1): a patent evaluation. **Expert opinion on therapeutic patents**. v. 25, n.8, p. 945-948, 2015.

SUTTON, S. Measurement of Cell Concentration in Suspension by Optical Density. **Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter**. v.12, n. 8. 2006.

TALEB-CONTINI, S. H., SALVADOR, M. J. WATANABE, E., ITO, I. Y., OLIVEIRA, D. C. R. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 39, n. 4, p. 403-408, 2003.

TORRES-DURÁN, P. V., MIRANDA-ZAMORA, R., PAREDES-CARBAJAL, M. C., MASCHER, D., BLÉ-CASTILLO, J., DIAZ-ZAGOYA, J. C., JUÁREZ-OROPEZA, M. A. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 64, n. 2, p. 141-147, 1999.

TONG, S. Y., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L., FOWLER, V. G. Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

USMAN AMIN, M., KHURRAM, M., KHAN, T. A., FAIDAH, H. S., ULLAH SHAH, Z., UR RAHMAN, S., HASEEB, A., ILYAS, M., ULLAH, N., KHAYAM, S., IRITI, M. Effects of Luteolin and Quercetin in Combination with Some Conventional Antibiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 17, n. 11, p. 1947, 2016.

VALVERDE, A. L. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 3, p. 263-264, 2001.

VANEPEREN, A. S., SEGRETTI, J. Empirical therapy in Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: An Up-to-date approach. **Journal of Infectious. Chemotherapy.** v. 22, n. 6, p. 351-359, 2016.

VARGAS-MENDOZA, N., MADRIGAL-SANTILLÁN, E., MORALES-GONZALEZ, A., ESQUIVEL-SOTO, J., ESQUIVEL-CHIRINO, C., GONZÁLEZ-RUBIO, M. G. L., GAYOSSO-DE-LUCIO, J. A., MORALES-GONZÁLEZ-MORALES, J. A. Hepatoprotective effect of silymarin. **World Journal of Hepatology.** v. 6, n. 3, p. 144-149, 2014.

VERISIMO, L. F., BACCHI, A. D., ZAMINELLI, T., DE PAULA, G. H. O., MOREIRA, E. G. Herbs of interest to the Brazilian Federal Government: female reproductive, 2011.

VICENTE, M. A. A., ALMEIDA, W. A. B., CARVALHO, Z. S. Multiplicação *in vitro* e aclimação de *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009.

VOEKS, R. A. Tropical forest healers and habitat preference. **Economic Botany.** v. 50, p. 4, p. 381-400, 1996.

XIE, Y., YANG, W., TANG, F., CHEN, X., REN, L. Antibacterial activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. **Current Medicinal Chemistry.** v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

WAN, X. Y., LUO, M., LI, X. D., HE, P. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine. **Chemico Biological Interactions.** v. 181, n. 1, p. 15-19, 2009.

WATKINS, P. B; SEEFF, L. B. Drug-induced injury: Summary of a single topic clinical research conference. **Hepatology.** v. 43, p. 3, p. 618-631, 2006.

World Health Organization, 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.

WÖLFLE, U., HAARHAUS, B., SCHEMPP, C. M. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry.** v. 145, p. 599–607, 2014.

WOOLHOUSE, M., WAUGH, C., PERRY, M. R., NAIR, H. Global disease burden due to antibiotic resistance – state of the evidence. **Journal of Global Health.** v. 6, n. 1, 010306, 2016.

YANG, E. J., YIM, E. Y., SONG, G., KIM, G. O., HYUN, C. G. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. **Interdisciplinary Toxicology**. v. 2, n. 4, p. 245–249, 2009.

YIN, M., WHEELER, M. D., KONO, H. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. **Gastroenterology**. v. 117, p. 942–952, 1999.

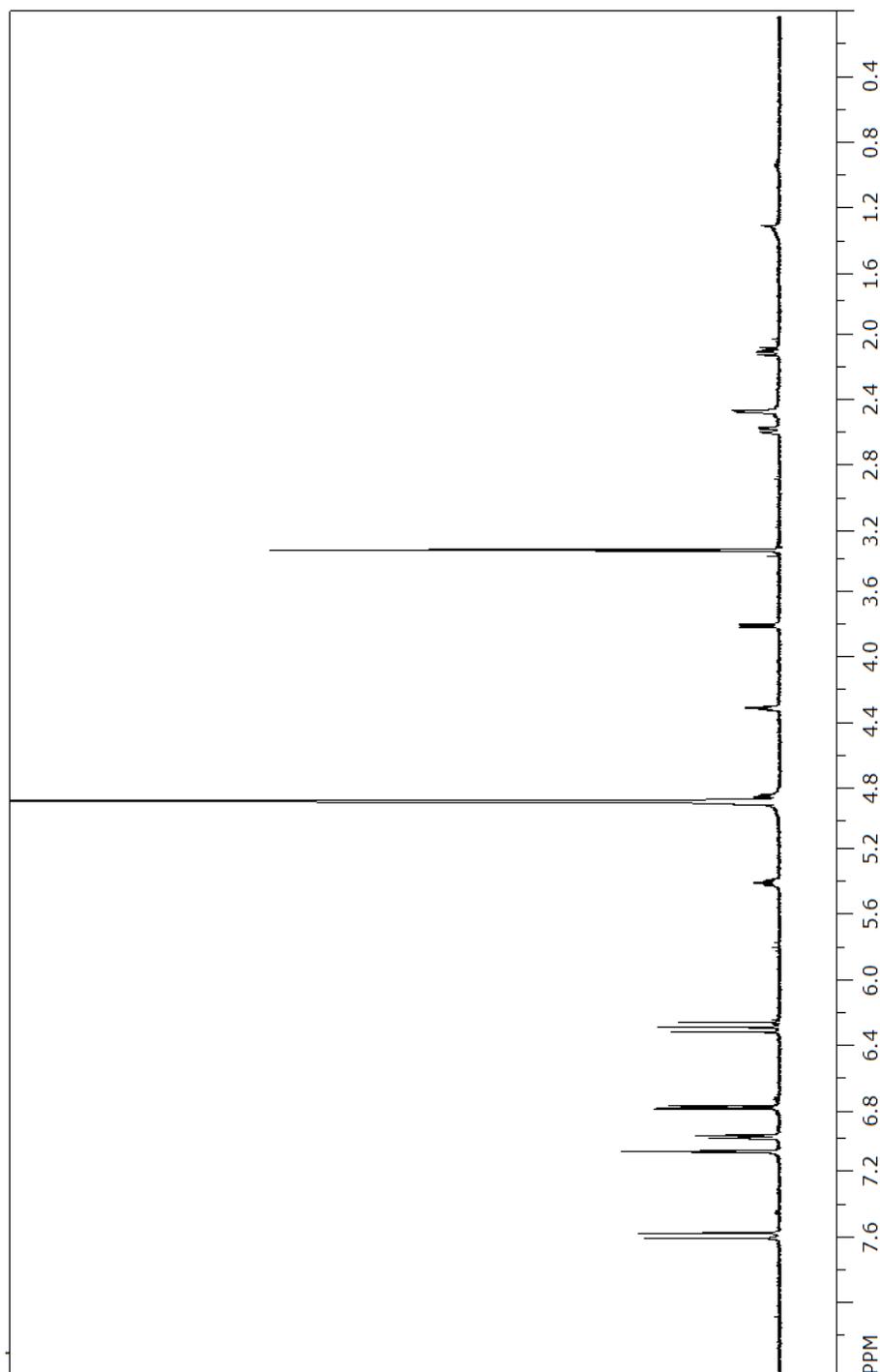
ZHOU, K., ZHOU, W., LI, P., LIU, G., ZHANG, J., DAI, Y. Mode of action of pentocin 31-1: an antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from chinese traditional ham. **Food Control**. v.19, p. 817-822, 2008.

ZHU, J., ZHAO, Y., YANG, L., HOU, S., SU, Y., YANG, R. Antibacterial Modification of Kirschner Wires with Polylyuteolin toward Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Materials**. v. 8, n. 8, p. 4876-4883, 2015.

ZIMMERMAN, H. J. Acetaminophen (Paracetamol). In, Zimmerman H. J. Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott,. 271-274; 540-541, 1999.

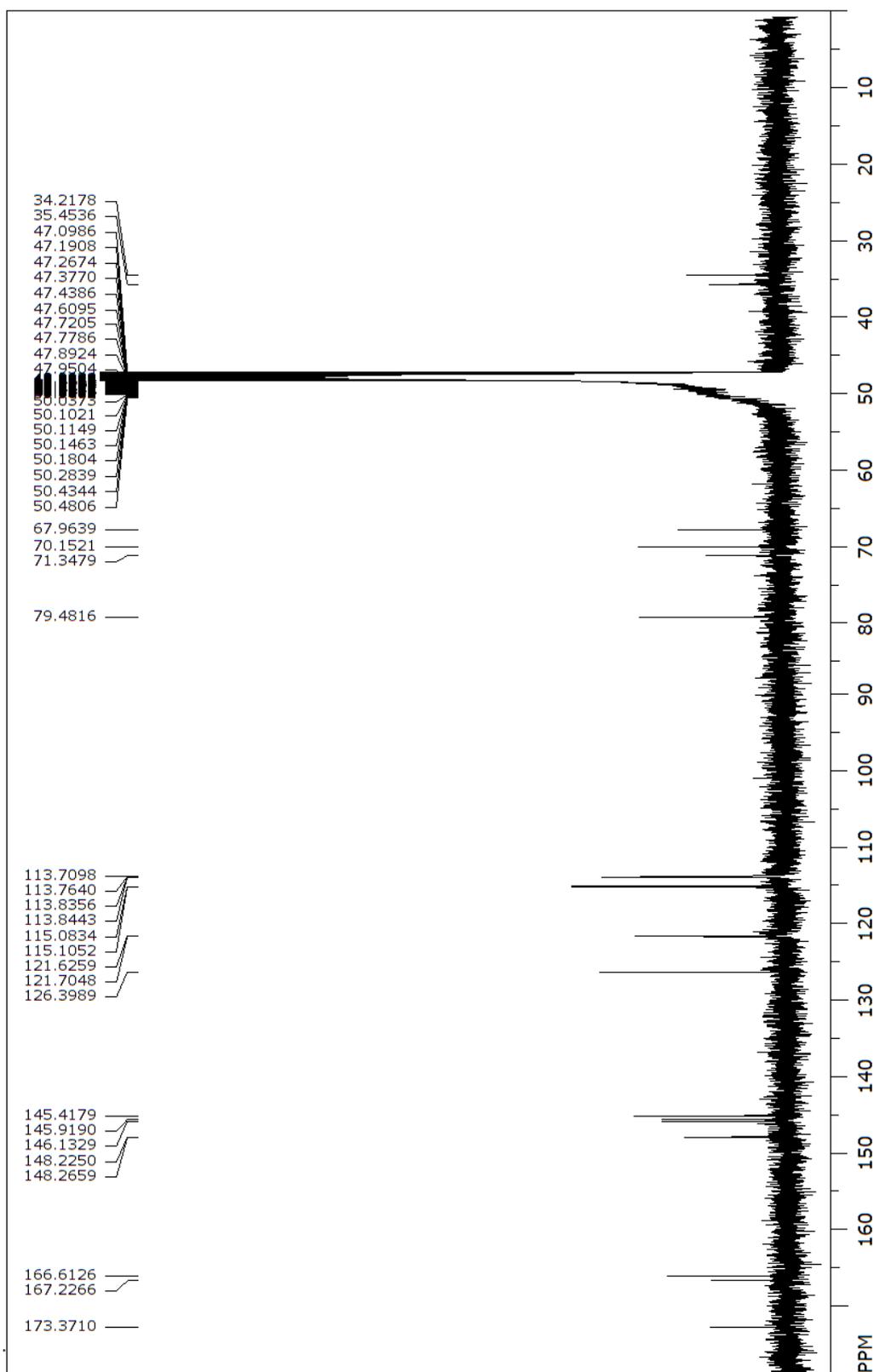
## ANEXOS

Anexo A – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC e HMBC. Registrados em espectrômetro Bruker AVANCE III em solução de MeOD a  $25^\circ\text{C}$ , utilizando TMS ( $\delta = 0$ ) como padrão interno. Os desvios químicos são reportados em ppm na escala  $\delta$  e referenciados às ressonâncias do pico do solvente residual.



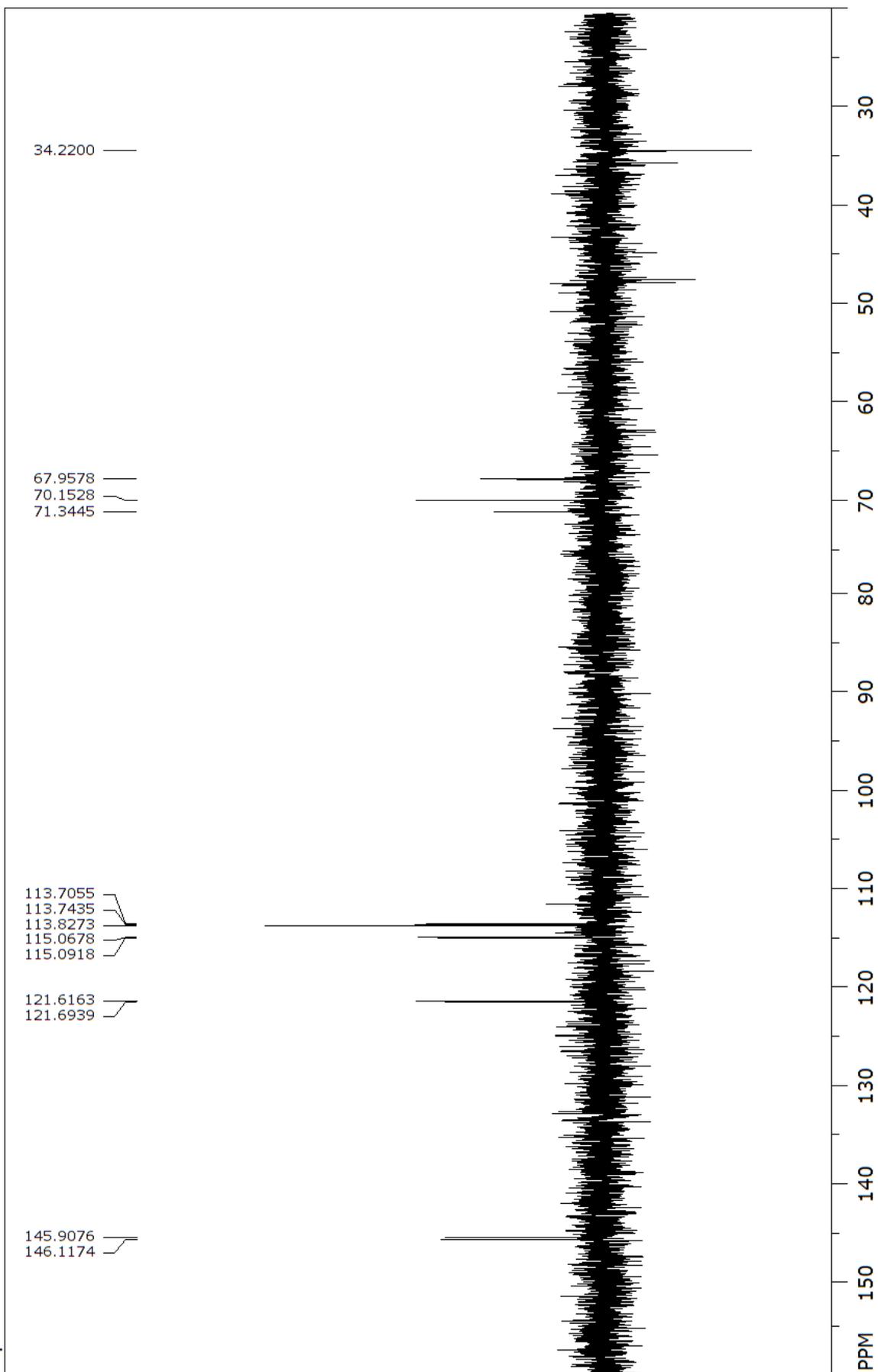
### Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) do ácido 1,5-dicafeoilquinico

$^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 2,09 (H-6ax; dd,  $J_{6\text{ax}-6\text{eq}} = 13,7$  Hz,  $J_{5-6\text{ax}} = 8,6$  Hz); 2,58 (H-6eq, dd,  $J_{6\text{ax}-6\text{eq}} = 13,7$  Hz e  $J_{5-6\text{eq}} = 3,9$  Hz); 3,41 (H-5, td,  $J_{4-5} = 8,2$  Hz,  $J_{5-6\text{ax}} = 3,9$  Hz,  $J_{5-6\text{eq}} = 8,6$  Hz); 3,80 (H-4, dd,  $J_{3-4} = 3,6$  e  $J_{4-5} = 8,2$  Hz); 4,32 (H-3, m); 2,46 (2H, m, H-2ax e H-2eq), (fração de ácido quínico); 7,08 (2H, H-2 'e H-2' '); d,  $J_2' / 2'' = 6' / 6'' = 2$  Hz); 6,80 (2H, H-5 'e H-5'' '); d,  $J_5' / 5'' = 6' / 6'' = 8,0$  Hz); 6,96 (2H, H-6 'e H-6'' '); dd,  $J_2' / 2'' = 6' / 6'' = 2$  Hz e  $J_5' / 5'' = 6' / 6'' = 7,60$  (2H, H-7 'e H-7'' '); d,  $J_7' / 7'' = 8' / 8'' = 15,1$  Hz); 6,30 (2H, H-8 'e H-8'' '); d,  $J_7' / 7'' = 8' / 8'' = 15,1$  Hz); 6,28 (H-8'', d,  $J_7'' = 8'' = 15,1$  Hz), (grupo cafeico).

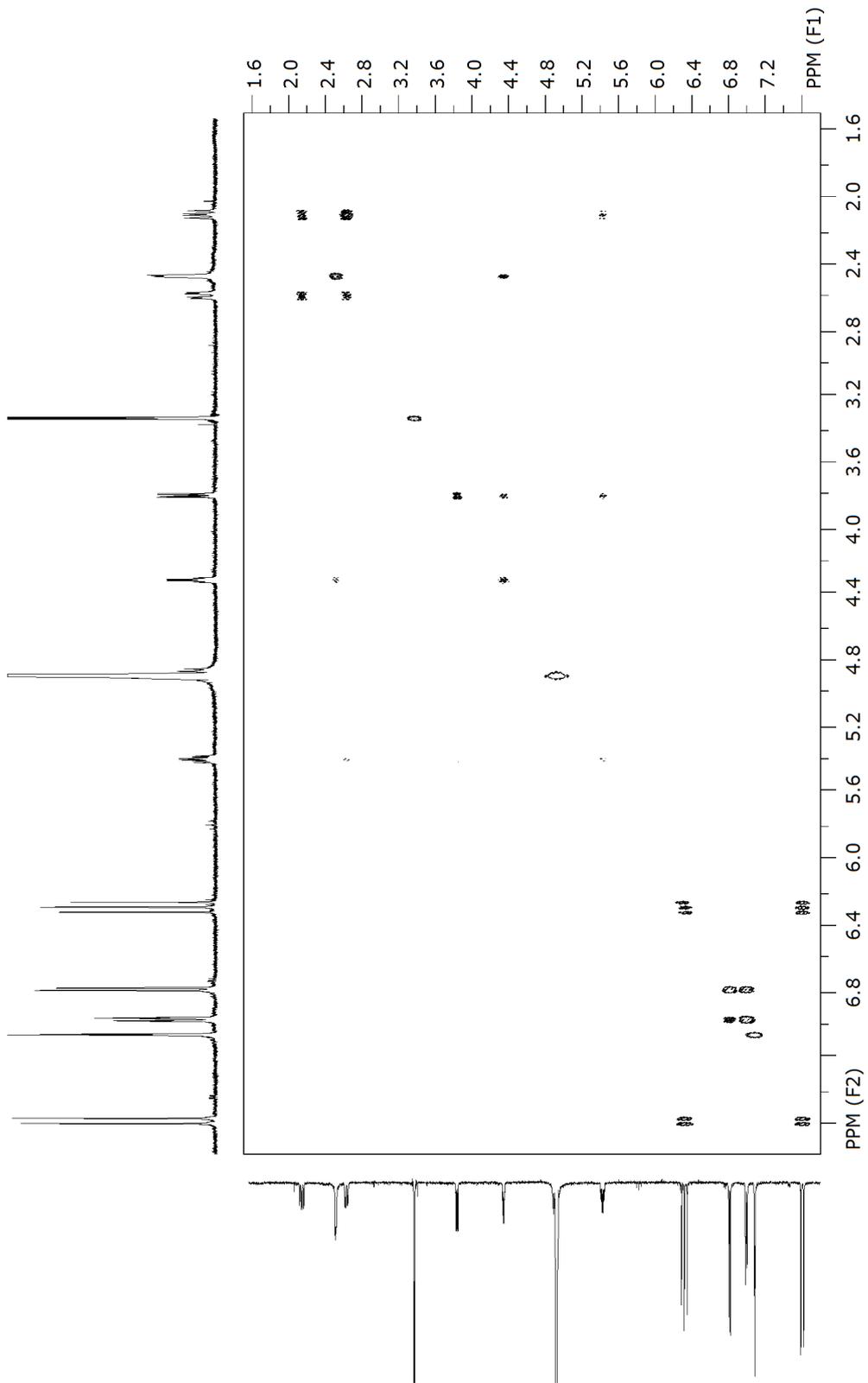


### Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do ácido 1,5-dicafecilquinico

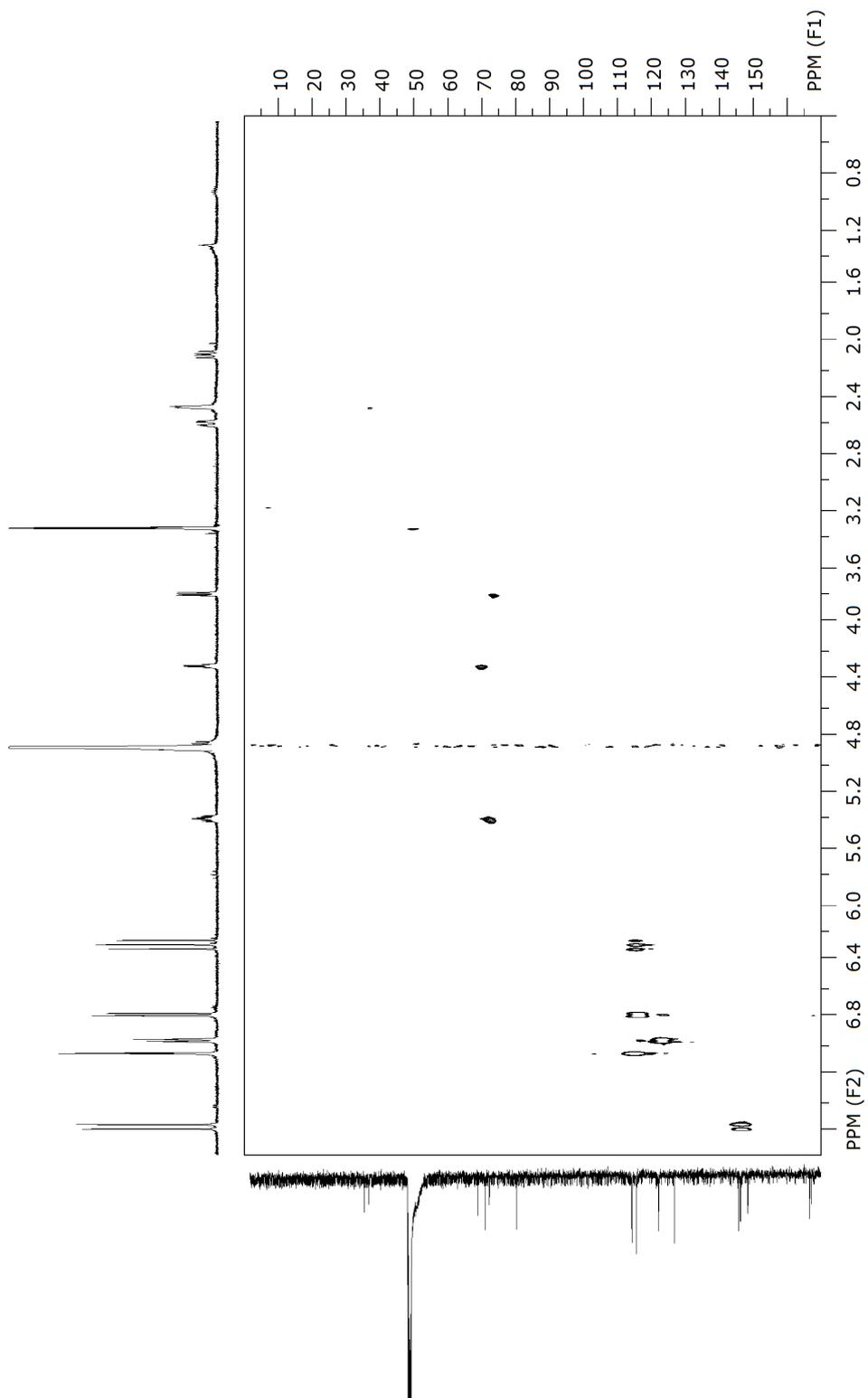
RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 79,48 (C-1); 34,22 (C-2); 67,96 (C-3); 71,35 (C-4); 70,15 (C-5); 35,45 (C-6), 173,37 (COOH) (porção de ácido quinico); 126,40 (C-1' / C-1''); 113,84 / 113,83 (C-2' / C-2''); 145,42 (C-3' e C-3''); 148,26 / 148,23 (C-4' / C-4''); 115,11 / 115,08 (C-5' / C-5''); 121,70 / 121,63 (C-6' / C-6''); 146,13 / 145,92 (C-7' / C-7''); 113,76 / 113,70 (C-8' / C-8''); 166,61 / 167,23 (C-9' / C-9''), (grupo cafeico).



Espectro DEPT-135 - do ácido 1,5-O- dicafeoilquínico



Mapa de contorno 2D RMN do ácido 1,5-O-dicafoilquinico



Mapa de contorno 2D RMN-HSQC do ácido 1,5- o- dicafeoilquinico



Anexo B – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

  
**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Protocolo de nº.: 027/2014

Coordenador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elita Scio Fontes  
O protocolo intitulado “Estudo químico e farmacológico de plantas bioativas – atividade hepatoprotetora de VCB”, recebido em 14/08/2014, foi avaliado na reunião de 02/09/2014, e recebeu o seguinte parecer:

Com pendências  Reprovado

Esclarecer, especificadamente e correspondentemente, à seguinte sequência de pendências:

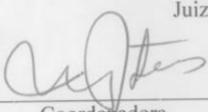
Pendência	Tópicos
1	Item 10.4: Justificar o uso de analgésico (paracetamol), uma vez que não há procedimentos cirúrgicos e/ou claramente indutor de dor;
2	Item 10.6: Explicar a necessidade e momento de jejum no experimento.

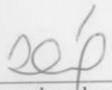
EXIGE-SE QUE O ENVIO DE RESPOSTA ÀS PENDÊNCIAS SEJA FEITO POR CARTA OU OFÍCIO, EM DUPLICATA, ASSINADO PELO COORDENADOR DO PROJETO E NÃO ENVIAR NOVO FORMULÁRIO CORRIGIDO PARA ANÁLISE.

CASO HAJA NECESSIDADE DE DOCUMENTOS ANEXOS AO PROTOCOLO, EXIGE-SE ENVIO EM DUPLICATA.

**NÃO RECEBEREMOS RESPOSTAS DE PROCESSOS NO FORMATO DE NOVO PROTOCOLO CORRIGIDO**

Juiz de Fora, 03 de setembro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Coordenadora  
CEUA

  
\_\_\_\_\_  
Vice-coordenadora  
CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 27/2014 – CEUA sobre “Estudo químico e farmacológico de plantas bioativas – atividade hepatoprotetora de VCB” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELITA SCIO FONTES com a colaboração JUCÉLIA BARBOSA DA SILVA e DANIELLE MARIA DE OLIVEIRA ARAGÃO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 06/09/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 228 ratos Wistar de 60 dias de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período de 03/12/2016 a 31/07/2017.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº. 027/2014 - CEUA about “Estudo químico e farmacológico de plantas bioativas – atividade hepatoprotetora de VCB” under responsibility of ELITA SCIO FONTES and collaboration of JUCÉLIA BARBOSA DA SILVA e DANIELLE MARIA DE OLIVEIRA ARAGÃO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 06/09/2016. For the development of this research 228 male Wistar rats of 60 days old, will be delivered as requested in the period of 03/12/2016 a 31/07/2017.

**Juiz de Fora, 15 de setembro de 2016.**

Coordenadora  
CEUA

Vice-coordenadora  
CEUA

## Anexo C – Artigo publicado em periódico científico

Journal of Ethnopharmacology 198 (2017) 399–406



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)

## New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of *Vernonia condensata* Baker



Jucélia Barbosa da Silva<sup>a</sup>, Renata de Freitas Mendes<sup>a</sup>, Vivian Tomasco<sup>a</sup>, Nicolas de Castro Campos Pinto<sup>a</sup>, Luiz Gustavo de Oliveira<sup>b</sup>, Matheus Nehrer Rodrigues<sup>c</sup>, Danielle Maria de Oliveira Aragão<sup>a</sup>, Jair Adriano Kopke de Aguiar<sup>b</sup>, Maria Silvana Alves<sup>d</sup>, Maria Christina Nogueira Marques Castañón<sup>c</sup>, Antônia Ribeiro<sup>a</sup>, Elita Scio<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Bioactive Natural Products, Department of Biochemistry, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

<sup>b</sup> Glycoconjugate Analysis Laboratory, Department of Biochemistry, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

<sup>c</sup> Department of Morphology, Biological Sciences Institute, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036-900, Brazil

<sup>d</sup> Molecular and Cellular Bioactivity Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG 36036 900, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Chemical compounds studied in this article:

Ethyl Acetate (PubChem CID: 8857)  
 Apigenin (PubChem CID: 5280443)  
 Chlorogenic Acid (PubChem CID: 1794427)  
 Luteolin (PubChem CID: 5280445)  
 1,5-Dicaffeoylquinic acid (PubChem CID: 6474640)

#### Keywords:

Hepatoprotective  
 Anti-inflammatory  
 Antioxidant  
 Vernonia condensata  
 1,5-dicaffeoylquinic acid

### ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) is traditionally used in South American Countries as an anti-inflammatory, analgesic and hepatoprotective.

**Aim of the study:** This study aimed to investigate the *in vivo* hepatoprotective and antioxidant, and the *in vitro* anti-inflammatory activities of the ethyl acetate partition (EAP) from the ethanolic extract of this medicinal plant leaves.

**Materials and methods:** For the *in vivo* hepatoprotective activity, rats were pretreated orally for seven days with vehicle, silymarin 100 mg/kg or EAP 50, 100 and 200 mg/kg. Then, acetaminophen 3 g/kg was also orally administrated. Animals were euthanatized 24 h after the damage inducement. The levels of the serum enzymes ALT, AST and ALP were determined, as well as the triglycerides, total cholesterol and fractions. The antioxidant activity was evaluated by TBARS assay and by the measurement of glutathione reductase, superoxide dismutase and catalase activities in the rats liver tissue. The *in vitro* anti-inflammatory assay using Raw 264.7 cell line induced by lipopolysaccharide was conducted to verify EAP ability to inhibit pro-inflammatory cytokines.

**Results:** EAP was able to inhibit all the acute biochemical alterations caused by acetaminophen overdose. EAP inhibited malondialdehyde formation, maintained the catalase and increased the glutathione reductase activities. Also, EAP decreased NO, IL-6 and TNF- $\alpha$  levels at concentrations from 10 to 20  $\mu$ g/mL. 1,5-dicaffeoylquinic acid was isolated and identified as the major compound in EAP. Apigenin, luteolin, chlorogenic acid were also identified. EAP anti-inflammatory action may be due to its antioxidant activity or its capacity to inhibit the pro-inflammatory cytokines.

**Conclusion:** These results strongly suggested that *V. condensata* may be useful as a possible therapy against liver damage.

### 1. Introduction

Drug-induced hepatic injury is a common reason of liver failure and

consists of an essential task for new approval medications by regulatory agencies (Kuehn, 2009). Regarding this aspect, liver damages are not due to drugs themselves, but to their toxic metabolites, such as free

**Abbreviations:** CAT, catalase; CEEA, Ethics Committee on Animal Experimentation; COBEA, Brazilian College of Animal Experimentation; EAP, ethyl acetate partition; EE, ethanolic extract; FCS, fetal calf serum; GSHPx, glutathione peroxidase; GSH, glutathione reductase; HDL-c, HDL cholesterol; H & E, hematoxylin and eosin; LDL-c, LDL cholesterol; NAPQI, N-acetyl-p-benzoquinone imine; TC, total cholesterol; TRIGL, triglycerides; SOD, superoxide dismutase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; VLDL-c, VLDL cholesterol

\* Corresponding author.

E-mail address: [elita.scio@ufjf.edu.br](mailto:elita.scio@ufjf.edu.br) (E. Scio).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.039>

Received 30 November 2016; Received in revised form 16 January 2017; Accepted 19 January 2017

Available online 21 January 2017

0378-8741 / © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

radicals, which react mainly with membrane lipids (Madkour and Abdel-Daim, 2013). In general, the liver can combat the free radical damage by biotransformation of these toxic agents in less reactive compounds *via* cytochrome P-450, and glutathione peroxidase (GSHPx) (Hiraganahalli et al., 2012).

Acetaminophen, also known as paracetamol or *N*-acetyl-*p*-aminophenol (Wang et al., 2015), is an analgesic agent that often induces hepatic intoxication causing serious liver damage, usually associated with unintentional overdose (Kuehn, 2009). *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) is the main toxic metabolite produced after acetaminophen administration, which decreases the hepatic antioxidant system, leading to a cellular oxidative stress (Wang et al., 2015).

The liver damage associated with drugs is also related to the production of pro-inflammatory cytokines, and other mediators, by Kupffer cells, which are the liver macrophages. These cells present important regulatory roles in pathophysiological liver damages due to the production of a variety of modulatory factors that can counteract the inflammatory response, and/or stimulate liver regeneration (Ju et al., 2002).

In spite of the claim for an effective hepatoprotective medicine, there is a lag in the modern pharmacotherapies of a reliable drug with this property. However, there are a large number of traditional plants recommended for liver protection or treatment (Hiraganahalli et al., 2012).

*Vernonia condensata* Baker, popularly known in Brazil as “alumã”, “figatil” or “necroton”, is a medicinal plant frequently used to treat liver and stomach disorders, as well as an anti-inflammatory remedy by some South American communities (Frutoso et al., 1994; Risso et al., 2010; Silva et al., 2011; Valverde et al., 2001). The ethyl acetate partition (EAP), obtained from ethanolic extract of the leaves, had been pointed as a promising source of antioxidants (Silva et al., 2013). Several compounds have already been detected in *V. condensata* leaves, as luteolin, apigenin, vernonioside, chlorogenic acid and rutin (Ola et al., 2009; Silva et al., 2013; Valverde et al., 2001).

As species of *Vernonia* genus was already reported as hepatoprotective (Iwalokun et al., 2006), and EAP was also described with a remarkable antioxidant activity (Silva et al., 2013), this study aimed to investigate EAP ability to prevent hepatic injury on acute acetaminophen-induced liver damage model in rats, by the evaluation of the hepatic enzymes activities in the serum of these animals. The oxidative stress in addition to the cholesterol and fractions measurements were also used as parameters to understand better the EAP hepatoprotective role. Besides, the anti-inflammatory activity was assessed in RAW264.7 murine macrophages. The chemical characterization was also performed, followed by the isolation of the major compound, which was identified by spectrometry methods.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

*Vernonia condensata* leaves were collected in the Garden of Medicinal Plants of Faculty of Pharmacy, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Minas Gerais, Brazil, between June and September 2012, in the morning. Local names for this species are “alumã”, “figatil” or “necroton”. The plant name was checked with <http://www.theplantlist.org/tp1.1/record/gcc-133050>, site accessed in November, 11th of 2016. The exsiccate (voucher number CESJ No. 52943) was deposited in the UFJF Herbarium Leopoldo Krieger.

### 2.2. Preparation of EAP

Approximately 2.5 kg of fresh leaves were dried at room temperature, and then crushed and pulverized. The powder (500 g) was extracted by static maceration with ethanol 96%. Then, the ethanolic extract (EE) was concentrated using a rotary evaporator under reduced

pressure. Forty five grams of EE were resuspended in water: ethanol (9:1), followed by liquid/liquid partition with organic solvents (3×200 mL, each) of increasing polarity to obtain the hexane, dichloromethane and ethyl acetate (EAP –5.7 g) partitions. All solvents were purchased from Vetec\*.

### 2.3. In vivo hepatoprotective and antioxidant properties

#### 2.3.1. Animals

Male Wistar rats (2–3 months old and 200–300 g) were housed in cages and kept under appropriately controlled conditions. The animals were adapted to the environment and handlers for a minimum of 72 h before the beginning of the experiments. The experimental protocols and procedures were in accordance with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The protocol was submitted to the Ethics Committee on Animal Experimentation (CEEA/UFJF – n° 024/2014; October 22nd, 2014).

#### 2.3.2. Inducement of liver damage

The hepatoprotective activity was evaluated by the induction of acute liver injury with acetaminophen in rats (Kuriakose and Kurup, 2010). The animals were divided into six groups (A-F) of six animals each, as follows: Group A: normal control - Vehicle; Group B: negative control - Vehicle; Group C: positive control - Silymarin 100 mg/kg (Legalon, Nycomed\* –77,8%); Group D: EAP 50 mg/kg; Group E: EAP 100 mg/kg; Group F: EAP 200 mg/kg. The vehicle consisted of distilled water, sodium lauryl sulfate 0.6% and Tween 80 2% (Sigma\*). Each treatment was orally administered for seven days. After this period, the animals from Groups B to F received a single oral dose of acetaminophen (Tylenol\*) 3 g/kg, and after 24 h, they were euthanized. The blood and liver were collected for biochemical and histopathological analysis, respectively.

#### 2.3.3. Measurement of the biochemical parameters in the serum

Liver injury was assessed by the determination of the serum enzymatic activities of ALT, AST and ALP. TRIGL, TC, VLDL-c, LDL-c and HDL-c were also evaluated. The analyses were performed using corresponding commercial kits (LABTEST\*) according to the manufacturer instructions.

#### 2.3.4. TBARS assay and measurement of enzymes activity in liver homogenates

Liver tissues were homogenized with phosphate buffer pH 7.4 at 1:9 ratio (w/v, tissue, buffer). The homogenates were centrifuged (3000 rpm for 5 min) to collect the supernatants for the subsequent determinations. The evaluation of MDA levels was performed as an index of lipid peroxidation (Buege and Aust, 1978). The activity of GSH (Carlberg and Mannervik, 1985), CAT (Beutler, 1975) and SOD (Kakkar et al., 1984) were also determined in liver homogenates.

#### 2.3.5. Histopathological analysis

Pieces of livers in each group were fixed in a formalin 10% solution, and processed for paraffin embedding. Sections (5 µm thick) were stained with hematoxylin and eosin (H & E) for microscopic evaluation to verify changes of hepatic cells. Photomicrographs of these sections were obtained using the software Image-Pro Plus\* 6.0.

### 2.4. In vitro anti-inflammatory activity

#### 2.4.1. Cell line RAW 264.7

The murine macrophages (RAW 264.7) were acquired from the cell bank of Federal University of Rio de Janeiro. The cells were maintained in DMEM purchased from Sigma\* supplemented with the antibiotics penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL), both purchased from GIBCO\*, and FCS 10% at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

#### 2.4.2. Cell viability

Cell viability in the presence of EAP was determined using the MTT assay (Mosmann, 1983). Briefly, RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^4$  cells/well) were seeded in 96-well microplates and incubated for 24 h before the treatment with EAP. The cells were treated with various EAP concentrations (0.5–40  $\mu\text{g/mL}$ ) at 37 °C for 44 h. Next, MTT solution (Sigma, 5 mg/mL in serum-free medium, 20  $\mu\text{L/well}$ ) was added to each well and followed by incubation for 4 h. Finally, the MTT solution was removed, and the formazan crystals formed by MTT reduction were solubilized in 200  $\mu\text{L}$  of DMSO. The absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader (Thermo Scientific® - MULTISKAN) and values were calculated in comparison to the control cells.

#### 2.4.3. Nitric oxide production

The production of NO was indirectly determined by Griess reaction to measure the concentration of nitrite in the culture medium. RAW 264.7 cells were seeded in 96-well microplates at a density of  $8 \times 10^4$  cells/well and were incubated for 24 h. Cells were exposed to 100 ng/mL of LPS (Sigma®) with various EAP concentrations (1.0–20  $\mu\text{g/mL}$ ) for 48 h. The culture supernatant (100  $\mu\text{L}$ ) was mixed with Griess reagent (100  $\mu\text{L}$ , 1% sulphanilamide, 0.1% *N*-[1-naphthyl]-ethylenediamine in 5% phosphoric acid) and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 540 nm (Thermo Scientific® - MULTISKAN). NO concentration was determined using a standard curve of sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ).

#### 2.4.4. Analysis of pro-inflammatory cytokines

Anti-inflammatory effects of EAP have also analyzed on the LPS-induced RAW 264.7 cells. Cells were seeded on 96-well microplate at a density of  $8 \times 10^4$  cells/well and incubated for 24 h. The cells were exposed to LPS 100 ng/mL in the presence or absence of EAP at concentrations from 1.0 to 20  $\mu\text{g/mL}$  for 48 h. Then, the TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in the supernatants were analyzed with ELISA kits according to the manufacturer instructions (DuoSet kit, R & D Systems).

### 2.5. Phytochemical analysis

#### 2.5.1. HPLC-DAD phytochemical profile

The phytochemical profile was obtained using a HPLC-DAD Agilent 1200 series® and a Zorbax SB-C18 column (5  $\mu\text{m} \times 4.6 \times 150$  mm). Twenty  $\mu\text{L}$  of EAP was injected. The mobile phase used was a linear gradient of solvents A (MeOH:H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH=3 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and B (MeOH); 0 a 100% of B in 30 min; a flow rate of 0.6 mL/min was used. The chromatogram was obtained at 330 nm. Solvents were purchased from Tedia.

#### 2.5.2. Isolation of EAP major compound

EAP (2 g) was fractionated using a Sephadex® LH 20, purchased from Sigma® (250 g) column chromatography (4 $\times$ 74 cm), eluted with MeOH, and the fractions were grouped in accordance to their thin layer chromatography profile, so that five fractions were obtained and named according to their elution order (FA, FB, FC, FD and FE). The major compound was isolated from the most purified fraction (FD) using HPLC-DAD with a semi-preparative Zorbax CN column (5  $\mu\text{m} \times 9.4 \times 250$  mm). An isocratic 70% A (MeOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH=3 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and 30% B (MeOH), 0–10 min was used as mobile phase at a flow rate of 2.5 mL/min to yield 7.4 mg of the major EAP compound.

#### 2.5.3. Spectroscopic studies

EAP major compound was identified by <sup>1</sup>H NMR (500 MHz), <sup>13</sup>C NMR (125 MHz), DEPT-135, and <sup>2</sup>D NMR (COSY, HMBC, HSQC) spectra, which were recorded on a Bruker AVANCE III spectrometer in MeOD solution at 25 °C, using TMS ( $\delta=0$ ) as internal standard. Chemical shifts are reported in ppm on the  $\delta$  scale and referenced to the residual solvent peak resonances.

For chemical analysis by mass spectrometry, 4  $\mu\text{g}$  of EAP major compound was diluted in methanol for the negative mode. The solution was infused directly into the ESI source using a syringe pump at a flow rate of (10  $\mu\text{L/min}$ ). ESI (-)-MS and tandem ESI-MS/MS were acquired using a hybrid high-resolution and high accuracy Xevo® G2-S Q-ToF (Waters®). For data acquisition and processing, MassLynx V4.1 software (Waters®) was used. The data were collected in the *m/z* range of 50–1000 at the speed of 1 scan per second.

1,5-di-*O*-caffeoylquinic acid: C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>, amorphous white powder. ESI-MS/MS *m/z* (rel. int.): 515 [M-H] (75); 353[M-H-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>] (100); 335 [M-H-C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O] (7); 191 [M-H-2x C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>] (20). NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  2.09 (H-6ax, dd,  $J_{6ax-6eq}=13.7$  Hz,  $J_{5-6ax}=8.6$  Hz); 2.58 (H-6eq, dd,  $J_{6ax-6eq}=13.7$  Hz and  $J_{5-6eq}=3.9$  Hz); 5.41 (H-5, td,  $J_{4-5}=8.2$  Hz;  $J_{5-6eq}=3.9$  Hz,  $J_{5-6ax}=8.6$  Hz); 3.80 (H-4; dd,  $J_{3-4}=3.6$  and  $J_{4-5}=8.2$  Hz); 4.32 (H-3, m); 2.46 (2 H,m, H-2ax and H-2eq),(quinic acid moiety); 7.08 (2 H, H-2' and H-2''; d,  $J_{2'/2''-6'/6''}=2$  Hz); 6.80 (2 H, H-5' and H-5''; d,  $J_{5'/5''-6'/6''}=8.0$  Hz); 6.98 (2 H, H-6' and H-6''; dd,  $J_{2'/2''-6'/6''}=2$  Hz and  $J_{5'/5''-6'/6''}=8.0$  Hz); 7.60 (2 H, H-7' and H-7''; d,  $J_{7'/7''-8'/8''}=15.1$  Hz); 6.30 (2 H, H-8' and H-8''; d,  $J_{7'/7''-8'/8''}=15.1$  Hz); 6.28 (H-8'', d,  $J_{7'-8'}=15.1$  Hz),(caffeoyl group). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  79.48 (C-1); 34.22 (C-2); 67.96 (C-3); 71.35 (C-4); 70.15 (C-5); 35.45 (C-6), 173.37 (COOH) (quinic acid moiety); 126.40 (C-1'/C-1''); 113.84/113.83 (C-2'/C-2''); 145.42 (C-3' e C-3''); 148.26/148.23 (C-4'/C-4''); 115.11/115.08 (C-5'/C-5''); 121.70/121.63 (C-6'/C-6''); 146.13/145.92 (C-7'/C-7''); 113.76/113.70 (C-8'/C-8''); 166.61/167.23/(C-9'/C-9''), (caffeoyl group).

#### 2.5.4. EAP chemical characterization

EAP chemical biomarkers quantification was conducted in HPLC-DAD as previously described (item 3.5.1) using the external standards apigenin (purity  $\geq 95\%$ ), luteolin purity  $\geq 98\%$ ) and chlorogenic acid (purity  $\geq 95\%$ ) all of them were purchased from Sigma®, in addition to an internal standard (the major compound isolated from EAP). These compounds were quantified by the calibration curve construction using 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625–0.0312 mg/mL in triplicate of each standard.

### 2.6. Statistical analysis

The results were expressed as a mean  $\pm$  standard deviation. The software GraphPad Prism® 5.0 was used for one-way ANOVA followed by Tukey test for all experiments ( $p < 0.05$  was considered significant).

## 3. Results and discussion

### 3.1. In vivo EAP hepatoprotective activity

Acetaminophen overdose can induce hepatotoxicity and acute liver failure (Kuriakose and Kurup, 2010). For this reason, a pretreatment with EAP followed by the acetaminophen administration (3 g/kg, v.o.) was used to evaluate its hepatoprotective capacity. As shown in Table 1, the relative liver weights for EAP 100 and 200 mg/kg (group E and F) were close to the normal group. An increase of the liver weight may be associated with an inflammatory process induced by the hepatic toxicity (Wang, 2015).

In acute liver injury induced by acetaminophen or other compounds with similar metabolism, it is possible to detect changes in certain biochemical parameters. The intracellular enzymes aspartate aminotransferases (AST) and alanine aminotransferases (ALT) are important indicators of liver damage. AST and ALT are normally present in the cytoplasm; however, after liver injury their levels increase in blood serum due to alterations in hepatic cells membrane permeability (Giannini et al., 2005; Vargas-Mendoza et al., 2014). Alkaline phosphatase (ALP) is another important hepatic parameter and high serum levels of this enzyme indicate cholestasis (Vargas-Mendoza et al., 2014). The levels of these enzymes in the serum of

**Table 1**  
Relative body and liver weight after the pretreatment with EAP.

Animals group	Relative body weight (g)			Livers weight (g)
	First day	8th day	% change	
A	212.8 ± 5.0	232.2 ± 4.9	9.15	8.32 ± 0.25 <sup>a</sup>
B	211.8 ± 2.1	234.6 ± 1.7	10.80	9.71 ± 0.15 <sup>b</sup>
C	225.6 ± 4.4	226.4 ± 5.8	0.3	9.62 ± 0.43 <sup>b</sup>
D	269.4 ± 8.71	269.0 ± 8.44	0.1	9.68 ± 0.27 <sup>b</sup>
E	229.4 ± 6.5	232.6 ± 7.2	1.3	8.00 ± 0.31 <sup>a</sup>
F	226.6 ± 8.3	229.8 ± 7.4	1.4	8.98 ± 0.43 <sup>c</sup>

Group A: normal group; Group B: negative control; Group C: silymarin, 100 mg/kg; Group D, E and F: EAP 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. The values represent the mean ± standard deviation. One-way ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.001$ ). Groups with the same letter indicate no statistical differences.

animals pretreated with EAP are shown in Fig. 1. All EAP doses reduced AST level; however, at 200 mg/kg, AST achieved normal levels (Fig. 1A). Also, all pretreatments reduced ALT levels (Fig. 1B). Pretreatment with EAP, at all doses, was able to maintain the ALP levels close to normal values (Fig. 1C). Taken together, these results suggested that EAP pretreatment was able to prevent liver damage.

Acetaminophen was capable to increase triglycerides and cholesterol serum levels (Özsoy and Pabuçcuoğlu, 2007; Buttar et al., 1976), which explains why total cholesterol (TC), and VLDL (c-VLDL) and LDL cholesterol (c-LDL) fractions, in addition to triglycerides (TRIGL), were increased in the negative control group (Group B). Nevertheless, HDL cholesterol (c-HDL) levels decreased. In contrast, EAP 50, 100 and 200 mg/kg caused significant reduction of TC and c-LDL. At 200 mg/kg, EAP also reduced TRIGL and c-VLDL levels to normal values (Group A). It is important to point out that, under acetaminophen effect, animals pretreated with EAP 100 and 200 mg/kg (Groups E and F) showed high levels of c-HDL when compared to Groups B and C (Table 2).

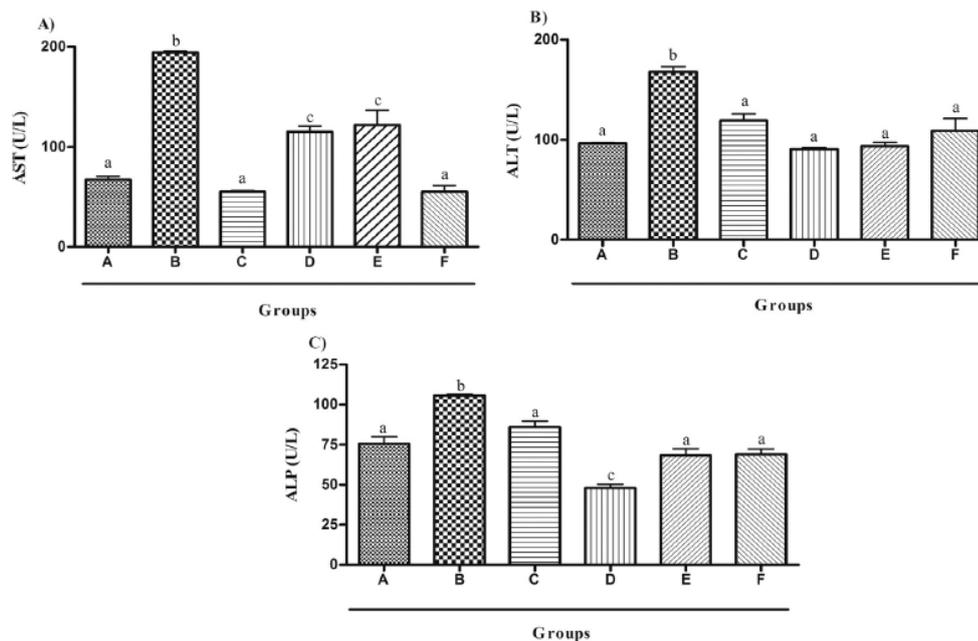
The ability of *V. condensata* aqueous extract to inhibit the *in vitro*

activity of HMG-CoA reductase, a key enzyme involved in the biosynthesis of endogenous cholesterol, was already published (Arantes et al., 2016). Thus, the present data reinforced the hypocholesterolemic effect reported in the literature and showed that EAP pretreatment can prevent the hypercholesterolemia commonly caused after liver damages induced by acetaminophen (Arantes et al., 2016; Koppes et al., 2005).

In order to evaluate EAP ability to prevent oxidative stress, thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS) and GSH, CAT and SOD activities were performed. NAPQI and other free radicals induce macromolecules peroxidation, leading to an MDA increase and a failure in the hepatocyte antioxidant system (Pareek et al., 2013; Wang et al., 2015). Oxidative stress induced by NAPQI is the major cause for the deleterious acetaminophen action (Wang et al., 2015). NAPQI is converted to harmless water-soluble metabolites by the GSH action, so that the increasing of GSH levels is fundamental for more efficient NAPQI elimination (Iwalokun et al., 2006). Fig. 2 (A and B) shows the effect of EAP pretreatment in the production of MDA and in the GSH enzyme activity in the hepatic tissue, respectively. The oxidative stress caused by NAPQI was evidenced in the animals of Group B due to the high levels of MDA and the low GSH activity. On the other hand, EAP in all doses, was able to inhibit MDA formation and to increase the GSH activity.

In acetaminophen intoxications, CAT and SOD activities are normally compromised (Adam et al., 2016; Wang et al., 2015). The negative control group (Group B) showed a decrease in CAT activity, unlike the animals pretreated with EAP (100 and 200 mg/kg), which showed CAT levels similar to the normal group (Group A) (Fig. 2C). EAP 100 and 200 mg/kg also increased SOD activity (Fig. 2D). Therefore, EAP strongly prevented the oxidative stress caused by acetaminophen administration, reaffirming its protective capacity, which is a relevant finding, as the antioxidant activity is usually related to a hepatoprotective role (Sabir et al., 2012; Wang et al., 2015).

Histopathological studies confirmed the liver damage caused by acetaminophen. Untreated animals (negative control) presented de-

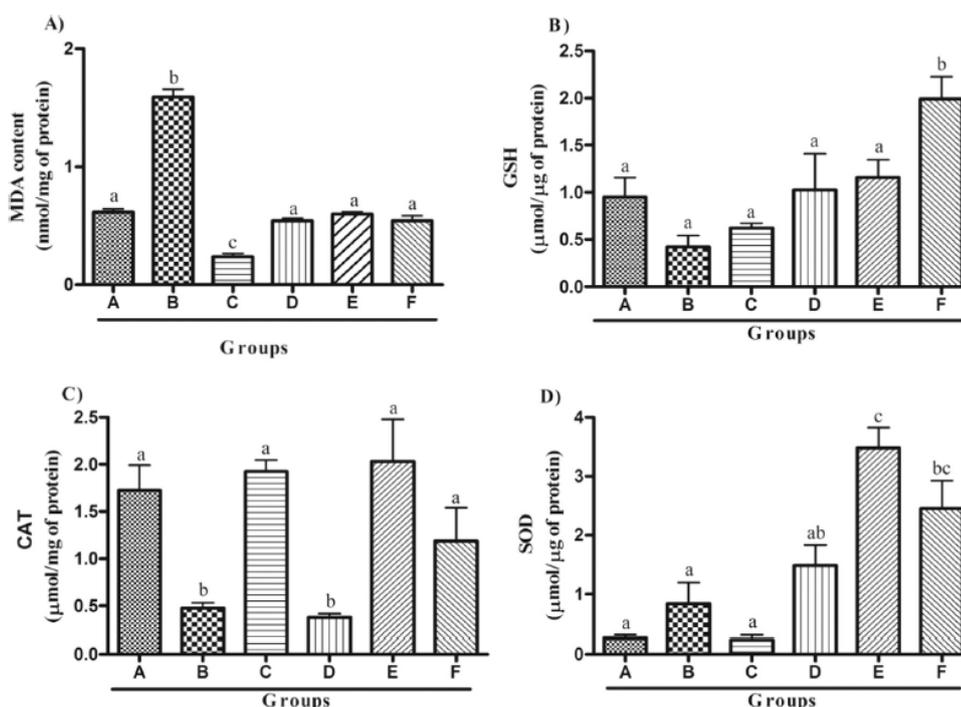


**Fig. 1.** Effects of EAP pretreatment on AST (A), ALT (B) and ALP (C) serum levels after acetaminophen-induced acute liver toxicity in rats. Group A: normal group; Group B: negative control; Group C: silymarin, 100 mg/kg; Group D, E and F: EAP 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. The values represent the mean ± standard deviation. One-way ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.01$ ). Groups with the same letter indicate no statistical difference.

**Table 2**  
Effect of EAP on lipidic parameters after acute acetaminophen damage in pretreated rats.

Animals groups	TRIGL mg/dL	TC mg/dL	c- VLDL mg/dL	c-LDL mg/dL	c-HDL mg/dL
A	88.99 ± 9.16 <sup>a</sup>	88.40 ± 4.34 <sup>a</sup>	17.80 ± 1.83 <sup>a</sup>	62.28 ± 3.55 <sup>a</sup>	11.88 ± 4.67 <sup>a</sup>
B	123.1 ± 13.76 <sup>b</sup>	122.4 ± 14.62 <sup>b</sup>	20.57 ± 4.67 <sup>b</sup>	86.49 ± 11.47 <sup>b</sup>	3.59 ± 1.14 <sup>b</sup>
C	116.5 ± 16.58 <sup>c</sup>	84.27 ± 9.98 <sup>a</sup>	23.29 ± 3.12 <sup>c</sup>	57.10 ± 4.40 <sup>a</sup>	3.57 ± 0.57 <sup>b</sup>
D	117.8 ± 15.87 <sup>c</sup>	81.54 ± 7.42 <sup>a</sup>	24.98 ± 6.8 <sup>c</sup>	50.10 ± 5.49 <sup>c</sup>	7.57 ± 1.19 <sup>c</sup>
E	125.1 ± 19.17 <sup>b</sup>	81.04 ± 2.50 <sup>a</sup>	25.01 ± 3.83 <sup>c</sup>	43.56 ± 3.94 <sup>c</sup>	10.36 ± 2.90 <sup>d</sup>
F	84.22 ± 3.48 <sup>a</sup>	83.06 ± 3.68 <sup>a</sup>	16.40 ± 0.70 <sup>a</sup>	53.88 ± 2.01 <sup>a</sup>	11.06 ± 0.67 <sup>a</sup>

Group A: normal group; Group B: negative control; Group C: silymarin, 100 mg/kg; Group D, E and F: EAP 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. The values represent the mean ± standard deviation. One-way ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.01$ ). Groups with the same letter indicate no statistical differences.



**Fig. 2.** Effects of EAP on MDA (A) content and GSH (B), CAT (C) and SOD (D) activity in hepatic tissue of acetaminophen-induced acute liver toxicity in rats. Group A: normal group; Group B: negative control; Group C: silymarin, 100 mg/kg; Group D, E and F: EAP 50, 100 and 200 mg/kg, respectively. The values represent the mean ± standard deviation. One-way ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Groups with the same letter indicate no statistically difference.

generative changes such as vacuolization and pycnotic nuclei in the parenchymal cells in the centrilobular areas, congestion and sinusoidal dilation, mild degree of lymphocytic infiltrate and bleeding (Fig. 3B). On the other hand, the liver of the rats pretreated with EAP did not present degenerative changes maintaining a quite normal histological aspect, with only few areas of congestion and mild lymphocytic infiltrate.

### 3.2. In vitro EAP anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity of EAP was evaluated by the measurement of nitric oxide (NO), and interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) cytokines. LPS-induced RAW 264.7 cell line, which presents a good correlation with the Kupffer cells (Kiemer et al., 2002), was used. Initially, MTT assay was performed in order to identify the ideal EAP concentrations to be assessed. Cellular viability was observed below 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

In cellular injury, NO is produced in large quantities by the enzyme

nitric oxide synthase (iNOS) (Yang et al., 2009). NO is a free radical and an intracellular messenger produced by different human and other mammalian cells. It is a mediator in numerous biological actions, including vasodilation, neurotransmission, inhibition of platelet adhesion and aggregation (Oh et al., 2008). The level of NO produced by iNOS can reflect a certain degree of tissue inflammation and also serves as an important indicator in the assessment of inflammatory processes. Large amount of NO inhibits cellular respiration, induces DNA damage and decreases intracellular levels of enzymatic antioxidants (Chen et al., 2002). Thus, it is essential to reduce NO production for the prevention of liver injury (Miki et al., 2015). EAP was able to significantly decrease the NO levels at 10 and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 4A).

LPS, a glycolipid endotoxin from Gram-negative bacteria outer membrane, is recognized by receptors in animal cells, such as macrophages, which activate the innate immune system and stimulates the secretion of cytokines (TNF- $\alpha$ ) (Kim et al., 1999). The inhibition of TNF- $\alpha$  expression may attenuate liver injury induced by alcohol (Iimuro et al., 1997). TNF- $\alpha$  is generally produced with IL-6, which

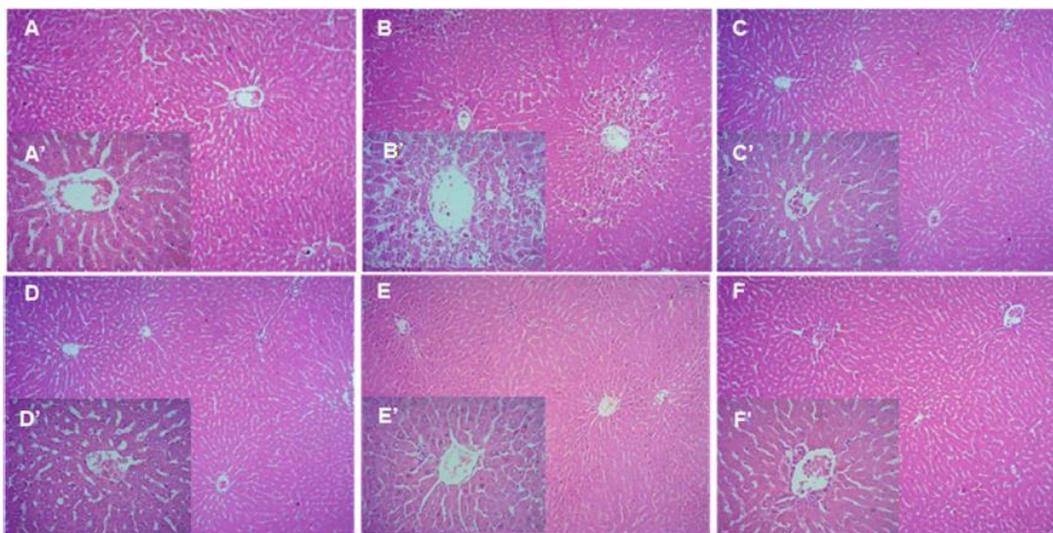


Fig. 3. Representative photomicrographs of longitudinal sections of rat liver after 7 days of pretreatments followed by acetaminophen-induced acute damaged. normal group (A 100x, A' 400x), negative control (B 100x, B' 400x), sylimarin (C 100x, C' 400x), EAP 50 mg/kg (D 100x, D' 400x), EAP 100 mg/kg (E 100x, E' 400x) and EAP 200 mg/kg (F 100x, F' 400x). Images were captured using the Image-Pro Plus® 6.0 software.

exerts an important regulatory role in acute inflammation (local or systemic). Drugs that are capable to reduce or inhibit the expression of both pro-inflammatory cytokines are considered as promising anti-inflammatory agents (Sittisart et al., 2016). IL-6 levels were reduced by EAP at 5, 10 and 20 µg/mL (Fig. 4B). TNF-α levels decreased by EAP at all tested concentrations (Fig. 4C).

### 3.3. Phytochemical analysis

EAP chemical profile was shown in Fig. 5. Chlorogenic acid, luteolin

and apigenin were identified by relative retention times using authentic standards and quantified by a calibration curve (Table 3).

The main compound was isolated in order to better know the chemical profile of EAP. Its structure, showed in Fig. 5, was identified as 1,5-di-O-caffeoylquinic acid by analysis of one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) high resolution NMR spectroscopy and by comparison with published data (Merfort, 1992). The molecular mass (C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>O<sub>12</sub>) was determined by ESI-MS negative spectra that showed the deprotonated molecular peak, [M-H]<sup>-</sup>, at m/z 515. The ESI-MS/MS fragmentation pattern was identical to that observed by Clifford et al.

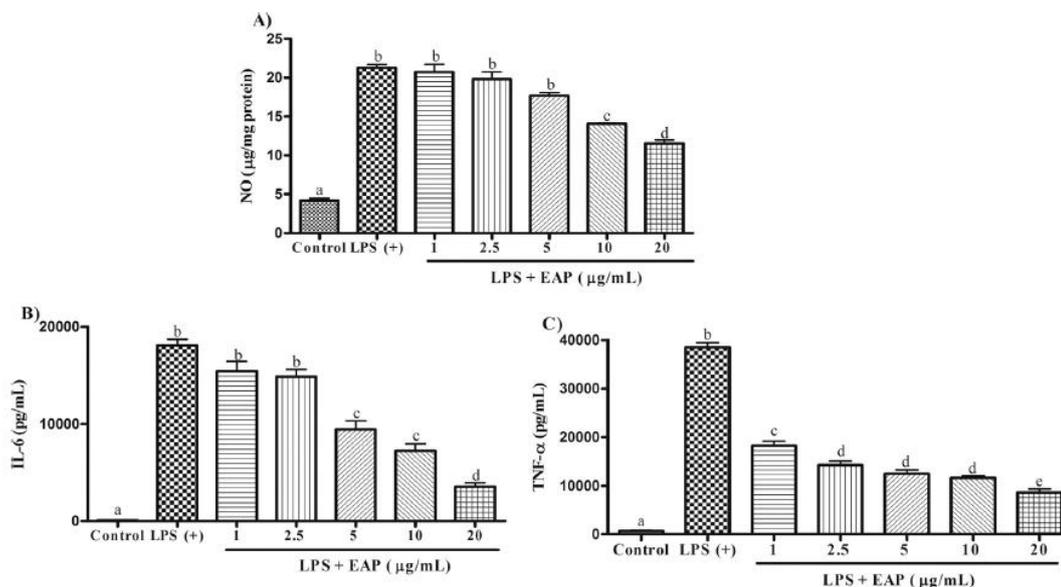


Fig. 4. Effects of EAP on NO (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) levels in LPS-induced RAW 264.7 cells; 8 × 10<sup>4</sup> cells/well in 96 wells microplates. The values represent the mean ± standard deviation. Test was performed in hexuplicate. One-way ANOVA followed by Tukey test (p < 0.05). Groups with the same letter indicate no statistically difference.

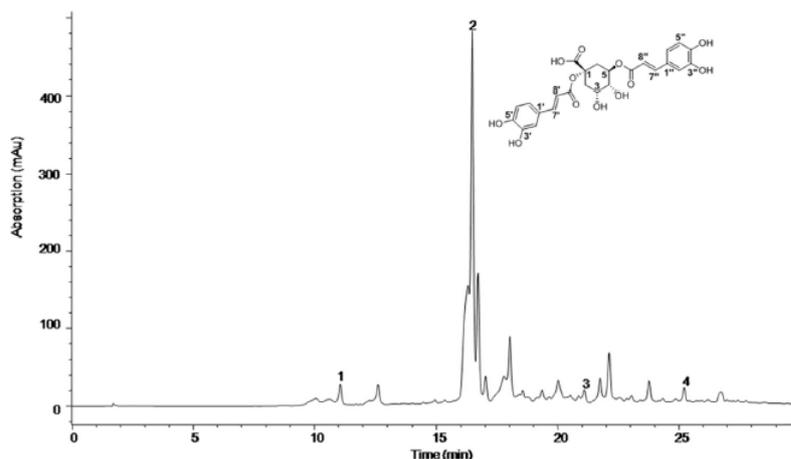


Fig. 5. HPLC-DAD phytochemical profile of EAP. (1) chlorogenic acid, (2) 1,5-di-O-caffeoylquinic acid, (3) luteolin and (4) apigenin. Zorbax SB-C18 column (5  $\mu\text{m}$  x 4.6 x 150 mm). 20  $\mu\text{L}$  of EAP was injected. The mobile phase used was a linear gradient of solvents A (MEOH: H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH=3 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and B (MEOH); 0 a 100% of B in 30 min; a flow rate of 0.6 mL/min was used. The chromatogram was obtained at 330 nm.

Table 3

Calibration curves and quantification of chlorogenic acid, apigenin, luteolin and 1,5-dicaffeoylquinic acid.

Standard	Curve	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>
Chlorogenic acid	$y = 7998.6x - 31.639$ $r^2 = 0.9982$	$9.23 \pm 0.08$
1,5-di-O-caffeoylquinic acid	$y = 12012x + 688.60$ $r^2 = 0.9986$	$292.00 \pm 0.06$
Luteolin	$y = 20233x + 419.43$ $r^2 = 0.9975$	$1.87 \pm 0.08$
Apigenin	$y = 2918.3x + 47.453$ $r^2 = 0.9936$	$25.08 \pm 0.01$

<sup>a</sup> Values expressed as a mean  $\pm$  standard error.

(2005) for 1,5-di-O-caffeoylquinic acid isomers. Those compounds had previously been detected in *V. condensata* (Arantes et al., 2016).

Chlorogenic acid and the flavonoids luteolin and apigenin are commonly found in several plant species and possess biological activities related to the findings reported in this study. According to the literature, chlorogenic acid is endowed with antioxidant activity (Johnston et al., 2003; Sato et al., 2011; Shimoda et al., 2006). In addition, this compound may inhibit the absorption of lipids, increase their metabolism, and reduce the serum cholesterol levels and steatosis (Khan et al., 2016; Shimoda et al., 2006). Apigenin and luteolin are also an antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective agents (Rathee et al., 2009; Simeonova et al., 2014). Moreover, there are reports describing the antioxidant activity of dicaffeoylquinic acids (Salem et al., 2015; Zhao et al., 2014). Thus, the presence of these compounds in EAP might contribute for the expressive antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of *V. condensata* leaves showed in this study.

#### 4. Conclusion

Taken together, all those findings suggested that EAP pretreatment presented a notable hepatoprotective potential associated with antioxidant, hypocholesterolemic, control of triglycerides levels and anti-inflammatory activities. For this reason, EAP should be further evaluated as a future remedy to prevent liver damage, dyslipidemia and inflammatory process.

#### Conflict of interest

"The authors declare no conflict of interest."

#### Acknowledgements

This work was supported by the grant from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG APQ 01403/14 and APQ 01798/14) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Profissional de Ensino Superior (CAPES). The authors are grateful to Dr Fátima Salimena for the botanical identification of the species, to Delfino Antônio Campos for technical assistance, to the Reproduction Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora for providing the rats, as well as the Chemistry Department of the Institute of Exact Sciences (UFJF) for NMR analysis and Research Center of Pharmaceutical Sciences for mass spectrometry data.

#### References

- Kuehn, B.M., 2009. FDA focuses on drugs and liver damage. *JAMA* 302 (4), 369–371. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2009.1019>.
- Madkour, F., Abdel-Daim, M., 2013. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Dunaliella salina* in paracetamol-induced acute toxicity in rats. *Indian J. Pharm. Sci.* 75 (6), 642. <http://dx.doi.org/10.4103/0250-474X.124747>.
- Hiraganahalli, D., Chandrasekaran, C., Dethle, S., Mundkinajeddu, D., Pandre, M., Balachandran, J., 2012. Hepatoprotective and antioxidant activity of standardized herbal extracts. *Pharmacogn. Mag.* 8 (30), 116. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1296-96553>.
- Wang, Y., Li, D., Cheng, N., Gao, H., Xue, X.F., Cao, W., Sun, L., 2015. Antioxidant and hepatoprotective activity of vitex honey against paracetamol induced liver damage in mice. *Food Funct.* 6, 2339–2349. <http://dx.doi.org/10.1039/c5fo00345h>.
- Ju, C., Reilly, T.P., Bourdii, M., Radonovich, M.F., Brady, J.N., George, J.W., Pohl, L.R., 2002. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 15 (12), 1504–1513. <http://dx.doi.org/10.1021/tx0255976>.
- Frutuoso, V.S., Guirã, M.R.R., Cordeiro, R.S.B., Martins, M.A., 1994. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. *Planta Med.* 60 (1), 21–25. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-959400>.
- Risso, W.E., Scarmínio, L.S., Moreira, E.G., 2010. Antinociceptive and toxicity evaluation of *Vernonia condensata* leaves. *Indian J. Exp. Biol.* 48 (8), 811–816.
- Silva, J.B., Temponi, V.S., Fernandes, F.V., Alves, G.A.D., Matos, D.M., Gasparetto, C.M., Ribeiro, A., Pinho, J.J.R.G., Alves, M.S., Sousa, O.V., 2011. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 8993–9008. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12128993>.
- Valverde, A.L., Cardoso, G.L.C., Pereira, N.A., Silva, A.J.R., Kuster, R.M., 2001. Analgesic

- and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. *Phytother. Res.* 15 (3), 263–264. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.733>.
- Silva, J.B., Temponi, V.S., Gasparetto, C.M., Fabri, R.L., Aragão, D.M.O., Pinto, N.C.C., Ribeiro, A., Scio, E., Vieira, G.D., Sousa, O.V., Alves, M.S., 2013. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): a promising source of antioxidants. *Oxid. Med. Cell Longev.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/698018>.
- Ola, S.S., Catia, G., Marzia, I., Francesco, V.F., Afolabi, A.A., Nadia, M., 2009. HPLC/DAD/MS characterization and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. *Food Chem.* 115, 1568–1574. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.013>.
- Iwalokun, B.A., Efedede, B.U., Alabi-Sofunde, J.A., Oduala, T., Magbagbeola, O.A., Akinwande, A.L., 2006. Hepatoprotective and antioxidant activities of *Vernonia amygdalina* on acetaminophen-induced hepatic damage in mice. *J. Med. Food* 9 (4), 524–530. <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2006.9.524>.
- Kuriakose, G.C., Kurup, M.G., 2010. Antioxidant and hepatoprotective of *Aphanizomenon flos-aquae* Linn against paracetamol intoxication in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 48 (11), 1123–1130.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
- Beutler, E., 1975. Red Cell Metabolism A Manual of Biochemical methods Second ed. Grune & Stratton, New York.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490.
- Kakkar, P., Das, B., Viswanathan, P.N., 1984. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian J. Biochem. Biophys.* 21 (2), 130–132.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1–2), 55–63.
- Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V., 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 3, 367–379. <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.1040752>.
- Vargas-Mendoza, N., Madrigal-Santillán, E., Morales-Gonzalez, A., Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C., González-Rubio, M.G.L., Gayosso-De-Lucio, J.A., Morales-González-Morales, J.A., 2014. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J. Hepatol.* 6 (3), 144–149. <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>.
- Özsoy, M.B., Pabuçoğlu, A., 2007. The effect of acetaminophen on oxidative modification of low-density lipoproteins in hypercholesterolemic rabbits. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 41 (1), 27–31. <http://dx.doi.org/10.3164/jcfn.2007004>.
- Buttar, H.S., Nera, E.A., Downie, R.H., 1976. Serum enzyme activities and hepatic triglyceride levels in acute and subacute acetaminophen-treated rats. *Toxicol* 6, 9–20. [http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X\(76\)90003-2](http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(76)90003-2).
- Aranes, A.A., Falé, P.L., Costa, L.C.B., Pacheco, R., Ascensão, L., Serralheiro, M.L., 2016. Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata*. *Braz. J. Pharm. Adv. Online Publ.* 28 July 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjph.2016.05.008>.
- Koppes, L.L., Twisk, J.W.R., Van Mechelen, W., Snel, J., Kemper, H., 2005. Cross-sectional and longitudinal relationships between alcohol consumption and lipids, blood pressure and body weight indices. *J. Stud. Alcohol.* 66 (6), 713–721. <http://dx.doi.org/10.15288/jsa.2005.66.713>.
- Pareek, A., Godavathi, A., Issarani, R., Nagori, B.P., 2013. Antioxidant and hepatoprotective activity of *Fagoni schweinfurthii* (Hadidi) extract in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in HepG2 cell line and rats. *J. Ethnopharmacol.* 150, 973–981. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.048>.
- Adam, G.O., Rahman, M.M., Lee, S.J., Kim, G.B., Kang, H.S., Kim, J.S., Kim, S.J., 2016. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* seed extract against acetaminophen-induced oxidative stress. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9 (3), 221–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.039>.
- Sabir, S.M., Ahmad, S.D., Hamid, A., Khan, M.Q., Athayde, M.L., Santos, D.B., Santos, D.B., Boligon, A.A., Rocha, J.B.T., 2012. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chem.* 131, 741–747. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.026>.
- Kiemer, A.K., Müller, C., Vollmar, A.M., 2002. Inhibition of LPS-induced nitric oxide and TNF- $\alpha$  production by  $\alpha$ -lipoic acid in rat Kupffer cells and in RAW 264.7 murine macrophages. *Immunol. Cell Boil.* 80 (6), 550–557. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1711.2002.01124.x>.
- Yang, E.J., Yim, E.Y., Song, G., Kim, G.O., Hyun, C.G., 2009. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. *Interdiscip. Toxicol.* 2 (4), 245–249. <http://dx.doi.org/10.2478/v10102-009-0022-2>.
- Oh, J.H., Lee, T.J., Park, J.W., Kwon, T.K., 2008. Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 599, 11–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.09.017>.
- Chen, G.G., Lau, W.Y., Lai, P., Chun, Y.S., Chak, E.C., Leung, B., Chui, A.K., 2002. Activation of Kupffer cells inhibits tumor growth in a murine model system. *Int. J. Cancer* 99 (5), 713–720. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10412>.
- Miki, H., Tokuhara, K., Oishi, M., Nakatake, R., Tanaka, Y., Kaibori, M., Kon, M., 2015. Japanese Kambo Saireito has a liver-protective effect through the inhibition of inducible nitric oxide synthase induction in primary cultured rat hepatocytes. *J. Parenter. Enter. Nutr.* <http://dx.doi.org/10.1177/0148607115575035>.
- Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y., Kim, H.P., 1999. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem. Pharmacol.* 58, 759–765. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00160-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00160-4).
- Imuro, Y., Gallucci, R.M., Luster, M.I., Kono, H., Thurman, R.G., 1997. Antibodies to tumor necrosis factor  $\alpha$  attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 26, 1530–1537. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510260621>.
- Sittisart, P., Chitsomboon, B., Kaminski, N.E., 2016. *Pseuderanthemum palatiferum* leaf extract inhibits the proinflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL-6 expression in LPS-activated macrophages. *Food Chem. Toxicol.* 97, 11–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.021>.
- Merfort, I., 1992. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* 31 (6), 2111–2113.
- Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N., 2005. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3821–3832.
- Johnston, K.L., Clifford, M.N., Morgan, L.M., 2003. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am. J. Clin. Nutr.* 78 (4), 728–733.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Iseki, K., 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int. J. Pharm.* 403 (1–2), 136–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>.
- Shimoda, H., Seki, E., Aitani, M., 2006. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *Complement. Altern. Med.* 6 (1), 1–9. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-6-9>.
- Khan, J., Saraf, S., Saraf, S., 2016. Preparation and evaluation of luteolin–phospholipid complex as an effective drug delivery tool against GalN/LPS induced liver damage. *Pharm. Dev. Technol.* 21 (4), 475–486. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2015.1022786>.
- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., Kohli, K., 2009. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm. Allergy-Drug Targets* 8 (3), 229–235. <http://dx.doi.org/10.2174/187152809788681029>.
- Simeonova, R., Kondeva-Burdina, M., Vitcheva, V., Krasteva, I., Manov, V., Mitcheva, M., 2014. Protective effects of the apigenin-O-C-diglucoiside saponarin from *Gypsophila trichotoma* on carbonyl tetrachloride-induced hepatotoxicity *in vitro/in vivo* in rats. *Phytomedicine* 21 (2), 148–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.07.014>.
- Salem, M.B., Affes, H., Ksouda, K., Dhoubi, R., Sahoun, Z., Hammami, S., Zeghal, K.M., 2015. Pharmacological studies of Artichoke leaf extract and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 70, 441–453. <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-015-0503-8>.
- Zhao, Y., Geng, C., Ma, Y., Huang, X., Chen, H., Cao, T., He, K., Wang, H., Zhang, X., Chen, J., 2014. UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis. *J. Ethnopharmacol.* 156, 147–154.