

IZABELA MARIA MONTEZANO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHEPATOTÓXICA DE DUAS ESPÉCIES
VEGETAIS POPULARMENTE CONHECIDAS COMO “QUINA”: *Strychnos
pseudoquina* A. St.-Hil. E *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

IZABELA MARIA MONTEZANO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHEPATOTÓXICA DE DUAS ESPÉCIES
VEGETAIS POPULARMENTE CONHECIDAS COMO “QUINA”: *Strychnos
pseudoquina* A. St.-Hil. E *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 14 de julho de 2009.

Profa. Elita Scio Fontes

Profa. Marisa Alves Nogueira Diaz

Profa. Tânia Toledo de Oliveira
(Coorientadora)

Prof. Cláudio César Fonseca
(Coorientador)

Prof. João Paulo Viana Leite
(Orientador)

Aos meus pais, Luiz Carlos e Geuza.

À minha irmã e companheira de sempre, Paula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, que me deu saúde, inteligência e perseverança para concluir mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Luiz e Geuza, que me deram a bênção da vida e sempre me apoiaram em tudo, sempre com palavras de amor e incentivo. Nunca poderei retribuir à altura.

À minha irmã Paula, presente em todos os momentos com seu carinho, afeto e amor incondicional. Meu anjo da guarda!

Ao Heitor, que sempre me apoiou em cada momento e que, apesar da “pequena” distância, esteve presente com muito amor, carinho e incentivos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela excelente formação acadêmica.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Professor João Paulo Viana Leite, pela orientação, apoio, confiança e pela preciosa oportunidade de realizar este trabalho.

Aos Professores Cláudio César Fonseca e Tânia Toledo de Oliveira por terem aceitado fazer parte deste trabalho com sua co-orientação, contribuindo com valiosos ensinamentos e sempre eliminando as dúvidas a eles levadas.

Às Professoras Marisa Alves Nogueira Diaz e Elita Scio Fontes, por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste trabalho, contribuindo com seus conhecimentos.

Às Professoras Sílvia das Graças Pompolo e Maria Catarina Megumi Kasuya, pela oportunidade de realizar parte deste trabalho em seus laboratórios.

Aos estagiários e colegas de trabalho Nayana, Thais, Filipe, Douglas e Isabella. A ajuda de vocês foi imprescindível para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao técnico do Laboratório de Biofármacos, José Geraldo, pela ajuda durante a realização dos experimentos.

Às amigas que conheci durante o mestrado, Rita, Patrícia e Larissa, pela amizade construída e pelas indispensáveis horas de descontração.

À amiga Luanna, pelo apoio, incentivo e amor de irmã que me ajudaram a chegar até aqui. Você foi fundamental!

Aos meus familiares que sempre estiveram presentes com palavras de apoio e carinho, apesar da distância.

À minha prima-irmã Sarah, pelo amor incondicional e sem palavras para descrever. Sempre presente desde o berço!

Ao Secretário do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola Eduardo Pereira Monteiro pelo carinho e pela contínua disponibilidade de ajuda.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram com a concretização desse trabalho e cujos nomes não foram citados aqui. Nunca me esquecerei de vocês.

Muito Obrigada!!!

BIOGRAFIA

Izabela Maria Montezano de Carvalho, nascida em Mutum, Minas Gerais, em doze de março de 1983, filha de Luiz Carlos de Carvalho e Geuza Maria dos Reis de Carvalho.

Graduada em Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa em março de 2007. Durante sua graduação foi estagiária no Laboratório de Bioquímica Nutricional, do Departamento de Nutrição e Saúde.

Em agosto de 2007, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, defendendo a dissertação em 14 de julho de 2009.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. Introdução	1
1.1 Importância do estudo das plantas medicinais para obtenção de novos fármacos.....	3
1.2 Etnofarmacologia.....	4
1.3 Hepatotoxicidade.....	6
1.4 Parâmetros bioquímicos para análise de hepatotoxicidade.....	8
1.5 Extratos Vegetais com ação antihepatotóxica.....	10
1.6 <i>Strychnos pseudoquina</i> A. St.-Hil.....	12
1.7 <i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum.....	15
1.8 Objetivos	17
1.8.1 Objetivos específicos	17
Referências Bibliográficas	19
2. Capítulo 1 – Avaliação da eficácia de extratos de cascas e folhas de <i>Strychnos pseudoquina</i> A. St.-Hil contra hepatotoxicidade induzida em ratos	30
2.1 Resumo.....	31
2.2 Abstract	32
2.3 Introdução.....	33
2.4 Materiais e Métodos.....	35
2.4.1 Material vegetal	35
2.4.2 Preparo dos extratos	35

2.4.3	Prospecção fitoquímica preliminar	35
2.4.4	Atividade antioxidante.....	36
2.4.5	Animais	36
2.4.6	Indução da hepatotoxicidade com paracetamol	37
2.4.7	Avaliação da função hepática	37
2.4.7.1	Análises de transaminases séricas e de albumina.....	38
2.4.7.2	Análise de fosfatase alcalina e de gama-glutamil transferase.....	38
2.4.7.3	Análises histológicas	38
2.4.8	Análises estatísticas	38
2.5	Resultados e Discussão	39
2.5.1	Análise fitoquímica por cromatografia de camada delgada (CCD).....	39
2.5.2	Atividade antioxidante dos extratos	40
2.5.3	Efeitos dos extratos sobre AST, ALT e ALB.....	41
2.5.4	Efeitos dos extratos sobre fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase.....	43
2.5.5	Histologia	44
2.6	Conclusão	48
2.7	Referências Bibliográficas	50
3.	Capítulo 2 - Avaliação da eficácia de extratos de folhas e cascas de <i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum contra hepatotoxicidade aguda induzida em ratos	55
3.1	Resumo.....	56
3.2	Abstract	56
3.3	Introdução.....	57
3.4	Material e Métodos.....	58
3.4.1	Material vegetal	58
3.4.2	Preparo dos extratos	58
3.4.3	Prospecção fitoquímica preliminar	59
3.4.4	Atividade sequestrante de DPPH.....	59

3.4.5 Animais	60
3.4.6 Indução da hepatotoxicidade com paracetamol	60
3.4.7 Avaliação da função hepática	61
3.4.8 Análises histológicas	61
3.4.9 Análise estatística	62
3.5 Resultados e Discussão	62
3.5.1 Análise fitoquímica preliminar	62
3.5.2 Atividade antioxidante dos extratos	62
3.5.3 Efeito hepatotóxico do paracetamol.....	63
3.5.4 Efeitos dos extratos sobre os parâmetros bioquímicos	64
3.5.5 Análise histológica.....	66
3.6 Conclusão	70
3.7 Referências Bibliográficas	72
4. Conclusões	77

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - Avaliação da eficácia de extratos de folhas e cascas de *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil contra hepatotoxicidade aguda induzida em ratos

Tabela 1 – Grupos de animais testados com extratos etanólicos de <i>S. pseudoquina</i>	37
Tabela 2 - Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos etanólicos de folhas e cascas de <i>S. pseudoquina</i>	39
Tabela 3 - Atividade sequestrante (%) do radical DPPH de extratos etanólicos de cascas e folhas de <i>S. pseudoquina</i> em diferentes concentrações, com respectivo IC ₅₀	40
Tabela 4 - Efeito da administração dos extratos etanólicos de cascas e folhas de <i>S. pseudoquina</i> nos parâmetros sorológicos de AST, ALT e ALB.....	41
Tabela 5 - Efeito da administração de extratos etanólicos de cascas e folhas de <i>S. pseudoquina</i> nos parâmetros sorológicos de fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (γ-GT).....	43
Tabela 6 - Morfometria percentual (média ± erro padrão da média) de elementos do parênquima lobular (hepatócitos com e sem depósitos de lipídios, sinusóides); e do estroma não-lobular (veia centro-lobular, veia porta e bainha perivascularobiliar) de fígado de ratos submetidos a tratamentos com extratos de <i>S. pseudoquina</i>	46

Capítulo 2 - Avaliação da eficácia de extratos de folhas e cascas de *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum contra hepatotoxicidade aguda induzida em ratos

Tabela 1 – Grupos testados com extratos etanólicos de <i>C. hexandra</i>	61
Tabela 2 – Atividade sequestrante do radical DPPH dos extratos etanólicos de cascas e folhas de <i>C. hexandra</i>	62
Tabela 3 - Efeito da administração dos extratos etanólicos secos de cascas e folhas de <i>C. hexandra</i> sobre os parâmetros bioquímicos de fígado em ratos.....	64
Tabela 4 - Morfometria percentual (média ± erro padrão da média) de elementos do parênquima lobular (hepatócitos com e sem depósitos de lipídios, sinusóides); e do estroma não-lobular (veia centro-lobular, veia porta e bainha perivascularobiliar) de fígado de ratos submetidos a tratamentos com extratos de <i>C. hexandra</i>	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização e anatomia do fígado humano	6
Figura 2 - <i>Strychnos pseudoquina</i> St. Hil.	14
Figura 3 - <i>Strychnos pseudoquina</i> St. Hil (planta seca).....	14
Figura 4 - <i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum.	16
Figura 5 - <i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum (planta seca)	16

Capítulo 1 - Avaliação da eficácia de extratos de folhas e cascas de *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil contra hepatotoxicidade aguda induzida em ratos

Figura 1: Tecido hepático normal (GI) (aumento de 200X – HE).....	44
Figura 2: Tecido hepático submetido à injúria com paracetamol (GII) (aumento de 200X – HE).....	45
Figura 3: Tecido hepático submetido à injúria com paracetamol e tratado com extrato etanólico de folhas de <i>S. pseudoquina</i> 200mg/kg (GVII) (aumento de 200X – HE).....	45

Capítulo 2 - Avaliação da eficácia de extratos de folhas e cascas de *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum contra hepatotoxicidade aguda induzida em ratos

Figura 1: Tecido hepático normal (GI) (aumento de 200X – HE).....	66
Figura 2: Tecido hepático submetido à injúria com paracetamol (GII) (aumento de 200X – HE).....	67
Figura 3: Tecido hepático submetido à injúria com paracetamol e tratado com extrato etanólico de cascas de <i>C. hexandra</i> 100mg/kg (GIII) (aumento de 200X – HE).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

µg: micrograma

γ-GT: gama glutamil transferase

Aa = Absorbância da amostra

Ac = Absorbância do controle

ALB: albumina

ANOVA: Análise de variância

CCD: Cromatografia em camada delgada

CETEA/UFMG: Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais

CO₂: dióxido de carbono

DPPH[•]: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

FA: fosfatase alcalina

HE: hematoxilina e eosina

GSH: glutationa

IC₅₀: quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH[•].

kg: quilograma

mg: miligrama

mL: mililitros

mM: milimolar

nm: nanômetro

OMS: Organização Mundial da Saúde

ALT: alanina amino transferase

AST: aspartato amino transferase

UV: ultra-violeta

RESUMO

CARVALHO, Izabela Maria Montezano de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Avaliação da atividade antihepatotóxica de duas espécies vegetais popularmente conhecidas como “quina”: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil. E *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Coorientadores: Claudio César Fonseca e Tânia Toledo de Oliveira.

O Brasil possui a maior e mais diversa flora mundial, sendo detentor de cerca de 22% de todas as espécies de plantas superiores do planeta. Ao mesmo tempo, o conhecimento tradicional de várias culturas brasileiras está associado a esse patrimônio genético, sobretudo com o uso de plantas na medicina popular. Nesse contexto, o presente trabalho teve como propósito avaliar o potencial antihepatotóxico de extratos obtidos de cascas e folhas de duas espécies vegetais utilizadas popularmente com esta finalidade, as quinas *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., família Loganiaceae, e *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum, família Rubiaceae. Foi realizada a prospecção fitoquímica preliminar, por cromatografia em camada delgada, dos extratos etanólicos de cascas e folhas, separadamente, destas espécies e avaliado o potencial antioxidante *in vitro*. Posteriormente, ensaios biológicos foram conduzidos para investigar a capacidade dos extratos avaliados em reverter injúria hepática induzida por paracetamol em ratos. Os testes *in vivo* antihepatotóxico foram realizados empregando-se três doses distintas, sendo ao final do experimento, avaliados parâmetros bioquímicos e histológicos dos animais. Pela prospecção fitoquímica preliminar observaram-se diferenças na composição dos grupos de metabólitos secundários avaliados entre os extratos de cascas e folhas para cada uma das espécies. Em relação ao potencial antioxidante, em ambas as espécies, os extratos provenientes das cascas demonstraram melhores resultados em relação aos da folha. No ensaio biológico da espécie *S. pseudoquina*, o extrato de cascas (100mg/kg) e de folhas (200mg/kg) apresentaram possível efeito benéfico no metabolismo do sistema hepatobiliar. Por outro lado, os resultados indicam a incapacidade desses extratos

em reverter as lesões hepatocelulares causadas pelo paracetamol. No mesmo modelo de ensaio conduzido para a *C. hexandra*, observou-se fraco efeito antihepatotóxico em toxicidade induzida por paracetamol do extrato de cascas (100mg/kg), enquanto o extrato das folhas não mostrou atividade. Observações histológicas confirmam o efeito benéfico dos extratos de cascas de ambas as espécies contra injúrias do fígado induzidas por paracetamol em ratos. Possível mecanismo pode envolver a atividade antioxidante desse extrato, promovido principalmente por metabólitos polifenólicos.

ABSTRACT

CARVALHO, Izabela Maria Montezano de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Evaluation of antihepatotoxic activity of two plant species popularly known as “quina”: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil. and *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum.** Advisor: João Paulo Viana Leite. Co-Advisor: Claudio César Fonseca e Tânia Toledo de Oliveira.

Brazil possesses the most abundant and diverse plant life in the world, home to nearly 22% of all higher plant species on the planet. Traditional knowledge of many of these Brazilian plants is associated to this genetic patrimony, especially the use of plants in popular medicine. Therefore, the proposal of the present work was to evaluate the antihepatotoxic potential of extracts obtained of bark and leafs from plant species popularly used for this purpose, *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., family: Loganiaceae and *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum, family: Rubiaceae. A preliminary phytochemical analysis was separately performed on the ethanol extract of bark and leafs by thin film chromatography; as well as an *in vitro* evaluation of antioxidant potential. Subsequently, biological tests were conducted to investigate the capacity of the evaluated extracts to revert hepatic damage induced by paracetamol in rats. *In vivo* antihepatotoxic tests were performed by employing three distinctive doses and thereafter, evaluating biochemical and histological parameters of the animals. From the preliminary phytochemical analysis, differences in the composition of evaluated secondary metabolite groups were observed between the bark and leaf extracts for each of the studied species. In relation to antioxidant potential, in both species, the bark extracts showed better results compared with leafs. In the biological test of the species *S. pseudoquina*, the bark (100mg/kg) and leaf (200mg/kg) extracts presented possible beneficiary effects on the metabolism of the hepatobiliary system. On the other hand, results indicated the incapability of these extracts to revert the hepatocellular damages caused by the paracetamol. In the same test model conducted for *C. hexandra*, a weak antihepatotoxic effect was observed in toxicity induced by paracetamol from the bark extract (100mg/kg), while the leaf extract showed no activity. Histological

observations confirmed the beneficiary effect of the bark extracts from both species against liver damage induced by paracetamol in rats. A possible acting mechanism may involve antioxidant activity of this extract, principally promoted by polyphenolic metabolites.

1. INTRODUÇÃO

O homem sempre buscou no reino vegetal recursos para sua sobrevivência, tanto para a sua alimentação, levando-o ao aprendizado de práticas agrícolas, quanto para a cura de suas doenças, através do uso de plantas medicinais. A construção do arsenal de informações sobre o uso terapêutico de plantas ao longo da história baseou-se, principalmente, no conhecimento intuitivo dos homens que aprenderam a diferenciar as ervas benéficas daquelas tóxicas à saúde (Leite, 2008).

Nesse contexto, o Brasil, país de maior biodiversidade do planeta, apresenta adicionalmente uma rica diversidade social e cultural que detém valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais. Essa conjunção estabelece cenário com grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas que visam à descoberta de novos fármacos e desperta interesses de comunidades científicas internacionais para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos.

O emprego de plantas medicinais é muitas vezes o único recurso terapêutico de algumas comunidades e grupos étnicos, sendo o seu uso relacionado a origem da espécie humana. O uso popular de plantas medicinais contribui fortemente para a divulgação de propriedades terapêuticas de muitas espécies vegetais prescritas com frequência na fitoterapia, apesar de não terem sempre sua composição química, efeitos toxicológicos e farmacológicos conhecidos. Dessa forma, na medicina popular de diversas nações existe a prática do consumo de plantas medicinais, sustentado pelas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante várias gerações (Maciel et al., 2002).

Ao longo da história, as plantas medicinais sempre tiveram importante papel como ferramenta de cura das patologias humanas, seja pelo uso tradicional, ou como fonte para o desenvolvimento de fármacos modernos. Não obstante, mesmo com a grande evolução da medicina, ocorrida principalmente a partir da segunda metade do século XX, ainda coexiste a falta de acesso a esses avanços, inclusive de fármacos, por grande parte da população mundial. Esse contexto de exclusão de parte da sociedade aos novos fármacos, associado com o fácil acesso e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribui para a grande utilização desses recursos terapêuticos pelas

populações de diversos países, sobretudo em desenvolvimento (Veiga Junior et al., 2005). Vale também ressaltar, o crescimento na pesquisa de novos medicamentos a partir de plantas, seja nos laboratórios de instituições de ensino e pesquisa, como também nas indústrias farmacêuticas, incentivado pelo aumento de consumo desses instrumentos terapêuticos pela população, que reflete no crescimento do mercado farmacêutico de fitoterápicos. Esse cenário mostra que o conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais se tornou hoje um forte aliado às pesquisas científicas de novos fármacos, incorporando a essa ferramenta terapêutica os subsídios de segurança e eficácia, essenciais para a sua incorporação em sistemas oficiais de saúde.

Mesmo sendo recente no cenário de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, o campo de bioprospecção farmacêutica dos recursos vegetais tem despertado grande interesse de pesquisadores, envolvendo estudos em áreas multidisciplinares, como a botânica, engenharia florestal, toxicologia, farmacologia, química, nutrição e tecnologia farmacêutica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a abundante fonte medicinal natural: a flora mundial (Maciel et al, 2002).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi difundido com a contribuição de várias culturas, como indígena, africana, européia, asiática e outras, e por ser um país cujo território possui grande diversidade biológica distribuída em cinco grandes biomas (floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga) garante uma megadiversidade, tornando-se fonte potencial para o desenvolvimento de produtos florestais não-madeireiros, como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é ainda pouco explorado, quando comparado com o que ocorre em alguns outros países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (Calixto, 2000; Rates, 2001; Veiga-Junior, 2008).

As pesquisas de investigação das propriedades terapêuticas de plantas usadas na medicina popular devem envolver diferentes etapas, como o acesso a informação tradicional e ao patrimônio genético, domesticação agrônômica, extração, isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos; investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados; transformações químicas de princípios ativos; estudo da relação entre estrutura-atividade e dos mecanismos de ação dos constituintes ativos e, por

fim, os procedimentos para a formulação e produção de fitoterápicos. Assim, a integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficiente para descobertas de novos medicamentos.

1.1. Importância do estudo das plantas medicinais para obtenção de novos fármacos

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de novas drogas, não somente quando seus extratos são usados em formulações fitoterápicas, mas também quando seus constituintes isolados e purificados são usados diretamente como agentes terapêuticos e como protótipos para a síntese de compostos farmacologicamente ativos (Calixto et al., 2001).

As plantas medicinais desempenham, portanto, papel importante na medicina moderna. Primeiramente, porque podem fornecer metabólitos secundários extremamente complexos, muitos dos quais dificilmente seriam obtidos por via de síntese química. Em segundo lugar, os metabólitos secundários, também conhecidos como produtos naturais, podem ser quimicamente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como modelos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (Turolla et al., 2006). Por fim, mas não menos importante, extratos vegetais padronizados podem ser obtidos para a produção de medicamentos fitoterápicos (Leite, 2008).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microrganismos, e 3% de animais (Calixto et al., 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são originárias de plantas e um número significativo trata-se de drogas semi-sintéticas obtidas de precursores naturais (Rates, 2001). Além disso, o aumento significativo do interesse da população pelas terapias naturais verificado nas últimas décadas, tem resultado em expansão na pesquisa de fitoterápicos tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos.

É notável nas últimas décadas a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas. Assim, alguns grupos farmacêuticos passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de medicamentos fitoterápicos e sua produção em escala industrial. Entretanto, o novo avanço dos medicamentos fitoterápicos, longe de ser volta ao passado, caracteriza-se pela busca de produção em escala industrial, com comprovação científica de segurança e eficácia de uso, diferentemente das formas artesanais que caracterizaram os estágios iniciais de sua utilização (Turolla et al., 2006).

O crescimento do mercado mundial de fitoterápicos é estimado em 10% a 20% ao ano e as principais razões que impulsionaram esse grande crescimento nas últimas décadas podem ser atribuídas à valorização de uma vida de hábitos mais saudáveis e, conseqüentemente, o consumo de produtos naturais; à descoberta de novos princípios ativos nas plantas; à comprovação científica de fitoterápicos. O custo da pesquisa e desenvolvimento de um novo fitoterápico oriundo de uma planta usada na medicina popular é mais viável em relação aquele sintético, sendo privilegiados os países possuidores de megabiodiversidade, como o Brasil. O desenvolvimento de medicamentos sintéticos custa em torno de US\$ 500 milhões, podendo cair a cerca de US\$ 50 milhões no caso dos fitoterápicos e chegar ao mercado em intervalo de tempo dez vezes menor (Souza et al., 2008).

As plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos são amplamente utilizados no Brasil pela medicina popular, porém deve-se ressaltar que o emprego de algumas plantas usadas pelo arsenal terapêutico podem, também, provocar efeitos adversos, toxicidade e apresentar contra-indicações de uso (Alexandre, 2008). Diante disto, torna-se de extrema importância a condução de estudos científicos que comprovem a eficácia e segurança dos efeitos atribuídos a tais plantas ou fitoterápicos.

1.2. Etnofarmacologia

Para pesquisa no campo da fitoterapia faz-se fundamental a forma como os estudos são conduzidos, e alguns aspectos devem ser considerados, como o acesso ao conhecimento popular e o uso racional das espécies. O estudo etnobotânico consiste na avaliação da interação humana com todos os aspectos do meio ambiente, através de levantamentos nas comunidades

tradicionais sobre a utilização das plantas nos afazeres diários (Souza et al., 2006). Já a etnofarmacologia baseia-se particularmente nas plantas empregadas na medicina popular, valorizando, sobretudo, conjuntamente os aspectos étnicos e culturais. Deste modo, na conduta etnofarmacológica, para interpretar corretamente uma propriedade terapêutica de determinada planta usada na medicina tradicional, é fundamental conhecer suas formas específicas de cultivo, coleta, preparo e administração (Sixel et al., 2008).

Segundo Albuquerque et al. (2006), esta forma de abordagem etnodirigida consiste na seleção de espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos de plantas em determinados contextos de uso, enfatizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito de seus recursos naturais e aplicação que fazem deles em seus sistemas de saúde e doença.

A partir da década de 1990, houve um incremento significativo nas pesquisas etnofarmacológicas, devido à teoria de que o sucesso na descoberta de novos fármacos oriundos de fontes vegetais seria maior a partir de pesquisas etnodirigidas (Albuquerque, 2006). Alguns exemplos confirmam essa tendência. Slish et al. (1999) compararam a percentagem de confirmação da atividade biológica, nesse caso monitorada por contrações induzidas em músculo liso, apresentada por espécies acessadas de forma etnodirigida e com espécies coletadas de forma randômica. Os resultados mostraram que, pelo estudo etnodirigido, o efeito observado foi positivo para 13% das 31 amostras acessadas; enquanto que, para o estudo aleatório, nenhum efeito foi observado em 32 amostras analisadas, indicando assim, a maior possibilidade de sucesso ao se buscar compostos bioativos de plantas quando se faz o acesso do patrimônio genético pela estratégia etnodirigida. Khafagi e Dewedar (2000) pesquisaram plantas com efeito vasoativo, também comparando os resultados de amostras acessadas de forma etnodirigida com aquelas obtidas de forma randômica. Das espécies etnodirecionadas, 83,3% apresentaram algum efeito relaxante no tecido vascular, enquanto que das espécies escolhidas de forma randômica, 41,7% apresentaram tal propriedade.

Tendo em vista os resultados promissores da pesquisa etnofarmacológica, deve-se ressaltar a importância do seu rigor metodológico e suas implicações éticas, no contexto das discussões atuais sobre o acesso a

conhecimentos associados à biodiversidade brasileira e retorno de resultados das pesquisas (Albuquerque, 2006).

1.3. Hepatotoxicidade

O fígado é o órgão mais volumoso do corpo humano, pesando cerca de 1.400 a 1.600g em no adulto, correspondente a aproximadamente 2,5% do peso corporal. Situa-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, junto à superfície inferior do diafragma (Oliveira, 2007).

A unidade funcional deste órgão é o lóbulo hepático, uma estrutura de forma poliédrica com 0,8 a 2 mm de diâmetro. No lóbulo hepático, os hepatócitos se dispõem em lâminas contínuas e unicelulares que se distribuem de forma radial partindo da veia centro-lobular (Guyton e Hall, 2002).

No local de junção entre os lóbulos há um conjunto de estruturas denominado espaço-porta, composto por um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos, envolvidos por uma bainha de tecido conjuntivo (Junqueira e Carneiro, 1995).

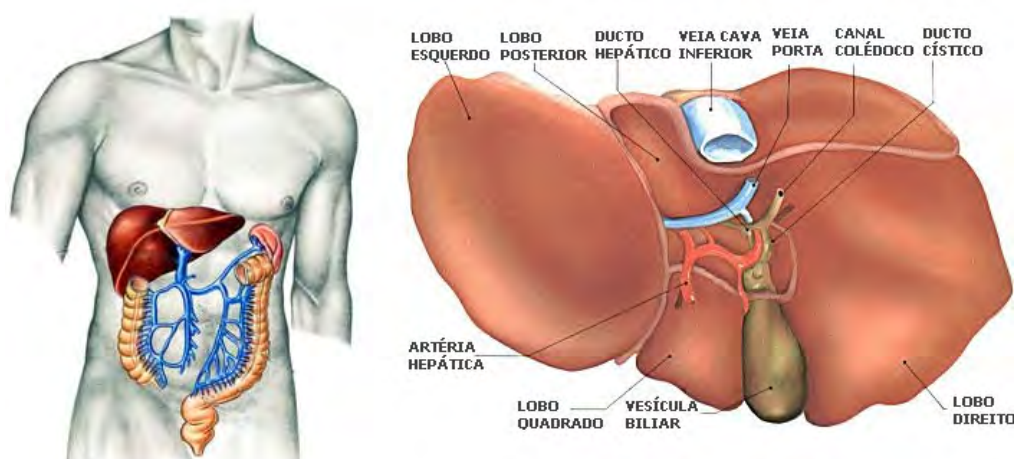


Figura 1 – Localização e anatomia do fígado humano

A maior parte do sangue que chega ao fígado é oriundo da veia porta, levando o material absorvido pelos intestinos, com exceção de parte dos lipídios, que é transportada pela via linfática (Junqueira e Carneiro, 1995).

Do espaço-porta, o sangue venoso e arterial é distribuído para a rede de vasos sinusóides que ocupam o espaço entre as lâminas de hepatócitos. O sangue percorre os sinusóides e é recolhido pela veia centro-lobular (ramo inicial da veia hepática), de onde flui para a veia cava inferior (Junqueira e Carneiro, 1995).

O fígado é um órgão que desempenha várias funções como o metabolismo de substâncias cujos metabólitos gerados são transportados para outras partes do organismo. O órgão desempenha também funções específicas para o organismo no metabolismo de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídios), e no armazenamento de micronutrientes como vitaminas e ferro (Guyton e Hall, 2002; Klover e Mooney, 2004). Além disso, é o principal órgão envolvido na biotransformação e eliminação de compostos químicos de natureza exógena e endógena, aos quais o organismo está constantemente exposto (Oliveira, 2007). Entre os compostos exógenos estão os fármacos, poluentes ambientais e outros (Hodgson e Rose, 2007). Quando a exposição a tais fatores supera a capacidade de seu metabolismo, o resultado é a injúria hepática, que pode ser hepatocelular ou no sistema biliar (Setty et al., 2007).

No Brasil, as doenças gastroenterológicas representam a 7^a causa de mortalidade, sendo a cirrose hepática a primeira causa de óbito deste grupo de doenças. Estima-se que, nos Estados Unidos, nas últimas três décadas, cerca de quatro milhões de pessoas tenham sido infectadas por diferentes tipos de hepatite, com o número de casos novos mantendo-se, atualmente, em torno de 30 mil por ano. Para o mundo como um todo, a OMS estima a existência de cerca de 170 milhões de portadores crônicos de hepatite (Passos, 2003).

Muitos medicamentos empregados rotineiramente na prática clínica podem apresentar como reação indesejável a agressão ao fígado, o que poderá limitar seu uso e os benefícios esperados. O dano hepático induzido por medicamentos pode ser hepatocelular, o que se traduzirá por aumento das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) devido ao extravasamento destas enzimas citoplasmáticas; ou colestático, o que levará ao aumento de bilirrubinas, da fosfatase alcalina e da *gama*-glutamil transferase (γ -GT). Além disso, o dano hepático está frequentemente associado à necrose celular, aumento da peroxidação lipídica e depleção dos níveis teciduais de glutathione (GSH) (Bertolami, 2005; Setty et al, 2007). Existem alguns mecanismos que podem ser desencadeados pelos

medicamentos que, dependendo da relação dose-resposta, podem induzir a alterações hepáticas em diversos níveis celulares, como por exemplo, reações envolvendo as enzimas do citocromo P-450 que podem alterar a homeostase do cálcio intracelular culminando com a lise celular, alterações nas proteínas de transporte da membrana canalicular e a interferência no fluxo biliar levando à colestase intra-hepática. A biotransformação de fármacos no fígado também pode gerar produtos que desencadeiam resposta imune indesejada (citotoxicidade mediada por anticorpos), com estresse oxidativo resultante da agressão às mitocôndrias pelo fármaco, o qual pode desregular a oxidação dos ácidos graxos e a produção de energia na célula. Esse evento pode resultar na elevação do metabolismo anaeróbico, produzindo acidose láctica e acúmulo de triglicérides das células (esteatose hepática) (Lee, 2003; Jaeschke et al., 2002).

1.4. Parâmetros bioquímicos para análise de hepatotoxicidade

Como já foi mencionado, o tecido hepático submetido a estímulos nocivos pode sofrer danos funcionais ou estruturais, transitórios ou permanentes, dependendo da força e da duração do estímulo. Nesse sentido, o paracetamol tem sido usado em diversos modelos experimentais para indução de hepatotoxicidade em animais, pois pode levar a danos como cirrose, proliferação celular hepática e necrose celular (Khatri et al., 2009). Existem três vias de metabolismo para o paracetamol ingerido, sendo essas, a sulfatação, glicuronidação e metabolismo pelo sistema enzimático do citocromo p-450. Os dois primeiros processos são responsáveis por cerca de 90% do metabolismo da droga, enquanto o terceiro, por aproximadamente 5%, estando este relacionado com a overdose, pois quando o paracetamol é ingerido em excesso, as vias de glicuronidação e sulfatação tornam-se saturadas. O metabolismo via citocromo p-450 produz a *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI), a qual é diretamente tóxica ao fígado. Normalmente ela é destoxificada pelo fígado por ação da glutathiona (GSH), com a formação do conjugado paracetamol-GSH. Porém, quando a NAPQI excede a capacidade de destoxificação da GSH, aquela se liga covalentemente às proteínas dos hepatócitos causando a morte celular e as subseqüentes disfunções hepáticas,

sendo esse evento refletido por alterações nos testes de função hepática (Bartlett, 2004; Mladenovic et al., 2009).

Embora as funções hepáticas afetem os níveis séricos de muitos metabólitos, alguns testes correlacionam-se muito bem com a integridade funcional e estrutural do fígado, sendo essas determinações convencionalmente denominadas testes da função hepática. Dentre esses testes destacam-se níveis séricos de albumina (capacidade de sintetizar proteínas), aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) (integridade hepatocelular) e fosfatase alcalina (FA) e *gama*-glutamil transferase (γ -GT) (sistema hepatobiliar) (Abrahão, 2007).

AST e ALT catalisam a transferência dos amino-grupos de aspartato e alanina, respectivamente, para o *alfa*-cetoglutarato formando piruvato ou oxalacetato e glutamato, respectivamente (Ozer et al., 2008). Geralmente estas enzimas são avaliadas para o diagnóstico de lesão aos hepatócitos, pois sua liberação através da membrana plasmática danificada eleva seus níveis na circulação sistêmica. Acredita-se que a ALT seja o indicador mais específico da lesão hepática, uma vez que a AST, apesar de estar associada com a toxicidade hepática, pode aparecer elevada em enfermidades de outros órgãos, como coração e músculo esquelético (Oliveira, 2004). Além disso, a ALT em ratos possui meia-vida mais longa (~40-60 horas) do que a AST (~12 horas) (Ramaiah, 2007), o que possibilita a detecção de injúria hepatocelular aguda e sub-aguda pela avaliação da ALT, uma vez que os níveis de AST podem voltar rapidamente ao normal.

Novas formas de mensuração da ALT para um diagnóstico mais específico de hepatotoxicidade têm sido propostas, minimizando a ocorrência de resultados falsos positivos. Ozer et al. (2008) propõem a avaliação separada das isozimas ALT1 e ALT2, uma vez que foi identificada imunorreatividade (IR) para ALT1 em hepatócitos, células do epitélio tubular renal e células epiteliais das glândulas salivares, enquanto que para ALT2, a IR foi detectada no córtex da glândula adrenal, neurônios, miócitos cardíacos, fibras musculares esqueléticas e pâncreas endócrino (Lindblom et al., 2007).

Já as enzimas FA e γ -GT mostram pequena atividade em tecido hepático normal, mas se elevam em uma grande quantidade de transtornos que afetam a drenagem da bile, como no caso de obstruções que bloqueiam o seu conduto normal ou enfermidade hepática causada por álcool ou

medicamentos, que bloqueiam o fluxo da bile nos canalículos dentro do fígado. Desta forma, quando o fluxo da bile é prejudicado há um aumento na síntese de FA e γ -GT em poucas horas, e elas são então liberadas na circulação por mecanismos ainda desconhecidos. A γ -GT hepática está localizada particularmente nas células epiteliais dos ductos biliares. Possui múltiplas funções catalíticas, incluindo a transferência de grupos γ -glutamil para aminoácidos e peptídeos, e degradação da glutatona tornando-a disponível como fonte de cisteína para síntese protéica (Oliveira et al., 2000; Ozer et al., 2008). Já a FA está associada às membranas celulares em diversos tecidos; no fígado está localizada principalmente nos canalículos biliares e células epiteliais dos ductos biliares. É responsável pela hidrólise de monofosfatos em pH alcalino (Ramaiah, 2007). Como ela pode ser encontrada em outros órgãos (ossos, placenta e intestino), sua avaliação é realizada em conjunto com a γ -GT para assegurar que o aumento da FA provém verdadeiramente do sistema biliar ou do fígado (Oliveira, 2004). Em humanos, níveis aumentados de FA têm sido associados com colestase induzida por drogas. Em ratos, a atividade da γ -GT é considerada um marcador confiável para colestase quando comparada à atividade da FA (Ozer et al., 2008).

1.5. Extratos vegetais com ação antihepatotóxica

Atualmente, várias drogas convencionais ou sintéticas usadas no tratamento de doenças hepáticas apresentam inconveniências para o usuário e algumas vezes podem ter sérios efeitos colaterais, o que torna necessário a busca de novos fármacos que atuem sobre patologias do fígado (Rao et al., 2006).

Como anteriormente mencionado, o uso das plantas faz parte da cultura de várias populações, desde aquelas que ainda mantêm costumes antigos até o homem atual que tem acesso aos grandes avanços tecnológicos. De acordo com a OMS, 80% da humanidade dependem da medicina tradicional para tratamento de doenças. Isto corresponde a aproximadamente cinco bilhões de pessoas e, ainda 85% desta medicina tradicional envolvem o uso de extratos vegetais (David et al., 2004).

Na medicina tradicional de diferentes países existe o emprego de drogas vegetais no tratamento de doenças hepáticas. Nesse contexto, há relatos na

literatura nacional e internacional sobre a utilização de plantas com atribuição de efeito hepatoprotetor (profilático) ou antihepatotóxico (curativo), porém a maioria delas ainda não tem sua eficácia cientificamente comprovada. A investigação científica de algumas dessas drogas vegetais tem levado à constatação de atividade hepatoprotetora/antihepatotóxica, indicando uma promissora fonte para a descoberta de novos fármacos com aplicação em doenças hepáticas (Rao et al., 2006; Achliya et al., 2004).

Setty et al (2007) avaliaram a atividade hepatoprotetora da espécie *Calotropis procera* em ratos sob injúria hepática induzida por paracetamol e verificaram que o extrato etanólico das flores da planta reduziu significativamente os elevados níveis sanguíneos de AST, ALT, fosfatase alcalina, bilirrubina e colesterol, indicando que a administração prévia do extrato estudado foi capaz de proteger o fígado dos agravos causados pelo paracetamol.

Porchezian e Ansari (2005) verificaram efeito hepatoprotetor significativo ao estudar a espécie *Abutilon indicum*. Ao induzir dano hepático com tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos e tratá-los com extrato aquoso das folhas da planta, observaram importante redução dos níveis sanguíneos de AST, ALT, fosfatase alcalina, bilirrubinas direta e total e aumento dos níveis de GSH no tecido hepático. Sanmugapriya e Venkataraman (2006) também estudaram efeito hepatoprotetor em modelo de dano induzido por CCl₄ em ratos. Eles testaram o extrato aquoso das sementes de *Strychnos potatorum* e verificaram que nos grupos tratados com a planta, o aumento das enzimas séricas provocado pelo CCl₄ foi atenuado e os cortes histológicos dos mesmos não apresentaram necrose celular.

Em modelo experimental desenvolvido por Kumar e colaboradores (2004), o dano hepático em ratos foi induzido por paracetamol e tioacetamida. Os animais foram tratados com extrato alcoólico das folhas de *Trianthema portulacastrum* e foram avaliados os parâmetros bioquímicos sanguíneos AST, ALT, fosfatase alcalina, bilirrubina sérica e proteínas totais. Em ambos os grupos, houve redução significativa de todos os parâmetros elevados induzidos por paracetamol e tioacetamida e aumento nas proteínas totais.

Jain et al. (2008) avaliaram também em ratos com hepatotoxicidade induzida por CCl₄, os efeitos hepatoprotetor e antioxidante de extratos alcoólico e aquoso de folhas de *Mormodica dioica*. Foram verificados melhores

parâmetros bioquímicos sanguíneos em todos os grupos teste, principalmente naqueles tratados com extrato alcoólico, sendo o resultado também evidenciado nos cortes histológicos.

Bolkent et al (2005) estudaram o papel do extrato aquoso de *Melissa officinalis* em fígados de ratos hiperlipidêmicos. Verificaram melhora nos parâmetros bioquímicos de avaliação da atividade hepática, redução dos níveis de colesterol sérico e lipídios totais, aumento dos níveis séricos de GSH e redução da peroxidação lipídica.

Em relação às plantas usadas popularmente no Brasil, são algumas associadas ao tratamento de doenças hepáticas: *Baccharis trimera*, *Peumus boldus*, *Passiflora sp.*, *Spiranthea odorantissima*, *Erythrina verna*, *Strychnos pseudoquina*, *Anona squamosa*, *Maytenus ilicifolia*, *Plecranthus gratissima*, *Portulaca pilosa*, *Strychnos pseudoquina*, entre muitas outras (Luz, 2001; Souza e Felfili, 2006). Souza e Felfili (2006) estudaram o uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso no estado de Goiás, e verificaram que a população do município utiliza plantas medicinais, seja para enfermidades cotidianas, seja para trabalhos terapêuticos alternativos e por médicos naturalistas. Para uma parte das plantas relatadas é atribuído algum efeito benéfico ao sistema hepático, como por exemplo, *Artemisia verlotorum* (males do fígado em geral), *Carduus benedictus* (icterícia), *Phyllanthus niruri* (cálculos biliares), *Amburana cearensis* (males do fígado em geral e icterícia), *Croton adenodontus* (má digestão) e *Erythrina verna* (males do fígado em geral).

Apesar da extensa utilização de cascas, raízes e folhas de plantas com atribuições medicinais, esta prática ainda carece de pesquisas que comprovem sua segurança e sua eficácia.

1.6. *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil

Espécies vegetais do gênero *Strychnos*, da família Loganiaceae, têm relato de uso na medicina tradicional de diversos países da América de Sul e Central, sendo algumas delas popularmente conhecidas como “quina”, nome esse atribuído oficialmente (Farmacopéia Brasileira) a espécies da região amazônica pertencentes ao gênero *Cinchona* spp.. Diferentes espécies conhecidas como quina são usadas popularmente pelos seus efeitos antimalárico, tônico, afrodisíaco, antitérmico e anti-anêmico, tendo essas

atividades atribuídas principalmente a classe de metabólitos secundários conhecida como alcalóides quinolínicos (Pinheiro et al., 2004; Leite, 2008).

O gênero *Strychnos* é constituído por cerca de 150 a 200 espécies, que ocorrem praticamente em todo o planeta, mas especialmente nas Américas do Sul e Central, na África, na Ásia e na Austrália (Aimi et al., 1989). São espécies encontradas predominantemente na forma de cipós ou arbustos de pequeno porte (Lorenzi, 1998). Apenas a espécie *S. pseudoquina*, nativa da América do Sul, se apresenta como uma árvore de médio porte, tendo a sua altura variando de 3 a 5 m de altura (Silva et al., 2005).

O Brasil é um dos centros de diversidade de espécies do gênero *Strychnos*, onde são encontradas cerca de 62 espécies das 71 registradas para a América. Só para a região amazônica, Ducke (1955) registrou a presença de 43 espécies.

Uma importante classe de metabólitos secundários conhecida de algumas espécies do gênero *Strychnos* é a dos alcalóides (Philippe et al., 2004), já identificado em algumas espécies como *Strychnos nux-vomica* (Sefcovic et al., 1968; Bisset, 1976; Baser e Bisset, 1982; Gadi-Biala et al., 1996), *Strychnos ignatii* (Bisset e Walker, 1974; Bratati e Bisset, 1990), *Strychnos wallichiana* (Bisset, 1976), *Strychnos lucida* (Shaw e De la Lande, 1948; Bisset, 1976), *Strychnos icaia* (Kambu et al., 1980), *Strychnos tabescana* e *Strychnos panamensis* (Marini- Bettolo et al., 1972).

Embora algumas espécies sejam tóxicas, muitas vêm sendo utilizadas popularmente para diversas afecções. A maioria das espécies usadas na medicina popular emprega o chá das folhas ou cascas (Angenot et al., 1990; Frederich et al., 2000).

A *Strychnos pseudoquina* St. Hil. (Figuras 2 e 3) é nativa do cerrado brasileiro e usada na medicina popular para tratamento de doenças hepáticas e gástricas, febres e malária (Andrade-Neto et al., 2003).



Figura 2 - *Strychnos pseudoquina* St. Hil.



Figura 3 - *Strychnos pseudoquina* St. Hil (planta seca).

Estudos fitoquímicos realizados nesta espécie têm demonstrado a presença de alcalóides e flavonóides (Nicoletti et al., 1984; Silva et al., 2005). Já foram identificados nessa espécie alcalóides bisnorhidroxitixiferina, diabolina e 11-metoxidiabolina, como também, dos flavonóides isoramnetina e estricnobiflavona (Delle-Monache et al., 1969; Nicoletti et al., 1984). Outro estudo demonstrou que, apesar do seu nome popular de “quina” estar associado a algumas plantas usadas tradicionalmente para o tratamento de malária, não foi evidenciada atividade antimalárica para extratos da planta, sendo também não detectada a presença do alcalóide quinina, presente em outras espécies também conhecidas como quina (Andrade-Neto et al., 2003).

Apesar de muitos alcalóides terem demonstrado potencial biológico, exibindo atividades antimicrobiana e antitumoral (Frederich et al., 2000;

Kingston et al., 1978), alguns desses são conhecidos por serem tóxicos (Wang e Peng, 1996; Mei et al., 2004; Ansah et al., 2005). Da mesma forma, os flavonóides, apesar de vários resultados indicarem atividade farmacológica e benéfico potencial para a saúde humana (Park et al., 2004; Toker et al., 2004), muitos também são descritos como possuidores de potencial mutagênico (Suzuki et al., 1991). Nunes (2008) avaliou o potencial mutagênico de extratos etanólicos de folhas e de cascas de *S. pseudoquina*, e verificou atividade mutagênica para o extrato etanólico das folhas.

Apesar de não terem sido encontrados estudos sobre a *S. pseudoquina* que avaliem seu efeito no metabolismo hepático, alguns trabalhos que citam a utilização e/ou ação de outras espécies da família Loganiaceae em doenças relacionadas ao fígado estão disponíveis (Sanmugapriya e Venkataraman, 2006; Estomba et al., 2006).

Como várias espécies do gênero *Strychnos* são conhecidas por conterem componentes potencialmente tóxicos, faz-se importante também conduzir investigação específica que vise avaliar a presença de componentes tóxicos em extratos provenientes dessas plantas (Angenot et al., 1990).

1.7. *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum.

Segundo Pereira e Barbosa (2004), a família Rubiaceae ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermas, sendo que no Brasil são estimados cerca de 96 gêneros. No mundo todo, abrange cerca de 637 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies que são classificadas em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae), basicamente tropicais (Robbrecht, 1988). Os grupos de produtos naturais biossintetizados característicos destas subfamílias incluem iridóides, alcalóides indolo-terpênicos, antraquinonas, triterpenos, e derivados de ácidos fenólicos (Trevisan et al., 1993).

Os estudos recentes sobre plantas do gênero *Coutarea* abordam principalmente questões pertinentes à distribuição, filogenia e ecologia (Ivizi e Araújo, 1997; McDowell et al., 2003). Para a espécie *Coutarea latiflora* foi detectada atividade antimalárica *in vitro* e hipoglicemiante (Barbosa-Filho et al., 2005), bem como atividade hemolítica em seres humanos (Roca, 2003).

Coutarea hexandra (Jacq.) K. Schum (Figuras 4 e 5), é conhecida popularmente como murta-do-mato, também como quina, quina-branca, quina-de-pernambuco, quina-do-pará, quina-do-piauí, quina-quina, quineira e outros. Apresenta-se como uma árvore ou arvoreta, 3-5m altura, de tronco tortuoso e copa globosa, com inflorescência rósea, sendo usada bastante como planta ornamental em paisagismo. É nativa do Brasil, amplamente distribuída em regiões úmidas da Amazônia e Mata Atlântica. Na medicina popular, a casca de sabor fortemente amarga, é usada contra febre intermitente, malária, paludismo, feridas e inflamações (Pereira & Barbosa, 2004).



Figura 4 - *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum.



Figura 5 - *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum (planta seca)

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonóides (Reher et al., 1983) e cumarinas (Aquino et al., 1988) em extratos de *C. hexandra*. Algumas das cumarinas isoladas da *C. hexandra* também têm sido sintetizadas (Linuma et al., 1987; Lucena et al., 2006).

O uso popular de casca de *C. hexandra* como abortiva foi avaliado em ratas e foi observado efeito anti-fertilizante após tratamento com a fração acetato de etila desta casca enquanto a fração hexânica, embora não tenha apresentado efeito anti-fertilizante, interferiu no crescimento fetal e aumentou a mortalidade intra-uterina (Almeida et al., 1990). Reabsorção fetal foi observada na presença do extrato etanólico da casca de *C. hexandra* (Almeida et al., 1988) e atividade antiinflamatória (Falcão et al., 2005). O extrato aquoso da *C. hexandra* administrado para camundongos e ratos por via oral, possui efeito antiinflamatório e antinociceptivo em doses de 100, 200 e 400mg/kg mantendo-se o volume administrado de 0,1 mL/10g de animal. O efeito antinociceptivo do extrato aquoso não está relacionado a ativação dos sistemas opióide e adenosina e, ao menos em parte, é devido a atuação no sistema nervoso central (Lucena et al., 2006).

Estudos sobre a atividade antihepatotóxica da *C. hexandra* ainda não estão disponíveis, porém, pesquisas que avaliam a atividade de outras espécies da família Rubiaceae no metabolismo hepático já se encontram publicados (Sadasivan, et al., 2006; Ahmed, et al., 2001; Rao et al., 2006).

Apesar do extenso uso etnomedicinal de preparados com cascas e folhas de *C. hexandra* no tratamento de doenças hepáticas, não foram encontrados na literatura estudos que avaliem esta atividade da espécie.

1.8 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antihepatotóxico de extratos de cascas e folhas provenientes de duas espécies vegetais popularmente conhecidas como quina, *Strychnos pseudoquina* e *Coutarea hexandra*.

1.8.1 Objetivos específicos

- Avaliar a ação antihepatotóxica de extratos etanólicos de cascas e folhas de *Strychnos pseudoquina* e de *Coutarea hexandra* em ratos com injúrias hepáticas induzidas por paracetamol, monitorando-se parâmetros bioquímicos e histomorfométricos;

- Realizar a prospecção fitoquímica preliminar dos extratos etanólicos de cascas e folhas de *Strychnos pseudoquina* e *Coutarea hexandra*;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos etanólicos de cascas e folhas de *Strychnos pseudoquina* e *Coutarea hexandra* em diferentes concentrações.

Referências Bibliográficas:

Abrahão, S.A. **Qualidade da bebida e atividade antioxidante do café *in vivo* e *in vitro***. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2007. 92p. (Dissertação, Mestrado em Ciência dos Alimentos).

Achyla, G.S.; Wadodkar, S.G.; Dorle, A.K. Evaluation of hepatoprotective effect of Amalkadi Ghrita against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.90, p.229-232, 2004.

Ahmed, B.; Alam, T.; Khan, S.A. Hepatoprotective activity of *Luffa echinata* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**. v.76, p.187-189, 2001.

Aimi, N.; Sakai, S.I.; Ban, Y. Alkaloids of *Strychnos* and *Gardneria* species. In: **The Alkaloids**. California: Academic Press, INC, p. 1-69, 1989.

Albuquerque, U.P.; Hanazaki, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, p.678-689, 2006.

Alexandre, R.F.; Bagatini, F.; Simões, C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.18, n.1, p.117-126, 2008.

Almeida, F.R.C.; Rao, V.S.N.; Gadelha, M.G.T.; Matos, F.J.A. Estudo sobre a atividade antifertilizante de *Coutarea Hexandra* Schum. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.71, p.69-71, 1990.

Andrade-Neto, V.F.; Brandão, M.G.L.; Stehmann, J.R.; Oliveira, L.A.; Krettli, A.U. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 87, p. 253–256, 2003.

Angenot L.; Quertim-Leclercq J.; Bisset N.G. South american *Strychnos* species. Ethnobotany (except curare) and alkaloid screening. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 28, p.1 - 52, 1990.

Ansah C.; Khan A.; Gooderham N.J. *In vitro* genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. **Toxicology**. v. 208, p. 141–147, 2005.

Aquino, R.; Dagostino, M.; Desimone, F.; Pizza C. Plant metabolites - 10.4-arylcoumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**. v. 27, p. 1827-1830, 1988.

Barbosa-Filho, J.M.; Vasconcelos, T.H.C.; Alencar, A.A.; Batista, L.M.; Oliveira, R.A.G.; Guedes, D.N.; Falcão, H.S.; Moura, M.D.; Diniz, M.F.F.M.; Modesto-Filho, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North América with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 392-413, 2005.

Bartlett, D. Acetaminophen Toxicity. **Journal of Emergency Nursing**. v.30, n.3, p.281-283. 2004.

Baser, K.H.C.; Bisset, N.G. Alkaloids of Sri Lankan *Strychnos nux-vomica*. **Phytochemistry**. v.21, p.1423–1429, 1982.

Bertolami, M.C. Mecanismos de hepatotoxicidade. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 85, p. 25-27, 2005.

Bisset, N.G. The Asian species of *Strychnos*. Part IV. **The alkaloids**. v.39, p.263–315, 1976.

Bisset, N.G.; Walker, M.D. Alkaloids from the stem bark of *Strychnos ignatii*. **Phytochemistry**. v.13, p.525–526, 1974.

Bolkent, S.; Yanardag, R.; Karabulut-Bulan, O.; Yesilyaprak, B. Protective role of *Melissa of cinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological

and biochemical study. **Journal of Ethnopharmacology**. v.99, p.391-398, 2005.

Bratati, D.; Bisset, N.G. Alkaloids of *Strychnos ignatii*. **Planta Medica** v.56, p.133, 1990.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological research**. v.33, p.179-189, 2000.

Calixto, J.B.; Scheidt C.; Otuki, M.; Santos, A. R. S. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v.2, p.261-279, 2001.

David, J.P.L.; Nascimento, J.A.P.; David, J.M. Produtos Fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**. v.16, p.71-76, 2004.

Dellemonache F.; Aldo P. T.; Bettolo G. B. M. Occurrence of nor dihydrotoxiferine in *Strychnos pseudoquina* St. Hil. **Tetrahedron Letter**. v. 25, p. 2009-2012, 1969.

Ducke, A. O gênero *Strychnos* no Brasil. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte**. v.30, p.1-64, 1965.

Estomba, D.; Ladio, A.; Lozada, M. Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 103, p.109-119, 2006.

Falcão, H.S.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; Dantas, H.F.; Diniz, M.F.F.M.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p.381-391, 2005.

Frederich M.; Hayette M.P.; Tits M.; De Mol P.; Angenot L. *In vitro* activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 43, p. 2328–2331, 2000.

Gadi-Biala, R.; Tits, M.; Wauters, J.N.; Angenot, L. A new HPLC method for the assay of alkaloids in *Strychnos nux-vomica* and *Strychnos ignatii*. **Fitoterapia**. v.67, p.163–165, 1996.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Hodgson, E.; Rose, R.L. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. **Pharmacology & Therapeutics**. v.113, p.420-428, 2007.

linuma, M.; Tanaka, T.; Hamada, K.; Mizuno, M.; Asai, F.; Reher, G.; Kraus, L. Revised structure of neofl avone in *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**. v.26, p.3096- 3097, 1987.

Ivizi, L.; Araujo, G.M. Phenology of 14 tree species of a deciduous seasonal forest in Uberlandia, MG, central Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**. v. 40, p. 883-892, 1997.

Jaeschke, H.; Gores, G.J.; Cedebaum, A.I. Mechanisms of Hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**. v.65, p.166-176, 2002.

Jain, A.; Soni, M.; Deb, L.; Jain, A.; Rout, S.P.; Gupta, V.B.; Krishna, K.L. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Mormodica dioica* Roxb. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v.115, p.61-66, 2008.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Kambu, K.; Coune, C.; Angenot, L. Nouveaux alcaloides des racines du *Strychnos icaia*. **Planta Medica**. v.37, p.161–164, 1980.

Khafagi, I.K.; Dewedar, A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**. v.71, p.365–376, 2000.

Khatri, A.; Garg, A.; Agrawal, S.S. Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea* L. and stem bark of *Tecomella undulate*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.122, p.1-5, 2009.

Kingston D.G.; Gerhart B.B.; Ionescu F.; Mangino M.M.; Sami S.M. Plant anticancer agents V: new bisindole alkaloids from *Tabernaemontana johnstonii* stem bark. **Journal Pharmacology Science**. v. 67, n. 2, p. 249–251, 1978.

Klover, P.J.; Mooney, R.A. Hepatocytes: Critical for glucose homeostasis. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 36, p.753-758, 2004.

Kumar, G.; Sharmila, B.; Pappa, P.V.; Sundararajan, M.; Pandian, M.R. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.92, p.37-40, 2004.

Lee, W.M. Drug-induced hepatotoxicity. **The New England Journal of Medicine**. v.349, p.474-485, 2003.

Leite, J.P.V. Desenvolvimento da Fitoterapia. In.: **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu. Capítulo 1, p. 3-20, 2008.

Lindblom, P.; Rafter, I.; Copley, C.; Andersson, U.; Hedberg, J.J.; Berg, A.L.; Samuelsson, A.; Hellmold, H.; Cotgreave, I.; Glinghammar, B. Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum—differential tissue expression using novel antibodies. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.466, p.66-77, 2007.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

Lucena, J.E.X.; Bispo, M.D.; Nunes, R.S.; Cavalcant, S.C.H.; Silva, F.T.; Marçal, R.M.; Antonioli, A.R. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.16, n.1, p.67-72, 2006.

Luz, F.J.F. Plantas medicinais de uso popular em Boa Vista, Roraima, Brasil. **Horticultura Brasileira**. v.19, p.88-96, 2001.

Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga Jr, V.F.; Grynberg, N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v.25, p.429-438, 2002.

Marini-Bettolo, G.B.; Ciasca, M.A.; Galeffi, C.; Bisset, N.G.; Krukoff, B.A. The occurrence of strychnine and brucine in an American species of *Strychnos*. **Phytochemistry**. v.11, p.381–384, 1972.

McDowell, T.; Volovsek, M.; Manos, P. Biogeography of exostema (Rubiaceae) in the Caribbean region in light of molecular phylogenetic analyses. **Systematic Botany**. v. 28, p. 431-441, 2003.

Mei N.; Heflich R.H.; Chou M.W.; Chen T. Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver cell gene of transgenic big blue rats. **Chemical Research Toxicology**. v. 17, p. 814–818, 2004.

Mladenovic, D.; Radosavljevic, T.; Ninkovic, M.; Vucevic, D.; Jesic-Vukicevic, R.; Todorovic, V. Liver antioxidant capacity in the early phase of acute paracetamol-induced liver injury in mice. **Food and Chemical Toxicology**. v.47, p.866–870, 2009.

Nicoletti M.; Goulart M.O.; Lima R.A.; Goulart A.E.; Dellemonache F.; Marini-Bettolo G.B. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. **Journal of Natural Products**. v. 47, n.6, p. 953–957, 1984.

Nunes, L.G. **Avaliação de mutagenicidade *in vitro* e prospecção fitoquímica de três espécies vegetais: *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum e *Bathysa cuspidata* (A. St.-Hil.) Hook.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2008. 100p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica Agrícola).

Oliveira, E.M.S. **Efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos.** Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2007. 65p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

Oliveira, I.M.V.; Paulo, R.H.; Fujimori, E. Efeito da restrição energética na atividade hepática da *gama*-glutamyltranspeptidase e nos níveis de glutathione. **Revista de Nutrição**. v.13, n.1, p.51-56, 2000.

Oliveira, S.T. **Alterações de compostos nitrogenados não protéicos em cães e gatos.** Seminário: Alterações de compostos nitrogenados em cães e gatos/UFRGS, 2004. Disponível em: http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/alteracoes_nnp.pdf. Acesso em 25/03/09.

Ozer, J.; Ratner, M.; Shaw, M.; Bailey, W.; Schomaker, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**. v.245, p.194-205, 2008.

Park S.; Hahm K.B.; Oh T.Y.; Jin J.H.; Choue R. Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Diagnostic Disease Science**. v. 49, n.3, p. 384–394, 2004.

Passos, A.D.C. Aspectos epidemiológicos das hepatites virais. **Medicina, Ribeirão Preto**. v.36, p.30-36, 2003

Pereira, M. S.; Barbosa, M. R. V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. **Acta Botanica Brasilica**. v.18, n.2, p.305-318, 2004.

Pereira, M. S.; Barbosa, M. R. V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamília Rubioideae. **Acta Botanica Brasilica**. v.20, n.2, p.455-470, 2006.

Philippe, G.; Angenot, L.; Tits, M.; Frederich, M. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. **Toxicon**. v. 44, p. 405–416, 2004.

Pinheiro, M.L.B.; Rocha, A.F.I.; Fernandes, M.A.N.; Monte, F.J.Q.; Villar, J.D.F.; Cruz, E.R. **Química Nova**. v.27, n.2, p.188-192, 2004.

Porchezian, E.; Ansari, S.H. Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. **Phytomedicine**. v.12, p.62-64, 2005.

Ramaiah, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**. v.45, p.1551-1557, 2007.

Rao, G.M.; Rao, C.V.; Pushpangadan, P.; Shirwaikar, A. Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia Cordifolia* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**. v.103, p.484-490, 2006.

Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v.39, p.603-613, 2001.

Reher, G.; Kraus, L.; Sinnwell, V.; Konig, W.A. A neoflavonoid from *Coutarea hexandra* (Rubiaceae). **Phytochemistry**. v. 22, p. 1524-1525, 1983.

Roca, B. Rhabdomyolysis and hemolysis after use of *Coutarea latiflora*. **The American journal of medicine**, v. 115, p. 677-677, 2003.

Robbrecht E. Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contribution to a new subfamilial classification. **Opera Botanica Belgica**. v. 1, p. 1-272, 1988.

Sadasivan, S.; Latha, P.G.; Sasikumar, J.M.; Rajashekaram, S.; Shyamal, S.; Shine, V.J. Hepatoprotective studies on *Hedyotis corymbosa* (L.) Lam. **Journal of Ethnopharmacology**. v.106, p.245-249, 2006.

Sanmugapriya, E.; Venkataraman, S. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.105, p.154-156, 2006.

Sefcovic, P.; Dubravkova, L.; Torto, F.G. Die Alkaloide der Blätter von *Strychnos nux-vomica* L. **Planta Medica**. v.16, p.143–146, 1968.

Setty, S.R.; Quereshi, A.A.; Swamy, V.; Patil, T.; Prakash, T.; Prabhu, K.; Gouda, A.V. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**. v.78, p.451-454, 2007.

Shaw, F.H.; De la Lande, J.S. The alkaloids of *Strychnos lucida*. **Australian Journal of Experimental Biological and Medicinal Sciences**. v.26, p.199-203, 1948.

Silva, M.A.; Souza-Brito, A.R.M.; Hiruma-Lima, C.A.; Santos, L.C.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.3, p.256-267, 2005.

Sixel, P.J.; Pecinalli, N.R. **Características farmacológicas gerais das plantas medicinais**. Disponível em: <http://www.cff.org.br/revistas/47/infcaracteristicas.pdf>. Acesso em: 18/01/2008.

Sligh, D.F.; Ueda, H.; Arvigo, R.; Balick, M.J. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**. v.66, p.159-165, 1999.

Souza, C.D.; Felfili, M.J. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v.20, p.135-142, 2006.

Souza, J.A.; Miranda, E.M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis**. Disponível em: <http://www.cpafac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/planmed.htm>. Acesso em: 18/01/2008.

Suzuki S.; Takada T.; Sugawara Y.; Muto T.; Kominami R. Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. **Japan Journal Cancer Research**. v. 82, n.10, p.1061–1064, 1991.

Toker G.; Ku P.E.; Memisoglu M.; Yesilada, E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). **Journal Ethnopharmacology**. v. 95, p. 393–397, 2004.

Trevisan L.M.V.; Bolzani V. S.; Lopes M.N.; Young M.C.; Braga M.R.; Dietrich S.M.; Gottlieb, R. Problemas de Classificação de Rubiaceae: Tentativas de Solução Via Química Micromolecular. **XV Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares** (XV RESEM), livro de Resumos, p.31, 1993.

Turolla, M.S.R.; Nascimento, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, p.289-306, 2006.

Veiga-Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v.28, n.3, p.519-528, 2005.

Veiga-Junior, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p.308-313, 2008.

Wang C.; Peng C. The mutagenicities of alkaloids and N-nitrosoguvacoline from betel quid. **Mutation Research**. v. 360, p. 165–171, 1996.

CAPÍTULO 1

**Avaliação da eficácia de extratos de folhas e cascas de
Strychnos pseudoquina A. St.-Hil contra hepatotoxicidade aguda
induzida em ratos**

Avaliação da eficácia de extratos de folhas e cascas de *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil contra hepatotoxicidade aguda induzida em ratos

Resumo

Diferentes partes da planta *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil. (Loganiaceae), nativa do cerrado brasileiro, são utilizadas na medicina popular brasileira, principalmente para tratamento de desordens hepáticas. O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito antihepatotóxico de extratos etanólicos de cascas e folhas em diferentes doses (100, 200, 300 mg/Kg peso corporal, oralmente) de *Strychnos pseudoquina* contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol em ratos. Parâmetros bioquímicos como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina (ALB), fosfatase alcalina (FA) e *gama*-glutamil transferase (γ -GT), foram avaliados. As observações bioquímicas foram suplementadas com exames histológicos de seções de fígado dos ratos. Os resultados dos parâmetros bioquímicos permitem sugerir que os extratos de cascas (100 mg/Kg) e de folhas (200 mg/Kg) apresentam possível efeito colerético ou colagogo, com diminuição significativa nos níveis de FA e γ -GT, embora não tenha sido observado diferença significativa na reversão da injúria hepatocelular induzida por paracetamol nas doses administradas. No entanto, pelos resultados obtidos dos parâmetros bioquímicos, com respaldo do estudo histológico, pode-se observar que a administração do extrato das folhas de *S. pseudoquina* agravou o quadro de injúria hepatocelular induzida por paracetamol, principalmente pelo aumento do número de hepatócitos com depósitos de lipídios e de sinusóides. Já essa ação não foi observada para o extrato das cascas, que, pela análise dos dados histológicos, não se verificou diferença entre as doses administradas desse extrato com o grupo controle. Os extratos também exibiram atividade sequestrante de radicais livres pelo teste do DPPH, sendo essa atividade maior para as cascas. Esse estudo sugere que possível efeito dos extratos sobre o fígado poderia ser atribuído a presença de compostos polifenólicos, como flavonóides e taninos nos extratos, sendo que no caso das cascas, compostos alcaloídicos e cumarínicos também poderiam estar relacionados com a atividade.

Abstract

Different parts of the plant *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil. (Loganiaceae), native to the Brazilian Cerrado, are used in popular Brazilian medicine, principally for the treatment of hepatic disorders. The objective of the present study was to evaluate the antihepatotoxic effect of bark and leaf ethanol extracts from *Strychnos pseudoquina* at different doses (100, 200 and 300 mg/kg body weight, orally induced) against hepatotoxicity, induced by paracetamol in rats. Biochemical parameters such as aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB), alkaline phosphatase (FA) and gamma glutamyl transferase (γ -GT) were evaluated. Biochemical observations were supplemented with histological exams of liver sections of the rats. Results from the biochemical parameters suggested that bark (100 mg/kg) and leaf (200 mg/kg) extracts presented possible choleric or cholagogic effects with significant reduction of FA γ -GT levels; nevertheless, no significant difference was observed in the reversal of hepatocellular induced damage by paracetamol at the administered doses. However, from the results obtained by the biochemical parameters and supported by the histological study, it could be observed that administration of the *S. pseudoquina* leaf extracts aggravated the hepatocellular injury induced by paracetamol, principally by the increase in number of hepatocytes with lipid and sinusoid deposits. This action was not observed for bark extracts, which, from analysis of the histological data, showed no difference between the doses administered with this extract and the control group. The extracts also exhibited sequestering activity of free radicals from the DPPH tests, with greater activity being observed from the bark. This study suggested that possible extract effects on the liver may be attributed to the presence of polyphenolic compounds, such as flavonoids and tannins in the extracts, whereas in the bark, alkaloidal and coumarin compounds can also be related to activity.

1. Introdução

Os recursos vegetais desempenham um papel importante na medicina moderna, uma vez que biossintetizam metabólitos secundários que podem interagir com receptores do organismo humano, exercendo ação terapêutica ou toxicológica. Assim, a investigação científica das propriedades medicinais das plantas pode ser direcionada para a obtenção de fármacos. A legislação brasileira, pela sua Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004), discrimina duas formas de aproveitamento de plantas para o desenvolvimento de medicamentos. A primeira trata-se do emprego do metabólito secundário purificado, passando esse a constituir o princípio ativo de uma formulação farmacêutica, recebendo a denominação de fitofármacos. A segunda possibilidade trata-se da obtenção de fitoterápicos, no qual se faz uso do extrato vegetal bruto ou semi-purificado, de forma padronizada, cuja mistura complexa de metabólitos secundários estará presente na formulação (Ministério da Saúde - Brasil, 2004). Além disso, na gênese de novos fármacos, os produtos naturais isolados de plantas podem ser utilizados como protótipo para a síntese química, ou emprestarem seu esqueleto estrutural para a realização de modificações estruturais (Turolla e Nascimento, 2006).

Outro aspecto das plantas medicinais diz respeito ao seu emprego na medicina popular, fazendo parte da cultura de várias populações tradicionais brasileiras. Nesse contexto deve-se ressaltar que os conhecimentos empíricos acumulados no passado sobre as propriedades medicinais das plantas, aliados aos avanços científicos mais recentes, podem contribuir para o desenvolvimento de um instrumento terapêutico mais eficaz, seguro e de baixo custo. No entanto, a investigação científica dessas práticas populares faz-se importante, uma vez que as plantas medicinais também podem apresentar efeitos adversos, toxicidade e contra-indicações de uso (Alexandre et al., 2008).

Na medicina tradicional de diferentes países existe o emprego de fitoterápicos para o tratamento de doenças do fígado. Sabe-se que o sistema hepático está envolvido na manutenção de importantes funções metabólicas e destoxificação de substâncias exógenas e endógenas como drogas, infecções virais e alcoolismo crônico. Quando a exposição a tais fatores supera a capacidade de seu metabolismo, o resultado é a injúria hepática (Setty et al.,

2007). A investigação científica de algumas drogas vegetais popularmente utilizadas tem levado à comprovação de atividade antihepatotóxica, indicando uma promissora fonte para a descoberta de novos fármacos com aplicação em doenças hepáticas (Rao et al., 2006; Achliya, et al., 2004). Além disso, na pesquisa por espécies vegetais com ação antihepatotóxica, estudos têm associado essa atividade com a capacidade antioxidante dos extratos de plantas, uma vez que os processos oxidativos podem estar envolvidos na gênese de algumas patologias hepáticas (Kumar et al., 2004; Bolkent et al., 2005; Porchezian e Ansari, 2005; Sanmugapriya e Venkataraman, 2006; Setty et al., 2007; Jain et al., 2008).

No Brasil, algumas espécies conhecidas como quina, pertencentes ao gênero *Sthychnos*, família Loganiaceae, são empregadas na medicina popular, que as apontam como fonte promissora de tratamento de doenças hepáticas, embora algumas destas espécies sejam tóxicas (Botsaris, 2007). Dentre estas, as cascas do caule de *S. pseudoquina* A. St.-Hil., conhecida popularmente como quina-mineira ou quina-do-cerrado, apesar de ser amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças hepáticas e problemas estomacais, não foram encontrados relatos na literatura que comprovem a eficácia dessa ação (Almeida et al., 1998; Silva et al., 2005).

A *S. pseudoquina* é nativa do bioma cerrado brasileiro, sendo encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul e Tocantins. Trata-se de uma árvore com cerca de 4 a 9 metros de altura e tronco tortuoso, com até 40 cm de diâmetro, casca bastante grossa e folhas simples (Almeida et al., 1998).

Segundo Silva et al. (2005), a *S. pseudoquina* apresenta alcalóides e flavonóides em sua constituição, sendo atribuída atividade antiulcerogênica ao extrato metanólico de suas folhas. Tendo em vista o seu uso popular amplamente difundido para o tratamento de enfermidades hepáticas e a escassez de estudos que comprovem sua eficácia neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a composição fitoquímica, a atividade antihepatotóxica *in vivo*, e a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de cascas e folhas de *S. pseudoquina*.

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal

As cascas e folhas de *S. pseudoquina* foram coletadas no município de Uberlândia no estado de Minas Gerais. O material foi coletado em bioma de cerrado, em abril de 2007 e identificado pelo botânico André Furtado Carvalho. Foram depositadas exsiccatas no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU 10936). As partes da planta foram separadas, secadas em sala com circulação de ar e à temperatura ambiente, protegidas da incidência direta de luz e, posteriormente, pulverizadas em moinhos de faca.

2.2. Preparo dos extratos

Os materiais vegetais secos de *S. pseudoquina* (400g de cada parte do vegetal) foram submetidos à percolação exaustiva com etanol 92° e os extratos concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Para completa remoção dos solventes, os extratos etanólicos foram liofilizados, obtendo-se 82,8 g (20,7% p/p) e 84,4 g (21,1% p/p) de extratos secos de cascas e de folhas, respectivamente.

2.3. Prospecção fitoquímica preliminar

Os extratos etanólicos foram submetidos às análises fitoquímicas preliminares para investigar as principais classes de metabólitos secundários, os quais podem estar relacionados às atividades atribuídas para essa planta na medicina popular. Testes para identificação de triterpenos/esteróides, compostos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, antraquinonas, glicosídeos cardiotônicos, saponinas e alcalóides foram realizados por cromatografia em camada delgada, utilizando-se folhas de alumínio cobertas com sílica gel GF254 (Merck ®) de espessura 0,25 mm e 20 cm de comprimento, com diferentes sistemas de eluição. Os reagentes borrifados nas folhas cromatográficas para identificar a presença das classes de metabólitos foram o reagente de Lieberman-Burchard (esteróides/triterpenos); cloreto férrico 1% (taninos); cloreto de alumínio 5% em etanol (flavonóides); solução

etanólica de hidróxido de potássio 5% (cumarinas, fluorescência azul em UV_{365nm}; derivados antraquinônicos, mancha vermelha); reagente de Kedde (glicosídeos cardiotônicos); anisaldeído sulfúrico (saponinas); e reagente de Dragendorff (alcalóides) (Wagner et al., 1984).

2.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada utilizando-se o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) de acordo com Blois (1958). Nesta forma, o radical DPPH[•] absorve luz ultravioleta na faixa de 517 nm, e desaparece sob redução pelo composto antioxidante. Diferentes quantidades (1,0; 10,0; 50,0; e 100,0µg) de cada extrato foram diluídas em 1,0 mL de metanol, obtendo-se quatro diferentes soluções. De cada uma destas soluções, foi retirada uma alíquota de 0,3 mL, à qual foram adicionados 2,7 mL da solução de DPPH[•] (0,07mM) preparada diariamente e armazenada em frasco âmbar e sob refrigeração (4°C). Para os tubos controle, foram adicionados os mesmos volumes de reagentes, porém no lugar do extrato foi utilizado somente o seu veículo, metanol. A absorbância a 517 nm foi mensurada com auxílio de espectrofotômetro marca T70+UV/VIS, 30 minutos após o início da reação. Uma redução na absorbância a 517 nm da solução mistura de extrato e DPPH[•] indica aumento na sua atividade, a qual é dada como porcentagem de captura do radical DPPH[•]. Cada determinação foi realizada em triplicata. A porcentagem de DPPH[•] remanescente foi calculada a partir da equação:

$$\% \text{ de captura do radical DPPH}^{\bullet} = [(A_c - A_a)/A_c] \times 100\%$$

Onde: A_c = Absorbância do controle

A_a = Absorbância da amostra

2.5. Animais

Foram utilizados 48 ratos *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, pesando em média 280g, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas de polietileno com tampa metálica e assoalho forrado com maravalha (6 animais por gaiola), cada uma correspondendo a um grupo de seis animais, mantidas

em ambiente climatizado ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração comercial (Labina - Purina®) e água “ad libitum”, no Laboratório Biofármacos I da UFV.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG - Protocolo 122/2008).

2.6. Indução de hepatotoxicidade com paracetamol

A hepatotoxicidade foi induzida por administração oral de paracetamol na dose de 2g/kg de peso animal, dividida em cinco dias consecutivos. O paracetamol foi administrado a todos os grupos de seis animais, exceto para o grupo I, utilizado como controle. O grupo II recebeu somente o paracetamol, sem uso de extrato vegetal. Durante 30 dias após a administração do paracetamol os grupos GIII a GVIII receberam os extratos de casca ou de folhas, nas dosagens descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos de animais testados com extratos etanólicos de *S. pseudoquina*

Grupo	Agente indutor de hepatotoxicidade	Extrato etanólico	n	Dose (mg de extrato /kg animal/dia)
G I	-	-	6	-
G II	paracetamol	-	6	-
G III	paracetamol	casca	6	100
G IV	paracetamol	casca	6	200
G V	paracetamol	casca	6	300
G VI	paracetamol	folhas	6	100
G VII	paracetamol	folhas	6	200
G VIII	paracetamol	folhas	6	300

2.7. Avaliação da função hepática

Após 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por inalação de CO_2 (após 12 horas de jejum) e o sangue, retirado por punção cardíaca, foi centrifugado por 15 minutos a $7100 \times g$ para separação do soro e utilizado para

as estimacão de parâmetros bioquímicos. Todas as análises no soro foram realizadas em equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé) utilizando kits da marca BIOCLIN®

2.7.1 Análises de transaminases séricas e de albumina

As atividades de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT) foram estimadas segundo Bergmeyer et al. (1976) e expressas em U/L, de forma a avaliar a capacidade dos extratos de regeneração da integridade hepatocelular. As dosagens de albumina (ALB) foram realizadas segundo método de Doumas et al. (1971) e os resultados expressos em g/dL.

2.7.2. Análise de fosfatase alcalina e de gama-glutamil transferase

As atividades de fosfatase alcalina (FA) e de albumina e *gama*-glutamil transferase (γ -GT) foram estimadas de forma a avaliar a ação dos extratos sobre o sistema hepatobiliar. A atividade enzimática de ambas as enzimas foi expressa por U/L (Dimov e Kulhanék, 1967; Bretaudiére et al., 1977).

2.7.3. Análises histológicas

Foram coletados fragmentos do fígado de três animais por grupo e fixados em solução de formol a 10% tamponado. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois 70 a 100%, diafanizados em xilol e incluídos em parafina histológica. Em seguida foram feitos cortes de 5 μ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). Dez campos aleatórios em cada corte histológico foram fotografados para caracterização do fragmento e posteriores análises morfométricas.

2.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos em valores de média \pm erro padrão, e foram realizadas análises estatísticas descritivas e análises de variância (ANOVA), seguida por testes de comparação de médias. Para avaliação do efeito antioxidante dos extratos utilizou-se teste t ($P < 0,05$); para análise dos

resultados dos testes bioquímicos utilizou-se teste de Dunnet ($P < 0,05$); os resultados histológicos foram avaliados pelo teste de Dunnet ou teste de Kruskal Wallis conforme a distribuição normal ou não dos dados, respectivamente ($P < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise fitoquímica por cromatografia de camada delgada (CCD)

A Tabela 2 mostra os resultados da prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos de cascas e folhas de *S. pseudoquina*.

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica por CCD dos extratos etanólicos de folhas e cascas de *S. pseudoquina*

Classe de metabólitos secundários	Extratos de cascas	Extratos de folhas
Cumarinas	+	-
Antraquinonas	-	-
Triterpenos e esteróides	+	+
Saponinas	-	-
Flavonóides	+	+
Heterosídeos cardiotônicos	-	-
Taninos	+	+
Alcalóides	+	-

CCD: Cromatografia de camada delgada.

Na prospecção fitoquímica preliminar de grupos de metabólitos secundários nos extratos etanólicos das cascas e folhas de *S. pseudoquina* não foi detectada a presença de antraquinonas, saponinas e de heterosídeos cardiotônicos. A detecção de triterpenos/esteróides, flavonóides e taninos foi positiva nos extratos de cascas e folhas. Foi detectada presença de cumarinas e alcalóides apenas nas cascas de *S. pseudoquina*, o que pode refletir variação na atividade terapêutica da planta ao se utilizar extratos provenientes de cada uma dessas partes. Vale ressaltar que, estudos etnofarmacológicos sobre o

emprego de *S. pseudoquina* apontam a casca como principal farmacógeno desta planta a ser utilizado nas preparações caseiras (Botsaris, 2007).

3.2. Atividade antioxidante dos extratos

Os resultados da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos das cascas e folhas de *S. pseudoquina* estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade sequestrante (%) do radical DPPH de extratos etanólicos de cascas e folhas de *S. pseudoquina* em diferentes concentrações, com respectivo IC₅₀

Extrato etanólico	1 µg/mL	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	IC ₅₀ (µg/mL)
Cascas	1,32 ±0,25 ^a	6,42±0,37 ^a	19,71±0,37 ^b	59,95±0,47 ^a	89,09
Folhas	2,42 ±0,69 ^a	5,56±0,70 ^a	21,51±0,52 ^a	39,19±0,89 ^b	128,04

IC₅₀=quantidade em massa de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH. As análises foram feitas em triplicata e os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão. Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

Na análise dos resultados da capacidade antioxidante considerou-se os valores de IC₅₀, sendo observado que o extrato de cascas apresentou atividade antioxidante 1,44 vezes maior do que o extrato de folhas de *S. pseudoquina*. A ação antioxidante encontrada nos extratos avaliados pode ser atribuída à presença de alguns compostos naturais identificados pela CCD, como flavonóides e taninos.

Galvez et al. (1995) avaliaram a atividade antioxidante de vários flavonóides sobre a peroxidação de membrana de células de fígado de rato induzidas pelo sistema não enzimático (sistema ácido ascórbico-Fe²⁺) e pelo sistema enzimático (ácido araquidônico). Todos os flavonóides testados foram capazes de inibir a peroxidação lipídica, induzida pelos dois sistemas. Outros estudos sugerem que a administração oral de flavonóides em ratos pode proteger o fígado contra falência do órgão por melhora da atividade antioxidativa hepática. Além disso, também pode exercer ação hepatoprotetora e ainda ser utilizada na prevenção do desenvolvimento de fibrose hepática (Lee, 2003; Su, 2003).

3.3. Efeitos dos extratos sobre AST, ALT e de ALB

Todos os tratamentos foram comparados ao grupo que recebeu somente paracetamol (GII). A administração de paracetamol elevou os valores dos parâmetros sanguíneos AST e ALT no grupo que recebeu somente paracetamol (GII) em relação ao grupo controle sadio (GI), apesar desse aumento não ter sido significativo estatisticamente ($P < 0,05$). Já os teores de ALB sofreram uma redução significativa no grupo II, sendo esta redução um indicativo de lesão hepática. Estes resultados são demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito da administração dos extratos etanólicos de cascas e folhas de *S. pseudoquina* nos parâmetros sorológicos de AST, ALT e ALB

Grupo	AST (U/L)	% de variação da AST em relação ao Grupo II	ALT (U/L)	% de variação da ALT em relação ao Grupo II	ALB (g/dL)	% de variação da albumina em relação ao Grupo II
GI	47,6 ± 4,6 ^b	--	33,0 ± 5,0 ^b	--	4,8 ± 0,1 ^b	--
GII	56,8 ± 2,8 ^b	--	36,8 ± 2,9 ^b	--	4,4 ± 0,02 ^a	--
GIII	83,3 ± 11,4 ^a	+ 46,65	42,6 ± 2,5 ^b	+ 15,76	4,8 ± 0,08 ^b	+ 9,09
GIV	75,3 ± 12,5 ^b	+ 32,57	45,0 ± 3,0 ^b	+ 22,28	4,8 ± 0,1 ^b	+ 9,09
GV	79,3 ± 2,3 ^b	+ 39,61	46,6 ± 2,9 ^b	+ 26,63	4,4 ± 0,4 ^a	0,0
GVI	86,3 ± 6,5 ^a	+ 51,93	49,0 ± 1,1 ^a	+ 33,15	4,8 ± 0,04 ^b	+ 9,09
GVII	91,0 ± 6,9 ^a	+ 60,21	45,3 ± 2,4 ^b	+ 23,09	5,1 ± 0,07 ^b	+ 15,9
GVIII	76,3 ± 3,6 ^b	+ 34,33	40,0 ± 0,8 ^b	+ 8,69	5,1 ± 0,07 ^b	+ 15,9

G I: controle sem paracetamol. G II: controle com paracetamol. G III: paracetamol + extrato de cascas (100mg). G IV: paracetamol + extrato de cascas (200mg). G V: paracetamol + extrato de cascas (300mg). G VI: paracetamol + extrato de folhas (100mg). G VII: paracetamol + extrato de folhas (200mg). G VIII: paracetamol + extrato de folhas (300mg). Os resultados estão expressos em valores de média ± erro-padrão. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente do grupo II ($P < 0,05$).

Foi observada elevação significativa do parâmetro ALB nos grupos que receberam extrato de cascas nas doses de 100 e de 200mg/kg (GIII e GIV), e nos grupos que receberam extrato de folhas nas três doses testadas, 100, 200 e 300 mg/kg (GVI, GVII e GVIII).

A albumina é sintetizada exclusivamente pelos hepatócitos (Santos, 2003), e a redução no seu nível sérico pode refletir desordens na síntese

protéica hepática. Alterações em seus níveis sanguíneos ocorrem em cerca de 70-80% dos casos de perda significativa da função hepática. No entanto, sua avaliação no diagnóstico de hepatopatias deve ser feita em conjunto com outros parâmetros específicos de função hepática, uma vez que ela pode ser alterada por causas diversas (Ramaiah, 2007).

Já em relação às transaminases, verificou-se que, nos grupos tratados com extrato de cascas, houve elevação significativa na enzima AST no grupo que recebeu a dose de 100mg/kg (GIII). Nos grupos que receberam extratos de folhas houve elevação significativa nas dosagens sorológicas das enzimas AST e ALT no grupo tratado com a dose de 100mg/kg (GVI) e elevação da AST no grupo que recebeu 200mg/kg (GVII).

AST e ALT catalisam a transferência dos grupamentos aminos de aspartato e alanina, respectivamente, para o α -cetogluturato formando piruvato ou oxalacetato e glutamato, respectivamente (Ozer et al., 2008). Geralmente estas enzimas são avaliadas para o diagnóstico de lesão nos hepatócitos, pois sua liberação através da membrana plasmática danificada eleva seus níveis na circulação sistêmica. Acredita-se que a ALT seja o indicador mais específico da lesão hepática, uma vez que a AST, pode aparecer elevada em enfermidades de outros órgãos, como coração e músculo esquelético (Oliveira, 2004). Além disso, a ALT em ratos possui meia-vida mais longa (~40-60 horas) do que a AST (~12 horas) (Ramaiah, 2007), o que possibilita a detecção de injúria hepatocelular aguda e sub-aguda.

No presente trabalho, as elevações ocorridas nestes dois parâmetros sugerem que os extratos vegetais administrados aos grupos que receberam extrato de cascas 100mg/kg e de folhas nas doses de 100 e 200mg/kg não foram capazes, nestas doses, de reverter os danos hepáticos causados pelo paracetamol quanto aos parâmetros sanguíneos. Por outro lado, deve-se destacar a elevação significativa dos teores de albumina nos grupos GIII e GIV, tratados com extrato de cascas e nos grupos GVI, GVII e GVIII, tratados com extrato de folha. Esta elevação pode ser um indicativo de recuperação da capacidade de síntese protéica pelo fígado.

3.4. Efeitos dos extratos sobre fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase

Como mostrado na Tabela 5, houve redução significativa das enzimas FA e γ -GT nos grupos de animais que receberam extrato de cascas a 100mg/kg e de folhas a 200mg/kg.

Tabela 5 - Efeito da administração de extratos etanólicos de cascas e folhas de *S. pseudoquina* nos parâmetros sorológicos de fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamil transferase (γ -GT)

Grupo	FA (U/L)*	% de variação da FA em relação ao Grupo II	γ - GT (U/L) *	% de variação da γ -GT em relação ao Grupo II
G I	38,6 \pm 5,8 ^a	--	17,33 \pm 2,1 ^a	--
G II	60,4 \pm 8,1 ^a	--	14,40 \pm 0,7 ^a	--
G III	29,3 \pm 6,1 ^b	- 51,49	7,33 \pm 2,1 ^b	- 49,09
G IV	46,3 \pm 19,7 ^a	- 23,34	9,67 \pm 2,2 ^a	- 38,84
G V	36,0 \pm 7,3 ^a	- 40,39	8,33 \pm 1,3 ^a	- 42,15
G VI	55,6 \pm 13,5 ^a	- 7,94	10,00 \pm 1,8 ^a	- 30,55
G VII	30,6 \pm 6,0 ^b	- 49,33	6,67 \pm 1,4 ^b	- 53,68
G VIII	44,6 \pm 4,0 ^a	- 26,15	12,67 \pm 0,6 ^a	- 12,01

G I: controle sem paracetamol. G II: controle com paracetamol. G III: paracetamol + extrato da casca (100mg). G IV: paracetamol + extrato da casca (200mg). G V: paracetamol + extrato da casca (300mg). G VI: paracetamol + extrato da folha (100mg). G VII: paracetamol + extrato da folha (200mg). G VIII: paracetamol + extrato da folha (300mg). Os resultados estão expressos em valores de média \pm erro-padrão.

*Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente do grupo II ($p < 0,05$).

Estas duas enzimas apresentam pequena atividade em tecido hepático normal, mas se elevam em grande quantidade em eventos de obstrução que interferem na condução normal da bile ou em enfermidades hepáticas causadas por álcool ou medicamentos, que também podem bloquear fluxo da bile no fígado. A γ -GT hepática está localizada particularmente nas células epiteliais dos ductos biliares. Possui múltiplas funções, incluindo a transferência de grupos γ -glutamil para aminoácidos e peptídeos (Oliveira et al., 2000; Ozer et al., 2008). Já a FA, no fígado, está localizada principalmente nos canalículos biliares e células epiteliais dos ductos biliares. É responsável pela hidrólise de monofosfatos em pH alcalino (Ramaiah, 2007). Desta forma, quando o fluxo da bile é prejudicado há um aumento na síntese de FA e γ -GT em poucas horas e

elas são liberadas na circulação, por mecanismos ainda desconhecidos. Como a FA pode ser encontrada em outros órgãos (ossos, placenta e intestino), sua avaliação é realizada em conjunto com a γ -GT para assegurar que o aumento da FA provém verdadeiramente do sistema hepático (Oliveira, 2004). Em humanos, níveis aumentados de FA têm sido associados com colestase induzida por drogas. Em ratos, a atividade da γ -GT é considerada um marcador mais confiável para colestase quando comparada à atividade da FA (Ozer et al., 2008).

Como houve redução significativa destas duas enzimas nos grupos de tratamento que receberam extrato de cascas a 100mg/kg e extrato de folhas a 200mg/kg, pode-se dizer que estes extratos foram capazes de recuperar os danos hepatobiliares causados pela droga sintética (paracetamol), apresentando possível efeito colerético ou colagogo.

3.5. Histologia

Na análise histomorfométrica do tecido hepático, foram quantificados hepatócitos com e sem depósito de lipídios, sinusóides, veias centrolobulares, ramos da veia porta e bainhas perivascularobiliares (Figuras 1, 2 e 3), cujas proporções avaliam quantitativamente estes constituintes do órgão. Os resultados estão expressos na Tabela 6.

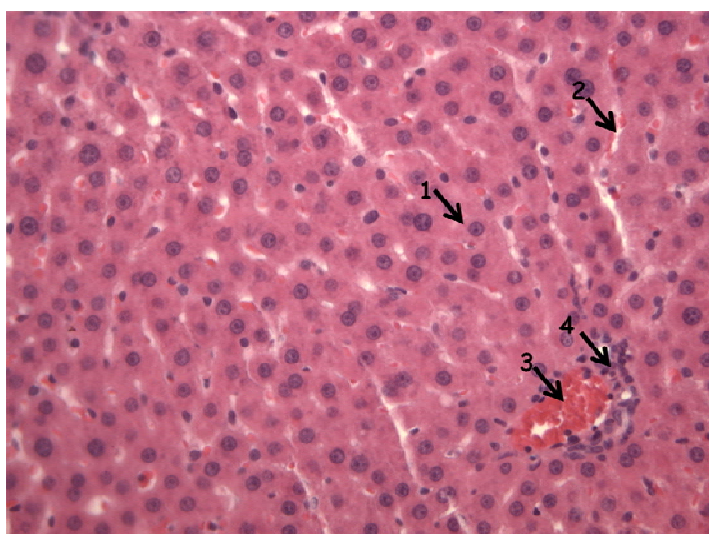


Figura 1: Tecido hepático normal (GI) (aumento de 200X – HE). 1: Hepatócito normal. 2: Sinusóide. 3: Veia centrolobular. 4: Bainha perivascularobiliar.

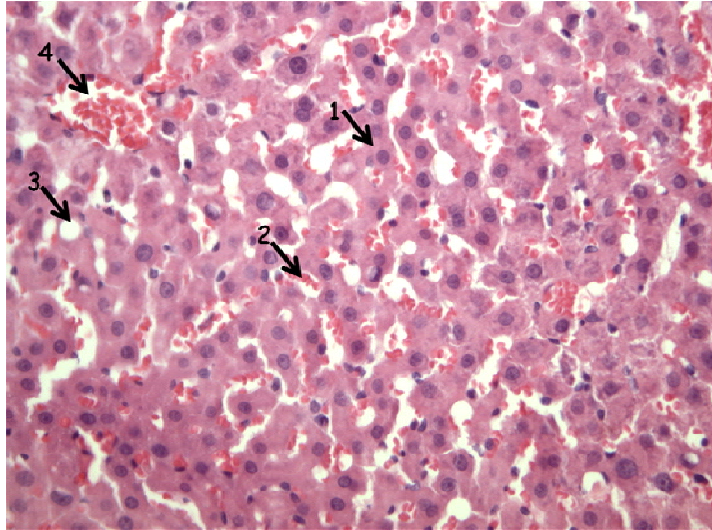


Figura 2: Tecido hepático submetido à injúria com paracetamol (GII) (aumento de 200X – HE). 1: Hepatócito normal. 2: Sinusóide. 3: Hepatócito com depósito de lipídios. 4: Veia centrolobular.

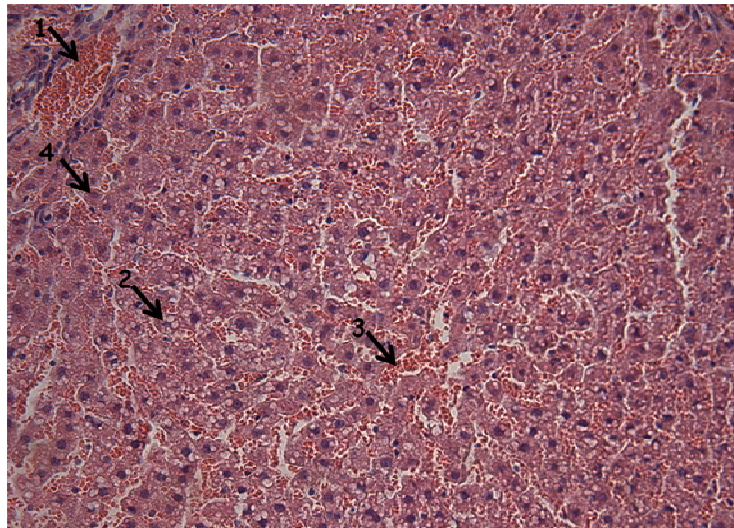


Figura 3: Tecido hepático submetido à injúria com paracetamol e tratado com extrato etanólico de folhas de *S. pseudoquina* 200mg/kg (GVII) (aumento de 200X – HE). 1: Veia centrolobular. 2: Hepatócito com depósito de lipídios. 3: Sinusóide. 4: Hepatócito normal.

Tabela 6 - Morfometria percentual (média \pm erro padrão da média) de elementos do parênquima lobular (hepatócitos com e sem depósitos de lipídios, sinusóides); e do estroma não-lobular (veia centro-lobular, veia porta e bainha perivascularobiliar) de fígado de ratos submetidos a tratamentos com extratos de *S. pseudoquina*

Grupo	Parênquima lobular			Estroma não-lobular		
	Hepatócitos sem depósito de lipídios (%)	Hepatócitos com depósito de lipídios (%)	Sinusóides (%)	Veia centro-lobular (%)	Ramo da veia porta (%)	Bainha perivascularobiliar (%)
G I	75,04 \pm 2,3 ^a	0,00 ^b	24,85 \pm 2,2 ^b	0,00 ^a	0,00 ^a	0,10 \pm 0,09 ^a
G II	67,51 \pm 3,6 ^a	2,73 \pm 1,4 ^b	28,97 \pm 3,1 ^b	0,78 \pm 0,6 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
G III	61,91 \pm 5,8 ^a	4,59 \pm 2,5 ^b	31,69 \pm 4,6 ^b	0,38 \pm 0,2 ^a	0,18 \pm 0,1 ^a	1,22 \pm 0,5 ^a
G IV	69,72 \pm 3,0 ^a	0,00 ^b	29,42 \pm 3,0 ^b	0,27 \pm 0,1 ^a	0,00 ^a	0,57 \pm 0,2 ^a
G V	66,09 \pm 4,1 ^a	2,23 \pm 1,3 ^b	31,20 \pm 3,8 ^b	0,09 \pm 0,09 ^a	0,00 ^a	0,36 \pm 0,2 ^a
G VI	66,03 \pm 3,6 ^a	0,00 ^b	32,77 \pm 3,4 ^b	0,64 \pm 0,5 ^a	0,00 ^a	0,55 \pm 0,2 ^a
G VII	47,11 \pm 3,1 ^b	10,54 \pm 2,2 ^a	40,85 \pm 2,1 ^a	0,09 \pm 0,09 ^a	0,37 \pm 0,2 ^a	1,02 \pm 0,5 ^a
G VIII	66,55 \pm 2,2 ^a	0,83 \pm 0,3 ^b	31,49 \pm 2,3 ^b	0,28 \pm 0,2 ^a	0,00 ^a	0,83 \pm 0,3 ^a

G I: controle sem paracetamol. G II: controle com paracetamol. G III: paracetamol + extrato da casca (100mg). G IV: paracetamol + extrato da casca (200mg). G V: paracetamol + extrato da casca (300mg). G VI: paracetamol + extrato da folha (100mg). G VII: paracetamol + extrato da folha (200mg). G VIII: paracetamol + extrato da folha (300mg).

*Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente do grupo II ($p < 0,05$).

Segundo Weibel et al. (1969) os dados morfométricos fornecidos pela microscopia de luz em fígados de ratos normais demonstram que 96% do volume hepático do rato é constituído pelo parênquima lobular, isto é, pelos hepatócitos, sinusóides, espaços de Disse e canalículos biliares, enquanto os 4% restantes constituem o estroma não lobular, ou seja, bainhas perivascularobiliares, ramos da artéria hepática, ramos da veia porta e ductos biliares que constituem os espaços portas. De acordo com os resultados obtidos, o parênquima lobular dos animais controle (GI) tem constituição semelhante àqueles descritos na literatura, totalizando aproximadamente 99,89 \pm 2,25% do volume hepático. Nos animais do grupo II, que recebeu somente paracetamol, esta parte totaliza cerca de 99,21 \pm 2,70%, porém, deste

total, em $2,73 \pm 1,41\%$ foram observados hepatócitos contendo depósito de lipídios, o que indica que o tecido sofreu algum tipo de injúria decorrente de desordem no metabolismo normal, como pode ocorrer em intoxicações por medicamentos, neste caso, o paracetamol.

Assim como na avaliação dos parâmetros bioquímicos, todos os grupos foram comparados ao grupo II.

No grupo de tratamento VII, que recebeu extrato etanólico de folhas a 200mg/kg, foi observada redução significativa na proporção de hepatócitos normais e, aumento significativo no número de hepatócitos com depósito de lipídios e na contagem de sinusóides. Tais observações podem indicar uma redução da velocidade do fluxo sanguíneo no tecido hepático, uma vez que houve aumento percentual de sinusóides. O aumento percentual de hepatócitos com depósito de lipídios indica que o sangue, ao chegar ao fígado levando nutrientes, está permanecendo em contato com o tecido hepático por mais tempo, com o conseqüente acúmulo lipídico na célula. A redução do número de hepatócitos normais pode ser uma conseqüência do aumento desse número de hepatócitos com depósito de lipídios, e/ou mesmo pela destruição destas células normais pelo paracetamol. Neste caso, o extrato, na dose administrada para o grupo VII indica não ter sido eficaz para reverter a injúria causada ao tecido pelo paracetamol.

Na avaliação dos parâmetros sanguíneos deste mesmo grupo GVII, foi observado o aumento nos níveis sorológicos das enzimas AST e ALT, o que também é indicativo de injúria hepática, mais especificamente de dano à membrana dos hepatócitos causando extravasamento destas enzimas citosólicas. Tais resultados corroboram as alterações histológicas encontradas. Além disso, na avaliação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos, o extrato de folhas apresentou menor atividade antioxidante *in vitro*, o que pode sugerir que este extrato possui menor potencial para proteger e/ou recuperar o tecido hepático de possíveis lesões.

Na prospecção fitoquímica do extrato de folhas de *S. pseudoquina* administrado ao grupo VII, foram identificados os metabólitos secundários triterpenos/esteróides, flavonóides e taninos. Os triterpenos podem produzir danos ao fígado por interferência no metabolismo biliar, uma vez que são metabolizados pelas enzimas do sistema microsomal hepático podendo se transformar em metabólitos ativos. Essas toxinas podem causar colestase

intra-hepática pela inibição da secreção da bile pelos hepatócitos (Santos et al., 2008). Pires (2001) sugere que triterpenos de *Brachiaria decumbens* (Gramineae) podem estar envolvidos na patogenia de lesões hepáticas. Sanz et al. (1993) estudaram o efeito hepatotóxico de diferentes extratos de *Heliotropium indicum* L., dentre eles o extrato contendo a fração composta por triterpenos, e verificaram, no estudo histopatológico, zonas de necrose com destruição da membrana citoplasmática dos hepatócitos.

Os flavonóides e taninos são compostos fenólicos exhaustivamente estudados pelas suas propriedades antioxidantes e conseqüente prevenção de doenças desencadeadas pelo estresse oxidativo, como as patologias hepáticas. No entanto, estudos mostram que seus efeitos biológicos e farmacológicos dependem da sua concentração e da fonte de radicais livres sobre a qual eles atuam, podendo agir como anti ou prooxidantes (Cao et al., 1997). Metodiewa et al. (1999) observaram que o flavonóide quercetina pode exercer atividade prooxidante e citotóxica. Sahu e Gray (1993) verificaram peroxidação lipídica e dano ao DNA em hepatócitos de ratos que receberam o flavonóide miricetina isolado, sugerindo um papel ambíguo deste composto nos processos de mutagênese e carcinogênese.

Deve-se ressaltar, no entanto, que, apesar de não serem verificadas diferenças estatísticas nos resultados histomorfométricos dos grupos que receberam extratos de casca de *S. pseudoquina* (GIII, GIV e GV), também foram identificados triterpenos/esteróides, flavonóides e taninos nestes extratos, assim como nos extratos de folhas. Contudo, novos trabalhos fitoquímicos devem ser realizados para identificar e quantificar tais compostos nas cascas e folhas dessas espécies.

4. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- ✓ alguns compostos identificados nos extratos de *S. pseudoquina* podem justificar a atividade antioxidante verificada nos ensaios *in vitro*;
- ✓ os extratos de cascas (100mg/kg) e de folhas (200mg/kg) apresentam possível efeito colerético ou colagogo, segundo os resultados dos parâmetros sanguíneos;

- ✓ o extrato de folhas na dose de 200mg/kg parece não ter sido eficaz em reverter a injúria hepatocelular causada pelo paracetamol, como demonstrado nas análises histomorfométricas

Modelos biológicos específicos de avaliação do metabolismo do sistema biliar devem ser realizados com o extrato de cascas administrado na dose de 100mg/kg e o de folhas a 200mg/kg, uma vez que as reduções observadas nos parâmetros bioquímicos FA e γ -GT destes grupos foram bastante expressivas. Por outro lado, novos estudos precisam ser realizados para avaliar possível hepatotoxicidade do extrato das folhas de *S. pseudoquina*.

Referências Bibliográficas

Achyla, G.S.; Wadodkar, S.G.; Dorle, A.K. Evaluation of hepatoprotective effect of Amalkadi Ghrita against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.90, p.229-232, 2004.

Alexandre, R.F.; Bagatini, F.; Simões, C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**.v.18, n.1, p.117-126, 2008.

Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC. DF, 464p, 1998.

Bergmeyer, H.U.; Bowes Jr, G.N.; Horder, M.; Moss, D.W. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. **Clinica Chimica Acta**. v.70, p.F19-F42, 1976.

Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. v.181, p.1199-1200, 1958.

Bolkent, S.; Yanardag, R.; Karabulut-Bulan, O.; Yesilyaprak, B. Protective role of *Melissa of cinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: A morphological and biochemical study. **Journal of Ethnopharmacology**. v.99, p.391-398, 2005.

Botsaris, A.S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v.3, p.1-8, 2007.

Brasil. Resolução-RDC Nº. 48, DE 16 DE MARÇO DE 2004. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>. Acesso em: 18/01/2009.

Bretondière, J.P.; Vassault, A.; Amsellem, L.; Pourci, M.L.; Thieu-Phung, H.; Bailly, M. Criteria for Establishing a Standardized Method for Determining Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum. **Clinical Chemistry**. v.23, n.12, p.2263-2274, 1977.

Cao, G.; Sofie, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**. v.22, p.749-760, 1997.

Dimov, D.M.; Kulhánek, V. Comparison of four methods for the estimation of γ -glutamyl transpeptidase activity in biological fluids. **Clinica Chimica Acta**. v.16, p.271-277, 1967.

Doumas, B.T.; Watson, W.A.; Biggs, H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clinica Chimica Acta**. v.31, n.1, p. 87-96, 1971.

Galvez, J.; De La Cruz, J.P.; Zarzuelo, A.; De La Cuesta, F.S. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**. v.51, p.127-133, 1995.

Jain, A.; Soni, M.; Deb, L.; Jain, A.; Rout, S.P.; Gupta, V.B.; Krishna, K.L. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Mormodica dioica* Roxb. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. v.115, p.61-66, 2008.

Kumar, G.; Sharmila, B.; Pappa, P.V.; Sundararajan, M.; Pandian, M.R. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.92, p.37-40, 2004.

Lee, W.M. Drug-induced hepatotoxicity. **The New England Journal of Medicine**. v.349, p.474-485, 2003.

Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickançaité, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Radical Biology & Medicine**. v.26, n.1/2, p.107-116, 1999.

Oliveira, I.M.V.; Paulo, R.H.; Fujimori, E. Efeito da restrição energética na atividade hepática da gama-glutamyltranspeptidase e nos níveis de glutathione. **Revista de Nutrição**. v.13, n.1, p.51-56, 2000.

Oliveira, S.T. Alterações de compostos nitrogenados não protéicos em cães e gatos. Seminário: Alterações de compostos nitrogenados em cães e gatos/UFRGS, 2004. Disponível em: http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/alteracoes_nnp.pdf. Acesso em 25/03/09.

Ozer, J.; Ratner, M.; Shaw, M.; Bailey, W.; Schomaker, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**. v.245, p.194-205, 2008.

Pires, V.S. Análise fitoquímica de *Brachiaria decumbens*. **Caderno de Farmácia**. v. 17, n. 1, p. 50- 51, 2001.

Porchezian, E.; Ansari, S.H. Hepatoprotective activity of *Abutilon indicum* on experimental liver damage in rats. **Phytomedicine**. v.12, p.62-64, 2005.

Rao, G.M.; Rao, C.V.; Pushpangadan, P. Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia Cordifolia* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**.v.103, p.484-490, 2006.

Ramaiah, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**. v.45, p.1551-1557, 2007.

Sahu, S.C.; Gray, G.C. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by miricetin. **Cancer Letters**. v.9, p.70-73, 1993.

Sanmugapriya, E.; Venkataraman, S. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.105, p.154-156, 2006.

Santos, M.M.A. **Provas de função e lesão hepática**. Faculdade de Medicina- UnB: Monitoria de Clínica Médica, 2003. Disponível em: http://www.damedpel.com/CDD/5o_6oAno/CLINICA/Internato%20I/Discussao%20Dr.%20Gastal/DD.REVISA0%201.Prova_funcao_hepatica%20Medstudents%2B%2B%2B.pdf. Acesso em 09/03/2009.

Santos, F.C.A.; Riet-Correa, F.; Simões, S.V.D.; Barros, C.S.L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.28, n.1, p.1-14, 2008.

Sanz, J.M.; Roman, B.R.; Zambrano, O. Hepatotoxicidad de la maleza *Heliotropium indicum* L. (Rabo de Alacran) Familia Boraginaceae. **Revista Científica FCV-LUZ**. v.3, p.68-73, 1993.

Setty, S.R.; Quereshi, A.A.; Swamy, V. Hepatoprotective activity of *Calotropis procera* flowers against paracetamol-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**. v.78, p.451-454, 2007.

Silva, M.A.; Souza-Brito, A.R.M.; Hiruma-Lima, C.A.; Santos, L.C.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. *Strychnos* L. da América do Sul e Central. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.15, n.3, p.256-267, 2005.

Su, J.F. Protection againts hepatic ischemiareperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin. **Biomedical and Environmental Sciences**. v.16, p.1-8, 2003.

Turolla, M.S.R.; Nascimento, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, p.289-306, 2006.

Wagner, H.; Bland, S.; Zgainski, E.M. **Plant drug analysis**. Berlim: Springer-Verlag, 320p, 1984.

Weibel, E.R.; Staubli, W.; Gnagi, H.R.; Hess, F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. **Journal Cell Biology**. v.42, p.63-91, 1969.

CAPÍTULO 2

**Atividade antihepatotóxica de extratos de cascas e folhas de
Coutarea hexandra (Jacq.) K. Schum em hepatotoxicidade
induzida por paracetamol em ratos**

Atividade antihepatotóxica de extratos de cascas e folhas de *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum em hepatotoxicidade induzida por paracetamol em ratos

Resumo

O presente trabalho objetivou investigar possível efeito antihepatotóxico de extratos etanólicos de cascas e folhas de *Coutarea hexandra* em diferentes doses (100, 200, 300 mg/Kg peso corporal, oralmente) em ratos com hepatotoxicidade induzida por paracetamol. Diferentes parâmetros bioquímicos como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina (ALB), fosfatase alcalina (FA) e *gama*-glutamil transferase (γ -GT) foram avaliados. As observações bioquímicas foram suplementadas com exames histológicos de seções de fígado dos ratos. A ação antioxidante desses extratos foram analisados pela atividade sequestrante de DPPH, sendo também obtido o perfil fitoquímico por CCD. A avaliação dos parâmetros bioquímicos sugere que os extratos, tanto de cascas quanto de folhas, nas doses administradas, não foram capazes de reverter a injúria hepatocelular causada pelo paracetamol. Na avaliação histológica, o extrato de cascas apresentou melhores resultados comparado ao extrato da folhas, porém ambos não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle com paracetamol. Os extratos exibiram atividade sequestrante de radicais livres pelo teste do DPPH, sendo essa atividade maior para as cascas. Esse estudo sugere que os extratos de cascas e folhas de *Coutarea hexandra* nas doses utilizadas tem fraco efeito antihepatotóxico em toxicidade induzida por paracetamol. O efeito sobre o fígado, anunciado pelas informações etnofarmacológicas talvez possa se dar por efeito hepatoprotetor. O desenvolvimento de condições e parâmetros analíticos fitoquímicos para os extratos analisados contribui para o controle de qualidade da espécie.

Abstract

The objective of the present study was to investigate possible antihepatotoxic effects of ethanol extracts from bark and leafs of *Coutarea hexandra* in different doses (100, 200, 300 mg/Kg body weight, orally induced)

in rats with hepatotoxicity induced by paracetamol in rats. Different biochemical parameters such as aspartate aminotransferase (AST), albumin (ALB), alkaline phosphatase (FA) and gamma glutamyl transferase (γ -GT) were evaluated. The biochemical observations were supplemented with histological exams of liver sections of the rats. Antioxidant action of these extracts was analyzed by the DPPH sequestering activity and the phytochemical profile was obtained by CCD. Evaluation of the biochemical parameters suggested that extracts, from both bark and leaf at the administered doses, were not capable of reverting hepatocellular damage caused by paracetamol. The histological evaluation showed better results for the bark extract compared with that of leaf, however neither presented significant differences in relation to the control group with paracetamol. The extracts exhibited sequestering activity of free radicals from the DPPH tests, with greater activity being observed for the bark extracts. This study suggested that leaf and bark extracts from *Coutarea hexandra* at the utilized doses has a weak antihepatotoxic effect on paracetamol induced toxicity. Effect on the liver, shown by ethnopharmacological indications may be due to the hepatoprotector effect. Development of phytochemical conditions and analytical parameters for the analyzed extracts contributes to quality control of the species.

Introdução

O Brasil além de ser considerado um país de megabiodiversidade, apresenta também uma rica sócio-diversidade que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais. Essa conjunção estabelece um cenário potencial para o desenvolvimento de pesquisas que visam a descoberta de novos fármacos. Ao mesmo tempo, o aproveitamento sustentável da biodiversidade, visando a busca de recursos vegetais com propriedades medicinais, representa uma forma de agregação de valor ao importante patrimônio genético vegetal, contribuindo para a conservação dos ecossistemas.

Coutarea hexandra (Jacq.) K. Schum, família Rubiaceae, é uma planta nativa em quase todo o território brasileiro, popularmente conhecida como quina-branca, quina-quina ou amora-do-mato (Pereira et al., 2006). Na medicina popular, as cascas de sabor fortemente amargo, são usadas na forma

de decocto para tratamento de febre intermitente, malária, paludismo, hepatopatias, feridas e inflamações (Lucena et al., 2006; Lorenzi e Abreu Matos, 2002). Estudo fitoquímico dessa planta levou ao isolamento de metabólitos 4-aril-cumarinas (Dellemonache et al., 1983) e fenilcumarinas que apresentam comprovada ação relaxante muscular, sem apresentar efeitos tóxicos quando administrada por via oral em camundongos (Araújo et al., 1988). Estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonóides (Linuma et al., 1987) e de cumarinas em extrato aquoso de *C. hexandra* (Dellemonache et al., 1990). Efeitos antiinflamatório e antinociceptivo foram confirmados em testes realizados com camudongos para o extrato aquoso da entrecasca de *C. hexandra* (Lucena et al., 2006).

Tendo em vista sua extensa utilização como erva medicinal e a escassez de estudos que comprovem cientificamente suas indicações de uso no tratamento de doenças hepáticas, o presente trabalho objetivou investigar a atividade de extratos etanólicos de cascas e folhas de *C. hexandra* contra a hepatotoxicidade aguda induzida em ratos, bem como fazer um estudo fitoquímico preliminar da espécie e avaliar o seu potencial antioxidante *in vitro*.

2. Materiais e métodos

2.1. Material vegetal

As cascas do caule e folhas de *C. hexandra* foram coletadas no município de Uberlândia no estado de Minas Gerais. O material foi coletado em bioma de cerrado, em abril de 2007 e identificadas pelo botânico André Furtado Carvalho. Foram depositadas exsiccatas no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU 2124). As partes da planta foram separadas, secadas em sala com circulação de ar e à temperatura ambiente, protegidas da incidência direta de luz e, posteriormente, pulverizadas em moinhos de faca.

2.2. Preparo dos extratos

Os materiais vegetais secos de *C. hexandra* (400g de cada parte do vegetal) foram submetidos à percolação exaustiva com etanol 92° e os extratos concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Para completa

remoção dos solventes, os extratos etanólicos foram liofilizados, obtendo-se 116,0g (29,0% p/p) e 218,6g (54,6% p/p) de extratos secos de cascas e folhas, respectivamente.

2.3. Prospecção fitoquímica preliminar

Os extratos etanólicos foram submetidos a análise fitoquímica preliminar para investigar as principais classes de metabólitos secundários, as quais podem estar relacionadas às atividades atribuídas para essa planta na medicina popular. Testes para identificação de triterpenos/esteróides, compostos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, antraquinonas, glicosídeos cardiotônicos, saponinas e alcalóides foram realizados. A presença de metabólitos secundários foi analisada por cromatografia em camada delgada, utilizando-se folhas de alumínio cobertas com sílica gel GF254 (Merk®) de espessura 0,25 mm e 20 cm de comprimento; com diferentes sistemas de eluição. Os reagentes borrifados nas folhas cromatográficas para identificar a presença das classes de metabólitos foram: reagente de Lieberman Burchard (esteróides/triterpenos); cloreto férrico 1% (taninos); cloreto de alumínio 5% em etanol (flavonóides); solução etanólica de hidróxido de potássio 5% (cumarinas, fluorescência azul em UV_{365nm}; derivados antraquinônicos, mancha vermelha na região do visível); reagente de Kedde (glicosídeos cardiotônicos); anisaldeído sulfúrico (saponinas); e reagente de Dragendorff (alcalóides) (Wagner et al., 1984).

2.4. Atividade sequestrante de DPPH

A atividade sequestrante (antioxidante) do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) dos extratos foi determinada utilizando-se de acordo com Blois (1958). Nesta forma, o radical DPPH* absorve luz ultravioleta na faixa de 517 nm, e desaparece sob redução pelo composto antioxidante. Diferentes quantidades (1,0; 10,0; 50,0; e 100,0µg) de cada extrato foram diluídas em 1,0 mL de metanol, obtendo-se quatro diferentes soluções. De cada uma destas soluções, foi retirada uma alíquota de 0,3 mL, à qual foram adicionados 2,7 mL da solução de DPPH* (0,07mM) preparada diariamente e armazenada em frasco âmbar e sob refrigeração (4°C). Para os tubos controle, foram

adicionados os mesmos volumes de reagentes, porém no lugar do extrato foi utilizado somente o seu veículo, metanol. A absorvância a 517 nm foi mensurada com auxílio de espectrofotômetro marca T70+UV/VIS Spectrometer, 30 minutos após o início da reação. Uma redução na absorvância a 517 nm da solução mistura de extrato e DPPH• indica aumento na sua atividade, a qual é dada como porcentagem de captura do radical DPPH•. Cada determinação foi realizada em triplicata.

A porcentagem de DPPH• remanescente foi calculada a partir da equação:

$$\% \text{ de captura do radical DPPH}^\bullet = [(A_c - A_a)/A_c] \times 100\%$$

Onde: A_c = Absorvância do controle

A_a = Absorvância da amostra

2.5. Animais

Foram utilizados 48 ratos *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, pesando em média 280g, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram acondicionados em gaiolas coletivas de polietileno com tampa metálica e assoalho forrado com maravalha, cada uma correspondendo a um grupo de seis animais, mantidas em ambiente climatizado ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração comercial (Labina - Purina®) e água "ad libitum", no Laboratório Biofármacos I da UFV. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG - Protocolo 122/2008).

2.6. Indução de hepatotoxicidade com paracetamol

A hepatotoxicidade foi induzida por administração oral de paracetamol na dose de 2g/kg de peso animal, dividida em cinco dias consecutivos. O paracetamol foi administrado a todos os grupos de seis animais, exceto para o grupo I, utilizado como controle normal. O grupo II recebeu somente o paracetamol, sem uso de extrato vegetal. Durante 30 dias após a

administração do paracetamol os grupos III a VIII receberam as doses desejadas dos extratos por gavagem, diariamente, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Grupos testados com extratos etanólicos de *C. hexandra*

Grupo	Agente indutor de hepatotoxicidade	Extrato etanólico	<i>n</i>	Dose (mg de extrato /Kg animal/dia)
I	-	-	6	-
II	paracetamol	-	6	-
III	paracetamol	cascas	6	100
IV	paracetamol	cascas	6	200
V	paracetamol	cascas	6	300
VI	paracetamol	folhas	6	100
VII	paracetamol	folhas	6	200
VIII	paracetamol	folhas	6	300

2.7. Avaliação da função hepática

Após tratamento, os animais foram eutanasiados por inalação de CO₂ (após 12 horas de jejum) e o sangue, retirado por punção cardíaca, foi centrifugado por 15 minutos para separação e coleta do soro, sendo esse utilizado para a estimativa dos seguintes parâmetros bioquímicos: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), albumina (ALB), fosfatase alcalina (FA) e *gama*-glutamil transferase (γ -GT). Todas as análises no soro foram realizadas em equipamento de dosagens multiparamétrico de bioquímica (Alizé) utilizando kits da marca BIOCLIN®

2.8. Análise histológica

Foram coletados fragmentos do fígado de três animais por grupo e fixados em solução de formol a 10% tamponado. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois 70 a 100%, diafanizados em xilol e incluídos em parafina histológica. Em seguida foram feitos cortes de 5 μ m de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). Dez campos aleatórios em cada corte histológico foram fotografados para identificação do fragmento e posteriores análises morfométricas.

2.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos em valores de média \pm erro padrão, e foram feitas estatísticas descritivas e análises de variância (ANOVA), seguida por testes de comparação de médias. Para avaliação do efeito antioxidante dos extratos utilizou-se teste t ($p < 0,05$); para análise dos resultados dos testes bioquímicos utilizou-se teste de Dunnet ($p < 0,05$); os resultados histológicos foram avaliados pelo teste de Dunnet ou teste de Kruskal Wallis conforme a distribuição normal ou não dos dados respectivamente ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise fitoquímica preliminar

Os estudos fitoquímicos dos extratos de cascas e folhas de *C. hexandra* mostraram a presença de triterpenos/esteróides, flavonóides e taninos. A presença de cumarinas e de alcalóides foi evidenciada no extrato das cascas de *C. hexandra*. Não foi detectada a presença de antraquinonas, saponinas e de heterosídeos cardiotônicos para ambos extratos.

A ocorrência de triterpenos, taninos e de flavonóides é relatada na literatura em espécies da família Rubiaceae, como nas folhas de *Rudgea viburnoides*, planta bastante comum na região do cerrado brasileiro (Young et al., 1998; Alves et al., 2004). Em folhas e cascas da espécie *Remijia ferruginea* (Rubiaceae), também conhecida como quina, existe relato da presença de iridóides, triterpenos e esteróides, cumarinas, alcalóides e flavonóides (Braga et al., 2003). Metabólitos alcaloídicos também são encontrados em diversas espécies medicinais da família Rubiaceae, como *Psychotria ipecacuanha* (ipeca), *Cinchona* spp. (quinas) e *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato).

3.2. Atividade antioxidante dos extratos

Os resultados da análise da capacidade antioxidante dos extratos etanólicos de cascas e folhas de *C. hexandra* estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade sequestrante do radical DPPH dos extratos etanólicos de cascas e folhas de *C. hexandra*

Concentração (µg/mL)	Seqüestro de DPPH (% de inibição)	
	Cascas	Folhas
1,0	2,52 ±0,70 ^a	2,22 ±0,35 ^a
10,0	7,27±0,26 ^a	6,26±1,17 ^a
50,0	27,37±0,46 ^a	24,60±0,49 ^b
100,0	57,83±0,74 ^a	50,76±1,46 ^b
IC50	87,46	99,57

IC₅₀=quantidade em massa de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH. As análises foram feitas em triplicata e os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão. Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

Os resultados indicam que o extrato de cascas apresentou atividade antioxidante maior do que o extrato de folhas de *C. hexandra*, sendo o poder sequestrante de DPPH diretamente proporcional com o aumento da concentração. Na prospecção fitoquímica dos extratos de cascas e folhas desta espécie foram identificados grupos de metabólitos secundários aos quais tem sido atribuídas propriedades antioxidantes, como taninos, flavonóides e cumarinas (Galati e O'Brien, 2004; Zhang e Wang, 2004; Okuda, 2005; Montagner, 2007; Araújo et al., 2008; Ammar et al., 2009; Pessuto et al., 2009).

3.3. Efeito hepatotóxico do paracetamol

A desordem hepática causada pelo paracetamol no grupo II, quando comparado ao grupo controle normal (GI), foi verificada pelo aumento significativo de albumina e pela análise histológica, evidenciada, principalmente, pela alteração do parênquima lobular que apresentou aumento no número de hepatócitos com depósito de lipídios. Os teores de albumina sofreram uma redução significativa no grupo II (Tabela 3). Apesar da administração de paracetamol ter elevado os valores dos parâmetros de AST e ALT no grupo que recebeu somente paracetamol (GII), esses parâmetros não foram significativos quando comparados com o controle normal (I).

O paracetamol é um medicamento seguro quando não são excedidas suas doses terapêuticas, mas quando usado em doses que ultrapassam 140 a 250 mg/kg/dia pode exercer toxicidade. Em condições normais, parte desta substância é metabolizada pelas enzimas do complexo citocromo P-450, originando um composto tóxico ativo denominado *N*-acetil-*p*-benzoquinona imina (NAPQI), que, nas condições fisiológicas é destoxificado pela glutathione. Apesar do mecanismo pelo qual o paracetamol causa hepatotoxicidade não estar totalmente esclarecido, sabe-se que, quando este sistema de desintoxicação é sobrecarregado, a NAPQI se liga covalentemente às proteínas hepatocelulares, formando complexos que levam aos efeitos deletérios podendo provocar até mesmo morte celular (Hinson et al., 2002; Jaeschke et al., 2003).

3.4. Efeito dos extratos sobre os parâmetros bioquímicos

Os resultados da ação dos extratos sobre os parâmetros bioquímicos para se avaliar o efeito antihepatotóxico estão mostrados na Tabela 3. Todos os tratamentos foram comparados ao grupo que recebeu somente paracetamol (GII).

Tabela 3 - Efeito da administração dos extratos etanólicos secos de cascas e folhas de *C. hexandra* sobre os parâmetros bioquímicos de fígado em ratos

Grupo	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALB (g/dL)	FA	γ – GT (UI)
I	47,6 ± 4,6 ^a	33,0 ± 5,0 ^a	4,8 ± 0,1 ^b	38,66±5,8 ^a	17,33±2,1 ^a
II	56,8 ± 2,8 ^a	36,8 ± 2,9 ^a	4,4 ± 0,02 ^a	60,40±8,1 ^a	14,40±0,7 ^a
III	67,6 ± 4,6 ^a	43,6 ± 2,2 ^a	4,6 ± 0,04 ^b	44,33±4,7 ^a	13,66±1,2 ^a
IV	76,6 ± 4,6 ^a	50,3 ± 4,1 ^b	4,7 ± 0,09 ^b	46,00±5,1 ^a	9,66±1,4 ^a
V	72,0 ± 6,2 ^a	45,6 ± 4,0 ^a	4,6 ± 0,1 ^a	61,33±11,9 ^a	13,66±1,8 ^a
VI	98,0 ± 9,6 ^b	55,6 ± 2,0 ^b	5,0 ± 0,03 ^b	47,66±10,2 ^a	10,66±2,2 ^a
VII	89,6 ± 10,2 ^a	48,3 ± 2,9 ^a	4,6 ± 0,1 ^a	68,66±6,6 ^a	11,66±1,2 ^a
VIII	76,0 ± 3,6 ^a	42,6 ± 2,8 ^a	4,8 ± 0,1 ^b	42,33±4,8 ^a	10,66±1,6 ^a

G I: controle sem paracetamol. G II: paracetamol sem extrato. G III: paracetamol + extrato da casca (100mg). G IV: paracetamol + extrato da casca (200mg). G V: paracetamol + extrato da casca (300mg). G VI: paracetamol + extrato da folha (100mg). G VII: paracetamol + extrato da folha

(200mg). G VIII: paracetamol + extrato da folha (300mg). Os resultados estão expressos em valores de média \pm erro-padrão.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente do grupo II ($p < 0,05$).

Verificou-se que entre os grupos que receberam extratos de cascas, houve aumento significativo de ALT no grupo tratado com a dose de 200mg/kg (IV). Já entre os grupos que receberam extratos de folhas, houve aumento significativo dos parâmetros AST e ALT no grupo que recebeu a dose de 100mg/kg (VI), e aumento da AST no grupo tratado com a dose de 200mg/kg. Esses resultados, no entanto, não são suficientes para afirmar uma possível hepatotoxicidade desses extratos. Para os demais grupos tratados com extratos não observou-se diferença significativa sobre os níveis de AST e ALT. Em relação à albumina, houve aumento significativo deste parâmetro nos grupos tratados com extrato de casca a 100 e 200mg/kg (III e IV) e nos grupos com extrato de folha a 100 e 300mg/kg (VI e VIII). Chama-se atenção para o grupo VI, no qual foi observada elevação simultânea de AST e ALT.

Na avaliação dos parâmetros sanguíneos de FA e γ – GT não foram observadas alterações significativas nos grupos tratados com os extratos em relação ao grupo II. Com esses resultados, não verifica-se evidência de ação dos extratos sobre o sistema hepatobiliar nos ratos com hepatotoxicidade induzida por paracetamol.

Estas duas enzimas mostram pequena atividade em tecido hepático normal, mas alterações nos níveis de fosfatase alcalina e γ -GT são interpretadas como dano no sistema hepatobiliar, uma vez que estas enzimas, no fígado, localizam-se principalmente nas células epiteliais dos ductos biliares (Ozer et al., 2008, Ramaiah, 2007). Sua elevação sugere a obstrução mecânica dos ductos biliares, e tem sido relacionada com ocorrência de cirrose biliar primária ou hepatite induzida por álcool ou medicamentos (Herlong, 1994). A γ -GT hepática está localizada particularmente nas células epiteliais dos ductos biliares. Possui múltiplas funções, incluindo a transferência de grupos γ -glutamil para aminoácidos e peptídeos (Oliveira, 2000; Ozer et al., 2008). Já a FA, no fígado, está localizada principalmente nos canalículos biliares e células epiteliais dos ductos biliares, sendo responsável pela hidrólise de monofosfatos em pH alcalino (Ramaiah, 2007). Como a FA pode ser encontrada em outros órgãos (ossos, placenta e intestino), sua avaliação é realizada em conjunto com a γ -GT para assegurar que o aumento da FA

provém verdadeiramente do sistema hepático (Oliveira, 2004). Em humanos, níveis aumentados de FA têm sido associados com colestase induzida por drogas. Em ratos, a atividade da γ -GT é considerada um marcador mais confiável para colestase quando comparada à atividade da FA (Ozer et al., 2008).

3.5. Análise histológica

Na análise histomorfométrica do tecido hepático, foram quantificados hepatócitos com e sem depósito de lipídios, sinusóides, veia centrolobular, ramo da veia porta e bainha perivascularobiliar (Figuras 1, 2 e 3), cujas proporções avaliam quantitativamente estes constituintes do órgão. Os resultados estão expressos na Tabela 4.

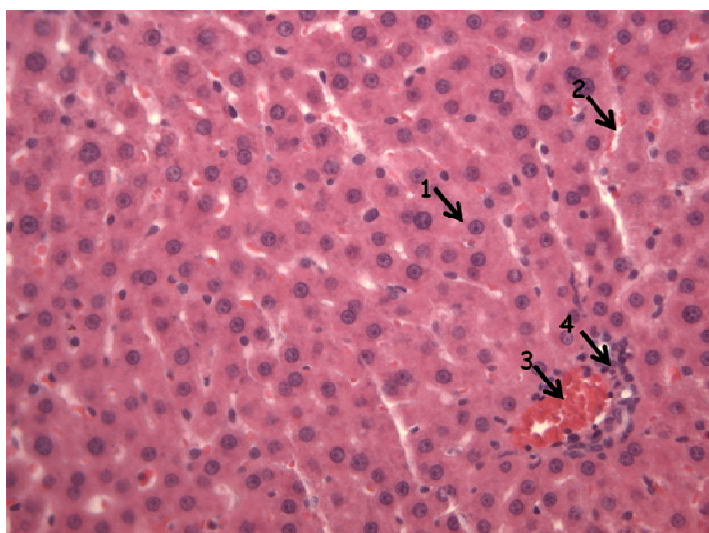


Figura 1: Tecido hepático normal (GI) (aumento de 200X – HE). 1: Hepatócito normal. 2: Sinusóide. 3: Veia centrolobular. 4: Bainha perivascularobiliar.

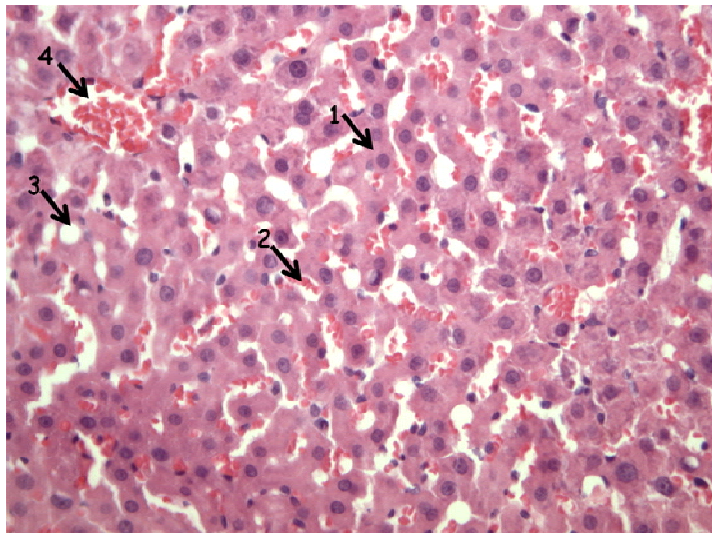


Figura 2: Tecido hepático submetido à injúria com paracetamol (GII) (aumento de 200X – HE). 1: Hepatócito normal. 2: Sinusóide. 3: Hepatócito com depósito de lipídios. 4: Veia centrolobular.

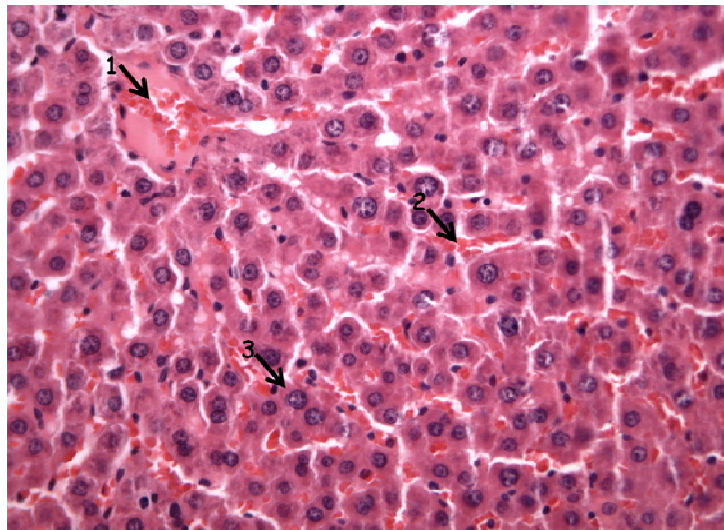


Figura 3: Tecido hepático submetido à injúria com paracetamol e tratado com extrato etanólico de cascas de *C. hexandra* 100mg/kg (GIII) (aumento de 200X – HE). 1: Veia centrolobular. 2: Sinusóide. 3: Hepatócito normal.

Tabela 4 - Morfometria percentual (média \pm erro padrão da média) de elementos do parênquima lobular (hepatócitos com e sem depósitos de lipídios, sinusóides); e do estroma não-lobular (veia centro-lobular, veia porta e bainha perivascularbiliar) de fígado de ratos submetidos a tratamentos com extratos de *C. hexandra*.

GRUPO	Parênquima lobular			Estroma não-lobular		
	Hepatócitos sem depósito de lipídios (%)	Hepatócitos com depósito de lipídios (%)	Sinusóides (%)	Veia centro-lobular (%)	Ramo da veia porta (%)	Bainha perivascularbiliar (%)
G I	75,06 \pm 2,2 ^a	0,00 ^a	24,82 \pm 2,2 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,10 \pm 0,09 ^a
G II	66,16 \pm 3,6 ^a	2,85 \pm 1,4 ^a	30,77 \pm 3,1 ^a	0,20 \pm 0,5 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
G III	77,65 \pm 3,0 ^b	0,43 \pm 2,4 ^a	21,90 \pm 1,1 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
G IV	74,07 \pm 4,0 ^a	0,47 \pm 0,2 ^a	25,44 \pm 3,3 ^a	0,00 ^a	0,18 \pm 0,1 ^a	0,00 ^a
G V	61,38 \pm 3,3 ^a	0,47 \pm 0,4 ^a	37,65 \pm 3,3 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,49 \pm 0,3 ^a
G VI	74,33 \pm 3,0 ^a	0,09 \pm 0,09 ^a	24,65 \pm 3,1 ^a	0,18 \pm 0,1 ^a	0,00 ^a	0,73 \pm 0,3 ^a
G VII	71,20 \pm 2,8 ^a	0,28 \pm 0,1 ^a	27,39 \pm 2,7 ^a	0,45 \pm 0,3 ^a	0,00 ^a	0,65 \pm 0,3 ^a
G VIII	63,78 \pm 4,3 ^a	0,84 \pm 0,3 ^a	33,39 \pm 3,8 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	1,97 \pm 0,6 ^a

G I: controle sem paracetamol. G II: paracetamol sem extrato. G III: paracetamol + extrato da casca (100mg). G IV: paracetamol + extrato da casca (200mg). G V: paracetamol + extrato da casca (300mg). G VI: paracetamol + extrato da folha (100mg). G VII: paracetamol + extrato da folha (200mg). G VIII: paracetamol + extrato da folha (300mg).

*Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente do grupo II ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos à microscopia de luz no presente trabalho, cerca de 99,88 \pm 2,20% do volume hepático dos animais do grupo sadio (I) correspondem ao parênquima lobular, o qual é constituído por hepatócitos, sinusóides, espaços de Disse e canalículos biliares. Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura para tecido hepático de animais normais (Weibel et al., 1969). Já no grupo que recebeu somente paracetamol (II), foi verificado que aproximadamente 98,78 \pm 2,70% dos pontos contados correspondem ao parênquima lobular, porém, 2,85 \pm 1,42% deste total são constituídos por hepatócitos com depósito de lipídios, o que caracteriza a ocorrência de desordem hepática causada pelo paracetamol, uma vez que hepatócitos com esta característica não são encontrados em tecido hepático sadio.

A comparação entre os tratamentos foi realizada da mesma forma que na análise dos parâmetros bioquímicos, de forma a confrontar os resultados obtidos. Todos os grupos foram comparados ao grupo II.

Verificou-se diferença estatística somente na contagem de hepatócitos sem depósito de lipídios no grupo III, que recebeu extrato etanólico da casca de *C. hexandra* na dose de 100mg/kg. Neste grupo, este percentual de hepatócitos normais (77,65%) foi estatisticamente maior em relação ao valor encontrado no grupo II (66,16%), aproximando-se do valor encontrado no grupo sadio (75,06%). O somatório dos valores que traduzem o parênquima lobular quantificado (hepatócitos sem lipídios, hepatócitos com lipídios e sinusóides) no grupo III totalizou cerca de 99,98%, valor semelhante ao encontrado para o grupo controle (99,88%), como citado anteriormente, e destes, apenas 0,43% foram de hepatócitos com depósito de lipídios. Tais resultados permitem sugerir que o tratamento administrado ao grupo III pode ter promovido uma recuperação da injúria provocada pela administração do paracetamol.

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo III e o grupo II em nenhum dos parâmetros dosados. Porém, deve-se ressaltar que os valores verificados para as enzimas fosfatase alcalina e γ -GT foram menores no grupo III em relação ao grupo II. Apesar deste resultado não ter sido estatisticamente significativo a 5%, houve significância estatística a 10% para fosfatase alcalina nesta comparação. O significado clínico deste achado deve ser considerado, uma vez que a mensuração destas duas enzimas em conjunto faz parte da avaliação da função hepatobiliar. A elevação simultânea destes dois parâmetros bioquímicos é observada em mais de 90% dos casos de doenças hepatobiliares e lesões hepáticas inflamatórias e tóxicas (Santos, 2003). A redução de fosfatase alcalina e γ -GT observada no grupo III pode indicar a reversão de uma possível injúria hepatobiliar causada pelo paracetamol.

Na prospecção fitoquímica do extrato etanólico de cascas de *C. hexandra* foram identificados cumarinas, triterpenos/esteróides, flavonóides, taninos e alcalóides. Já no extrato etanólico de folhas da espécie, identificou-se triterpenos/esteróides, flavonóides e taninos. Em relação ao potencial antioxidante, o extrato etanólico da casca apresentou atividade antioxidante 1,14 vezes maior do que o extrato da folha. Tais resultados são importantes

para se tentar estabelecer uma relação entre os resultados encontrados na análise histomorfométrica e as atividades atribuídas aos metabólitos secundários identificados no material vegetal administrado aos animais.

Flavonóides, taninos, cumarinas e alcalóides são compostos que podem exercer ação antioxidante dependendo da sua estrutura, concentração e meio em que atuam.

Os compostos fenólicos são reconhecidamente detentores de evidente atividade antioxidante, despertando, assim, interesse diante da possibilidade de serem utilizadas em várias doenças, como nas hepatopatias. Taninos e flavonóides são utilizados na prática terapêutica por suas propriedades como antiinflamatórios, antioxidantes e cicatrizantes (Zuanazzi e Montanha, 2004; Santos e Mello, 2004). Hikino et al. (1985) verificaram atividade antihepatotóxica de taninos em culturas de hepatócitos, sugerindo uma possível supressão da lesão causada aos hepatócitos por tetracloreto de carbono (CCl₄) pelos taninos.

As cumarinas podem se comportar como importantes antioxidantes naturais (Zhang e Wang, 2004). A atividade antioxidante das cumarinas já foi demonstrada em fibroblastos humanos e em células cancerosas (Nishiyama et al., 2001; Dinkova-Kostova, 2002). Algumas estruturas como as 4-metilcumarinas mostraram propriedades fortemente antioxidantes, melhores até do que as do α -tocoferol, antioxidante de referência em estudos (Raj et al., 1998). Já os alcalóides ocorrem em muitas plantas medicinais e possuem uma longa e importante história na medicina tradicional (Roberts e Strack, 1999). Foram relatados efeito protetor hepático, colerético e colagogo para a espécie *Peumus boldus* (popularmente conhecida como boldo), os quais foram atribuídos à presença do alcalóide boldina, entre outros compostos naturais (Ochoa et al., 2008).

A presença dos compostos acima citados no extrato da casca pode ter contribuído para o melhor resultado encontrado no grupo III.

4. Conclusão

De acordo com os resultados encontrados, conclui-se que:

- ✓ os extratos das cascas (100 e 200 mg/kg) e das folhas (100 e 300 mg/kg) de *C. hexandra* aumentam significativamente o nível de albumina sérica quando comparado com o grupo controle com hepatotoxicidade induzida por paracetamol;
- ✓ embora os achados dos estudos histológicos sugerirem que o extrato das cascas quando administrado na dose de 100 mg/kg tenha efeito antihepatotóxico, os resultados dos parâmetros bioquímicos não sustentam essa hipótese;
- ✓ o presente estudo sugere que os extratos de cascas e folhas de *C. hexandra* têm fraco efeito antihepatotóxico em toxicidade induzida por paracetamol em ratos.

Referências Bibliográficas

Alves, R.M.S.; Stehmann, J.R.; Isaias, R.M.S.; Brandão, M.G.L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, 2004.

Ammar, R.B.; Bhourri, W.; Sghaier, M.B.; Boubaker, J.; Skandrani, I.; Neffati, A.; Bouhlel, I.; Kilani, S.; Mariotte, A.M.; Chekir-Ghedira, L.; Dijoux-Franca, M.G.; Ghedira, K. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae): A structure-activity relationship study. **Food Chemistry**. v.116, p.258–264, 2009.

Araújo, C.C.; Thomas, G.; Paulo, M.Q. Effects of 5,7,2',5'-tetracetoxy-4-phenylcoumarin in guinea pig tracheal preparations. **Planta Medica**. v.20, p.494-497, 1988.

Araújo, T.A.S.; Alencar, N.L.; Amorim, A.L.C.; Albuquerque, U.P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**. v.120, p.72–80, 2008.

Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**. v.181, p.1199-1200, 1958.

Braga, F.C.; Valadares, Y.M.; Costa, M.A.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. Estudo fitoquímico de *Erythraea centaurium*, *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico Ierobina®. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 14, p. 28-31, 2003.

Dellemonache, G.; Botta, B.; Neto, A.S.; Delima, R.A. 4- Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**. v.22, p.1657-1658, 1983.

Dellemonache, G.; Botta, B.; Vinciguerra, V, Pinheiro, R.M. Constituents of *Coutarea hexandra*. 6. 4- Arylcoumarins from *Coutarea hexandra* **Phytochemistry**. v.29, p.3984-3986, 1990.

Dinkova-Kostova, A.T. Protection Against cancer by Plant Phenylpropanoids: Induction of mammalian Anticarcinogenic Enzymes. **Mini Reviews in Medical Chemistry**, v. 2, p. 595-610, 2002.

Galati, G.; O'Brien, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties **Free Radical Biology and Medicine**. v.37, n.3, p.287-303, 2004.

Herlong, H.F. Approach to the patient with abnormal liver enzymes. **Hospital Practice**. v.29, p.32-38, 1994.

Hikino, H.; Kiso, Y.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Okuda, T. Antihepatotoxic actions of tannins. **Journal of Ethnopharmacology**. v.14, p.19-29, 1985.

Hinson, J.A.; Bucci, T.J.; Irwin, L.K.; Michael, S.L.; Mayeux, P.R. Effect of inhibitors of nitric oxide synthase on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Biology and Chemistry**. v.6, n.2, p.160-167, 2002.

Jaeschke, H.; Knight, T.R.; Bajt, M.L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicology Letters**. v.144, p.279- 288, 2003.

Linuma, M.; Tanaka, T.; Hamada, K.; Mizuno, M.; Asai, F.; Reher, G.; Kraus, L. Revised structure of neoflavone in *Coutarea hexandra*. **Phytochemistry**. v.26, p.3096-3097, 1987.

Lorenzi, H.; Abreu-Matos, **F.J. Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 512p.

Lucena, J.E.X; Bispo, M.D.; Nunes, R.S.; Cavalcanti, S.C.H.; Teixeira-Silva, F.; Marçal, R.M.; Antonioli, A.R. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Coutarea hexandra* barks aqueous extract Schum. (Rubiaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 16, p. 67-72, 2006.

Montagner, C. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas.** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 2007. 126p. (Dissertação, Mestrado em Biotecnologia).

Nishiyama, T.; Ohnishi, J.; Hashiguchi, Y. Fused Heterocyclic Antioxidants: Antioxidative Activities of Hydrocoumarins in a Homogeneous Solution. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 5, p. 1127-1133, 2001.

Ochoa, C.; Granda, C.; Chapoñan, M.; Borja, R.; Borjas, P.; Ortiz, J.; Ugaz, G.; Puerta, E.; Pucutay, M. Efecto Protector de *Peumus boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por Paracetamol. **CIMEL**. v.13, n.1, p.20-25, 2008.

Okuda, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**. v.66, p.2012–2031, 2005.

Oliveira, I.M.V.; Paulo, R.H.; Fujimori, E. Efeito da restrição energética na atividade hepática da *gamma*-glutamyltranspeptidase e nos níveis de glutathione. **Revista de Nutrição**. v.13, n.1, p.51-56, 2000.

Oliveira, S.T. **Alterações de compostos nitrogenados não protéicos em cães e gatos.** Seminário: Alterações de compostos nitrogenados em cães e gatos/UFRGS, 2004. Disponível em: http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/TMAD/alteracoes_nnp.pdf. Acesso em 25/03/09.

Ozer, J.; Ratner, M.; Shaw, M.; Bailey, W.; Schomaker, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**. v.245, p.194-205, 2008.

Pereira, Z.V.; Carvalho-Okano, R.M.; Garcia, F.C.P. Rubiaceae Juss. da Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**. v.20, n.1, p.207-224, 2006.

Pessuto, M.B.; Costa, I.C.; Souza, A.B.; Nicoli, F.M.; Mello, J.C.P. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**. v.32, n.2, p.412-416, 2009.

Raj, H.G.; Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Goel, S.; Himanshu, P.; Malhotra, S.; Singh, A.; Olsen, C.E.; Wengel, J. Mechanism of Biochemical Action of Substituted 4-Metilbenzopiran-2-oneas. Part I: Dioxygenated 4-Metilcoumarins as Superb Antioxidant and Radical Scavenging Agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v. 6, p. 833-839, 1998.

Ramaiah, S.K. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. **Food and Chemical Toxicology**. v.45, p.1551-1557, 2007.

Roberts, M.F.; Strack, D. Biochemistry and physiology of alkaloids and betalains. In: Wink, M. Biochemistry of plant secondary metabolism. **Annual Plant Review**. v.1, p.17-78, 1999.

Santos, M.M.A. **Provas de função e lesão hepática**. Faculdade de Medicina- UnB: Monitoria de Clínica Médica, 2003. Disponível em: http://www.damedpel.com/CDD/5o_6oAno/CLINICA/Internato%20/Discussao%20Dr.%20Gastal/DD.REVISA0%201.Prova_funcao_hepatica%20Medstudents%2B%2B%2B.pdf. Acesso em 09/03/2009.

Santos, S.C., Mello, J.C.P., 2004. Taninos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. et al. (Orgs.) 5 ed., revisada, ampliada, primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 1096 p, 2004.

Young, M.C.; Araújo A.F.; Da Silva, C.A.; Lopes, M.N.; Trevisan, L.M.; Bolzani, V.S. Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnoides*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 936-938, 1998.

Zhang, H.; Wang, L.F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. **Journal of Molecular Structure**. v.675, p.199-202, 2004.

Zuanazzi, J.A.S., Montanha, J.A., 2004. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. et al. (Orgs.) 5 ed., revisada, ampliada, primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC.

Wagner, H.; Bland, S.; Zgainski, E.M. **Plant drug analysis**. Berlim: Springer-Verlag, 320p, 1984.

Weibel, E.R.; Staubli, W.; Gnagi, H.R.; Hess, F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. **Journal Cell Biology**. v.42, p.63-91, 1969.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos na presente pesquisa permitem concluir que:

- A prospecção fitoquímica por CCD dos extratos etanólicos das cascas e folhas das espécies popularmente conhecidas como quina, *C. hexandra*, e *S. pseudoquina*, apresentaram composição semelhante quanto a classes de metabólitos secundários. Para as duas espécies observou-se a presença simultânea em cascas e folhas de triterpenos/esteróides, flavonóides e taninos, enquanto que, às cascas soma-se a presença de cumarinas e alcalóides, inexistentes nas folhas. Esses parâmetros cromatográficos contribuem para o controle de qualidade das espécies;
- O extrato etanólico das cascas de *C. hexandra* foi o que revelou maior potencial antioxidante *in vitro*, com o menor valor de IC₅₀;
- Quanto aos parâmetros bioquímicos, apenas os extratos de *S. pseudoquina*, mais especificamente das cascas (100mg/kg) e folhas (200mg/kg), apresentaram resultado significativamente benéfico, demonstrando possível efeito colerético ou colagogo;
- Pela análise histológica, apenas o extrato de cascas (100mg/kg) de *C. hexandra* demonstrou indícios de efeito na recuperação tecidual quanto aos danos causados pelo paracetamol;
- Pelos resultados obtidos, verifica-se a necessidade de se avaliar a toxicidade aguda e sub-crônica dos extratos de cascas e folhas de ambas as espécies, de modo a monitorar o efeito desses extratos sobre o fígado de animais sem hepatotoxicidade induzida;
- Os resultados não são conclusivos sobre o efeito antihepatotóxico do preparado popular, em que se emprega o chá das cascas das duas espécies no tratamento de doenças hepáticas. Novos estudos deverão ser realizados para se investigar a indicação etnofarmacológica.