

REGGIANI VILELA GONÇALVES

**ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DO EXTRATO DA CASCA DE
Bathysa cuspidata (A. St. Hil.) Hook. f. CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO TETRACLORETO DE CARBONO EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G635a
2010

Gonçalves, Reggiani Vilela, 1979-

Atividade hepatoprotetora do extrato da casca de *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. contra estresse oxidativo induzido pelo tetracloreto de carbono em ratos wistar / Reggiani Vilela Gonçalves. – Viçosa, MG, 2010. xv, 86f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador : Sérgio Luis P. da Matta.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Toxicologia. 2. Stress oxidativo. 3. Toxicologia experimental. 4. Fígado - Histopatologia. 5. Rato como animal de laboratório. 6. Enzimas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 571.95

REGGIANI VILELA GONÇALVES

**ATIVIDADE HEPATOPROTETORA DO EXTRATO DA CASCA DE
Bathysa cuspidata (A. St. Hil.) Hook. f. CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO
INDUZIDO PELO TETRACLORETO DE CARBONO EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 14 de outubro de 2010

Prof. João Paulo Viana Leite
(Coorientador)

Profa. Izabel Regina S. C. Maldonado
(Coorientadora)

Prof^a. Vera Maria Peters

Prof^a. Maria do Carmo G. Peluzio

Prof. Sérgio Luis P. da Matta
(Orientador)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pois sem fé eu não conseguiria chegar até aqui. Obrigada Senhor.

Aos meus pais amados, Devair e Cleuza, minha fortaleza, meu refúgio, por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje. Pelo amor incondicional, pela paciência, pelos ensinamentos, por todas as minhas qualidades. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!

Aos meus irmãos Emerson e Wadson por todo apoio, orações e compreensão em todos os momentos. Amo vocês!

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de ter realizado o curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao orientador, mas acima de tudo amigo Sérgio Luis Pinto da Matta pela orientação, confiança e amizade. Você é para mim um exemplo de competência associada à paciência e bom humor.

Ao Professor João Paulo Viana Leite pela amizade e companheirismo, pela orientação, acompanhamento do trabalho e pela confiança depositada em mim.

À Professora Izabel Regina dos Santos Maldonado pela orientação e ensinamentos.

À Professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio pelos ensinamentos e por ter concedido o uso do laboratório para análises do trabalho.

Aos professores do Departamento de Biologia Geral, Adilson Ariza Zácara, Clóvis Andrade Neves, José Eduardo Serrão, Tânia Maria Fernandes Salomão, Sílvia das

Graças Pompolo, João Marcos de Araújo, Sergio Oliveira de Paula, Juliana Silva Rocha, e Mariana Machado Neves pelo exemplo de profissionalismo, pelos preciosos ensinamentos e pelo privilégio da convivência com vocês.

Às secretárias Beth e Diana, obrigada meninas por toda a ajuda e paciência. Ao Aécio e Lucinda pela ajuda no laboratório de análises clínicas no Departamento de Veterinária.

Ao amigo Rômulo por todo incentivo e ajuda neste trabalho.

Às amigas Bruna e Silvânia por estarem ao meu lado, pelas conversas e por todo apoio.

Aos amigos de laboratório Marli, Alex, Fernandinho, Claudivânia, Bife, Danielle, Diane, Daiane, Ana Paula Cerqueira, Juliana Silveira, Suellen, Katiane, Fabíola, Jane, Maytê, Michele, Mônica, Kyvia, Ana Carolina Torre, Frederico e Damiana.

E por último, mas não menos importante, a todas as pessoas que compartilharam esses 4 anos do doutorado, pois tudo não teria sido tão especial sem a participação de vocês. A todos os amigos que tive a oportunidade de fazer e à acolhedora Viçosa, meus sinceros agradecimentos.

Biografia

REGGIANI VILELA GONÇALVES, filha de Devair Rezende Vilela e Cleuza Gonçalves Ferreira Vilela, nascida em 14 de novembro de 1979, na cidade de Coronel Fabriciano, Minas Gerais.

Graduada em Fisioterapia pelo Centro Universitário de Caratinga em dezembro de 2003, especialista em Ortopedia e Esportes pela Universidade Federal de Minas Gerais em 2004.

Mestre em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa em outubro 2006.

Em outubro de 2006, iniciou doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Viçosa.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	ix
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	3
2.1. Fármacos de origem vegetal.....	3
2.1.1 Gênero <i>Bathysa</i>	6
2.2. Fígado.....	8
2.3. Radicais Livres.....	9
2.4. Tetracloreto de carbono (CCl ₄) e marcadores de lesões hepáticas.....	10
3- OBJETIVOS.....	14
3.1- Objetivos Gerais.....	14
3.2- Objetivos específicos.....	14
4. Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO I.....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	23

1. Introdução	24
2. Material e métodos.....	25
2.1. Preparação do extrato de <i>B. cuspidata</i>	25
2.2. Produtos químicos.....	26
2.3. Animais.....	26
2.4. Delineamento experimental.....	26
2.5. Análise bioquímica e histopatológica.....	27
2.6. Análise estatística.....	28
3. Resultados	29
3.1. Peso corporal e peso do fígado.....	29
3.4. Parâmetros da bilirrubina no soro.....	32
3.5. Efeito do extrato de cascas de <i>B. cuspidata</i> no tecido hepático.....	33
3.6. Desordem hepática nos níveis de SOD e CAT induzida por CCl_4 e tratamento com EBC.....	35
4. Discussão	37
5. Conclusão	40
6. Referências.....	40
CAPÍTULO II	45

Resumo.....	45
Abstract.....	46
1. Introdução.....	47
2. Material e Métodos.....	48
2.1. Obtenção do material vegetal.....	48
2.2. Preparação do extrato de <i>B. cuspidata</i>	49
2.3. Produtos químicos.....	49
2.4. Animais.....	49
2.5. Delineamento Experimental	50
2.6. Análise bioquímica e histopatológica.....	50
2.7. Análise estatística.....	52
3. Resultados	52
3.1. Peso corporal e peso do fígado.....	52
3.2. Quantificações de enzimas no soro.....	53
3.3. Determinação da peroxidação lipídica hepática	54
3.4. Histopatologia.....	55
3.5. Determinação das atividades de SOD E CAT no tecido hepático.	58
4. Discussão	59

5. Conclusões	62
6. Agradecimentos	62
7. Referências	62
8. Conclusões Gerais	66
9. Perspectivas	67

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Anova: Análise de Variância

ALT: Alanina Aminotransferase

AST: Aspartato Aminotransferase

B. cuspidata: *Bathysa cuspidata*

Bilirrubina- D: Bilirrubina Direta

Bilirrubina- I: Bilirrubina Indireta

Bilirrubina- T: Bilirrubina Total

CAT: Catalase

CCl₄: Tetracloreto de carbono

CCl₃: Triclorometil

Cu: Cobre

DMSO: Dimetilsulfóxido

EBC: Extrato de *Bathysa cuspidata*

FA: Fosfatase Alcalina

GGT: γ -glutamil transferase

GL: Gotículas Lipídicas

HPX: Hidroperóxidos

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

IHS: Índice Hepatosomático

i.p: Intraperitoneal

L[•]: Lipídio com radical centrado em carbono

MDA: Malondialdeído

mg: Miligrama

Mn: Manganês

OMS: Organização Mundial da Saúde

OH[•]: Radical hidroxil

O₂[•]: Radical superóxido

PBS: Tampão Fosfato de Sódio

PESB: Parque Estadual da Serra do Brigadeiro

PC: Peso corporal

PF: Peso do fígado

REL: Retículo endoplasmático Liso

RER: Retículo endoplasmático Rugoso

ROO[•]: Radical peroxi lipídicos

RO[•]: Radical alcoxi

EROS: Espécies reativas de oxigênio (EROS)

S.D: Desvio Padrão

SOD: superóxido dismutase

TBA: Ácido tiobarbitúrico

VC: Veia Centrolobular

Zn: Zinco

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFV: Universidade Federal de Viçosa

Resumo

GONÇALVES, Reggiani Vilela, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2010. **Atividade hepatoprotetora do extrato da casca de *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. contra estresse oxidativo induzido pelo tetracloreto de carbono em ratos Wistar.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-orientadores: João Paulo Viana Leite e Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

A *Bathysa cuspidata* pertencente à família Rubiaceae nativa da Mata Atlântica, é usada na medicina popular brasileira para tratamento de doenças do estômago, fígado e como cicatrizante. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do extrato da casca de *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. sobre lesões hepáticas induzidas em ratos Wistar pelo tetracloreto de carbono (CCl₄). A lesão hepática foi induzida por meio da administração intraperitoneal de CCl₄, a cada 48 horas, durante 12 dias. O tratamento dos animais com extrato de *B. cuspidata* (EBC) foi realizado por meio de gavagem. Setenta e sete ratos foram aleatoriamente divididos em 10 grupos, com 7 animais cada, para a realização do estudo curativo e preventivo, sendo constituídos da seguinte forma: Grupos Curativo: Grupo 1: CCl₄+12 (eutanasiado 12 dias após o término de administração do CCl₄); Grupo 2: CCl₄ (eutanasiado 24hs após a administração da última dose de CCl₄); Grupo 3: CCl₄+ Dimetilsulfóxido (DMSO durante 12 dias, após a aplicação do CCl₄); Grupo 4: EBC (EBC 400mg/kg durante 12 dias); Grupo 5: CCl₄+EBC 200mg/kg e Grupo 6: CCl₄+ EBC 400mg/kg, ambos durante 12 dias. Grupos Preventivo: Grupo 1 (G1): CCl₄ sem EBC; Grupo 2 (G2): DMSO+CCl₄ (dimetil sulfóxido, 700µl); Grupo 3(G3): EBC (somente EBC 200mg/kg durante 18 dias); Grupo 4(G4): EBC 200mg/kg + CCl₄; Grupo 5(G5): EBC 400mg/kg+CCl₄. Todos os animais começaram a receber o extrato seis dias antes do início da aplicação do CCl₄. Curativo: O grupo 2 apresentou redução significativa no peso final e no índice hepatossomático em relação aos demais grupos e, em relação à alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), este grupo apresentou os maiores valores no soro. EBC promoveu redução na quantidade de hidroperóxidos, malondialdeído e gotículas lipídicas no fígado quando comparado aos outros grupos. As atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) aumentaram nos grupos 5 e 6 quando comparado aos outros grupos (p<0,05). Preventivo: A

concentração da enzima aspartato aminotransferase (AST) diminuiu ($p < 0,05$) no soro dos animais que receberam o extrato e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foi significativamente maior ($p < 0,05$). Extensas áreas de necrose e gotículas lipídicas foram observadas no fígado de animais dos grupos G1 e G2. Já nos animais que receberam o extrato foi observada diminuição significativa nas áreas de gotículas lipídicas e de necrose celular ($p < 0,05$) no tecido hepático. Os resultados confirmam o efeito hepatoprotetor da casca de *B. cuspidata*. Os resultados de ambos os trabalhos demonstram que o extrato da casca de *B. cuspidata* estimula o sistema de defesa antioxidante e reduz lesões morfológicas e funcionais no fígado de ratos Wistar expostos ao CCl_4 .

Abstract

GONÇALVES, Reggiani Vilela, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2010. **Hepatoprotective activity of bark extract *Bathysa cuspidata* (A. St-Hil) Hook.f. against oxidative stress induced by carbon tetrachloride in Wistar rats.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-Advisers: João Paulo Viana Leite and Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado.

Bathysa cuspidata belongs to the Rubiaceae family and is used in popular medicine for the treatment of stomach and liver disorders and as a healing agent. The objective this study was investigate the effect of stem bark ethanolic extract of *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. on liver lesions induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in Wistar rats. Liver lesions were induced by intraperitoneal administration of CCl₄ every 48 hours for 12 days. The animals were treated with *B. cuspidata* extract (BCE) administered by gavage. Seventy rats were randomized into 10 treatment groups with 7 animals in each group, to achieve the curative and Preventive study, being made up as follows: Curative groups: Group 1: CCl₄ + 12 days; Group 2: CCl₄; Group 3: CCl₄ + dimethyl sulfoxide; Group 4: BCE 400 mg/kg; Group 5: CCl₄ + BCE 200 mg/kg; Group 6: CCl₄ + BCE 400 mg/kg. Preventive groups: Group 1 (G1): CCl₄ without BCE; Group 2 (G2): DMSO + CCl₄ (dimethyl sulfoxide 700 µl); Group 3 (G3): BCE (BCE 400 mg/kg alone for 18 days); Group 4 (G4): BCE 200 mg/kg + CCl₄; Group 5 (G5): BCE 400 mg/kg + CCl₄. In all the animals, treatment with the extract was initiated six days prior to the first application of CCl₄. Curative: Final weight and hepatosomatic index were significantly reduced in Group 2 compared to the other groups. Animals in Group 2 also had the highest serum ALT and AST levels. BCE administration resulted in a significant reduction in the quantity of hydroperoxides and malondialdehyde compared to the other groups. The number of lipid droplets in the liver was also lower in the BCE groups. A significant increase was found in superoxide dismutase activity and catalase enzymes in groups 5 and 6 compared to the other groups. Preventive: A significant reduction (p<0.05) in serum aspartate transaminase (AST) levels and a significant increase

($p < 0.05$) in the antioxidant enzymes super oxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were found in the livers of the animals that received the extract. Extensive areas of necrosis and lipid droplets were found in the livers of the animals in G1 and G2. Conversely, a significant reduction ($p < 0.05$) was found in the areas of lipid droplets and cell necrosis in the liver tissue of the animals that received the extract. The results of both studies demonstrate that the bark extract of *B. cuspidata* stimulates antioxidant defense system and reduces the morphological and functional lesions in the liver of rats exposed to CCl_4 .

1. Introdução

O tratamento das enfermidades humanas a partir de plantas medicinais ou seus derivados é uma prática antiga e, atualmente, encontra-se em expansão por todo o mundo. Como consequência da grande difusão e utilização de plantas medicinais, as indústrias farmacêuticas vêm desenvolvendo produtos à base de extratos vegetais padronizados, principalmente fitoterápicos, que têm sido registrados para diferentes especialidades médicas (Eldin e Dunford, 2001).

Em projeto desenvolvido por pesquisadores e extensionistas da Universidade Federal de Viçosa, intitulado “Uso de plantas medicinais em comunidades do entorno do parque Estadual da Serra do Brigadeiro”, foi feito um inventário de plantas tradicionalmente usadas na região por meio da coleta de informações junto aos moradores, que foram comparadas com informações disponíveis em bancos de dados científicos. A partir daí observou-se que para as plantas nativas mencionadas os percentuais de espécies submetidas a estudos químicos e farmacológicos foram de 53,5 e 53,6%, respectivamente. Esses dados reforçam o grande potencial da biodiversidade da região, associado ao levantamento do conhecimento popular, para a realização de pesquisas de bioprospecção farmacêutica. Dentre as espécies nativas levantadas na pesquisa, está a *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f., família Rubiaceae (Nunes, 2008; Leite et al., 2008). Por meio de investigações etnobotânicas e etnofarmacológicas nesta região observou-se que a *B. cuspidata* é uma das espécies mais utilizadas pela população para o tratamento de doenças hepáticas.

A *Bathysa cuspidata* ocorre na Serra do Mar nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, região serrana de Minas Gerais e Espírito Santo (Lombardi e Gonçalves, 2000; Soares et al., 2006). Segundo Correa (1984), as cascas de *B. cuspidata*, espessas e avermelhadas são utilizadas na preparação de tônicos amargos empregados em anemias, caquexias, febres palustres, ancilostomíase, convalescência, etc. A espécie é bem distinta das demais pelas folhas muito grandes, membranáceas e verde-amareladas. No estado de Minas Gerais esta espécie ocorre principalmente na região da zona da Mata e alguns estudos relatam a grande ocorrência desta espécie na Serra do Brigadeiro (Silva et al., 2003; Soares et al., 2006).

Alguns estudos têm mostrado que espécies reativas de oxigênio (EROS) provocam desordens degenerativas, incluindo hepatopatas (Brattin et al., 1985; Adaramoye et al., 2008) sendo o tetracloreto de carbono (CCl₄) frequentemente usado como indutor de lesão hepática. A necrose hepática causada pelo CCl₄ envolve a bioativação do sistema de citocromo P450 resultando na formação do triclorometil que inicia a peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas (Ki-Tae et al., 2005). Para avaliação de estresse oxidativo têm sido empregados uma série de marcadores que são muito utilizados para demonstrar peroxidação lipídica, assim como proteínas de defesa da célula, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GDH). Associado a estas análises realiza-se exame histopatológico do tecido hepático para identificar regiões de degeneração e necrose. Elevadas quantidades das enzimas AST, ALT, GGT, ALP e bilirrubina no soro são indicativos de lesões nas membranas celulares dos hepatócitos e desta forma, também são utilizados como marcadores de estresse oxidativo (Khatri et al., 2009).

Para entender os possíveis efeitos terapêuticos do extrato da *B. cuspidata* sobre lesões hepáticas induzidas pelo CCl₄ foi feita análise de enzimas, tecido hepático e quantificação de subprodutos da peroxidação lipídica. Desta forma, tentar esclarecer os possíveis mecanismos de ação deste determinado extrato.

2. Revisão de Literatura

2.1. Fármacos de origem vegetal

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países, sobretudo aqueles em desenvolvimento, depende da medicina tradicional para sua atenção primária. Cerca de 80% da população mundial utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, sendo que 85% desses indivíduos usam plantas ou seus derivados nas mais diferentes formas (Farnsworth et al., 1994; Kaur et al., 2005). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis tenham sido desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais (Calixto et al., 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas a partir de protótipos e precursores naturais (Rates, 2001). Pesquisadores da área de produtos naturais do Brasil, têm demonstrado que a natureza revela grande variedade de compostos químicos com considerável diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Wall et al., 1988), cabendo aos pesquisadores a descoberta da sua utilização e às instituições de fomento financiar projetos na área.

Durante séculos, as plantas representaram a principal fonte de agentes terapêuticos para a humanidade. No entanto, no início do século XIX, com o desenvolvimento da química, os extratos das plantas passaram a ser submetidos a processos de isolamento de princípios ativos para o desenvolvimento de novos fármacos (Leite, 2008a). O Brasil tem a flora mais diversificada do mundo quanto a plantas terrestres, possuindo quase 22% dos recursos vegetais mundiais (Lewinsohn e Prado, 2002). Além disso, possui cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas e estima-se que somente 8% dessas espécies foram estudadas quanto a sua química, e que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (Guerra e Nodari, 2001). Nesse grande patrimônio, vale ressaltar a importância da diversidade química dos produtos naturais biossintetizados a partir de plantas, para a descoberta de novos fármacos, o que tem despertado interesse da indústria farmacêutica. Atualmente, produtos naturais lideram as

estruturas químicas inovadoras com atividade biológica, representando uma importante fonte para novos medicamentos. Pesquisas estimam que cerca de 60% das drogas antitumorais e anti-infecciosas que estão no mercado, ou em fase de testes clínicos, são derivadas de produtos naturais (Motomiya et al., 2004; Lewinsohn e Prado, 2002).

Nesse cenário, é relevante acrescentar que apenas 15% das espécies vegetais conhecidas do planeta foi alvo de estudos farmacológicos descritos na literatura (Farnsworth, 1994). Esses dados fazem da pesquisa de análise de plantas uma ferramenta promissora para a descoberta de importantes extratos ou moléculas bioativas, que poderão ser importantes para a melhoria da qualidade de vida dos seres humanos e de animais em geral, além de possibilitarem a obtenção de produtos que possam contribuir para a geração de renda em diferentes comunidades e para a indústria nacional (Calixto, 2001; Leite, 2008b).

Contudo, ainda não há garantia de eficácia, segurança e qualidade quando da utilização para a maioria das plantas medicinais. Segundo Farias (2001), a eficácia de um medicamento é dada pela comprovação, por meio de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados para esses recursos terapêuticos, e a segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos.

É importante ressaltar o surgimento do conceito de “natural” associado aos produtos fitoterápicos, que contribuiu para o aumento do uso de plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas, esse conceito inspira a “ausência de componentes químicos nocivos à saúde”, levando a acreditar, portanto, que esses produtos não causam danos ou, de outra forma, não representam perigo para os usuários (Mengue et al., 2001). No entanto, a falsa propaganda veiculada na mídia e o desconhecimento por parte da população sobre possíveis efeitos secundários e toxicidade de espécies vegetais utilizadas habitualmente podem levar a sérias consequências para saúde (Moll, 2000). Existe um número cada vez maior de estudos científicos que comprovam a toxicidade de plantas, inclusive daquelas usadas na medicina popular, que são comumente consumidas sem restrição e de forma indiscriminada.

A partir das publicações científicas, intensificadas principalmente a partir da década de 1980, sobre o potencial dessas investigações para a descoberta de novos fármacos, a pesquisa envolvendo os saberes e práticas “tradicionais” ganharam novo sentido, extrapolando a simples compilação de plantas usadas na medicina popular. No Brasil, várias pesquisas foram realizadas com contribuições relevantes sobre o assunto, não somente quanto aos aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de extratos provenientes de plantas que ocorrem nos diferentes biomas brasileiros (Jorge et al., 2004; Duarte et al., 2004; Lima et al., 2006).

No caso do emprego dos recursos vegetais pela medicina tradicional, a relação que uma população estabelece com o ambiente em que vive molda a cultura popular desse povo, promovendo sistemas próprios de manejo, resultado da experiência acumulada durante séculos de relação com o seu habitat natural, que permite suprir suas necessidades com um prejuízo ambiental mínimo (Albuquerque, 2005).

A idéia primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos sintéticos, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, também registrados. Objetivos secundários, mas não menos importantes, seriam a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato autóctone para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local (Lapa et al., 2001).

As investigações etnobotânicas e etnofarmacológicas têm se mostrado eficientes como estratégia de seleção de plantas medicinais para a busca de novos fármacos. Por definição, a etnobotânica se ocupa da "inter-relação direta entre pessoas e plantas", incluindo todas as formas de percepção e apropriação dos recursos vegetais (Albuquerque, 2005) enquanto a etnofarmacologia se ocupa do estudo dos preparados tradicionais utilizados em sistemas de saúde e doença que incluem, isoladamente ou em conjunto, plantas, animais, fungos ou minerais. Na avaliação da eficácia dos usos “tradicionais” faz-se o emprego de um grande número de técnicas analíticas e de ensaios farmacológicos (Waller, 1993). Assim, o estudo etnofarmacológico representa importante instrumento para a realização de pesquisa de bioprospecção que, aliado aos avanços da ciência, constitui importante caminho para a descoberta de novos

fármacos, aproveitamento racional e preservação da biodiversidade e promoção do uso local das plantas medicinais, devendo tais práticas científicas respeitarem legislações pertinentes, como propriedade intelectual do conhecimento tradicional associado e acesso ao patrimônio genético (Etkin, 2001).

2.1.1 Gênero *Bathysa*

Estudos sobre a composição da vegetação brasileira tiveram um avanço significativo nos últimos 10 anos. No entanto, esses estudos ainda não foram suficientes para se conhecer o número real de espécies vegetais da nossa biodiversidade. Nesse contexto, pode-se citar a carência de informação sobre a diversidade florística da Zona da Mata de Minas Gerais, como descrita nos trabalhos realizados por Meira Neto e Martins (2002), Silva et al. (2003), e Marangon et al. (2003) relativos à ocorrência de espécies vegetais, muitas delas de interesse médico. Nesta região de Minas, que ainda conserva fragmentos do bioma Mata Atlântica, é comum encontrar-se alta riqueza florística e segundo Silva e Soares (2003), as famílias mais ricas são Leguminosae, Mystaceae e Lauraceae, Euphorbiaceae e Rubiaceae. É nesta família que se encontra a *Bathysa cuspidata*.

O gênero *Bathysa* engloba cerca de 15 espécies de árvores, arvoretas ou arbustos que podem chegar até 12m. São exclusivamente neotropicais, ocorrendo no Panamá, Venezuela, Guiana Francesa, Peru e Brasil. No Brasil ocorrem 7 espécies, todas exclusivas da Mata Atlântica das regiões Sudeste e Sul: *B. mendonçaei*, *B. cuspidata*, *B. gymnocarpa*, *B. sylvestrae*, *B. australis*, *B. stipulata* e *B. nicholsonii*. O gênero foi assim denominado devido à espessura do estilete, pois *Bathysa* deriva do grego “bathys” que significa espesso, sólido. Os exemplares de *Bathysa* depositados são na maioria das vezes indeterminados, com identificação duvidosa ou com atribuição errônea do autor, devido à escassez de bibliografia sobre o gênero e principalmente à falta de estudos abrangentes sobre todas as espécies brasileiras (Germano Filho, 1999). Além disto, a distribuição das espécies de *Bathysa*, no Brasil, restringe-se quase que exclusivamente à Mata Atlântica, estando, portanto, em sua maioria ameaçadas de extinção pelo impacto que este ecossistema vem sofrendo pela ação antrópica. No estado de Minas Gerais é encontrada principalmente no complexo

da Mantiqueira que detém grandes remanescentes da Mata Atlântica. A Serra do Brigadeiro, localizada em parte no Município de Araponga, Zona da Mata Mineira, faz parte do complexo da Mantiqueira. A Serra do Brigadeiro apresenta condições ecológicas muito diferentes das áreas vizinhas que condicionam a existência de um microclima peculiar – frio, de alta pluviosidade e elevada umidade, com uma flora ainda pouco conhecida. Segundo a classificação de Veloso et al. (1991) e levantamento florístico (Ribeiro, 2003), a vegetação florestal existente na Serra do Brigadeiro é caracterizada como Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Ombrófila Densa (Couto e Dietz, 1980).

Algumas espécies de *Bathysa* são incluídas entre as falsas quinas que, segundo Cunha (1937), englobam todas as plantas que contenham cascas de sabor amargo, de coloração avermelhada, amarelada ou acinzentada, capazes de fornecer uma alcoolatura ou decoto usados como tônicos ou febrífugos. As verdadeiras quinas diferem dessas por possuírem quinino e ainda assim em percentagem mínima prevista pelo código farmacêutico. Correa (1984) afirma que as cascas constituem tônicos que são frequentemente empregados no tratamento de anemias, caquexias, febres palustres, ancilostomíase, convalescência, entre outros, além de fornecerem matéria corante. Segundo Hoehne (1939), tanto as falsas quanto as verdadeiras quinas são tóxicas para os herbívoros, já que estes animais nunca atacam as folhas de tais plantas. Com o objetivo de conhecer as plantas usadas por moradores do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro- MG (PESB), pesquisadores da Universidade Federal de Viçosa realizaram estudo etnofarmacológico para levantar o uso dessas plantas. O resgate das informações foi realizado com 23 moradores, junto à comunidade do Estouro pertencente ao município de Araponga e no município de Bom Jesus da Madeira pertencente ao município de fervedouro, entre agosto de 2007 e setembro de 2008. A *B. cuspidata* foi a planta mais citada para o uso de alterações hepáticas e a partir deste levantamento os extratos de folha e casca começaram a ser estudados quanto ao seu efeito antihepatotóxico. No entanto, são escassos os estudos químicos e farmacológicos sobre a *Bathysa*. Estudos para conhecer as plantas usadas por moradores da região do PESB já vem sendo desenvolvidos tendo sido constatado,

nesta região, que a mucilagem de *B. australis* é muito empregada como cicatrizante (Leoni, 1995).

2.2. Fígado

O fígado é o órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos. É, portanto, uma interface entre o sistema digestivo e o sangue. A posição do fígado no sistema circulatório é ideal para captar, transformar e acumular metabólitos e para a neutralização e eliminação de substâncias tóxicas pela bile (Junqueira e Carneiro, 2008). O fígado é um órgão que possui dupla circulação: a artéria hepática, que é um ramo do tronco celíaco e fornece de 30 a 40% do sangue oxigenado e a veia porta, formada pelas veias mesentéricas, superior e inferior, que drenam o sangue do intestino, pâncreas e baço. O sistema eferente é formado pelas veias hepáticas que desembocam na cava inferior.

Os componentes estruturais do fígado incluem: hepatócitos, organizados como placas celulares; estroma de tecido conjuntivo; veia central do lóbulo, nervos, vasos linfáticos e ducto biliar; capilares sinusóides entre as placas de hepatócitos onde se encontram macrófagos, que no fígado são denominados células de Kupffer (Lee et al., 2001). No metabolismo de carboidratos, o fígado desempenha funções específicas de armazenamento de glicogênio, conversão da galactose e frutose em glicose, gliconeogênese e formação de muitos compostos químicos importantes a partir dos produtos intermediários do metabolismo de carboidratos (Kierszenbaum, 2008).

No metabolismo de gorduras o fígado é responsável pela oxidação dos ácidos graxos para a produção de energia, pela formação da maioria das lipoproteínas, pela síntese de colesterol e fosfolípidios e pela conversão de grandes quantidades de carboidratos e proteínas em gordura (Motta, 2000; Widmaier et al., 2006).

O fígado é um órgão envolvido no metabolismo e na desintoxicação de vários componentes e assim, o hepatócito é susceptível à injúria devido à função de absorver e estar em contato com vários metabólitos, substâncias tóxicas e drogas (Lee et al., 2007). A capacidade de desintoxicação realizada pelo hepatócito é dependente do

grande desenvolvimento do retículo endoplasmático liso (REL) presente em seu interior. No REL ocorre a modificação da molécula do agente agressor através dos processos de conjugação, metilação e oxidação tornando essas moléculas susceptíveis à ação das oxirredutases. Um vasto número de substâncias químicas usadas, industrial e farmacologicamente, fornece aumento constante do risco de lesões do fígado e existe um espectro muito grande de efeitos hepatotóxicos produzidos por estas substâncias. A maior causa de desordens do fígado ocorre devido à exposição a diferentes poluentes e xenobióticos como paracetamol, tetracloreto de carbono e álcool, que lesam o fígado e levam à produção de espécies reativas de oxigênio (Sreelatha et al., 2009).

2.3. Radicais Livres

Radicaís livres apresentam elétron desemparelhado no orbital externo, o que os tornam muito reativos a qualquer outro tipo de molécula, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Radicaís livres podem iniciar reações em cadeia que levam à formação de novos radicaís, amplificando sua capacidade de produzir lesões (Brasileiro Filho, 2006).

Os radicaís livres surgem quando os elétrons do último orbital ficam desemparelhados por ganho ou perda de elétrons. Essa transferência de elétrons ocorre nas reações de oxirredução, quando uma molécula cede elétrons (se oxida) para outra (que se reduz). Como o processo é feito em etapas, surge à oportunidade de se formarem compostos intermediários com elétrons desemparelhados (radicaís livres) o que acontece com freqüência nas reações de oxirredução com participação do oxigênio molecular (Brasileiro Filho, 2006).

O oxigênio molecular (O_2) é a principal fonte de radicaís livres dentro da célula. A importância do oxigênio na geração de radicaís livres, causando lesão celular e envelhecimento das células, tem atraído uma atenção crescente ao longo dos anos (Salawu e Akindahunsi, 2007). No processo normal de respiração celular, o O_2 é reduzido a água com aceitação de 4 elétrons (e^-). Como os elétrons são passados individualmente existem fases intermediárias em que o O_2 pode formar o superóxido

O_2^\bullet (ganho de um elétron), podendo ocorrer outra redução levando a formação de H_2O_2 , que também pode ser reduzida originando H_2O e radical hidroxil (OH^\bullet). Estas reações ocorrem no interior da mitocôndria, ficando a essa organela restrita devido à arquitetura molecular especial das enzimas que comandam esses processos de oxirredução (Alberts et al., 2007) .

Os radicais livres são produzidos no metabolismo normal das células não só na cadeia respiratória, como também nos processos de oxidação catalisados por oxidases citoplasmáticas, como nos peroxissomos (Ribeiro et al., 2005). Diversas agressões produzem lesões por liberar radicais livres. Substâncias químicas os produzem quando são metabolizadas nas células; radiações ionizantes os geram ionizando água; fumaça de cigarros e alguns tipos de alimentos oxidados os contêm. Os radicais livres têm vida média curta, razão pela qual são de difícil quantificação. Assim, a dosagem de produtos derivados da peroxidação de proteínas, de ácidos nucléicos e de lipídios (malondialdeído e hidrocarbonetos) têm sido os métodos mais utilizados para este tipo de análise.

2.4.Tetracloroeto de carbono (CCl_4) e marcadores de lesões hepáticas

O tetracloroeto de carbono (CCl_4) é um solvente industrial e sua hepatotoxicidade já é bastante conhecida por causar esteatose, necrose e cirrose em animais (Bruckner et al., 1984; Baru, S, 2003; Guicciardi e Gores, 2005; Chien-Chen et al., 2009). É utilizado como refrigerante para máquinas e propulsor, desengraxante de metal, na cloração de compostos orgânicos e produção de semicondutores e como fumigante agrícola (CETESB, 2010). Seu componente é rapidamente metabolizado no Retículo endoplasmático Liso (REL) do hepatócito *in vivo* para formar o radical livre tricolorometil (CCl_3^\bullet), que é o principal responsável pela necrose hepatocelular. O CCl_3^\bullet também ataca os lipídios poliinsaturados da membrana, originando um L^\bullet (Lipídio com radical centrado em carbono). O L^\bullet reage com o oxigênio originando um lipoperoxil ($L^\bullet + O_2 \rightarrow RLOO^\bullet$) que pode agir sobre outro lipídio, transferindo para um carbono o elétron desemparelhado, originando um novo L^\bullet , e assim sucessivamente (peroxidação em

cadeia), alterando várias moléculas lipídicas de membrana. Ao agir sobre outros lipídios, o LOO^{\bullet} se transforma em um hidróxido-peróxido (LOOH) que pode se decompor em aldeídos como malondialdeído e 4-hidroxi nonenal (Brattin et al., 1985; Boll et al., 2001; Janakat e Al Meire, 2002; Ha e Lee, 2003; Brasileiro Filho, 2006). O CCl_4 atua também no retículo endoplasmático rugoso (RER) dentro da célula, interferindo na síntese de proteínas e alterando a formação de lipoproteínas que são responsáveis em direcionar os lipídios captados e formados dentro da célula para a membrana e para o meio externo. Com esse direcionamento comprometido os lipídios se acumulam no interior da célula, levando ao desenvolvimento de um quadro degenerativo conhecido como esteatose (Chung et al., 2000; Boll et al., 2001; Brasileiro Filho, 2006). A lesão aparecerá na célula toda vez que um agente agressor interferir no metabolismo de ácidos graxos, aumentando sua síntese ou dificultando seu metabolismo, transporte e excreção.

A hepatotoxicidade pode ser caracterizada, em homens e animais, por colestase, hiperbilirrubinemia, hipoproteinemia, elevação das transaminases e sais biliares no sangue, inibição da síntese de proteínas e acúmulo de lipídios no interior da célula. Portanto, alterações nos parâmetros bioquímicos e patológicos estão positivamente correlacionadas com hepatotoxicidade (Chung et al., 2000; Tyson et al., 2004).

As enzimas transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), catalisam a conversão dos aminoácidos alanina e aspartato em piruvato e oxalacetato, respectivamente. Estas enzimas estão presentes em vários tecidos do organismo e não são organo-específicas. A ALT é encontrada em maior quantidade no fígado enquanto a AST é encontrada no fígado, coração e músculo esquelético. A ALT é exclusivamente citoplasmática e a AST é encontrada no citoplasma e mitocôndria e assim, em caso de lesão hepática causada pelo CCl_4 , a ALT é mais facilmente liberada quando comparada à AST (Ozer et al., 2008). A fosfatase alcalina (FA) e a γ -glutamil transferase (GGT) são enzimas hepáticas que apresentam alterações sorológicas em casos de colestases crônicas e doenças ductopênicas. Na cirrose biliar primária, que é uma doença colestática crônica e

progressiva caracterizada por inflamação e destruição dos ductos biliares intra hepáticos, os níveis de FA e GGT estão elevados (Chang et al., 1999).

A bilirrubina existe de duas formas: a bilirrubina não conjugada (indireta) e a bilirrubina conjugada (direta). A bilirrubina indireta é lançada no sangue e é insolúvel, por isso não pode ser excretada diretamente. Após a conjugação, a bilirrubina fica solúvel e pode ser excretada pelos canalículos biliares. Quando ocorre colestase, que consiste na interrupção do fluxo biliar para o intestino, há retenção da bile no fígado e refluxo do mesmo para a corrente sanguínea. Neste caso a bilirrubina estará aumentada no sangue, o que permite que ela seja utilizada também como marcador de lesão hepatocelular (Brasileiro Filho, 2006).

As espécies reativas de oxigênio são formadas no interior da célula em condições fisiológicas, não só pela cadeia transportadora de elétrons, mas também nos processos de oxidação celulares catalisados pelas oxidases citoplasmáticas, nos peroxissomos e nos sistemas de defesa do organismo. Os sistemas de defesa que protegem o corpo de lesões causadas por radicais livres incluem as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-peroxidase (GPO). Seu papel como enzimas protetoras é bem conhecido e tem sido investigado extensivamente em modelos *in vivo* (Gianni et al., 2004). A SOD existe em três formas: as que contêm Cu e Zn que são citossólicas e as que contêm Mn que são mitocondriais. Esta enzima tem a função de captar o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) na presença de água e produzir H_2O_2 de forma muito mais acelerada do que a conversão espontânea (Salvemini et al., 2001). A CAT é uma enzima tetramérica do grupo heme que catalisa a reação $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$. A catálise da H_2O_2 é importante, pois na presença de ferro leva à formação do radical hidroxil (OH^{\cdot}) altamente reativo e danoso às células (Mukherjee, 2003). Lesões graves em hepatócitos podem levar a quedas bruscas na quantidade destas enzimas devido à exaustão enzimática como resultado do estresse causado pelo CCl_4 (Dang et al., 2008).

A eficiência do sistema de transporte de elétrons, a pouca disponibilidade de metais de transição livres no citoplasma e os mecanismos antioxidantes naturais controlam a produção e os efeitos dos radicais livres gerados naturalmente nas células.

Em condições normais, existe equilíbrio entre produção e inativação de radicais livres, o que impede o aparecimento de lesões (Ribeiro et al., 2008). Quando este equilíbrio se rompe, quer por aumento na produção de radicais livres, quer por redução nos mecanismos antioxidantes, inicia-se um processo de estresse oxidativo que pode resultar em lesões.

Para esclarecer a relevância etnofarmacológica, eficácia e possível mecanismo de ação da *B. cuspidata* sobre desordens hepáticas induzidas por radicais livres produzidos a partir do CCl₄, foram investigados os efeitos curativo e preventivo do extrato etanólico da casca de *B. cuspidata*, a partir da análise de uma série de enzimas, da quantificação de subprodutos da peroxidação lipídica e também pelas modificações morfológicas intracelulares e teciduais.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivos Gerais

- Analisar o efeito curativo e preventivo do extrato de *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. sobre lesão hepática induzida pelo CCl₄.

3.2- Objetivos específicos

- Determinar, através de análises enzimáticas, análise histológica e também dos subprodutos da peroxidação lipídica, os efeitos do CCl₄ no fígado de ratos Wistar.

- Verificar se o extrato da *B. cuspidata* tem efeito curativo em lesões hepáticas que foram induzidas previamente pela aplicação intraperitoneal de CCl₄.

- Verificar se o extrato da *B. cuspidata* protege o fígado de lesões causadas posteriormente pela aplicação intraperitoneal de CCl₄.

- Verificar se o uso popular desta planta pode ser justificado através de um estudo controlado, utilizando marcadores de peroxidação lipídica, atividade enzimática e análise histológica.

4. Referências Bibliográficas

- Adaramoye, O.A., Farombi, E.O., Nssien, M., Idowu, S.O., Ademowo, O.G., Adeyemis, E.O., 2008. Hepatoprotective activity of purified fractions from *Garcinia kola* seeds in mice intoxicated with carbon tetrachloride. *Journal of Medicinal Food* 11, 544-550.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Peter, W., 2007. *Fundamentos de Biologia Celular*. Rio de Janeiro, Elsevier.
- Albuquerque U.P. Introdução à etnobotânica. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2005.
- Baru, S., 2003. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 113-127.
- Boll, M., Weber, L.W., Becker, E., Stampfil, A., 2001. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Journal of Biosciences* 56, 649-59.
- Brasileiro- Filho, G., 2006. In Brasileiro-Filho, G. *Bogliolo Patologia*. Rio de Janeiro p.24-26.
- Brattin, W.J., Glende Jr, E.A., Recknagel, R.O., 1985. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 1, 27-38.
- Bruckner, J.V., Luthra, R., Kyle, G.M., 1984. Influence of time of exposure to carbon tetrachloride on toxic liver injury. *Annual Review Chronopharmacology* 1, 373-376.
- Calixto, J.B., Scheidt, C., Otuki, M., Santos, A.R.S., 2001. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. *Expert Opinion Emerging Drugs*, 2, 261-279.
- CETESB (2010) Ficha de Informação de Produto Químico. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente.
- Chang, L.C., Sheu, H.M., Huang, Y.S., Tsai, T.R., Kuo, K.W., 1999. A novel function of emodin. *Biochemical Pharmacology* 58, 49-57.
- Chien-Chen, H., Chin-Lin, H., Shao-En, T., Timothy, Yu-Chi.F., Gow-Chin, Y., 2009. Protective effect of *Millettia reticulata* Benth against CCl₄- Induced hepatic damage and inflammatory actions rats. *Journal of Medical Food* 12, 821-828.

- Chung, H.S., Chong, L.C., Lee, S.K., Shamon, L.A., Breemen Olatunde, F., 2000. Mechanisms for the hepatoprotective action of Kolaviron. Studies on hepatic enzymes, microsomal lipids and lipids peroxidation in carbon tetrachloride treated rats. *Pharmacological Research* 42, 75-80.
- Correa, M. P., 1984. In: Correa, M.P (eds), *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF p.1- 747.
- Couto, E. A., Dietz, J. M., 1980. Sugestões para a criação do Parque Nacional da Serra do Brigadeiro. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa.
- Cunha, N.S., 1937. Uma perícia farmacognóstica e falsas quinas do Brasil. *Revista da Associação Brasileira de Farmacêuticos* 18, 156-168.
- Dang Shuang-suo., Zhang Xin., JIA Xiao-li., Cheng Yan-an., Song Ping., Liu En qi., HE qian and LI Zong-fang., 2008. Protective effects of emodin and astragalus polysaccharides on chronic hepatic injury in rats. *Chinese Medical Journal* 121, 1010-1014.
- Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Pereira, B., Magalhães, P.M., Delarmelina, C., 2004. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14, 6-8.
- Eldin, S., Dunford, A., 2001. *Fitoterapia na atenção primária à saúde*. São Paulo, Manole, p.163.
- Etkin, N.L. 2001. Perspectives in ethnopharmacology: forging a closer link between bioscience and traditional empirical knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 177-182.
- Farias, M.R., 2001. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. P. 197-220. In: Simões, C.M.O. (ed). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina
- Farnsworth, N.R., 1994. Ethnopharmacology and drug development. *Ciba Foundation Symposium* 185, 42-51: discussion 51-59
- Germano Filho, P., 1999. Estudos taxonômicos do gênero *Bathysa* C. Presl (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro).

- Gianni, O., Jan, K.J., Douglas, M. J., Stuart, P.M., Tarnopolsky, M.A., 2004 Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging human skeletal muscle. *Experimental. Gerontology* 39, 1391-1400.
- Guerra, P.M., Nodari, O.R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p.15, 2001.
- Guicciardi, M.E., Gores, G.J., 2005. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Journal of Gastroenterology of Hepatology* 54, 1024–1033.
- Ha, J.B., Lee, J.Y., 2003. The effect of chondroitin sulfate against CCL4- induced hepatotoxicity. *Biological & Pharmacological Bulletin* 26, 622-626.
- Hoehne, F.C., 1939. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais*. Graphicars. São Paulo 335p.
- Janakat, S., Al-Meire, H., 2002. Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon-tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of Pharmacology and Toxicological Methods* 48, 41-44.
- Jorge, R.M., Leite, J.P.V., Oliveira, A.B., Tagliati, C.A., 2004. Evaluation of antinociceptive anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 94, 93-100.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2008 In: Junqueira, L.C., Carneiro, J (eds). *Histologia Básica. Texto e Atlas*, 11ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.323.
- Khatri, A., Garg, A., Agrawal, S.S., 2009. Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea* L. and stem bark of *Tecomella undulate*. *Journal Ethnopharmacology* 122, 1-5.
- Kaur, S., Michael, H., Arora, S., Harkonem, P.L., Kumar, S., 2005. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 249-251.
- Kierszenbaum, A.L., 2008. In: Kierszenbaum, A.L (eds). *Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à Patologia*. 2ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier p.499-508.
- Ki-Tae, H., Sang-Ju, Y., Dall-Yeong, C., Dong-Wook, K., June-Ki, K., Cheorl-Ho, K., 2005. Protective effect of *Lycium Chinese* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 529-535.

- Lapa, A. J., Souccar, C., Lima-Landman, M.T.R., Godinho, R.O., De Lima, T.C.M.,
Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões, C.M.O., Schenkel,
E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P.de Mentz, L.A., Petrovick, P.R., 2001.
Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª ed. Porto Alegre/Florianópolis,
UFRGS/EDUFSC, Capítulo 11, p.183-198
- Lee, C.H., Park, S.W., Kim, Y.S., Kang, S.S., Kim, J.A., Lee, S.H., 2007. Protective
mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in
mice. *Biological & Pharmacological Bulletin* 30, 1898-1904.
- Lee, K.S., Lee, S.J., Park, H.J., Chung, J.P., Han, K.H., Chon, C.Y., Lee, S.I., Moon,
Y.N., 2001. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells.
Yonsei Medical Journal 42, 1-8.
- Leite, J.P.V., 2008a. Desenvolvimento da fitoterapia. In: *Fitoterapia: bases científicas
e tecnológicas*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu. Capítulo 1, p. 3-20.
- Leite, J.P.V., 2008b. Química de produtos naturais: Uma abordagem biossintética.
In: *Fitoterapia*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu. Capítulo 3, p.47-98.
- Leite, J.P.V., Fernandes, J.M., Favaro, L.B., Gontijo, D.C., Marotta, C.P.B., Siqueira,
L.C., Maia, R.T., Garcia, F.C.P., 2008. Plantas Medicinais no entorno do Parque
Estadual da Serra do Brigadeiro. MG. *Biota* 1, 16-34.
- Leoni, S.L., 1995. Fitoterapia no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG.
Pabstia 7, 1-5.
- Lewinsohn, T.M., Prado, P.I., 2002. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual
do conhecimento. São Paulo: Contexto. Capítulo 2, 176p.
- Lima, M.R.F., Ximenes, C.P.A., Luna, J.S., Sant' Ana, A.E.G., 2006. The antibiotic
activity of some Brazilian medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*
16, 300-306.
- Lombardi, J.A., Gonçalves, M., 2000. Composição florística de dois remanescentes
de Mata Atlântica do sudeste de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica* 23,
255-282.
- Marangon, L.C., Soares, J.J., Feliciano, A.L.P., 2003. Florística da Mata da Pedreira,
município de Viçosa, Minas Gerais. *Revista Árvore* 27, 207-215.
- Mengue, S. S., Mentz, L.A., Shenkel, E.P., 2001. Uso de plantas medicinais na
gravidez . *Revista Brasileira de Farmacognosia* 11, 21-35.

- Meira-Neto, J.A.A., Martins, F.R., 2002. Composição florística de uma floresta estacional semidecidual montana no município de Viçosa-MG. *Revista Árvore* 26, 437-446.
- Moll N.M.C., 2000. Uso racional de las plantas medicinales. *Pharmaceutical Care Espana* 2, 9-19.
- Motta, V.T., 2000. Bioquímica Clínica: Princípios e interpretações. 3° Ed. POA. Ed. Médica Missau 215-232.
- Motomiya, A.V.A., Polezzi, R.C.S., Wilson, C.F., Gomes, L.S.M.F., Batista, S. de., 2004. Levantamento e cultivo das espécies das plantas medicinais utilizadas em Cassilândia, MS. *Anais do 2° Congresso Brasileiro de Extensão Universitária*. Belo Horizonte.
- Mukherjee, P.K., 2003. Plant products with hypocholesterolemic potentials. In: Taylor, Steve L. (Ed), *Advanced in Food and Nutrition Research*, Elsevier Science 47, 277-338
- Nunes, L.G., 2008. 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. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa).
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S., 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245, 194-205.
- Rates, S.M.K., 2001. Plants as sources of drugs. *Toxicon* 39, 13-16.
- Ribeiro, C.A.N., 2003. Florística e fitossociologia de um trecho de floresta atlântica de altitude na fazenda da Neblina, Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa).
- Ribeiro, S.M.R., Queiroz, J.H., Peluzio, M.C.G., Costa, N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, M.E.L.R. 2005. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, 21, 133-149.
- Ribeiro, S.M.R., Queiroz, M.E.L.R, Peluzio, M.C.G., Costa, N.M.B., Matta, S.L.P., Queiroz, J.H. 2008. Antioxidantes da dieta. In: *Nutrição Básica e Metabolismo*, Costa, NMB e Peluzio, MCG Eds., Editora UFV, Viçosa, pp. 382-400.
- Salawu, S.O., Akindahunsi, A.A., 2007. Protective effect of some tropical vegetables against CCl4-Induced hepatic damage. *Journal of Medical Food* 10, 350-355.

- Salvemini, D., Mazzon, E., Dugo, L., Riley, D.P., Serriano, L., Caputi, A.P., Cuzzuocrea, S., 2001. Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M 40403. *British Journal of Pharmacology* 132, 815-827.
- Silva, A.F., Oliveira, R.V., Santos, N.R.L., de Paula, A., 2003. Composição florística e grupos ecológicos das espécies de um trecho de floresta semidecídua submontana da fazenda de São Geraldo, Viçosa - MG. *Revista Árvore* 27, 311-319.
- Silva, L.A., Soares, J.J., 2003. Composição florística de um fragmento de floresta estacional semidecídua no município de São Carlos-SP. *Revista Árvore* 27, 647-656.
- Soares, M.P., Saporetti Junior, A.W., Meira Neto, J.A.A., da Silva, A.F., de Souza, A.L., 2006. Composição florística do estrato arbóreo de floresta Atlântica interiorana em Araponga – Minas Gerais. *Revista Árvore* 30, 859-870.
- Sreelatha, S., Padma, P.R., Umadevi, M., 2009. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 47, 702-708.
- Tyson, C.A., Story, D.L., Stephens, R.J., 2004. Ultrastructural changes in isolated rat hepatocytes exposed to different CCl₄ concentrations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 114, 511-517.
- Veloso, H.P., Rangel-Filho, A.L.R., Lima, J.C.A., 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: IBGE 124p.
- Wall, M.E., Wani, M.C., Gaetano, K., Manikumar, G., Taylor, H., McGivney, R., 1988. Plant antimutagenic agents, 4. Isolation and elucidation of maesol, an inactive constituent of *Maesa ssp*. *Journal of Natural Products* 51, 1226-1231
- Waller, D.P. 1993. Methods in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 38, 189-195
- Widmaier, P., Raff, H.E., Strang K.T., 2006. *Fisiologia Humana*. 9^a ed. Guanabara Koogan.

CAPÍTULO I

Resumo

Efeito do extrato da casca de *Bathysa cuspidata* (A. St-Hill) Hook.f. no tratamento de lesões no fígado induzidas por tetracloreto de carbono.

Relevância etnofarmacológica: A *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. pertencente à família Rubiaceae nativa da Mata Atlântica, é usada na medicina popular brasileira para tratamento de doenças do estômago, fígado e como cicatrizante.

Objetivo: Investigar o efeito curativo de extratos da casca de *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. sobre lesões hepáticas induzidas em ratos Wistar pelo tetracloreto de carbono (CCl₄).

Material e métodos: A lesão hepática foi induzida por meio da administração intraperitoneal de CCl₄, a cada 48 horas, durante 12 dias. O tratamento dos animais com extrato de *B. cuspidata* (EBC) foi realizado por meio de gavagem. Quarenta e dois ratos foram aleatoriamente divididos em 6 grupos, com 7 animais cada, constituídos da seguinte forma: Grupo 1: CCl₄+12 (eutanasiado 12 dias após o término de administração do CCl₄); Grupo 2: CCl₄ (eutanasiado logo após a administração da última dose de CCl₄); Grupo 3: CCl₄+ Dimetilsulfóxido (DMSO durante 12 dias); Grupo 4: EBC (EBC 400mg/kg durante 12 dias); Grupo 5: CCl₄+EBC 200mg/kg e Grupo 6: CCl₄+ EBC 400mg/kg,

Resultados: O grupo 2 apresentou redução significativa no peso final e no índice hepatossomático em relação aos demais grupos e, em relação à alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), este grupo apresentou os maiores valores no soro. EBC promoveu redução na quantidade de hidroperóxidos, malondialdeído e gotículas lipídicas no fígado quando comparado aos outros grupos (p<0,05). As atividades de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) aumentaram nos grupos 5 e 6 quando comparado aos outros grupos (p<0,05).

Conclusão: Estes resultados demonstram que o extrato da casca de *B. cuspidata* estimula o sistema de defesa antioxidante e reduz lesões morfológicas e funcionais no fígado de ratos Wistar expostos ao CCl₄.

Abstract

Effect of bark extract *Bathysa cuspidata* (A. St-Hill) Hook.f. in the treatment of liver injury induced by carbon tetrachloride

Ethnopharmacological relevance: *Bathysa cuspidata* belongs to the Rubiaceae family and is used in popular medicine for the treatment of stomach and liver disorders and as a healing agent.

Aim: To investigate the effect of stem bark ethanolic extract of *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. on liver lesions induced by carbon tetrachloride (CCl₄) in Wistar rats.

Materials and methods: Liver lesions were induced by intraperitoneal administration of CCl₄ every 48 hours for 12 days. The animals were treated with *B. cuspidata* extract (BCE) administered by gavage. Forty-two rats were randomized into 6 treatment groups with 7 animals in each group. Group 1: CCl₄ + 12 days; Group 2: CCl₄; Group 3: CCl₄ + dimethyl sulfoxide; Group 4: BCE 400 mg/kg; Group 5: CCl₄ + BCE 200 mg/kg; Group 6: CCl₄ + BCE 400 mg/kg.

Results: Final weight and hepatosomatic index were significantly reduced in Group 2 compared to the other groups. Animals in Group 2 also had the highest serum ALT and AST levels. BCE administration resulted in a significant reduction in the quantity of hydroperoxides and malondialdehyde compared to the other groups. The number of lipid droplets in the liver was also lower in the BCE groups ($p < 0.05$). A significant increase was found in superoxide dismutase activity and catalase enzymes in groups 5 and 6 compared to the other groups ($p < 0.05$).

Conclusion: These results show that the extract of *B. cuspidata* stem bark stimulates the antioxidant defense system and reduces morphological and functional liver damage in Wistar rats exposed to CCl₄.

1. Introdução

O fígado é um importante órgão responsável por diversos processos metabólicos de desintoxicação do organismo devido a um complexo sistema enzimático que regula as funções hepáticas antioxidantes (Sanmugapriya e Venkataraman, 2006; Ranawat *et al.*, 2010). Lesões hepáticas frequentemente reduzem a função de defesa antioxidante desse órgão e aumentam a susceptibilidade do organismo durante a exposição a xenobióticos (Janakat e Al Meire, 2002; Lee *et al.*, 2003). Inúmeras substâncias químicas, usadas industrial e farmacologicamente, provocam aumento constante do risco de lesões do fígado, existindo um espectro elevado de efeitos hepatotóxicos produzidos por essas substâncias (Bissel *et al.*, 2001; Roome *et al.*, 2008). Grande parte das desordens do fígado ocorre devido à exposição a compostos químicos que podem induzir ao estresse oxidativo, com elevação da produção de compostos radiculares reativos. Esses compostos podem causar danos oxidativos às biomoléculas presentes em membranas celulares como proteínas e lipídios, culminando em perda parcial ou total da função celular (Dhuley and Naik, 1997; Faremi *et al.*, 2008). O tetracloreto de carbono (CCl₄), devido à propriedade de induzir lesões hepáticas por meio da elevação de espécies quimicamente reativas, principalmente pelo radical triclorometil (CCl₃), tem sido amplamente utilizado em modelos experimentais de hepatotoxicidade (Brattin *et al.*, 1985; Hwang *et al.*, 2009). Além disso, constitui um modelo reprodutível, de baixo custo e rápido efeito (Khan e Ahmed, 2009), sendo frequentemente empregado na investigação da atividade de extratos vegetais sobre desordens hepáticas (Sreelatha *et al.*, 2009).

O tratamento das enfermidades humanas a partir de plantas medicinais e seus derivados é uma prática antiga que se encontra em expansão por todo o mundo (Eldin e Dunford., 2001). Atualmente, existe considerável interesse da medicina na busca de produtos naturais extraídos de plantas, principalmente daquelas usadas na medicina tradicional, que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças, inclusive de desordens hepáticas induzidas por agentes tóxicos (Shen *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2009). Este tipo de investigação tem se mostrado eficiente como estratégia de seleção de plantas medicinais para a busca de

novos fármacos, pois cerca de 80% da população mundial utiliza produtos derivados de plantas nos seus cuidados básicos de saúde (Farnsworth, 1994; Kaur et al., 2005).

A *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f., pertencente à família Rubiaceae, é uma planta conhecida popularmente como “quina-do-mato” e suas cascas são usadas na medicina popular para tratamento de doenças do estômago, do fígado e como cicatrizante. Estudos com extrato etanólico e fração diclorometânica da *B. cuspidata* mostraram atividade antinociceptiva e antiinflamatória em camundongos albinos previamente tratados por via enteral (Vanderlinde et al., 2001). Extratos etanólicos da casca dessa espécie apresentaram em sua constituição cumarinas, esteróides, saponinas, taninos, alcalóides e quando utilizados em testes de toxicidade, não se mostraram mutagênicos nas doses testadas (Nunes, 2008).

Para esclarecer a relevância etnofarmacológica, eficácia e possível mecanismo de ação, foi investigado o efeito curativo do extrato etanólico das cascas de *B. cuspidata* sobre lesões hepáticas induzidas por CCl₄ em ratos Wistar.

2. Material e métodos

2.1. Preparação do extrato de *B. cuspidata*.

Plantas da espécie *B. cuspidata*, coletadas em bioma de Mata Atlântica, no município de Araponga, estado de Minas Gerais, Brasil (20°43'00,0``S e 42°29'10,8``W, 1.200 m de altitude), foram herborizadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Viçosa, sob o registro (VIC 21559). Amostras das cascas da espécie foram secas a temperatura ambiente em sala escura, ventilada, por 48hs, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de faca e armazenadas. O extrato etanólico foi obtido por método de percolação a partir da droga vegetal empregando etanol 98° GL como solvente extrator, de forma exaustiva. Em seguida o extrato foi concentrado em evaporador rotatório até a completa remoção do solvente. Para completa remoção do solvente, o extrato foi posteriormente liofilizado (Nunes, 2008).

2.2. Produtos químicos

Os reagentes químicos tetracloreto de carbono (CCl₄), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido tiobarbitúrico (TBA), formaldeído e glutaraldeído foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Missouri, USA). Os kits diagnósticos para aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), γ -glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA) foram adquiridos da Human In Vitro Diagnostics (Minas Gerais, Brasil) e o kit para dosagem de bilirrubina foi obtido da Labtest (São Paulo, Brasil). A atividade de superóxido dismutase foi mensurada por meio de Kit Cayman Chemical Co. (Michigan USA). A H₂O₂ utilizada para dosar a atividade de CAT foi obtido pela Sigma Chemical Co. (Missouri, USA).

2.3. Animais

Ratos Wistar machos com 11 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), pesando em média 235g, foram mantidos sob condições controladas de luminosidade (ciclos de 12 horas claridade/escuridão), temperatura (21 ± 2 °C) e umidade relativa do ar (60% - 70%). Água e ração comercial (Labcil) para roedores foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos envolvidos no protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (protocolo 122/2008) e estão de acordo com o Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adotado pela Sociedade Americana de Toxicologia, revisado em dezembro de 2008.

2.4. Delineamento experimental

A lesão hepática foi induzida nos grupos 1, 2, 3, 5 e 6 por meio da administração intraperitoneal (i.p) de CCl₄ (1ml/kg, 60% em azeite de oliva, v/v) a cada 48 horas durante 12 dias, totalizando 6 aplicações. O tratamento dos animais com extrato de *B. cuspidata* (EBC) foi realizado por meio de gavagem utilizando-se o extrato etanólico da casca ressuspendido em 700 μ l (v/v) de veículo DMSO. A administração do extrato, nas doses de 200mg/kg (EBC 200) e 400mg/kg (EBC 400) de peso corporal, teve início

após o término da aplicação do CCl₄ sendo oferecida diariamente durante 12 dias. Para o grupo de animais que recebeu apenas veículo (DMSO) utilizou-se o mesmo protocolo descrito para administração do extrato. Quarenta e dois ratos foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos com 7 animais cada de acordo com o tratamento recebido. Grupo 1: CCl₄+12 (eutanasiados 12 dias após o término de administração do CCl₄, sem EBC); Grupo 2: CCl₄ (eutanasiados logo após a administração da última dose de CCl₄, sem EBC); Grupo 3: CCl₄+DMSO (controle do veículo, 700 µl); Grupo 4: EBC (recebeu somente EBC 400mg/kg durante 12 dias); Grupo 5: CCl₄+EBC 200mg/kg; Grupo 6: CCl₄+ EBC 400mg/kg. O EBC e o DMSO foram ofertados durante 12 dias, após o término da administração de CCl₄.

2.5. Análise bioquímica e histopatológica

Quarenta e oito horas após receberem os últimos tratamentos os animais foram anestesiados com quetamina (10 mg/kg de peso corporal) e xilazina (2 mg/kg de peso corporal) e eutanasiados por meio do aprofundamento da anestesia seguido de punção cardíaca. O sangue foi coletado por punção cardíaca e centrifugado a 1750 G durante 15 minutos para separação do soro que foi imediatamente utilizado nas análises bioquímicas de AST, ALT, FA, GGT e bilirrubina. Amostras de soro foram processadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante dos kits diagnósticos. Para análise histopatológica e dosagem bioquímica no tecido hepático foi realizada uma incisão ventral mediana e o fígado foi removido *in totum* e pesado em balança analítica. Em seguida, dois fragmentos do fígado de cada animal foram rapidamente removidos, sendo um congelado em nitrogênio líquido (-196 °C) e mantido em freezer - 80 °C e a outra porção, constituída pelo lobo caudado, imersa em fixador histológico. Amostras de 500mg de fragmentos do fígado congelados foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (PBS), centrifugadas a 3.500 G e a frio (5°C) sendo o sobrenadante utilizado para análise de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A CAT foi

avaliada pelo método de Aebi (1984), pela mensuração da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A determinação da peroxidação lipídica no homogenato de fígado foi realizada por meio da detecção de malondialdeído (MDA) de acordo com protocolo descrito por Gutteridge & Halliwell, (1990) e mediante determinação dos hidroperóxidos lipídicos (HPX), segundo metodologia padronizada por Nourooz-Zadeh et al., (1994). A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Para análise histopatológica, fragmentos do fígado fixados em solução de Karnovsky durante 24 horas, foram desidratados em etanol e embebidos em metacrilato (Leica, Germany). Cortes de 4 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo Multicut 2045[®] (Reichert-Jung, Germany), corados com azul de toluidina e hematoxilina-eosina e montados com Entellan[®] (Merck, Germany). Foram obtidas 70 fotomicrografias com objetiva de 20x para cada grupo utilizando-se microscópio de luz BX-60[®] (Olympus, Tokio, Japan) conectado a câmera digital QColor-3[®] (Olympus, Tokyo, Japan). Por meio de imagens digitalizadas foram analisadas a presença de gotículas lipídicas nos hepatócitos através de análise histomorfométrica (% por área histológica) por meio do software Image Pro-plus 4.5[®] (Média Cybernetics, Silver Spring, USA). Calculou-se também o índice hepatossomático (IHS) que reflete o percentual de peso corporal alocado no fígado. Para o cálculo do IHS foi utilizada a seguinte fórmula: $IHS = PF/PC \times 100$, onde PF é o peso do fígado e PC representa o peso corporal. Os animais foram pesados no início e final do experimento.

2.6. Análise estatística

Os dados foram expressos como medidas de tendência central média ± desvio padrão (S.D.). A normalidade na distribuição dos dados foi verificada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Baseado nesse teste, os dados bioquímicos foram submetidos à análise de variância unifatorial one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Em adição, o teste Kruskal-Wallis foi utilizado na análise da proporção volumétrica (%) histológica de gotículas de gordura sendo $p < 0.05$ definido

como estatisticamente significativo. Todos os testes foram realizados no software estatístico GraphPad Prism 5.0[®] (GraphPad Software, Inc, Califórnia,USA).

3. Resultados

3.1. Peso corporal e peso do fígado

Não houve diferença entre os pesos iniciais dos animais nos diferentes grupos. Como mostrado na Tabela 1, os animais do grupo 2, apresentaram peso corporal final inferior aos demais grupos ($p < 0,05$). Além disso, a maior redução de peso foi encontrada nesse grupo, assim como índice hepatossomático (IHS) mais elevado ($p < 0,05$), se comparado com os grupos 4, 5 e 6 que receberam EBC. Os animais dos grupos 1 e 3, também apresentaram IHS mais elevado em relação aos grupos que receberam o EBC. Não houve diferença significativa dessas variáveis entre os grupos tratados com o extrato.

Tabela 1. Efeito do extrato das cascas de *B. cuspidata* (200 and 400 mg/kg) no peso corporal e no Índice hepatossomático de ratos Wistar expostos ao CCl₄ (60% v/v, 1ml/kg).

Grupos / Tratamento	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Varição de peso (g)*	Índice hepatossomático (%)
1/ CCl ₄ +12	251.71 ± 09.69 ^a	236.85 ± 17.04 ^a	-14.86 ± 14.91 ^a	5.17 ± 0.37 ^a
2/ CCl ₄	271.42 ± 20.55 ^a	212.85 ± 28.11 ^b	-58.57 ± 34.96 ^b	5.54 ± 0.31 ^a
3/ CCl ₄ +DMSO	257.85 ± 11.49 ^a	237.14 ± 10.59 ^a	-20.71 ± 17.42 ^a	5.02 ± 0.54 ^a
4/ EBC 400	250.71 ± 10.57 ^a	252.85 ± 19.54 ^a	2.14 ± 13.49 ^a	4.01 ± 0.43 ^b
5/ CCl ₄ +EBC 200	249.71 ± 08.86 ^a	252.46 ± 09.06 ^a	2.75 ± 9.06 ^a	4.05 ± 0.50 ^b
6/ CCl ₄ +EBC 400	274.28 ± 17.66 ^a	263.57 ± 22.67 ^a	-10.71 ± 31.28 ^a	4.12 ± 0.61 ^b

(*) Sinal Negativo indica perda de peso

Dados são expressos como média ± S.D

^{a,b} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), ANOVA one-way,

3.2. Quantificações de enzimas no soro

Os animais dos grupos 1, 3 e 5 apresentaram níveis séricos de ALT significativamente inferiores em relação ao grupo 2 ($p \leq 0,05$), enquanto os animais dos grupos 4 e 6 apresentaram os menores níveis de ALT no soro em relação a todos os outros grupos ($p \leq 0,05$). O grupo 2 apresentou níveis séricos mais elevados de AST quando comparado aos demais grupos ($p \leq 0,05$). Não houve diferença significativa nos valores de FA e GGT entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis séricos (U) de ALT, AST, FA e GGT em ratos Wistar tratados com o extrato das cascas de *B. cuspidata* (200 and 400 mg/kg) e expostos ao CCl₄ (60% v/v, 1 ml/kg).

Grupos/Tratamento	ALT(U)	AST(U)	FA(U)	GGT(U)
1/ CCl ₄ +12	121.71 ± 31.13 ^a	166.57 ± 42.34 ^a	244.00 ± 63.39 ^a	5.28 ± 1.89 ^a
2/ CCl ₄	217.42 ± 57.68 ^b	718.71 ± 318.02 ^b	234.14 ± 133.77 ^a	5.14 ± 1.06 ^a
3/ CCl ₄ +DMSO	127.57 ± 50.73 ^a	166.14 ± 44.99 ^a	289.57 ± 97.82 ^a	3.71 ± 0.75 ^a
4/ EBC 400	47.14 ± 2.19 ^c	82.00 ± 2.82 ^a	198.42 ± 9.16 ^a	2.00 ± 0.01 ^a
5/ CCl ₄ +EBC 200	74.42 ± 10.78 ^a	72.28 ± 15.35 ^a	189.00 ± 38.23 ^a	2.57 ± 0.97 ^a
6/ CCl ₄ +BCE 400	49.71 ± 5.28 ^c	113.00 ± 15.73 ^a	187.71 ± 36.39 ^a	2.85 ± 1.06 ^a

Dados são expressos como média ± S.D

^{a,b,c} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), ANOVA one-way,

3.3. Efeitos do extrato de *B. cuspidata* sobre marcadores da peroxidação lipídica hepática

Os efeitos do extrato das cascas de *B. cuspidata* na peroxidação lipídica em fígado de ratos, induzida por CCl₄ (Tabela 3), mostrou aumento significativo na quantidade de hidroperóxidos ($p \leq 0,05$) nos animais dos grupos 1 e 2, que receberam exclusivamente o CCl₄. Os animais do grupo 3 apresentaram valores menores de hidroperóxidos quando comparados aos grupos 1 e 2, mas valores aumentados quando comparados aos grupos 4,5 e 6. Os grupos 4 e 5, que receberam EBC e CCl₄ + EBC 200 respectivamente, apresentaram redução significativa na peroxidação lipídica ($p \leq 0,05$), mas não apresentaram diferenças entre si. Os animais do grupo 6, também apresentaram redução de hidroperóxidos e se diferenciou de todos os demais grupos. Em relação ao malondialdeído, os grupos 1, 2, 3 e 4 não apresentaram diferenças significativas entre si. Por outro lado, os animais dos grupos 5 e 6 apresentaram redução significativa deste marcador quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$).

Tabela 3. Efeitos do extrato das cascas de *B. cuspidata* (200 and 400 mg/kg) e da exposição ao CCl₄ (60% v/v, 1 ml/kg) sobre os níveis hepáticos de marcadores da peroxidação lipídica.

Grupos/Tratamento	HPX ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)	MDA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína)
1/ CCl ₄ +12	654.52 \pm 103.08 ^a	0.026 \pm 0.018 ^a
2/ CCl ₄	755.07 \pm 276.91 ^a	0.030 \pm 0.019 ^a
3/ CCl ₄ +DMSO	187.04 \pm 27.45 ^b	0.013 \pm 0.012 ^a
4/ EBC 400	82.27 \pm 2.92 ^d	0.021 \pm 0.007 ^a
5/ CCl ₄ +EBC 200	72.23 \pm 15.33 ^d	0.001 \pm 0.002 ^b
6/ CCl ₄ +EBC 400	97.64 \pm 3.94 ^c	0.000 \pm 0.000 ^b

Dados são expressos como média \pm S.D

^{a,b,c,d} Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$), ANOVA one-way. HPX: Hidroperóxidos, MDA: Malondialdeído

3.4. Parâmetros da bilirrubina no soro

A bilirrubina direta foi significativamente mais elevada no grupo 2 ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos 1,3 e 4 mas não apresentou diferenças em relação aos grupos 5 e 6. Os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si para este parâmetro. Não houve diferença significativa nos níveis de bilirrubina indireta e total entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis séricos de bilirrubina (mg/dl) em ratos Wistar tratados com o extrato da casca de *B. cuspidata* (200 and 400 mg/kg) e expostos ao CCl₄ (60% v/v, 1 ml/kg).

Grupos/tratamento	bilirrubina-D (mg/dl)	bilirrubina- I (mg/dl)	bilirrubina T (mg/dl)
1/ CCl ₄ +12	0,037 ± 0,018 ^a	0,523 ± 0,484 ^a	0,560 ± 0,491 ^a
2/ CCl ₄	0,137 ± 0,116 ^b	0,489 ± 0,332 ^a	0,626 ± 0,343 ^a
3/ CCl ₄ +DMSO	0,043 ± 0,014 ^a	0,331 ± 0,542 ^a	0,374 ± 0,550 ^a
4/ BCE 400	0,013 ± 0,005 ^a	0,187 ± 0,017 ^a	0,200 ± 0,016 ^a
5/ CCl ₄ +EBC 200	0,054 ± 0,030 ^{a,b}	0,123 ± 0,051 ^a	0,177 ± 0,051 ^a
6/ CCl ₄ +EBC 400	0,054 ± 0,034 ^{a,b}	0,197 ± 0,067 ^a	0,250 ± 0,078 ^a

bilirrubina-D= bilirrubina direta, bilirrubina- I= bilirrubina indireta, bilirrubina T= bilirrubina total

Dados são expressos como média ± S.D ^{a,b}Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), ANOVA one-way,

3.5. Efeito do extrato de cascas de *B. cuspidata* no tecido hepático

Alterações histopatológicas como acúmulo de gotículas lipídicas foram observadas nos três grupos que não receberam EBC. Na Figura 1 pode-se observar que os animais do grupo 2 apresentaram área percentual de gotículas lipídicas significativamente mais elevada ($p \leq 0,05$) em relação aos outros grupos, acompanhada de aumento de áreas de necrose em todo o tecido. A Figura 2 mostra as principais mudanças na região centro lobular como, degeneração lipídica e necrose que foram significativamente reduzidos com o tratamento do extrato de *B. cuspidata*. A imagem histológica do fígado de ratos tratados com EBC após a aplicação de CCl₄ não revelou sinais degenerativos e foi compatível como o grupo que recebeu apenas o extrato da planta. Adicionalmente, os animais dos grupos 1 e 3 apresentaram área de gotículas lipídicas significativamente mais elevada comparando-se aos grupos 4, 5 e 6 ($p \leq 0,05$). Animais dos grupos 4 e 6 não apresentaram gotículas lipídicas no tecido hepático enquanto os animais do grupo 5 apresentaram quantidade irrelevante de gotículas lipídicas dispersas no interior de alguns hepatócitos.

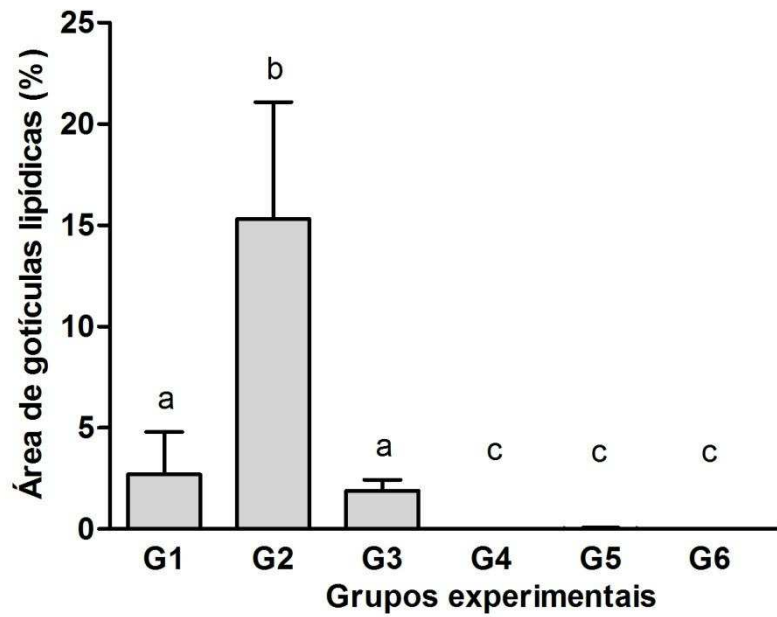


Figura 1. Efeitos do EBC (200 and 400 mg/kg) e da exposição ao CCl_4 (60% v/v, 1 ml/kg) sobre a área total de gotículas de gordura (%) em preparação de tecido hepático de ratos Wistar, G1= CCl_4 +12 dias; G2= CCl_4 ; G3= CCl_4 +DMSO; G4= (EBC 400); G5= CCl_4 + EBC 200; G6= CCl_4 + EBC 400. Dados são expressos como média \pm S.D. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), teste Kruskal-Wallis.

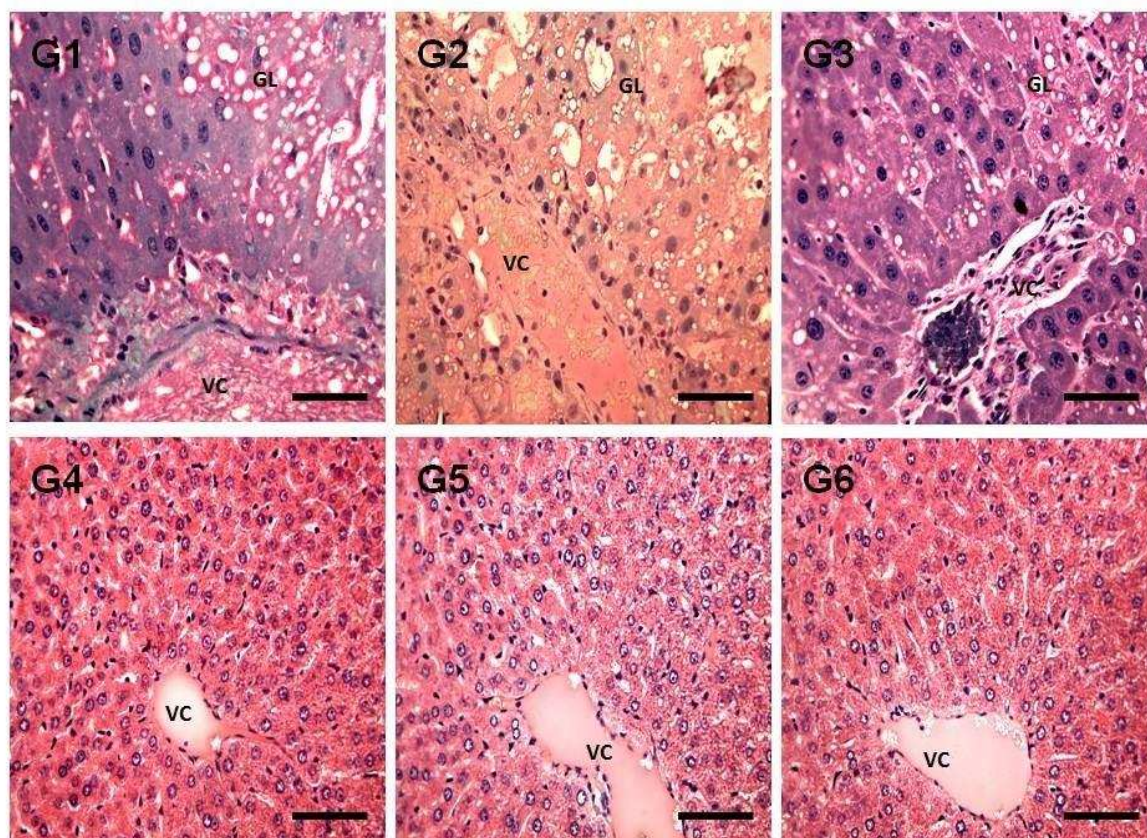


Figura 2. Efeitos do EBC (200 and 400 mg/kg) e da exposição ao CCl_4 (60% v/v, 1 ml/kg) no tecido hepático ratos Wistar. G1= CCl_4 +12 dias; G2= CCl_4 ; G3= CCl_4 +DMSO; G4= EBC 400; G5= CCl_4 +EBC 200; G6= CCl_4 +EBC 400. Veia Centro lobular (VC); Gotículas Lipídicas (GL). Hematoxilina-Eosina (HE). Barra: 65 μm .

3.6. Desordem hepática nos níveis de SOD e CAT induzida por CCl_4 e tratamento com EBC

A Figura 3 mostra o efeito do CCl_4 nos níveis de SOD em tecido hepático de ratos. Os resultados mostram redução significativa nos níveis de SOD nos grupos 1 e 2 ($p < 0.05$) que receberam exclusivamente o CCl_4 . Por outro lado, o grupo 3 apresentou menor atividade de SOD quando comparado aos grupos 4, 5, e 6 ($p \leq 0,05$). O grupo 4, que recebeu apenas o extrato, apresentou níveis de SOD mais elevados em relação

aos outros grupos ($p \leq 0,05$). Os animais dos grupos 5 e 6 não diferiram entre si em relação à SOD, mas apresentaram aumento na atividade desta enzima quando comparado aos grupos 1, 2, 3.

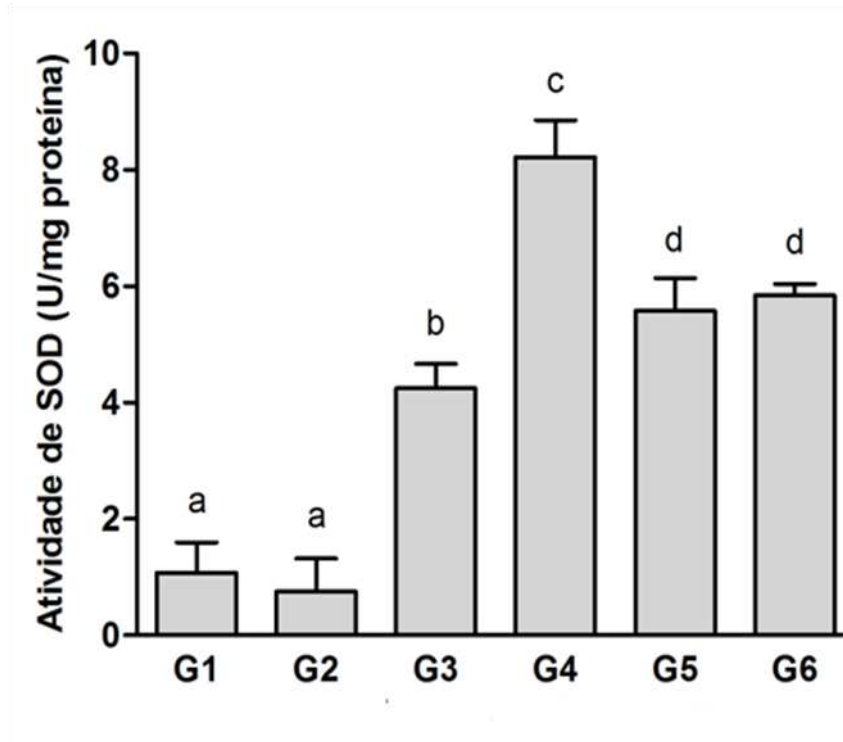


Figura 3. Efeitos do EBC (200 and 400 mg/kg) e da exposição ao CCl_4 (60% v/v, 1 ml/kg) sobre os níveis hepáticos de superóxido dismutase - SOD (U/mg protein) em ratos Wistar, G1= CCl_4 +12 dias; G2= CCl_4 ; G3= CCl_4 +DMSO; G4= EBC 400; G5= CCl_4 +EBC 200; G6= CCl_4 +EBC 400. Dados são expressos como média \pm S.D. ^{a,b,c,d} Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), ANOVA one-way.

O efeito do extrato de *B. cuspidata* no fígado dos animais expostos ao CCl_4 mostrou que a atividade de CAT foi significativamente reduzida no grupo 2 quando comparada aos demais grupos ($p \leq 0,005$). Além disso, os grupos 1, 3 e 4 apresentaram atividade de CAT significativamente inferior quando comparada aos grupos 5 e 6 ($p \leq 0,005$). Não houve diferença estatística na atividade hepática de CAT entre os grupos 1, 3 e 4 e entre os grupos 5 e 6 (Fig. 4).

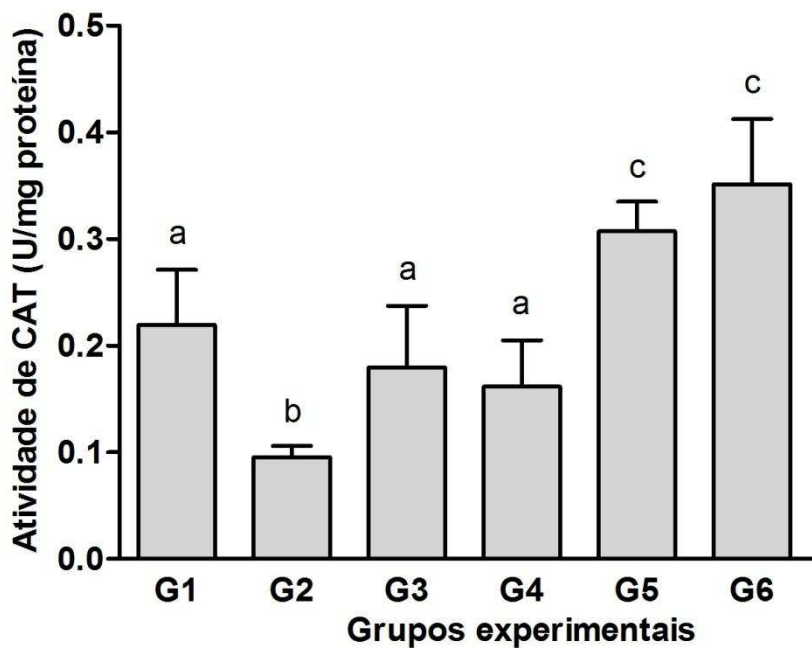


Figura 4. Efeitos do extrato EBC (200 and 400 mg/kg) e da exposição ao CCl_4 (60% v/v, 1 ml/kg) sobre os níveis hepáticos de catalase - CAT (U/mg protein) em ratos Wistar, G1= CCl_4 +12 dias; G2= CCl_4 ; G3= CCl_4 +DMSO; G4= EBC 400; G5= CCl_4 +EBC 200; G6= CCl_4 +EBC 400. Dados são expressos como média \pm S.D. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$), ANOVA one-way.

4. Discussão

O CCl_4 é um conhecido agente hepatotóxico que induz desordens celulares por meio da formação do radical triclorometil (CCl_3^\bullet) e seu radical peroxi derivado ($\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$), formados durante o metabolismo pelas enzimas de fase I presentes no retículo endoplasmático dos hepatócitos. Os radicais CCl_3^\bullet e $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$ oxidam os ácidos graxos insaturados da membrana plasmática dos hepatócitos e de organelas celulares, levando à produção de radicais peroxi lipídicos (ROO^\bullet), radical alcoxi (RO^\bullet) e malondialdeído (MDA) que propagam o dano oxidativo em um processo denominado peroxidação lipídica (Boll et al., 2001; Ha et al., 2005; Wu et al., 2007). Além de seu efeito tóxico direto, os peróxidos lipídicos ativam uma resposta imuno-inflamatória mediada por quimiotaxia neutrofílica, ativação de citocinas, quimiocinas e fosfolipases.

Ambos os mecanismos patológicos conduzem a alterações morfológicas e funcionais que podem levar à morte celular (Brattin et al., 1985; Geier et al., 2003; Zhang et al., 2005). Além do CCl₄ apresentar ação tóxica hepática, manifestações sistêmicas são comuns como anorexia, letargia, inanição e perda de peso progressiva (Kono et al., 2003). No presente estudo, apenas os animais do grupo 2, eutanasiados 48 horas após a administração da última dose de CCl₄, apresentaram perda significativa de peso corporal. Além disso, os maiores índices de hipertrofia hepática determinados pelo IHS, foram evidenciados nos grupos 2, 1 e 3, respectivamente. Os grupos tratados com extrato não demonstraram alterações nas variáveis supracitadas. Isso indica que o extrato exerce proteção contra perda excessiva de peso contribuindo, adicionalmente, na manutenção do peso do fígado, impedindo a hipertrofia hepática induzida pelo CCl₄.

No contexto bioquímico, devido à alteração da permeabilidade da membrana e morte celular desencadeada pela peroxidação lipídica e por mediadores inflamatórios, há um aumento nos níveis de enzimas hepáticas no soro. Níveis elevados de enzimas como ALT, AST, ALP e GGT são indicadores da perda de integridade funcional da membrana celular dos hepatócitos e de lesões hepáticas (Ozer et al., 2008; Ranawat et al., 2010). Além disso, a avaliação da bilirrubinemia constitui método complementar na investigação de lesões hepáticas desencadeadas por CCl₄, uma vez que essa hepatotóxica é capaz de elevar os níveis séricos de bilirrubina devido a indução de necrose hepatocelular e colestase (Sanmugapriya et al., 2006; Kumar et al., 2009). O presente estudo revelou aumento significativo de ALT, AST e de bilirrubina direta nos grupos que receberam apenas o CCl₄, indicando considerável lesão hepatocelular, confirmada pela análise histopatológica. A administração do extrato de *B. cuspidata* nas doses utilizadas (200 e 400 mg/kg) atenuou o aumento nos níveis destas enzimas no soro e causou subsequente normalização destes parâmetros quando comparado aos animais dos grupos tratados com CCl₄. Este fato indica que o EBC exerceu efeito curativo nas lesões hepáticas, onde ocorreram alterações da membrana, devido a aplicação do CCl₄.

Efeito curativo do extrato das cascas de *B. cuspidata* também foi observado sobre parâmetros de peroxidação lipídica e na atividade de SOD, uma importante enzima antioxidante que catalisa a conversão de radicais superóxido (O₂[•]) em oxigênio

molecular (O_2) e peróxido de oxigênio (H_2O_2). Durante lesão hepática causada pelo CCl_4 , os níveis de SOD e MDA refletem a quantidade de estresse causada pela liberação de radicais livres *in vivo*. Em função do processo inflamatório desencadeado pelo CCl_4 , ocorre ativação de macrófagos, neutrófilos e células hepáticas estreladas que produzem grande quantidade de O_2^{\cdot} e como consequência MDA. Essa elevação da produção de O_2^{\cdot} aumenta o consumo de SOD, levando a uma exaustão enzimática, o que resulta no declínio dos níveis teciduais desta enzima (Brattin et al., 1985; Zhang et al., 2005; Raja et al., 2007). No presente estudo, os grupos 1 e 2, que receberam exclusivamente CCl_4 , apresentaram aumento significativo da quantidade de hidroperóxidos quando comparados aos demais grupos. Por outro lado, animais que receberam EBC (grupos 4 e 5) apresentaram menores níveis de MDA quando comparados aos demais grupos, o que demonstra a eficácia deste extrato na neutralização de radicais livres e proteção à peroxidação das citomembranas. Em relação à SOD, os grupos 1 e 2 apresentaram redução significativa na atividade desta enzima, provavelmente associada com o aumento do estresse oxidativo causado pelo CCl_4 . O decréscimo de SOD foi revertido em todos os grupos de tratamento, particularmente nos grupos que receberam o extrato da planta em diferentes concentrações. Os maiores valores de SOD foram encontrados no grupo que recebeu apenas o extrato da planta (grupo 4), demonstrando que o extrato das cascas de *B. cuspidata* estimula a atividade de SOD, mesmo na ausência de estímulos lesivos. A catalase constitui mecanismo adicional de defesa antioxidante e complementar à atividade de SOD, que catalisa a degradação do H_2O_2 a oxigênio molecular e água (Brattin et al., 1985). No presente estudo, os animais do grupo 2 apresentaram a menor atividade de CAT, que também se apresentou diminuída nos grupos 1, 3 e 4 quando comparados aos grupos 5 e 6. Animais que receberam EBC em ambas às doses apresentaram elevação na atividade de CAT. Esse achado indica a modulação positiva do extrato sobre essa enzima, principalmente na presença de estímulos hepáticos lesivos.

Além de modificações no sistema enzimático antioxidante, a administração de CCl_4 promove acentuada modificação na histoarquitetura do fígado, como hemorragia, infiltração leucocitária, edema, fibrose, esteatose e necrose (Ha et al., 2005; Zeashan

et al., 2008; Kumar et al., 2009). Neste trabalho, o dano histológico do órgão foi mensurado pela deposição de gordura no tecido hepático, presente em grande quantidade, principalmente nos grupos 1, 2 e 3. É bem estabelecido que o CCl₄ interfere na síntese de lipoproteínas devido a peroxidação lipídica e dano oxidativo a proteínas do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos, tendo como consequência o acúmulo de lipídio no citoplasma dessas células (esteatose microvesicular). Os grupos tratados com o extrato da *B. cuspidata* apresentaram estrutura hepática normal em relação à disposição dos cordões de hepatócitos, vascularização e disposição de tecido conjuntivo, o que indica a eficácia do tratamento com EBC depois que o tecido hepático recebeu CCl₄. O grupo 4 também apresentou arquitetura normal do tecido hepático, mostrando que o extrato administrado isoladamente não induz a deposição de gordura no tecido hepático. Em associação com a análise dos marcadores de estresse oxidativo, esse achado sugere que o extrato investigado auxilia na regulação do metabolismo de lipídios por meio da estimulação de mecanismos enzimáticos de controle do dano celular oxidativo.

5. Conclusão

Os resultados mostraram que o extrato das cascas de *B. cuspidata* estimula o sistema de defesa antioxidante e reduz os danos morfológicos e funcionais do fígado de ratos *Wistar* expostos a injúrias induzidas por CCl₄, indicando que a planta apresenta grande potencial para a descoberta de novas drogas para tratamento de doenças hepáticas confirmando, nesse caso, a indicação popular.

6. Referências

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 105, 121-126.
- Bissel, D.M., Gores, G.J., Laskin, D.L., Hoorhagle, J.H., 2001. Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems. *Hepatology* 33, 1009-1013.
- Boll, M., Weber, L.W., Becker, E., Stampfil, A., 2001. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Journal of Biosciences* 56, 649-59.
- Bradford, M., 1976. *Analytical Biochemical* 72, pp.248.

- Brattin, W.J., Glende Jr, E.A., Recknagel, R.O., 1985. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 1, 27-38.
- Correa, M. P., 1984. In: Correa, M.P (Eds), *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF PP.1- 747.
- Dhuley, J.N., Naik, S.R., 1997. Protective effect of *Rhinax*, an herbal formulation, against CCl₄ - induced liver injury and survival in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 56, 159-164.
- Eldin, S., Dunford, A., 2001. *Fitoterapia na atenção primária à saúde*. São Paulo, Manole 163p.
- Farnsworth, N.R., 1994. *Ethnopharmacology and drug development*. Ciba Foundation Symposium 185, 42-51: discussion 51-59.
- Faremi, T.Y., Suru, S.M., Fafunso, M.A., Obioha U.E., 2008. Hepatoprotective potentials of *Phyllanthus amarus* against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology* 8, 46, 2658-2664.
- Geier, A., Christoph, G., Dietrich, S.V., Suk-Kyum, K., Gerloff, T., Gerd, A., Kullak-Ublick, J.L., Siegfried, M., Gartung, C., 2003. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* 38, 345-354.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in physiological systems. *Trends in Biochemical Sciences* 15, 129-135.
- Ha, K.T., Yoona, S.J., Choia, D.Y., Kimb, D.W., Kima, J.K., Kim, C.K., 2005. Protective effect of *Lycium chinense* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 529-535.
- Hwang, Y.P., Choi, J.H., Jeong, H.G., 2008. Protective effect of the *Aralia continentalis* root extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 47, 75-81.
- Janakat, S., Al-Meire, H., 2002. Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon-tetrachloride-induced hepatotoxicity in the rat. *Journal of Pharmacology and Toxicological Methods* 48, 41-44.

- Khan, M.R., Ahmed D., 2009. Protective effects of *Digera muicata* (L.) Mart. on testis against oxidative stress of carbon tetrachloride in rat. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1393-1399.
- Kaur, S., Michael, H., Arora, S., Harkonem, P.L., Kumar, S., 2005. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 249-251.
- Kono, H., Asakawa, M., Fuji, H., Maki, A., Amemiya, H., Yamamoto, M., Matsuda, M., Matsumoto, Y., 2003. Edaravone, a novel free radical scavenger, prevents liver injury and mortality in rats administered endotoxin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307, 74-82.
- Kumar, S.S., Kumar, B.R., Mohan, G.K., 2009. Hepatoprotective effect of *Trichosanthes cucumerina* Var *cucumerina* L. on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 347-350.
- Lee, T.Y., Wang, G.J., Chiu, J.H., Lin, H.C., 2003. Long-term administration of *Salvia miltiorrhiza* ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Journal of Pharmacology* 55, 1561-1568.
- Melo, J.G., Martins, J.D.G.R., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2007. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L), capim- limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e centela (*Centella asiática* (L) Urban). *Acta Botânica Brasílica* 21, 27-36.
- Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini- Sarmadi, J., Wolf, S.P., 1994. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xilenol orange assay in conjunction with thiophenylphosphine. *Analytical Biochemistry* 220, 403-409.
- Nunes, L.G., 2008. 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. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa).
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S., 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245, 194-205.

- Raja, S., Nazeer Ahamed, K.F.H., Kumar, V., Kakali Mukherjee, A. Bandyopadhyay, P.K.M., 2007. Antioxidant effect of *Cytisus* against tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 41-47.
- Ranawat, L., Bhatt, J., Patel, J., 2010. Hepatoprotective activity of ethanolic extracts of bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl₄ induced hepatic damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 777-780.
- Roome, T., Dar, A., Ali, S., Naqvi, S., Choudhary, M. I., 2008. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 118, 514-521
- Sanmugapriya, E., Venkataraman, S., 2006. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl₄-induced acute hepatic injury in experimental rats. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 154-160.
- Sreelatha, S., Padma, P.R., Umadevi, M., 2009. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 47, 702-708.
- Shen, X., Tang, Y., Yang, R., Yu, L., Fang, T., Duan, J., 2009. The protective effect of *Zizyphus jujube* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. *Food and Chemical Toxicology* 122, 555-60.
- Vanderlie, F.A., Filho, P.G., Alegre, L.V., Rocha, F.F., Lorenzo, M.A. de, Costa e Souza R.H. da Silveira J.W de S. da, Junior A.M., Matos, L.G de Costa E.A. Antinflammatory mechanism related to the antinociceptive activity of the ethanolic extract of the dichloromethano fraction from leaves of *Bathysa cuspidata* (Saint-Hilaire) Hooker. *Revista de Ciências Biológicas e Saúde* 2, 14-18.
- Wagner, H; Bladts, S., 1996. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer.
- Wu Y., Li, L., Wen, T., Li, Y-Q., 2007. Protective effects of echinacoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology* 232, 50-56.
- Ye, X., Feng, Y., Tong, Y., Kwan-Ming, Ng., Tsao, S., Lau, G.K.K., Chowing Sze., Zhang, Y., Tang, J., Shen, J., Kobayashi, S., 2009. Hepatoprotective effects of *Coptidis rhizoma* aqueous extract on carbon tetrachloride-induced acute liver hepatotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 130-136.

- Zeashan, H., Amresh, G., Singh, S., Rao, C.V., 2008. Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinous* in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology* 10, 8-13.
- Zhang, D; Wu, J; Zhang, S; Huang, J., 2005. Oleanane triterpenes from *Aegiceras corniculatum*. *Fitoterapia* 76, 131-133.

CAPÍTULO II

Resumo

**Efeito hepatoprotetor do extrato da casca de *Bathysa cuspidata* (A. St-Hill)
Hook.f. em lesões no fígado de ratos wistar induzidas por tetracloreto de
carbono.**

A espécie *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. é uma árvore nativa do bioma Mata Atlântica, conhecida popularmente como quina, e comumente empregada na medicina tradicional brasileira para tratamento de doenças do fígado. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico das cascas de *B. cuspidata* sobre o fígado de ratos Wistar que receberam o solvente tetracloreto de carbono (CCl₄) por via intraperitoneal. O tratamento dos animais com extrato de *B. cuspidata* (EBC) foi realizado por meio de gavagem. Trinta e cinco ratos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, com 7 animais cada, de acordo com o tratamento recebido. G1: CCl₄ sem EBC; G2: DMSO+CCl₄ (dimetil sulfóxido, 700µl); G3: EBC (somente EBC 200mg/kg durante 18 dias); G4: EBC (200mg/kg + CCl₄); G5: EBC (400mg/kg+CCl₄). Todos os animais começaram a receber o extrato seis dias antes do início da aplicação do CCl₄ e foram todos eutanasiados no final da aplicação do CCl₄, que ocorreu durante 12 dias, em intervalos de 48 horas. A concentração da enzima aspartato aminotransferase (AST) foi significativamente menor ($p < 0,05$) no soro dos animais que receberam o extrato, em ambas as doses, e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foi significativamente maior ($p < 0,05$). Extensas áreas de necrose e gotículas lipídicas foram observadas no fígado de animais dos grupos G1 e G2. Já nos animais que receberam o extrato foi observada diminuição significativa nas áreas de gotículas lipídicas e de necrose celular ($p < 0,05$) no tecido hepático. Os resultados encontrados confirmam o efeito protetor das cascas de *B. cuspidata* em lesões induzidas pelo CCl₄.

Abstract

The hepatoprotective effect of the bark of *Bathysa cuspidata* (A. St-Hill) Hook.f. in carbon tetrachloride-induced liver injury in rats

Bathysa cuspidata (A. St. Hil.) Hook. f. is a tree that is native to the biome of the Brazilian Atlantic rainforest. It is commonly known in Brazil as “quina-do-mato” and is often used in Brazilian traditional folk medicine for the treatment of liver diseases. The objective of this study was to investigate the hepatoprotective effect of the ethanolic extract of the bark of *B. cuspidata* on carbon tetrachloride (CCl₄) induced liver lesions in Wistar rats. The animals were treated with extract of *B. cuspidata* (BCE), administered by gavage. Thirty-five rats were randomly allocated to 5 groups of 7 animals each and treated as follows: G1: CCl₄ without BCE; G2: DMSO + CCl₄ (dimethyl sulfoxide 700 µl); G3: BCE (BCE 200 mg/kg alone for 18 days); G4: BCE (200 mg/kg + CCl₄); G5: BCE (400 mg/kg + CCl₄). In all the animals, treatment with the extract was initiated six days prior to the first application of CCl₄. After completing CCl₄ administration (every 48 hours for 12 days) the animals were euthanized. A significant reduction ($p \leq 0.05$) in serum aspartate transaminase (AST) and gamma-glutamyl transferase (GGT) levels and a significant increase ($p \leq 0.05$) in the antioxidant enzymes super oxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were found in the livers of the animals that received the extract. Extensive areas of necrosis and lipid droplets were found in the livers of the animals in G1 and G2. Conversely, a significant reduction ($p \leq 0.05$) was found in the areas of lipid droplets and cell necrosis in the liver tissue of the animals that received the extract. These results confirm the protective effect of the bark of *B. cuspidata* in injuries induced by CCl₄.

1. Introdução

A prevalência de doenças hepáticas induzidas por agentes químicos e fármacos tem aumentado progressivamente ao longo das décadas em vários países (Bissel et al., 2001, Lee, 2003). O fígado é o órgão responsável pela maior parte do metabolismo de xenobióticos e apresenta importante função na desintoxicação do organismo (Marina, 2006). Devido à exposição a compostos hepatotóxicos como produtos derivados de fungos, metabolitos bacterianos, metais pesados, poluentes ambientais e agentes quimioterápicos, o fígado está suscetível a várias desordens (Wang et al., 2008; Kumar et al., 2009; Ranawat et al., 2009). O tetracloreto de carbono (CCl_4) é um solvente industrial que apresenta reconhecida atividade hepatotóxica. O CCl_4 induz lesão hepática por meio da produção de espécies radicalares ($\text{CCl}_3\cdot$ e $\text{Cl}\cdot$) derivadas de seu metabolismo pelo sistema enzimático mitocondrial NADPH-citocromo P450 (Bedda et al., 2003; Okuyama et al., 2003). Esses radicais são altamente reativos e oxidam lipídios insaturados e proteínas das membranas celulares em um processo denominado peroxidação lipídica que culmina em alteração da estrutura e função celular e, eventualmente, morte celular (Recknagel et al., 1984; Boll et al., 2001). Devido ao baixo custo e boa reprodutibilidade da utilização do CCl_4 na indução de dano hepático, esse composto é amplamente utilizado em modelos animais de hepatotoxicidade. Além disso, esse modelo experimental fornece importante ferramenta que suporta os contínuos esforços para investigação e descoberta de plantas com potencial efeito hepatoprotetor, que são utilizadas na medicina tradicional, mas que ainda não apresentam eficácia comprovada cientificamente.

A biodiversidade é um grande reservatório de metabólitos secundários bioativos que aliada ao conhecimento tradicional tem possibilitado a descoberta de fármacos para tratamento de diferentes patologias humanas, como câncer, infecções, úlceras, diabetes, bronquites. Nesse contexto, diversos países têm buscado a introdução das plantas medicinais como prática integrativa e complementar na atenção primária à saúde, sendo tal iniciativa estimulada pela própria Organização Mundial de Saúde,

principalmente devido à aceitabilidade, disponibilidade e menor custo, (Elbling et al., 2005; Melo et al., 2007; Sreelatha et al., 2009; Ranawat et al., 2010).

Embora diferentes plantas sejam utilizadas na medicina popular, estima-se que menos de 10% tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (Guerra, 2001). Nesse contexto, investigações etnobotânicas têm sido sistematicamente conduzidas para selecionar e investigar plantas com potencial efeito medicinal na busca de novos fármacos (Albuquerque, 2005).

A *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f., pertencente à família Rubiaceae, é comumente encontrada em algumas regiões de mata brasileira constituindo arbustos ou árvores com até 6m de altura (Germano-Filho, 1999). Suas cascas são geralmente utilizadas para a produção de tônicos empregados na medicina popular para o tratamento de anemias e caquexias (Correa, 1984). Além disso, a *B. cuspidata* tem sido utilizada para diversas desordens incluindo problemas de estômago, fígado e também na cicatrização de feridas (Leite, 2008) Estudo realizado em camundongos albinos mostrou que a *B. cuspidata* possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória, resultados que podem explicar o uso popular desta planta para doenças que envolvem inflamação e dor (Vanderlinde et al., 2001). Ausência de mutagenicidade dos extratos da casca e a presença de cumarinas, flavonóides, taninos e alcalóides já foram evidenciados (Nunes, 2008). Nesse contexto, torna-se importante estudar o possível efeito protetor do extrato etanólico das cascas de *B. cuspidata* sobre lesões hepáticas induzidas por CCl₄ em ratos Wistar.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção do material vegetal

A espécie *B. cuspidata* foi coletada em bioma de Mata Atlântica, no município de Araponga, estado de Minas Gerais, Brasil (20°43'00,0``S e 42°29'10,8``W, 1.200 m de altitude). Amostras das cascas da espécie foram separadas, secas a temperatura ambiente em sala escura ventilada por 48hs, sendo posteriormente pulverizadas em

moinho de faca e armazenadas. Amostras foram herborizadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Viçosa, sob o registro (VIC 21559).

2.2. Preparação do extrato de *B. cuspidata*.

Plantas da espécie *B. cuspidata*, coletadas em bioma de Mata Atlântica, no município de Araponga, estado de Minas Gerais, Brasil (20°43'00,0``S e 42°29'10,8``W, 1.200 m de altitude), foram herborizadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Viçosa, sob o registro (VIC 21559). Amostras das cascas da espécie foram secas a temperatura ambiente em sala escura, ventilada, por 48hs, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de faca e armazenadas. O extrato etanólico foi obtido por método de percolação a partir da droga vegetal empregando etanol 98° GL como solvente extrator de forma exaustiva. Em seguida o extrato foi concentrado em evaporador rotatório até a completa remoção do solvente. Para completa remoção do solvente, o extrato foi posteriormente liofilizado (Nunes, 2008).

2.3. Produtos químicos

Tetracloroeto de carbono (CCl₄), etanol (Vetec), dimetilsulfóxido (DMSO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Missouri USA). Formaldeído e glutaraldeído foram adquiridos da Merck Chemicals (São Paulo, Brazil). Os kits diagnósticos para aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA) foram adquiridos da Human In Vitro Diagnostics (Minas Gerais, Brazil) e o kit para dosagem de bilirrubina foi adquirido da Labtest (São Paulo, Brasil). A atividade de superóxido dismutase foi mensurada por meio de Kit Cayman Chemical Co. (Michigan USA).

2.4. Animais

Trinta e cinco ratos Wistar machos, pesando em média 235,04 \pm 25,28g, provenientes do biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa (UFV), foram mantidos sob condições controladas de luminosidade

(ciclos de 12 horas claridade/escuridão), temperatura (21 ± 2 °C) e umidade relativa do ar (60%-70%). Água e ração comercial (Labcil) foram fornecidas ad libitum. Todos os procedimentos envolvidos no protocolo experimental foram aprovados pelo Comitê de Ética para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (protocolo 122/2008) e estão de acordo com o Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology, adotado pela Sociedade Americana de Toxicologia, revisado em dezembro de 2008.

2.5. Delineamento Experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos, com 7 animais cada, de acordo com o tratamento recebido. A lesão hepática foi induzida nos grupos 1, 2, 4 e 5 por meio da administração intraperitoneal (i.p) de CCl_4 (1ml/kg em 60% em azeite de oliva, v/v) a cada 48 horas, durante 12 dias. O tratamento dos animais com extrato de *B. cuspidata* (EBC) foi realizado por meio de gavagem utilizando-se o extrato etanólico da casca ressuspendido em 700 μl (w/v) de veículo dimetil sulfóxido (DMSO). A administração do extrato, nas doses de 200mg/kg (BC 200) e 400mg/kg (BC 400) de peso corporal, teve início seis dias antes da primeira aplicação de CCl_4 e continuou sendo administrado diariamente aos animais durante os 12 dias de aplicação de CCl_4 . Para o grupo de animais que recebeu apenas veículo (DMSO) utilizou-se o mesmo protocolo descrito para administração do extrato. Grupo 1 (G1): CCl_4 sem EBC; Grupo 2 (G2): DMSO 18 dias + CCl_4 (controle do veículo, 700 μl); Grupo 3 (G3): EBC (recebeu somente EBC 200mg/kg durante 18 dias); Grupo 4 (G4): EBC 200mg/kg durante 18 dias + CCl_4 ; Grupo 5 (G5): EBC 400mg durante 18 dias + CCl_4 . Todos os animais foram eutanasiados após 24hs ao final de 12 dias de aplicação do CCl_4 .

2.6. Análise bioquímica e histopatológica

Quarenta e oito horas após receberem os últimos tratamentos os animais foram anestesiados com quetamina (10 mg/kg de peso corporal) e xilazina (2 mg/kg de peso

corporal) e eutanasiados por aprofundamento da anestesia seguido de punção cardíaca. Alíquotas de sangue foram coletadas e centrifugadas a 1750 G durante 15 minutos para separação do soro que foi imediatamente utilizado nas análises bioquímicas de AST, FA, GGT e bilirrubina total (BRT). Amostras de soro foram processadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante dos kits diagnósticos. Para análise histopatológica e dosagens bioquímicas no tecido hepático foi realizada uma incisão ventral mediana e o fígado foi removido in totum e pesado em balança analítica. Em seguida, o fígado de cada animal foi rapidamente removido, sendo retirado o lóbulo caudado para análise histológica (imerso em solução Karnovsky) e o restante do órgão congelado em nitrogênio líquido (-196°C)

Alíquotas de 500mg de fragmentos do fígado congelado foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (PBS), centrifugadas a 3.500 G sob refrigeração (5°C) e o sobrenadante foi utilizado para análise da SOD e CAT. A catalase foi avaliada pelo método de Aebi (1984), pela mensuração da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A determinação da peroxidação lipídica no homogenato de fígado foi realizada por meio da detecção de hidroperóxidos lipídicos, segundo metodologia padronizada por Nourooz-Zadeh et al. (1994). A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Para análise histopatológica, fragmentos de fígado foram imersos em Karnovsky durante 24 horas, desidratados em etanol e embebidos em metacrilato (Leica, Germany). Secções de 4 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo Multicut 2045[®] (Reichert-Jung, Germany), coradas com azul de toluidina e hematoxilina-eosina e montadas com Entellan[®] (Merck, Germany). Foram capturadas 70 imagens para cada grupo utilizando-se microscópio de luz BX-60[®] (Olympus, Tokio, Japan) conectado a câmera digital QColor-3[®] (Olympus, Tokio, Japan). Uma grade de 200 pontos foi utilizada sobre imagens digitalizadas, para quantificar a presença de áreas de necrose e acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos (% por área histológica). Foi utilizado o software Image Pro-plus 4.5[®] (Média Cybernetcs, Silver Spring, USA) sendo contados 1000 pontos por animal (Azevedo et al., 2010; Vilela et al., 2010).

2.7. Análise estatística

Os dados foram expressos como medidas de tendência central média \pm desvio padrão (S.D.). A normalidade na distribuição dos dados foi verificada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Baseado nesse teste os dados bioquímicos foram submetidos à análise de variância unifatorial one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para múltiplas comparações. Em adição, o teste Kruskal-Wallis foi utilizado para análise da área histológica de gotículas de gordura sendo $p < 0,05$ definido como estatisticamente significativo. Todos os testes foram realizados no software estatístico GraphPad Prism 5.0[®] (GraphPad Software, Inc, Califórnia, USA).

3. Resultados

3.1. Peso corporal e peso do fígado

Não houve diferença significativa entre os pesos iniciais dos animais nos diferentes grupos (Tabela 1). Ao final do experimento foi observada diminuição do peso corporal em todos os grupos, sendo que os animais do grupo G3 apresentaram peso corporal final significativamente superior aos demais grupos ($p \leq 0,05$). Além disto, quando analisado perda ou ganho de peso, G3 apresentou a menor variação de peso e se diferenciou de todos os demais grupos ($p \leq 0,05$).

Tabela 1. Influência do extrato da casca de *B. cuspidata* (200 e 400 mg/kg) sobre o peso corporal de ratos wistar expostos ao CCl_4 (60% v/v, 1ml/kg).

Grupos	Peso	Peso	Variação
	Inicial (g)	Final (g)	(g)
G1	271,43 \pm 20,56 ^a	212,85 \pm 28,11 ^a	-58,57 \pm 34,96 ^a
G2	259,29 \pm 10,97 ^a	211,14 \pm 8,59 ^a	-48,14 \pm 6,36 ^a
G3	263,58 \pm 20,35 ^a	247,43 \pm 16,47 ^b	-16,15 \pm 10,91 ^b
G4	256,71 \pm 13,67 ^a	215,00 \pm 12,91 ^a	-41,71 \pm 10,17 ^a

G5 268,57 ± 14,06^a 212,14 ± 23,07^a -56,42 ± 12,10^a

(*) Sinal Negativo indica perda de peso. Dados são expressos como média ± S.D. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), ANOVA one-way,

3.2. Quantificações de enzimas no soro

Os animais de G3 apresentaram os menores níveis séricos de AST, diferenciando-se de todos os outros grupos ($p \leq 0,05$), com exceção de G4. Os grupos G1 e G2 apresentaram valores significativamente mais elevados dessa enzima quando comparados a G3 e G4 ($p \leq 0,05$), mas não se diferenciaram de G5. A análise dos níveis séricos de FA mostrou que os maiores valores foram encontrados nos grupos G4 e G5, que não diferenciaram entre si, mas se diferenciaram de G1 e G3, sendo que G5 se diferenciou também de G2 ($p \leq 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os grupos quando analisados os níveis de GGT. Em relação à bilirrubina o grupos G3 apresentou os menores valores quando comparados aos outros grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito preventivo do extrato das cascas de *B. cuspidata* (200 and 400 mg/kg) sobre os níveis séricos (U) de AST, FA, GGT e BRT (bilirrubina total) em ratos Wistar expostos ao CCl₄ (60% v/v, 1 ml/kg).

Grupos	AST	FA	GGT	BRT
G1	718,71±142,34 ^C	234,14±50,56 ^C	5,14±1,06 ^a	0,62±0,34 ^a
G2	620,85±116,52 ^C	289,57±97,82 ^{bc}	3,71±0,75 ^a	0,47±0,16 ^a
G3	87,85±5,24 ^a	218,14±56,17 ^C	2,57±0,97 ^a	0,18±0,10 ^b
G4	166,14±44,99 ^{ab}	431,85±133,05 ^{ab}	3,71±1,79 ^a	0,50±0,24 ^a
G5	482,71±178,30 ^{bc}	486,00±114,50 ^a	7,57±2,57 ^a	0,40±0,13 ^a

Dados são expressos como média ± S.D. Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), ANOVA one-way,

3.3. Determinação da peroxidação lipídica hepática

O efeito de EBC na peroxidação lipídica em fígado de ratos induzida por CCl_4 (Figura 1), mostrou aumento significativo na quantidade de hidroperóxidos nos animais do grupo 1 quando comparados aos demais grupos ($p \leq 0,05$). Animais de G3 e G5 diferenciaram entre si ($p \leq 0,05$), mas não apresentaram diferenças em relação aos outros grupos.

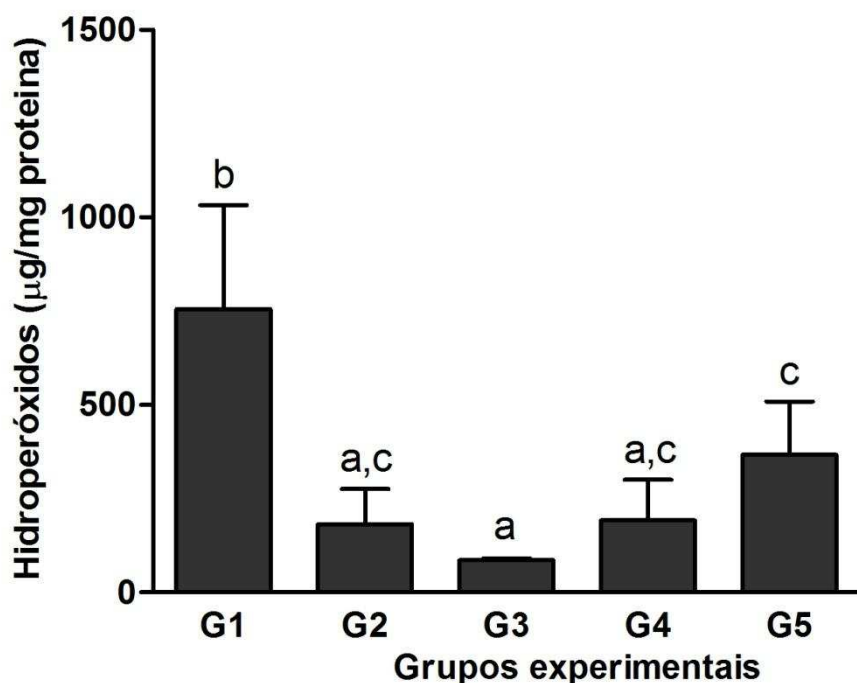


Figura 1. Efeito do EBC (200 and 400 mg/kg) e da exposição ao CCl_4 sobre os níveis hepáticos de marcadores da peroxidação lipídica no fígado de ratos Wistar. G1= CCl_4 ; G2= DMSO+ CCl_4 ; G3= EBC (400mg/kg); G4= EBC 200mg/kg + CCl_4 ; G5= EBC 400mg/kg + CCl_4 . Dados são expressos em média \pm S.D. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), teste Tukey.

3.4. Histopatologia

A administração de CCl_4 levou a um alto grau de desorganização tecidual e a lesões hepáticas nos animais dos grupos G1 e G2 que apresentaram intensas áreas de necrose e degeneração lipídica. Na Figura 2 pode-se observar que os animais dos grupos G1 e G2 apresentaram proporção de gotículas lipídicas significativamente mais elevada ($p \leq 0,05$) em relação aos outros grupos. O efeito hepatoprotetor da *B. cuspidata* pode ser observado ao analisar o fígado dos animais de G4 e G5, que apresentaram pequeno percentual de gotículas lipídicas dispersas no interior de hepatócitos, não mostrando diferenças significativas entre si, mas diferindo significativamente dos demais grupos ($p \leq 0,05$). Os animais do grupo G3 apresentaram a menor quantidade de gotículas lipídicas nos hepatócitos. Com relação ao percentual de necrose tecidual hepática, observou-se que os animais dos grupos G1 e G2 não apresentaram diferenças significativas entre si, mas mostraram maior porcentagem de necrose por área quando comparado a todos os outros grupos ($p \leq 0,05$). Os animais dos grupos G4 e G5, que receberam pré-tratamento com *B. cuspidata*, não apresentaram diferenças significativas entre si além de mostrarem pequeno percentual de necrose celular quando comparado aos grupos G1 e G2. Os animais do grupo G3 apresentaram a menor quantidade de áreas de necrose, sendo diferentes de todos os outros grupos. Os dados mencionados acima em relação a gotículas lipídicas e necrose podem ser confirmados pela análise da figura 4, onde podem ser observados próximos a veia centrolobular uma grande quantidade de gotículas lipídicas e regiões de necrose, principalmente em G1. Os grupos 4 e 5 que receberam tratamento prévio com o extrato de *B.cuspidata* apresentaram poucas gotículas lipídicas e pequenas regiões de necrose no tecido.

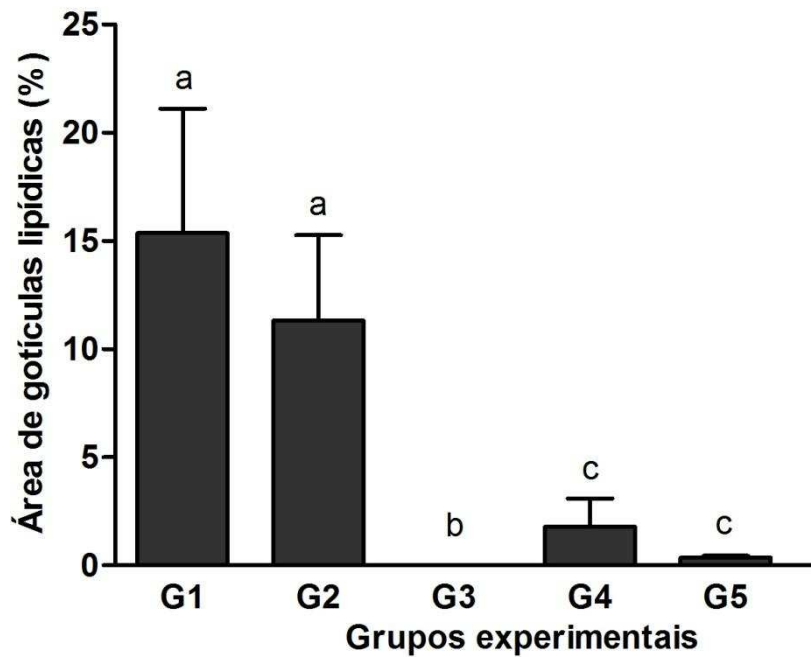


Figura 2. Efeito do extrato EBC (200 and 400 mg/kg) sobre a área histológica de gotículas de gordura (%) no fígado de ratos Wistar expostos ao CCl₄. G1= CCl₄; G2= DMSO+CCl₄; G3= EBC (400mg/kg); G4= EBC200mg/kg + CCl₄; G5= EBC400mg/kg +CCl₄. Dados são expressos em média ± S.D. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$), teste Kruskal-Wallis.

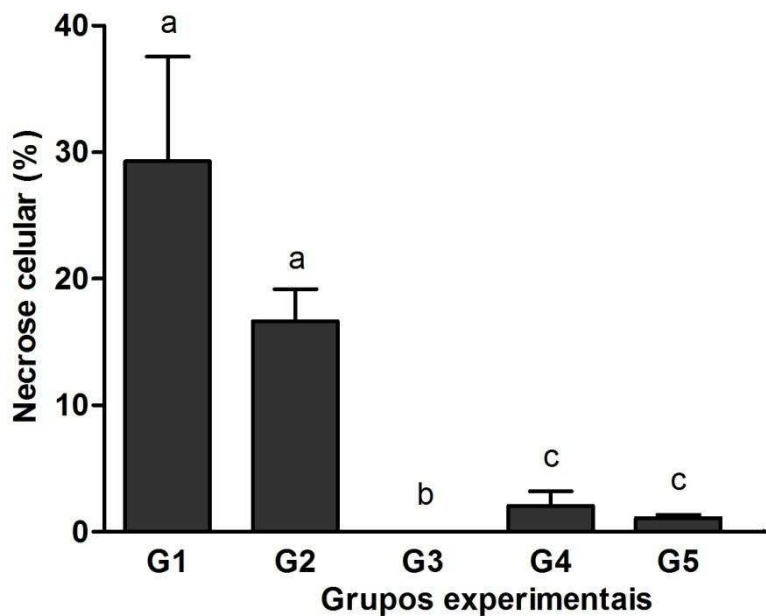


Figura 3. Efeito preventivo do EBC (200 and 400 mg/kg) sobre área de necrose (%) no fígado de ratos Wistar expostos ao CCl₄. G1= CCl₄; G2= DMSO+CCl₄; G3= EBC (400mg/kg); G4= EBC200mg/kg + CCl₄; G5= EBC400mg/kg +CCl₄. Dados são expressos em média ± S.D. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05), teste Kruskal-Wallis.

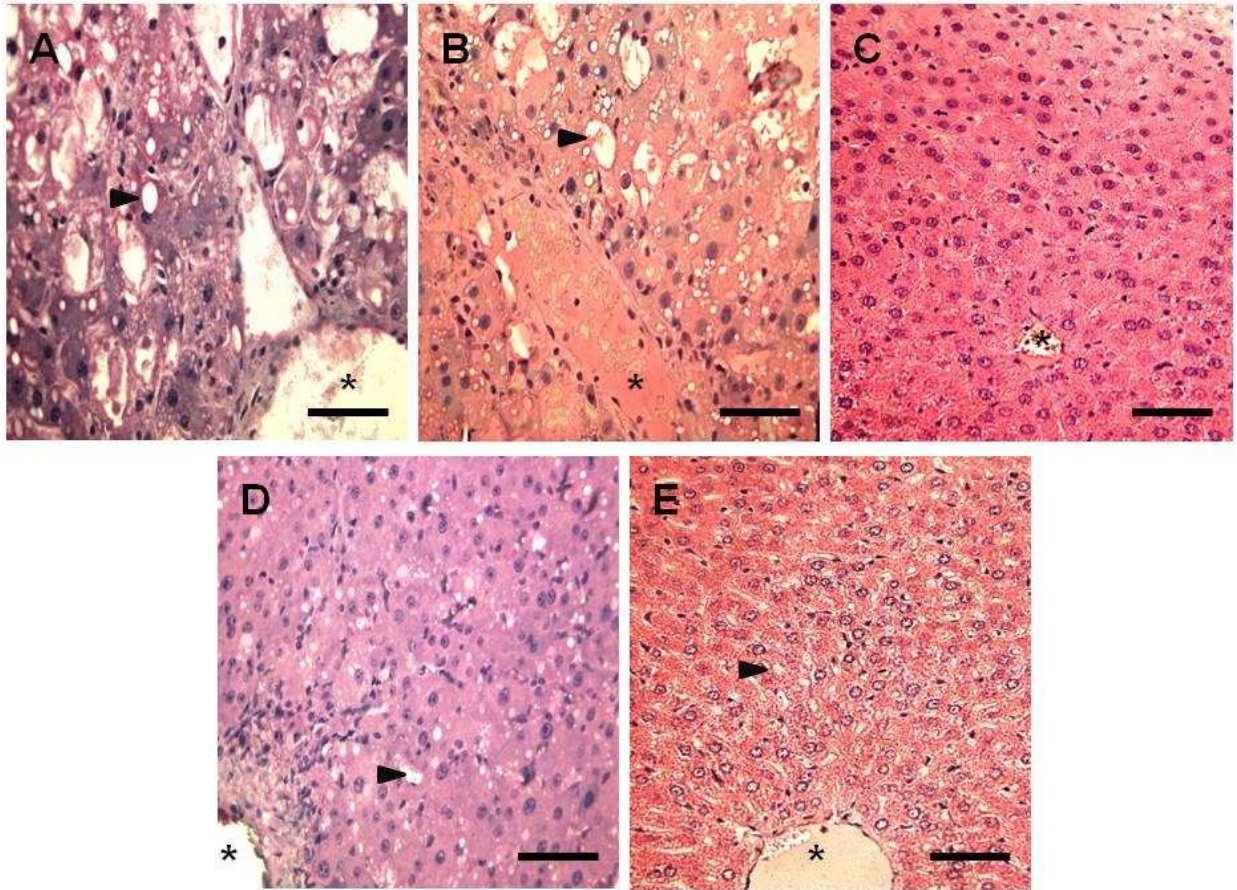


Figura 4. Efeito preventivo do EBC (200 and 400 mg/kg) e da exposição ao CCl₄ (60% v/v, 1 ml/kg) no tecido hepático de ratos Wistar. A=G1 (CCl₄); B=G2 (DMSO+CCl₄); C=G3 (EBC); D=G4 (EBC200mg/kg +CCl₄); E=G5 (EBC400mg/kg+CCl₄). Ponta de seta= Gotículas lipídicas; Asterisco (*)= Veia Centrolobular. Hematoxilina-Eosina (HE). Barra: 65µ

3.5. Determinação das atividades de SOD E CAT no tecido hepático.

A atividade de SOD no tecido hepático está mostrada na figura 5. Os resultados mostram redução significativa nos níveis de atividade de SOD no grupo G1 quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$), o que demonstra os efeitos negativos de CCl_4 sobre a ação desta enzima. O grupo G3 apresentou atividade significativamente maior de SOD quando comparado aos outros grupos ($p \leq 0,05$). Em adição, o grupo G2 não se diferenciou de G4 e G5, enquanto G4 apresentou atividade de SOD estatisticamente inferior ao encontrado no grupo G5 ($p \leq 0,05$). Em relação à atividade de CAT, os grupos G1 e G2 apresentaram redução quando comparados aos outros grupos ($p \leq 0,05$) exceto ao G3. Os grupos G3, G4 e G5 não apresentaram diferença estatística entre si. Nas figuras 5 e 6 observa-se um aumento gradativo na atividade das enzimas de acordo com o aumento na dose de *B. cuspidata*, sendo este aumento mais acentuado em relação à SOD.

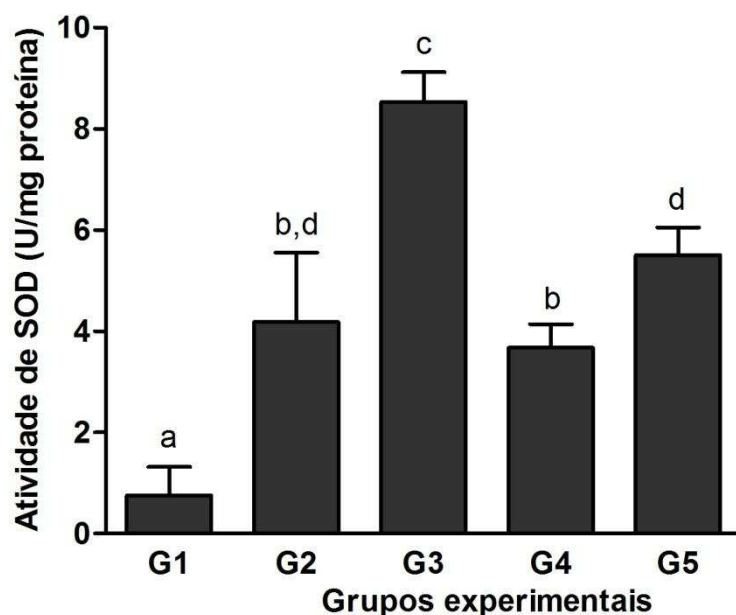


Figura 5. Efeito preventivo do EBC (200 and 400 mg/kg) sobre os níveis hepáticos de superóxido dismutase - SOD (U/mg protein) em ratos Wistar expostos ao CCl_4 . G1= CCl_4 ; G2= DMSO+ CCl_4 ; G3= EBC (400mg/kg); G4= EBC200mg/kg + CCl_4 ; G5= EBC400mg/kg + CCl_4 . Dados são expressos em média \pm S.D. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p \leq 0,05$), teste Tukey.

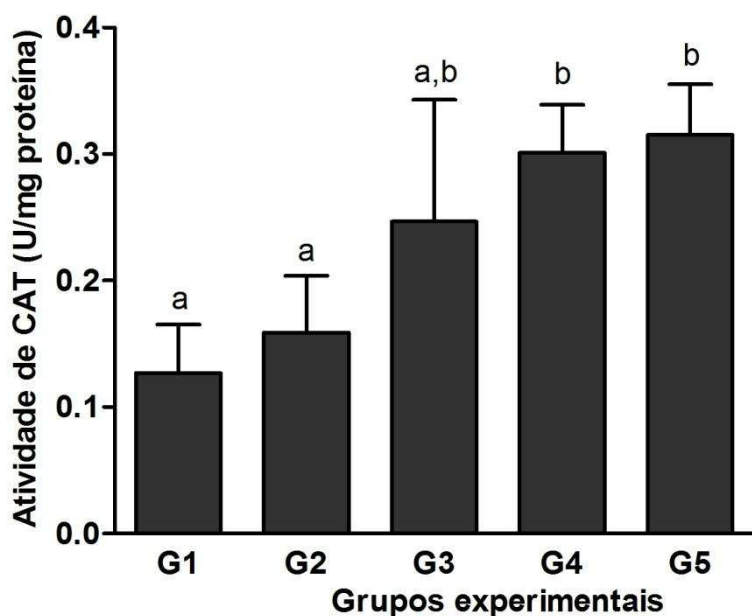


Figura 6. Efeito preventivo do EBC (200 and 400 mg/kg) sobre os níveis hepáticos de catalase - CAT (U/mg) em ratos Wistar exposto ao CCl_4 . G1= CCl_4 ; G2= DMSO+ CCl_4 ; G3= EBC (400mg/kg); G4= EBC200mg/kg + CCl_4 ; G5= EBC400mg/kg + CCl_4 . Dados são expressos em média \pm S.D. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$), teste Tukey.

4. Discussão

Além de sua ação hepática, a intoxicação por CCl_4 apresenta modificações sistêmicas, e alterações nos sinais clínicos, letargia, anorexia e perda de peso são manifestações comuns de intoxicação (Ha et al., 2005; Faremi et al., 2008). No presente estudo, foi observada perda de peso em todos os animais ao final do experimento quando comparados ao início do mesmo, sendo que a maior perda foi encontrada no grupo G1, que recebeu apenas o CCl_4 . Esses achados indicam que a disfunção metabólica determinada pelo CCl_4 apresenta importante influência sobre o peso corporal (Xiao-Yan et al., 2010) e que, quando foi administrado preventivamente a ação do EBC não foi suficiente para manter o peso dos animais.

As células hepáticas apresentam elevada concentração de enzimas como AST, FA e GGT. Um aumento na concentração destas enzimas no soro indica perda da função celular e da integridade da membrana (Drotman & Lowhorn, 1978). O índice hepatoprotetor de uma droga pode ser avaliado por sua capacidade de reduzir efeitos lesivos ou preservar os mecanismos fisiológicos hepáticos normais, e as análises de AST, FA e GGT são utilizadas como mecanismos indiretos para avaliar a condição hepática (Kumar et al., 2009). Neste trabalho G1 e G2 apresentaram os maiores valores de AST no soro e o grupo G4 que recebeu o pré-tratamento com a *B. cuspidata* apresentou uma menor atividade desta enzima, valores que se aproximaram dos encontrados em G3. Já a quantificação de FA mostrou grandes variações principalmente nos animais dos grupos G4 e G5. Esta grande variação dos valores das enzimas no soro pode ser justificada pela baixa especificidade destes biomarcadores (Ozer et al., 2008; Amacher., 2002), como exemplo, o aumento de FA no soro pode indicar lesão em outras regiões como intestinos, ossos e rins (Raimaiah, 2007). A bilirrubina total que funciona como um bom marcador de lesão hepatobiliar aguda, principalmente quando associada à ALT (Dufour et al., 2001), não apresentou diferenças em relação aos diferentes grupos, assim como GGT.

A peroxidação lipídica é um evento comum quando ocorre lesão hepática. Embora também ocorra em condições fisiológicas normais, fatores externos podem amplificar este processo levando à degradação de lipídios da membrana causando danos e levando à morte celular. A SOD e a CAT possuem papel protetor importante contra os efeitos tóxicos de muito xenobióticos (Khatri et al., 2009). Durante lesão hepática os níveis de SOD e CAT são baixos e os níveis de hidroperóxidos estão elevados. Isto reflete o nível de estresse causado pela liberação de radicais livres in vivo (Raja et al., 2007), uma vez que os hidroperóxidos são um dos principais subprodutos provenientes da decomposição de ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática (Parola et al., 1999) e as enzimas têm um papel importante nos mecanismos de defesa da célula contra espécies reativas de oxigênio (Kosover & Kosover, 1976). No presente trabalho os animais do grupo que receberam somente CCl₄ apresentaram quantidade significativamente superior de hidroperóxidos quando comparado a todos os outros e os grupos que receberam o extrato apresentaram uma

concentração sérica significativamente menor. Em relação à SOD, G1 apresentou os menores valores e os grupos tratados com o extrato G4 e G5 mostraram atividade aumentada desta enzima. Este é um fato importante já que a elevação na produção de radicais livres aumenta o consumo de SOD, o que leva a um declínio nos seus níveis teciduais (Zhang et al., 2005; Raja et al., 2007). Neste trabalho, os valores de CAT mostraram-se mais baixos em G1 e G2 e os grupos que foram tratados com extrato da *B. cuspidata* mostraram valores elevados desta enzima quando comparados à G1. O aumento de SOD e CAT pode estar relacionado à quantidade de extrato recebida, já que o grupo que recebeu 400mg/kg de extrato apresentou valores mais elevados para ambas as enzimas.

Estudos histopatológicos são pontos diretos para avaliar o efeito hepatoprotetor de uma droga. A degeneração lipídica é uma alteração morfofisiológica dos hepatócitos que ocorre em consequência de diversas desordens metabólicas (Ilyas & Iglesia, 1978; Hwang et al., 2009). Os dados encontrados mostraram que a *B. cuspidata* efetivamente preveniu as lesões e os acúmulos de gordura causados pelo CCl₄ no fígado dos animais. Levando em consideração a quantidade de gotículas lipídicas, os grupos G4 e G5 que receberam o extrato preventivamente, apresentaram redução significativa quando comparados à G1 e G2, que não receberam EBC. Além do acúmulo de lipídios, o CCl₄ promove também produção do radical peroxi triclorometil que se liga covalentemente às macromoléculas e causa a degradação da membrana celular levando à necrose hepática (Brattin et al., 1985; Guicciardi e Gores, 2005; Chien-Chen et al., 2009). Neste estudo, necrose de hepatócitos foi evidente nos grupos tratados com CCl₄ que não receberam o pré-tratamento com *B. cuspidata*, o que demonstra o poder protetor do extrato nas ações de radicais livres. Desta forma o extrato da *B. cuspidata* impediu os mecanismos citados acima e protegeu as células de possíveis danos que seriam causados pelo CCl₄. Os resultados dos estudos histopatológicos suportam e também correlacionam os dados obtidos na avaliação dos parâmetros bioquímicos. Os efeitos observados podem ser atribuídos à presença de compostos fenólicos e, ou, alcalóides evidenciados pela prospecção fitoquímica preliminar.

5. Conclusões

O extrato da casca da *B. cuspidata* foi efetivo na manutenção dos níveis séricos de AST e GGT. O efeito protetor da *B. cuspidata* em lesões hepáticas, também pode ser atribuído à redução da peroxidação lipídica e à melhora do sistema de defesa dos hepatócitos, através da elevação nos níveis de SOD e CAT, contra espécies reativas de oxigênio. A análise histopatológica também confirmou o efeito protetor do extrato de *B. cuspidata* impedindo o acúmulo lipídico e necrose hepática. Desta forma, os resultados sugerem efeito hepatoprotetor das cascas de *B. cuspidata*, confirmando o seu uso na medicina tradicional para o tratamento de desordens do fígado.

6. Agradecimentos

Agradecemos à FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa e a CAPES pela concessão da bolsa de estudo a Reggiani Vilela Gonçalves.

7. Referências

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 105, 121-126
- Albuquerque U.P., 2005. Introdução à etnobotânica. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência.
- Amacher, D.E., 2002. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Human Experimental Toxicology* 21, 253-262.
- Azevedo, M.H.F., Paula T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Costa, E.P., Costa, D. S., Peixoto, J.V., 2010. Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). *Animal Reproduction Science* 118, 83-88.
- Bedda, S., Laurent, A., Conti, F., Chereau, C., Tran, A., Tran- Van, N.J., Jaffray, P., Soubrane, O., Goulvestre, C., Calmus, Y., Weill, B., Batteux, F., 2003. Mangafodipir prevents liver injury induced by acetaminophen in the mouse. *Journal of Hepatology* 39, 765-772.
- Bissel, D.M., Gores, G.J., Laskin, D.L., Hoorhagle, J.H., 2001. Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems. *Hepatology* 33, 1009-1013.

- Boll, M., Weber, L.W., Becker, E., Stampfil, A., 2001. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Journal of Biosciences* 56, 649-59.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemical* 72, 248-254
- Brattin, W.J., Glende Jr, E.A., Recknagel, R.O., 1985. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 1, 27-38.
- Bruckner, J.V., Luthra, R., Kyle, G.M. 1984. Influence of time of exposure to carbon tetrachloride on toxic liver injury. *Annual Review Chronopharmacology* 1, 373-376.
- Correa, M. P., 1984. In: Correa, M.P (Eds), *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF, pp.1- 747.
- Drotman, R.B., Lawhorn, G.T., 1978. Serum enzymes as indicators of Chemical induced liver damage. *Drug and Chemical Toxicology* 1, 163-171.
- Dufour, D.R., Lott, J.A., Nolte, F.S., Gretch, D.R., Koff, R.S., Seeff, L.B., 2001. Diagnosis and monitoring of hepatic injury II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clinical Chemical* 47, 1133-1135.
- Elbling, L., Weiss, R.M., Teufelhofer, O., Uhi M., Knasmueller, S., Schulte-Hermann, R., Berger, W., Mickshe, M., 2005. Green tea extract and (-) epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *Faseb Journal* 19, 248-437.
- Faremi, T.Y., Suru, S.M., Fafunso, M.A., Obioha U.E., 2008. Hepatoprotective potentials of *Phyllanthus amarus* against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology* 8, 2658-2664.
- Germano-Filho, P. Estudos taxonômicos do gênero *Bathysa* C. Presl. (Rubiaceae, Rondeletieae), no Brasil. 1999. *Rodriguesia* 50, 49-75.
- Guerra, P.M., Nodari, O.R., 2001. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões M.O., et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 15.

- Ha, K.T., Yoona, S.J., Choia, D.Y., Kimb, D.W., Kima, J.K., Kim, C.K., 2005. Protective effect of *Lycium chinense* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 529-535.
- Hwang, Y.P., Choi, J.H., Jeong, H.G., 2009. Protective effect of the *Aralia continentalis* root extract against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 47, 75-81.
- Ilyas, M.S., Iglesia, F.A.G., 1978. The effect of phenobarbital and carbon tetrachloride on fatty acid content and composition of phospholipids from the endoplasmic reticulum of rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 45, 69-77.
- Khatri, M., Gargb, A., Agrawal, S.S., 2009 Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea L.* and stem bark of *Tecomella undulate*. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 1-5.
- Kosover, E.M., Kosover, N.S., 1976. Glutathione metabolism and function. Raven Press, New York, p.139.
- Kumar, S.S., Kumar, B.R., Mohan, G.K., 2009. Hepatoprotective effect of *Trichosanthes cucumerina Var cucumerina L.* on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 347-350.
- Lee, W.M., 2003. Drug-induced hepatotoxicity. *New England Journal of Medicine* 349, 474-481.
- Leite, J.P.V., 2008 Desenvolvimento da fitoterapia. In: *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu. Capítulo 1, p. 3-20.
- Marina, N., 2006. Hepatotoxicity antiretrovirals: Incidence, mechanisms and management. *Journal of Hepatology* 44, 132-139.
- Melo, J.G, Martins, J.D.G.R., Amorin, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2007. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: Castanha-da-Índia (*Aesculus hippocastanum L.*), capim-limão (*Cymbopogon citratus (DC) Stapf* e centela (*Centella asiática (L) Urban*). *Acta Botânica Brasílica* 21, 27-36.
- Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., Wolf, S.P., 1994. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation xylene orange assay in conjunction with thiophenylphosphine. *Analytical Biochemistry* 220, 403-409.

- Nunes, L.G., 2008. 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. (Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa).
- Okuyama, H., Nakamura, H., Shimahara, Y., Araya, S., Kawada, N., Yamaoka, Y., Yodoi, J., 2003. Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamine on lipopolisaccharid in mice. *Hepatology* 37, 1015-1025.
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S., 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245, 194-205.
- Parola, M., Bellomo, G., Robino, G., Barrera, G., Dianzani, M.U., 1999. 4-Hydroxynonental as a biological signal: Molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxidants and Redox Signaling* 1, 255-284.
- Raimaiah, S.K., 2007. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1551-1557.
- Raja, S., Nazeer Ahamed, K.F.H., Kumar, V., Kakali Mukherjee, A. Bandyopadhyay, P.K.M., 2007. Antioxidant effect of *Cytisus* against tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 41-47.
- Ranawat, L., Bhatt, J., Patel, J., 2010. Hepatoprotective activity of ethanolic extracts of bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl₄ induced hepatic damage in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 127, 777-780.
- Recknagel, R.O., Glende, E.A., Dolak, J.A., Walker, R.L., 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacology Therapy* 43, 139-154.
- Sabir, S. M., Rocha, J.B.T., 2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of aqueous extract of *Solanum fastigiatum* (false "jurubeba") against paracetamol-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 226-232.
- Sreelatha, S., Padma, P.R., Umadevi, M., 2009. Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 47, 702-708.
- Vanderlie, F.A., Filho, P.G., Alegre, L.V., Rocha, F.F., Lorenzo, M.A. de, Costa e Souza R.H. da Silveira J.W de S. da, Junior A.M., Matos, L.G de Costa E.A., 2001. Antiinflammatory mechanism related to the antinociceptive activity of the ethanolic extract of the dichloromethano fraction from leaves of *Bathysa*

- cuspidata* (Saint-Hilaire) Hooker. Revista de Ciências Biológicas e Saúde 2, 14-18.
- Vilela, L.M., Delcarlo, R.J., Matta, S.L.P., Siva, J.C.P., Rodrigues, M.C.D., Monteiro, B.S., Martines, M.M., Reis, A.M.S., Machado, D.P.D., Lopes, R.L., Rodrigues, M.C.D., Monteiro, B.S., Martines, M.M., Reis, A.M.S., et al., 2010. Estrutura e celularidade de meniscos frescos de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e preservados em glicerina. Pesquisa Veterinária Brasileira 30, 295-300.
- Wagner, H., Bladts, S., 1996. In: Wagner, H; Bladts, S (Eds). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer, pp. 62-73.
- Wang, T., Sun, N.L., Zhang, W.D., Li, H.L., Lu, G.C., Yuan, B.J., Jiang, H., She, J.H., Zhang, C., 2008. Protective effects of dehydrocavidine on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. Journal of Ethnopharmacology 117, 300-308.
- Xiao-Yan Jia, Qing-An Zhang, Zhi-Qi Zhang, Yan Wang, Jiang-Feng Yuan, Hong-Yuan Wang, Di Zhao. 2010. Hepatoprotective effects of almond oil against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. Food Chem. PII: S0308-146(10)01159-3. DOI: [10.1016/j.foodchem.2010.09.062](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.062)
- Zhang, D., Wu, J., Zhang, S., Huang, J., 2005. Oleanane triterpenes from *Aegiceras corniculatum*. Fitoterapy 76, 131-133.

8. Conclusões Gerais

A administração intraperitoneal (i.p) de CCl₄ (1ml/kg, 60% em azeite de oliva, v/v) a cada 48 horas durante 12 dias, mostrou-se extremamente eficaz na produção de lesões no fígado dos animais. Este fato pode ser comprovado pelos elevados níveis de enzimas no soro, assim como na quantidade de hidroperóxidos e malondialdeído. Adicionalmente, os baixos níveis de enzimas como CAT e SOD e a presença de intensas áreas de degeneração lipídica e necrose através do estudo histopatológico, confirmam que a dose utilizada promoveu alteração severa no órgão sem levar a morte do animal.

Por outro lado a partir de todas as análises citadas acima pode-se observar os efeitos benéficos do extrato de *B. cuspidata* em lesões induzidas pelo CCl₄. Os efeitos do extrato foram observados no tratamento e também na prevenção de lesões. No entanto, os melhores resultados foram encontrados nos animais que receberam o extrato após a lesão já ter sido causada, ou seja, o efeito curativo foi maior do que o efeito preventivo do extrato de *B. cuspidata*.

Os resultados não foram dose-dependentes, dentro das doses testadas, pois apenas em algumas situações uma dosagem promoveu diferenças significativas quando comparada a outra. Este fato pode ser observado tanto nos grupos que foram testados os efeitos curativos quanto nos grupos onde foram testados os efeitos preventivos.

Nossos achados reforçam o grande potencial do conhecimento popular para a realização de pesquisas de bioprospecção farmacêutica, além de mostrar a grande biodiversidade da região da zona da Mata Mineira. Diante disto pode-se concluir que o uso da *Bathysa cuspidata* (A. St. Hil.) Hook. f. é eficaz na prevenção e no tratamento de lesões hepáticas.

9. Perspectivas

É necessário que sejam realizados outros estudos, utilizando novas técnicas, com o objetivo de confrontar e comparar os resultados encontrados no presente trabalho, pois a *B.cuspidata* tem sido muito utilizada pela população do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro com objetivos terapêuticos. Além do seu efeito sobre o fígado é importante analisar também os efeitos desta planta sobre outros locais como pele e estômago, já que patologias relacionadas a estes órgãos foram as mais citadas pelo levantamento etnofarmacológico feito na região.

São necessários mais estudos com objetivo de se obter as doses mais indicadas para as diferentes alterações no fígado e a partir daí estabelecer as doses mais indicadas para tratar diferentes alterações em outros órgãos do corpo.

Além disto, faz-se necessário a criação e manutenção de programas de conscientização junto à população para a utilização de fitoterápicos, já que a grande maioria ainda não foi testada quanto à toxicidade e conseqüentemente seus efeitos no organismo ainda são desconhecidos.